

Tiskový výstup

SKRIPTA KE CVIČENÍ

Z OBECNÉ MIKROBIOLOGIE, CYTOLOGIE A MORFOLOGIE BAKTERIÍ

Mgr. Jana Kopecká, Ph.D.

Mgr. Gabriela Rotková, Ph.D.



MASARYKOVA UNIVERZITA
ELPORTÁL

Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity

Ústav experimentální biologie

Vytvořeno ve spolupráci se Servisním střediskem pro e-learning na MU, <http://is.muni.cz/stech/>.

Tiskový výstup publikace vydané na Elportále MU (<http://elportal.cz/>)

<http://is.muni.cz/elportal/?id=111222>

© 2017 Masarykova univerzita

Obsah

Úvod	v
Zásady bezpečné práce v mikrobiologické laboratoři	vi
I Obecná mikrobiologie	1
1 Příprava živných médií, kultivace mikroorganismů, aseptická práce	2
2 Metody sterilní práce, očkování a uchovávání mikroorganismů	8
3 Mikroorganismy kolem nás	18
4 Úvod pro práci s mikroskopem	21
5 Makroskopické a mikroskopické pozorování mikroorganismů, Gramovo barvení	27
6 Bakteriofág	37
7 Bakteriofág – transdukce	42
8 Nepřímé stanovení počtu životaschopných bakterií plotnovou metodou	45
9 Přímé stanovení počtu buněk v Bürkerově komůrce, vitální test, kvasinky	50
10 AP-test (test acidifikační schopnosti)	54
11 Fyzikální a chemické prostředky kontroly růstu mikroorganismů	57
12 Vliv některých barviv a alkoholických nápojů na růst bakterií	64
13 Stanovení citlivosti mikroorganismů k antibiotikům, stanovení koncentrace antibiotik	69
14 Bakteriociny	77
15 Průkaz a izolace některých půdních mikroorganismů	80
16 Winogradského kolona	86
17 Pozorování bakteriálních endospor a jejich barvení, negativní barvení	89
18 Základní mikrobiologický rozbor vody	99
19 Úvod do identifikace bakterií, biochemické testy a standardizované identifikační systémy	107

II	Cytologie a morfologie bakterií	117
1	Gramovo barvení, negativní barvení, nativní preparát	118
2	Struktury buňky (barvení inkluzí a pouzder)	126
3	Pohyb buněk	131
4	Acidorezistentní barvení	136
5	Sklíčkové kultury	139
6	Fluorescence	144

Úvod

Bakterie, viry a kvasinky nepatří do stejné taxonomické rodinky.

Se všemi se seznámíme a možná se i něco přiučíme.

V praxi je nutné asepticky pracovat, abychom se mohli z hezkých výsledků radovat.

Při plotnové metodě by měly být výsledky ve shodě.

Míchat vzorek se vždy musí, každý si to prakticky zkusí.

Inhibiční zóny vznikají, když citlivé bakterie se s antibiotiky setkají.

Při vitálním barvení docházíme k zjištění, barvu nepřijme buňka živá, protože je její membrána funkční a celá.

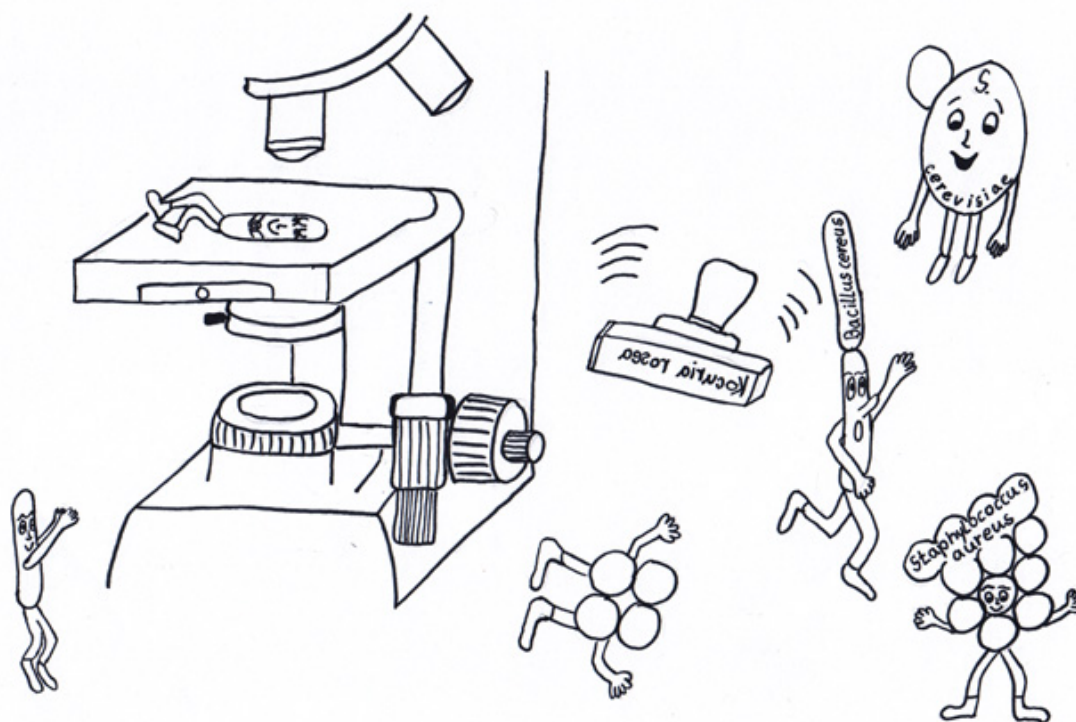
Pokud s fágů pracujeme, pak i bakterie potřebujeme, aby se fágů mohly pomnožit a fázový lyzát či plaky vytvořit.

Buď pozitivní modré či negativní červené, jsou buňky po „Gramovi“ zbarvené.

Při rozboru vody mají bakterie hody, kultivujeme je na selektivním médiu, a někdy vzorek médiem zaleju.

Jde nám o enterokoky a bakterie koliformní, ve vodě není vhodný jejich výskyt enormní.

Postupná identifikace a testy základní jsou pro správné určení vždycky to zásadní.



Zásady bezpečné práce v mikrobiologické laboratoři

1. Vstup do laboratoře je povolen pouze osobám vykonávajícím cvičení.
2. V laboratoři vykonávejte pouze práci stanovenou obsahem cvičení.
3. V laboratoři je zakázáno jíst, pít a kouřit.
4. V laboratoři je nutné používat laboratorní plášť a přezůvky.
5. V laboratoři je zakázáno otevírat okna. Větrání je zajištěno pomocí klimatizace.
6. Před příchodem do laboratorního cvičení se seznámte s jeho obsahem.
7. Před započatím a po ukončení práce je třeba dezinfikovat pracovní plochu, umýt si a dezinfikovat ruce.
8. Na pracovní plochu pokládejte co nejméně osobních věcí. Na pracovní ploše může snadno dojít k jejich kontaminaci. Oblečení, batohy a tašky odkládejte v šatně.
9. Pracujte pečlivě a opatrně. Zabráňte tím kontaminaci materiálu a náhodnému potřísnění pracovní plochy a sebe mikrobiálními kulturami.
10. Nedotýkejte se zbytečně rukama obličeje, nenanášejte v laboratoři kosmetiku, nemanipulujte s kontaktními čočkami.
11. Při barvení mikroorganismů používejte jednorázové ochranné rukavice, pokud je to možné, pracujte v digestoři. Ochranné rukavice není nutné používat při manipulaci s mikroorganismy, pokud se však budete cítit bezpečněji, použijte je.
12. Kahany nechávejte hořet pouze po dobu, kdy je užíváte.
13. Použité sklo a zbytky mikrobiálních kultur odkládejte na určená místa. V žádném případě nevylévejte kultury do odpadu! Veškerý kontaminovaný materiál je před likvidací a mytím nutno dezinfikovat nebo sterilizovat (týká se i rozbitého skla), případně vyhodit do koše na nebezpečný odpad (např. buničitá vata použitá k likvidaci rozlité kultury).
14. Dojde-li k náhodnému potřísnění pokožky mikrobiální kulturou či poranění pokožky, oznamte tuto skutečnost ihned vyučujícímu. Pokožku je nutno ošetřit vhodným dezinfekčním prostředkem (ajatin, Septoderm), aby nedošlo k infekci.
15. Stejně zásady jako v bodě 14 platí i v případě znečištění pracovní plochy nebo pracovního oděvu.
16. V případě jakékoli nejistoty se informujte o správném postupu u svého vyučujícího.
17. Označte všechna média a kultury ve zkumavkách, baňkách a Petriho miskách názvem média a kultury, svým jménem a pracovní skupinou. Misky popisujte na dno! K označení používejte popisovače na sklo.
18. Všechny pracovní postupy, obzvláště pak použité bakteriální kultury, množství pipetovaných roztoků a postupy při ředění si pečlivě zaznamenávejte.
19. Po ukončení práce odneste použité pomůcky na určené místo, uklid'te pracovní plochu a vydezinfikujte ji dezinfekčním roztokem.
20. Před odchodem ze cvičení si dobře umyjte ruce a vydezinfikujte dezinfekčním prostředkem. V případě, že potřebujete krátkou přestávku v průběhu cvičení, umyjte a vydezinfikujte si ruce před opuštěním laboratoře.

Část I

Obecná mikrobiologie

1 Příprava živných médií, kultivace mikroorganismů, aseptická práce



Cíl cvičení

Příprava a sterilizace živných médií (agar na Petriho miskách, šikmý agar a bujón). Seznámení se se zásadami aseptické práce v laboratoři.

Úvodní slovo

Zásady přípravy mikrobiologických pūd

Nutno pracovat se sterilním nádobím ve sterilním prostředí, co nejrychleji na úkor objemové přesnosti (tzv. aseptická práce). Ožehávat hrdla baněk i zkumavek. Při práci nemluvit. Nádoby s již sterilním médiem otevírat co nejméně.

Kultivace

Kultivace mikrobů je základním postupem sloužícím k jejich přímému průkazu. Charakter růstu bakterie je důležitým identifikačním znakem; nevýhodou je doba kultivace (např. *Mycobacterium tuberculosis* roste 9 týdnů, většina bakterií pouze 24–48 hodin). Mikroorganismy (bakterie, vláknité houby, kvasinky) se v mikrobiologických laboratořích kultivují na sterilních živných médiích, které splňují všechny požadavky na výživu a mají optimální pH, osmotické poměry a redoxpotenciál. Samozřejmostí je dostatek vody pro životní pochody a přítomnost živin: zdroje energie (organotrof – organická látka; fototrof – světlo; litotrof – anorganická látka), uhlíku (heterotrof – organická látka; autotrof – CO₂), dusíku (amonné ionty, dusičnanové ionty, aminokyseliny, bílkoviny nebo jejich částečné hydrolyzáty) a biogenních prvků (anorganické soli), přičemž hodnoty uvedených podmínek musí zůstat optimální po celou dobu kultivace.

Živná média

Dle složení lze média dělit do dvou základních skupin: média syntetická (definovaná) s přesně definovaným složením (ústočné roztoky, zdrojem uhlíku obvykle glukóza, zdrojem dusíku (NH₄)₂SO₄ nebo NH₄Cl, čisté aminokyseliny, vitamíny a růstové faktory) a média přirozená (komplexní), které mají ve svém základu živný bujón a nejsou chemicky definované. Jsou tvořeny složkami získanými po kyselé hydrolyze kaseinu, želatiny nebo po enzymatické hydrolyze masa (pepsin, trypsin, pankreatin).

Podle konzistence rozeznáváme média tekutá (mléko, masopeptonový bujón, cukrová média, sladina), polotekutá, ztužená a tuhá. Výhodou tekutých médií je snadný přístup vody a živin, mikroorganismy v nich snáze rostou. Nevýhodou je růst mikroorganismů projevující se zakalením, sedimentem nebo blankou (dle nároků na kyslík). V tekutém médiu nelze určit, zda se jedná o čistou kulturu nebo směs více druhů, rodů.

Pro přípravu ztužených pūd se k bujónovému základu přidává většinou agar (směs polysacharidů z mořských řas, není využíván jako zdroj živin), méně pak želatina (nižší teplota tání, okolo 35 °C) či křemičité gely. Výhodou kultivace na pevném médiu na Petriho misce je možnost pozorování izolovaných kolonií (klonů jedné buňky), tedy izolovaných kmenů. Kolonie bakteriálního druhu je taxonomicky významný makroskopický znak.

Média univerzální svým složením vyhovují požadavkům na výživu širokého spektra organizmů (např. masopeptonový bujon, sladinový agar). Média selektivní svým složením zvýhodňují růst jednoho druhu nebo cílové skupiny organizmů, růst ostatních druhů je inhibován (např. Ashbyho agar – bezduškaté médium, rostou na něm jen organizmy schopné fixace vzdušného dusíku). Selektivní média obsahují inhibiční složku nebo naopak některá základní složka chybí, což zvýhodňuje a cíleně izoluje prokazované rody a druhy. Média selektivně diagnostická svým složením potlačují růst většiny mikroorganismů a umožňují růst jen velmi malé skupině. Charakteristický růst se projeví změnou barvy média či kolonií vlivem biochemické reakce mikroorganismu (např. Endova půda).

Příklady kultivačních půd

Masopeptonový agar (MPA)

obsahuje výtazek z masa, pepton, sůl a agar, bývá základem pro další média.

Krevní agar (KA)

připravuje se přidáním 5–10 % defibrinované zvířecí krve k vhodnému základu (např. MPA), nejvíce používaná půda, roste na ní většina bakterií, na KA lze odečítat hemolýzu, pokud bakterie tvoří hemolýziny – vznik úplného projasnění, u neúplné hemolýzy není projasnění úplné.

Endova půda (Endoagar, EA)

selektivně diagnostická půda pro střevní bakterie (čeled' Enterobacteriaceae), obsahuje laktózu. Indikátorem jejího kvašení je bazický fuchsin odbarvený siřičitanem sodným. Je-li laktóza kvašena, mění se barva světle fialovočervená do temné fialové vlivem změny pH. Bakterie, které kvasí laktózu, mají tmavě fialově zabarvené kolonie. Bakterie, které laktózu nezkvašují, mají kolonie růžové.

XLD agar

půda pro záchyt patogenních střevních bakterií (Salmonella), obsahuje laktózu. Laktózu kvasící bakterie jsou žluté. Lze rozpoznat tvorbu H₂S – černý střed kolonií.

Sabouraudova půda

pro záchyt kvasinek a plísní, obsahuje glukózu nebo maltózu, pH 5,0.

Fortnerova půda

pro záchyt anaerobů (obsahuje redukující substance).

Löwenstein-Jensenova půda

pevná půda pro záchyt mykobakterií, obsahuje vaječnou emulzi, glycerin, škrob, malachitovou zeleň.

Slanetz-Bartley agar (SB)

selektivně diagnostická půda pro bakterie rodu Enterococcus, chudá na živiny (enterokoky jsou nenáročné oproti jiným bakteriím), kolonie enterokoků mají v masivním nárůstu fialovohnědou barvu.

Wilson-Blairova půda

selektivní půda pro salmonely (černě kovově lesklé kolonie s černým okolím).

Claubergova půda

diagnostická půda pro *Corynebacterium diphtheriae* (černé kolonie s kovovým leskem).

Čokoládový agar

obsahuje krev přidávanou do horkého základu pro krevní agar (80 °C), slouží ke kultivaci náročných mikrobů.

Mueller-Hinton agar

využívá se pro testování citlivosti a rezistence k antibiotikům a pro primární izolaci neisserií.

Uchování médií

Až na výjimky se média uchovávají v lednici tak, aby nevysychaly – dnem vzhůru a zabalené a to po stanovenou dobu expirace. Čerstvá média nesmí mít před očkováním bakterií mokry povrch – před začátkem práce se dávají na několik hodin sušit.

Dezinfekce, sterilizace, dekontaminace

Odstranění mikroorganismů z prostředí (dekontaminace) může být zabezpečeno různými způsoby a tomu odpovídá též dosažený efekt. Prostý úklid, mytí, praní a žehlení snižuje výskyt mikroorganismů až o 90 %. Tím se zvyšuje účinnost následně prováděné dezinfekce nebo sterilizace.

Dezinfekce

s použitím chemických látek nebo fyzikální je definována jako ničení či zneškodňování vegetativních buněk patogenních mikroorganismů na neživých předmětech, ve vnějším prostředí (ve vodě, ve vzduchu apod.) a v infekčním materiálu. Cílem dezinfekce je učinit předměty (zevní prostředí) neinfekční. Účinnost dezinfekce je závislá na rezistenci mikroorganismů vůči těmto prostředkům, které by měly mít baktericidní účinek na většinu patogenních mikroorganismů.

Antiseptik

je zneškodňování patogenních zárodků v prostředí živých tkání, v ranách, na sliznicích a na kůži s použitím antiseptik. Je namířena hlavně proti mikrobům vyvolávajícím hnisání. U antiseptik není striktní požadavek na baktericidní účinek jako u dezinfekčních prostředků, stačí bakteriostatické působení. Antiseptika musí splňovat požadavek nejedovatosti a dobré snášenlivosti živými tkáněmi. Na rozdíl od dezinfekčních prostředků proto podléhají schválení jako každý jiný zdravotnický prostředek. U antiseptik není nutná dobrá rozpustnost ve vodě.

Asepsa

je souhrn opatření vedoucích ke stavu, kdy je v prostředí minimum mikroorganismů. Asepsa má zabránit přístupu mikroorganismů k živým tkáním při chirurgických operacích používáním sterilních nástrojů, obvazových látek, šicího materiálu, pryžových rukavic, přípravou operačního pole, dezinfekcí chirurgových rukou, používáním ústenek apod. Pojem asepsa zahrnuje také laboratorní a výrobní metody, u nichž je snaha zabránit mikrobiální kontaminaci např. u mikrobiologických laboratorních prací a při výrobě léků.

Sterilizace

je zničení všech živých mikroorganismů, včetně vysoce rezistentních bakteriálních endospor fyzikálními nebo chemickými postupy.

Sterilizace nasycenou vodní parou pod tlakem

(v autoklávu) se provádí nejčastěji za přetlaku 100 kPa při teplotě 120 °C po dobu 15–30 minut. Tento způsob sterilizace umožňuje zničit bezpečně všechny formy mikroorganismů. Autokláv je tlakový sterilizátor opatřený vodoznakem pro stav vody ve vyvíječi páry (pokud není přímo napojen na přívod páry z centrálního zdroje). Dále je vybaven pojistným ventilem, dvěma manometry (jeden k měření přetlaku páry ve vyvíječi, druhý v pracovním prostoru), odvzdušňovacím ventilem, vodní vývěvou a teploměrem. Dokonalé odvzdušnění pracovního prostoru na začátku sterilizace je předpokladem úspěšné sterilizace (směs páry se vzduchem při 120 °C a 30 minutové expozici nemá spolehlivý sterilizační efekt). V autoklávu lze sterilizovat různé roztoky, kovové laboratorní nástroje, pryžový materiál. Při sterilizaci bakteriologických půd je třeba dát pozor na možnost hydrolyzy disacharidů a poškození termolabilních látek.

Seznam přístrojů a mikroorganismů

- komerční masopeptonové médium (MPB – meat pepton broth)
- agar, destilovaná voda
- sterilní Petriho misky
- skleněné biologické zkumavky, Erlenmeyerovy baňky
- vatové zátky, odměrný válec, autokláv

Postup

- Práce probíhá ve dvojici. Popsat své zkumavky a misky zespodu.
- Do Erlenmeyerovy baňky navážit 2,6 g masopeptonového bujonu.
- Doplnit do 200 ml destilovanou vodou, důkladně rozmíchat a změřit pH (pH papírkem, případně upravit).
- Pipetovat po 5 ml do dvou zkumavek, uzavřít vatovou či kovovou zátkou. Takto jsou zkumavky s bujonem připravené ke sterilizaci.
- Ke zbytku roztoku média přidat 3,6 g agaru a promíchat. Médium zahřívát do rozvaření agaru (v autoklávu či mikrovlnné troubě), poté pipetovat opět do dvou zkumavek po 5 ml, uzavřít vatovou či kovovou zátkou. Zkumavky jsou připravené pro sterilizaci – šikmý agar.
- Zbytek média v baňce uzavřít vatovou zátkou a společně se zkumavkami umístit do autoklávu. Sterilizace probíhá 20 min při tlaku 0,15 MPa a teplotě 121 °C.
- Po sterilizaci v autoklávu je již médium sterilní, nutno dodržovat zásady aseptické práce (ožehávání hrdla baněk a zkumavek)!
- Sterilní médium z baňky rozlévat do předem připravených sterilních Petriho misek. Do misky nalít zhruba 20 ml média, to odpovídá 4–5 mm média na výšku v misce. Misky otevírat co nejméně, při práci nemluvit (obr. 1A). Po utužení misky obrátit dnem vzhůru.
- Zkumavky se sterilním agarem ještě za tekutého stavu uložit do šikmé polohy a nechat utuhnout (obr. 1B).
- Po několika dnech vyhodnotit, zda nedošlo ke kontaminaci.



Obr. 1: Příprava živných agarů (archiv auterek)



Zhodnocení cvičení

- Připravená média budou v příštím cvičení sloužit nejen k očkování, ale i k následnému makroskopickému pozorování kultur mikroorganismů. Byly dodrženy zásady aseptické práce?
- Došlo k nárůstu kontaminace?



Další informace k této problematice najdete v následující literatuře

- Votava M., *Kultivační půdy v lékařské mikrobiologii*. 2000, Nakladatelství Hortus, Brno, ISBN 80-238-5058-X.



Kontrolní otázky

1. Jak byla zajištěna sterilita práce?
2. Jakou výhodu má šikmý agar oproti agaru v Petriho misce?
3. Proč se charakter růstu kolonií hodnotí na Petriho misce a nikoli v bujonomu?
4. Jak se od sebe liší syntetická média a přirozená?
5. Jmenujte příklady a složení ztužovadel kultivačních půd v mikrobiologii.

6. Jaké pomůcky a postupy zaručují aseptickou práci ve cvičení?
7. Jakým způsobem je možné získat z bujony ztuženou kultivační půdu?
8. Jaká je funkce kultivačních médií?
9. Jaký je rozdíl mezi antisepsí a aseptickou prací?
10. Inaktivují se pasterizací bakteriální endospory?
11. Co je to sterilizace; uveďte několik příkladů.
12. Uveďte několik příkladů pro zajištění aseptické práce na laboratorním stole mikrobiologického praktika bez flowboxu.
13. Čím je možné obohatit kultivační půdu?
14. Co znamená pojem dezinfekce?
15. Co znamená pojem sterilizace?

Zajímavosti

- Robert Koch zavedl kultivaci na extraktu zhovězího masa zpevněném **želatinou**. Kultivací na pevné půdě tak mohl zjistit počet druhů bakterií (dle vzhledu kolonie) a počet buněk ve vzorku (= počet kolonií) a získat čistou kulturu.
- Walter Hesse na radu své manželky nahradil želatinu **agarem**.
- Petriho misky byly v mikrobiologii zavedeny Richardem Petrim v roce 1887.
- Masový výtazek je bohatý na růstové faktory, ale na živiny je poměrně chudý. Frederick Löffler (spoluobjevitel původce záškrtu) vylepšil masový extrakt přidávkem **peptonu** (produkt enzymatického natrávení masa, obsahuje peptidy i volné aminokyseliny) a **NaCl**, tím vznikl živný bujon.
- Komerční sušená kultivační média se používají od roku 1914.

2 Metody sterilní práce, očkování a uchovávání mikroorganismů



Cíl cvičení

Naučit se zásady aseptické práce a dodržovat je při práci s mikroorganismy. Zvládnutí techniky očkování mikroorganismů (tekutá i tuhá média). Izolace jednotlivých kolonií pomocí křížového roztěru.

Úvodní slovo

Jako **kultury** označujeme mikroorganismy kultivované v laboratorních podmínkách na živných médiích. Pracujeme-li s kulturou jednoho druhu, považujeme ji za **kulturu čistou**. **Kultury smíšené** jsou kultury několika druhů (např. izoláty z přirozeného prostředí, které je potřeba kultivací pro identifikaci oddělit = izolovat). Jako **kultury technické** se označují kultury používané pro výzkumné nebo provozní účely (v čistírnách odpadních vod, bakteriální filtry, bioreaktory). Technické kultury mohou být jak čisté (pivovarské kvasinky), tak smíšené (mléčné bakterie pro výrobu jogurtů).

Kultury přenášíme (= přeočkováváme) na čerstvé médium z tekutého nebo z tuhého média za různými účely: přenesení do čerstvějšího média, oživení, očkování na diagnostické médium, izolace kultury, očkování pro odečet fyziologických a morfologických vlastností kultury. Charakter růstu a podmínky následné kultivace jednotlivých kultur se v laboratoři (optimální podmínky – čistá kultura, dostatek živin) vždy odlišují od růstu dané kultury v přirozeném prostředí. Růst v přirozeném prostředí doprovází kompetence o živiny, adaptace a neustálý boj s antibiotiky a metabolity současně přítomných dalších kmenů. Navíc je třeba si uvědomit, že mnoho bakteriálních druhů je nekultivovatelných.

Izolace bakteriálního kmene

Pro získání čisté kultury jsou využívána selektivní média, na kterých vyrostou pouze žádané bakteriální taxony či skupiny taxonů (druh, rod). Pro izolaci kmene na Petriho misce na selektivním nebo na neselektivním (univerzálním) médiu využíváme **metodu křížového roztěru**. Podle vzhledu vyrostlých kolonií lze odlišit různé morfologické typy a ty následně izolovat dalším křížovým roztěrem (odebráním buněk z dané kolonie). **Křížový roztěr** je metoda postupného zředování původní kultury za účelem získání jednotlivých kolonií a odečtení jejich morfologie. Kolonie mikroorganismů je ve své podstatě klon jedné buňky. Bakteriologická klička s přenášenou kulturou se po každém kroku očkování žihá v plamenu, tím dojde k usmrcení buněk a při dalším tahu pak po agaru roztíráme pouze buňky setřené z následující oblasti křížového roztěru. Roztírá se stále menší množství buněk. V místě tzv. **hádku** (poslední oblast křížového roztěru) již vyrůstají jednotlivé kolonie, u kterých lze hodnotit charakteristický profil, vzhled, tvar, barvu, okraje.

Kultivace

Kultury v tekutém médiu můžeme kultivovat **kontinuálně** (např. větší objemy média s průmyslovými kmeny). Příkladem je **chemostat**, kdy je růstová rychlost kultury řízena koncentrací limitující živiny, která je přítokem nového média dodávána. Naočkovujeme-li médium, do kterého již nejsou dodávány živiny, jedná se o kultivaci **statickou**. Statická kultivace může být **submerzní (třepaná)** nebo **vzdušněná**. Těmito procesy se promícháváním zvětšuje plocha fázového rozhraní a může probíhat efektivnější výměna plynů (např. provzdušňovací rošty v bioreaktorech).

Vzhled kultury ovlivňuje použité médium, typ kultivace i stáří kultury. Stejný mikroorganismus může na různých typech agarů vykazovat různé morfologické vlastnosti (pigmentace, velikost kolonií, atd.).

Při práci s čistými kulturami, v našem případě z České sbírky mikroorganismů, (), dodržujeme podmínky kultivace dle katalogu kultur – doporučené médium definovaného složení, teplota a podmínky kultivace. Pokud izolujeme **kmeny z prostředí**, snažíme se dodržet podmínky, které jsou pro ně v daném prostředí přirozené (koncentrace solí, živin, teplota, pH).

Růstová křivka (obr. 2)

je grafické vyjádření závislosti počtu buněk na délce statické kultivace a skládá se z několika fází:

Lag fáze

probíhá přizpůsobování a růst samotné buňky, aktivace vhodných enzymů, organizace metabolismu. V činnosti jsou adaptivní enzymy, v buňce je přítomno mnoho RNA (zvýšená syntéza enzymů), řada ještě neadaptovaných buněk odumírá.

Fáze fyziologického mládí (zrychleného růstu)

bod mezi lag a log fází; všechny potřebné enzymy jsou připraveny a kultura vykazuje vysokou rychlost růstu.

Log fáze (logaritmická, exponenciální)

intenzivní růst buňky a metabolismus, trvá, dokud není koncentrace živin limitující, všechny buňky se dělí konstantní maximální rychlostí. Z této části křivky se využívají parametry pro srovnávání experimentů. Buňky lze dobře charakterizovat, charakter růstu se odečítá vždy v log fázi (suchá a mokrá hmotnost buněk, nárůst metabolitů, stanovení váhy DNA, RNA).

Fáze zpomaleného růstu

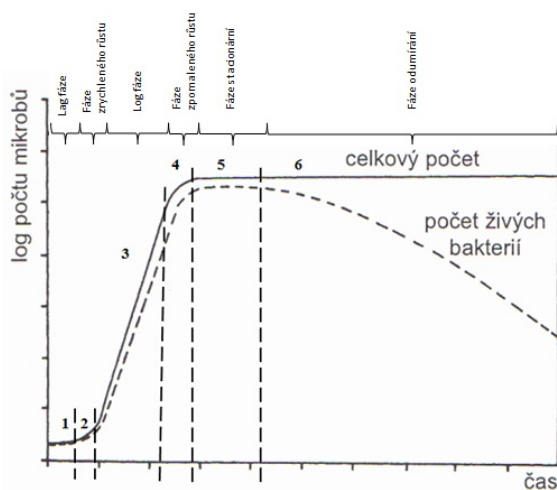
snížení intenzity metabolismu, hromadění metabolitů

Fáze stacionární

snížení rychlosti množení, počet nově vzniklých buněk se vyrovnává s počtem odumřelých, dochází k vyčerpání živin, délka života závisí na citlivosti k hladovění, mohou vznikat endospory

Fáze odumírání

médium je spotřebováno a buňka odbourává své zásobní látky, čelí kyselosti prostředí (ze svých zplodin), nestačí reparační systémy



Obr. 2: Růstová křivka. Plná čára – celkový počet mikroorganismů (mrtvých i živých); přerušovaná čára – počet živých mikroorganismů (Greenwood a kol., 1999, upraveno)

Diauxie je postupné využívání dvou substrátů. Nejdříve se využije jednoduchý zdroj, např. glukóza, a potom teprve složitější substrát, např. laktóza. Růstová křivka má v tom případě dva vrcholy.

Teplota

Podle optimální teploty kultivace rozlišujeme tři základní skupiny mikroorganismů: **psychrofilní** s optimem růstu pod 20 °C (oceány, jeskyně, chladnička – např. pseudomonády, aeromonády, listerie); **mezofilní** s optimem růstu mezi 20 až 40 °C (většina bakteriálních druhů; parazitické mikroorganismy); **termofilní** s optimem růstu nad 55 °C (extrémní termofilové rostou až kolem 100 °C).

Vztah ke kyslíku

Bakteriální druhy kultivované za přístupu vzduchu označujeme jako **aerobní**. Aerobní kultivace je zajištěna nátěrem a kultivací buněk na agaru na Petriho misce či ve zkumavce na agaru šikmém nebo v nízké vrstvě tekutého média (okolo 5 ml). Větší objemy tekutého média by již musely být syceny kyslíkem (aerace, submerzní kultivace). Některé střevní bakterie jsou příkladem **fa-kultativních anaerobů**, které jsou schopny růstu jak v aerobním, tak anaerobním prostředí. V prostředí s kyslíkem přepínají na energeticky výhodnější aerobní metabolismus. V tekutém médiu se projevují růstem v celém jeho sloupci (zákal média). **Anaerobní organizmy** se vyskytují v prostředí s nulovou či nízkou koncentrací kyslíku, kyslík působí jako jed či inhibitor růstu. Stav anaerobiózy jako první definoval Louis Pasteur, který zavedl do mikrobiologie termíny pro aerobní a anaerobní organizmy. V závislosti na stupni tolerance vůči molekulárnímu kyslíku, lze anaerobní mikroorganismy dělit na: **striktně (obligátně) anaerobní mikroorganismy** – vyžadují úplnou absenci kyslíku, koncentrace více než 0,5 % na ně působí toxicky a odumírají; **aer-rotolerantní mikroorganismy** – nevyužívají kyslík jako konečný akceptor elektronů, ale rostou v jeho nízkých koncentracích; **mikroaerofilní mikroorganismy** – vyžadují určité nízké procento kyslíku, využívají ho jako konečný akceptor elektronů, ale nerostou za přítomnosti 21 % vzdušného kyslíku za normálního tlaku.

Anaerobní nebo mikroaerofilní kultivace se provádí hlubokým vpichem do agaru nebo očkováním do vysoké vrstvy kapalného média. Je nutno snížit oxidoredukční potenciál přidáním redukcujících látek (kyselina askorbová, thioglykolát, thiosíran) do média. Pokud anaerobní prostředí pro kultivaci vytváříme, využíváme tzv. anaerostatu a směsi chemikálií (železný prášek, kyseliny vinná, citronová), která po ovlhčení uvolňuje vodík, který v přítomnosti katalyzátoru (Pt, Pd) reaguje s přítomným vzdušným kyslíkem za jeho vytěsnění a vzniku molekul vody.

Uchování mikroorganismů

Typ uchovávání volíme podle jeho zamýšlené délky:

- na Petriho misce při 4 °C, krátkodobě, nutno přeočkovávat (např. laktokoky po týdnu, bacily po 2–3 měsících)
- na šikmém agaru při 4 °C, v řádu týdnů; v místnosti či termostatu při 25 °C v řádu dnů
- ve zkumavce v agaru ve vpichu, po dobu několika měsíců
- na porózních materiálech – želatinových discích, kuličkách, dlouhodobě
- pod sterilním minerálním olejem (houby, bakterie)
- **lyofilizované** (lyofilizace = sublimace vody ve vakuu), méně šetrná než kryoprezervace, všechny mikroorganismy nelze lyofilizovat, např. houby; dochází ke snížení viability, lyofilizované kultury jsou připravené ihned k odeslání, snadná manipulace

- zmrazené na $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ (např. v kultivačním médiu s 15 % glycerolu) po malých objemech v **hlubokomrazicím boxu**, přežívání měsíce, roky
- boxy s pevným CO_2 , **suchý led ($-78\text{ }^{\circ}\text{C}$)**
- kryogenní hlubokomrazicí boxy ($-150\text{ }^{\circ}\text{C}$)
- **kryoprezervace** – zamražení kultur ve velmi nízkých teplotách, např. v tekutém dusíku (až $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) nebo v jiných plynech (He, Cr, H), uchovávání neomezeně dlouho. Nejvhodnější je postupné ochlazování (kontrolovaná rychlost zamražení: ideálně $1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$. pro snížení osmotické disbalance a proti nevhodnému formování krystalů vody v buňce (amorfní led); některé odolné bakterie snesou rychlejší nebo okamžité zamražení – dle rigidity buňky). Vhodné je použít kryoprotektanty v ochranném médiu – dimethylsulfoxid, glycerol.

Vlastnosti mikroorganismů ve cvičení

Escherichia coli

(čeleď *Enterobacteriaceae*): gramnegativní rovné tyčky vyskytující se jednotlivě nebo po dvou. Pohyblivé pomocí peritrichálních bičíků nebo nepohyblivé, mezofilní, fakultativně anaerobní. Běžný komezál tlustého střeva, pomáhá udržovat rovnováhu mikroflóry, působí proti patogenům střeva, syntetizuje vitaminy A, B, K. Pokud se dostane mimo střevo, může působit jako patogen. Fekálním znečištěním se dostává do vody, kde může přežít řadu týdnů – nejběžnější indikátor fekální kontaminace pitné vody. Slouží jako model genového inženýrství (sekvenace celého genomu), producent různých látek (např. inzulin).

Patogenní kmeny *E. coli* jsou charakterizovány a identifikovány sérologicky (somatické, kapsulární, bičíkové antigeny) i biochemicky: enterotoxigenní *E. coli* (ETEC) – cestovatelské průjemy, endemický výskyt v teplých oblastech; enteropatogenní *E. coli* (EPEC) – průjemy novorozenců, alterace epitelu střeva; enteroinvazivní *E. coli* (EIEC); enterohemoragická *E. coli* (EHEC) – způsobuje hemoragie (krvácení do orgánů trávicího traktu).

Serratia marcescens

(čeleď *Enterobacteriaceae*): gramnegativní rovné tyčky, fakultativně anaerobní, mezofilní, tvorba červeného pigmentu. Výskyt v půdě, vodě, na rostlinných površích, ale i oportunní patogen člověka – častý původce nozokomiálních infekcí močového a dýchacího traktu. Může být *součástí zubního povlaku (pigmentace zubu)*, je *původcem růžového povlaku ve vlhkém prostředí koupelen*.

Pseudomonas

(čeleď *Pseudomonadaceae*): gramnegativní rovné nebo nepatrně zakřivené tyčky, schopnost pohybu jedním nebo více polárními bičíky. Optimální kultivační teplota je $25\text{--}30\text{ }^{\circ}\text{C}$, aerobní. Tvorba fenazinových exopigmentů pyocyaninu a fluorescinu (pyoveridinu), které způsobují modrozelené a žluté až žlutozelené zbarvení kultury i kultivačního média. Výskyt v prostředí, ve zkažené potravě (vajínka, ryby, mléko), častá izolace z klinických vzorků. Významné lidské, zvířecí i rostlinné patogeny, původci nozokomiálních infekcí; faktorem virulence je tvorba biofilmu s vysokým stupněm rezistence na povrchu tkání nebo předmětů díky tvorbě polysacharidu alginátu (*P. aeruginosa* nebo *P. fluorescens*), který tvoří matrix biofilmu a chrání buňky vůči působení dezinfekčních látek, protilátek a antibiotik. Akumuluje poly- β -hydroxybutyrát. Díky širokému spektru metabolických drah se podílí na geochemických cyklech, biodegradacích a významně se uplatňuje při bioremediacích (např. degradace toluenu) nebo jako biokontrolní agens. *P. putida* – *bioremediace*; *P. fluorescens* – *produkce fluoresceinu*

Kocuria rosea

(čeleď *Micrococcaceae*): grampozitivní koky uspořádané po dvou, ve čtveřicích či shlucích. Aerobní, mezofilní, tvoří růžové a červené pigmenty. Výskyt v půdě, vodě, prachu, na kůži savců. Rod byl pojmenován na počest významného brněnského mikrobiologa doc. RNDr. Miloše Kocura, CSc.

Micrococcus luteus

(čeleď *Micrococcaceae*): grampozitivní koky uspořádané po dvou, ve čtveřicích či shlucích, aerobní. Výskyt na pokožce savců, v *potravinách*, půdě, vzduchu a vodě. *Produkce žlutého pigmentu*.

Staphylococcus aureus

(čeleď *Staphylococcaceae*): grampozitivní koky vyskytující se jednotlivě, po dvou nebo v nepravidelných shlucích. Kolonie mohou být bílé nebo nažloutlé. Výskyt na kůži a sliznicích teplokrevných obratlovců, v *potravinách* a v prostředí. Některé druhy jsou patogenní a produkují toxiny.

Bacillus

(čeleď *Bacillaceae*): grampozitivní rovné tyčky, často ve dvojici či v řetízcích, pohyblivé, aerobní či fakultativně anaerobní. Výskyt v půdě, vodě, *potravinách* (rýže). *Několik druhů rodu jsou patogeny člověka či hmyzu*. Produkce toxinů (*otravy z jídla, gastroenteritidy*). Tvoří oválné či kulaté endospory, které jsou v buňce uloženy terminálně, subterminálně, paracentrálně či centrálně a které se mohou využívat jako biopesticidy (*B. thuringiensis*). Tvar, velikost a uložení spory je charakteristický znak pro identifikaci.

- **B. cereus** – prostředí, způsobuje gastroenteritidy, alimentární intoxikace
- **B. subtilis** – prostředí, izolován při potravinových otravách
- **B. mycoides** – prostředí, rhizoidní růst
- **B. sphaericus** – půda i vodní sedimenty, potraviny
- **B. thuringiensis** – patogenní pro hmyz, produkce toxinů (parasporální tělísko)

Saccharomyces cerevisiae

patří mezi eukaryotní mikroorganismy. Mezofilní, fakultativně anaerobní kvasinka. Buňka vejcovitého tvaru je výrazně větší než buňky bakterií. Buněčná stěna neobsahuje peptidoglykan. Výskyt v prostředí a v průmyslových provozech. První osekvenovaný eukaryotický organizmus. Výroba *potravin* (pivo, víno, pečivo), produkce různých látek (např. inzulín, rekombinantní vakcína HBsAg), modelový organizmus.

Seznam přístrojů a mikroorganismů

Pomůcky a chemikálie

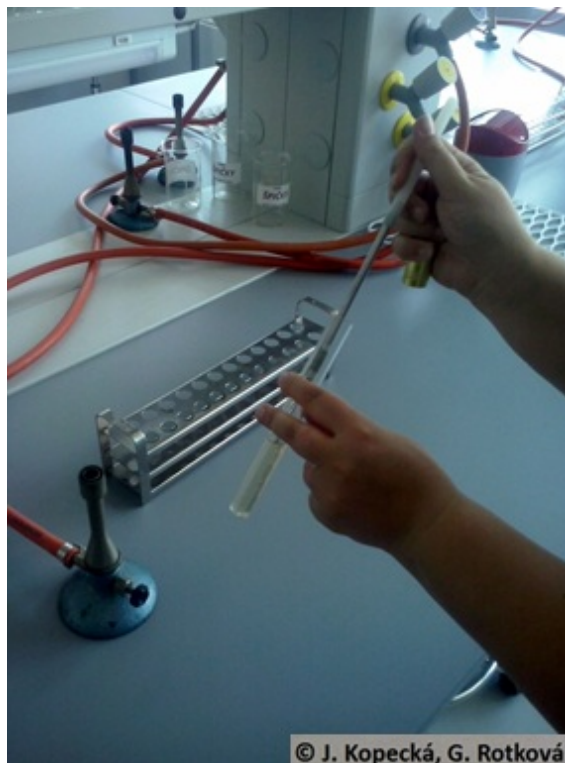
- Bakteriologické plotny s MPA (MEA v případě *S. cerevisiae*)
- Zkumavky se šikmým agarem MPA (MEA v případě *S. cerevisiae*)
- Zkumavky s tekutým médiem MPB (MEB v případě *S. cerevisiae*)
- Očkovací kličky, očkovací jehly, termostat, kahan

Mikroorganizmy

- *Escherichia coli* CCM 3954
- *Pseudomonas putida*,
- *P. fluorescens* CCM 2115T
- *Serratia marcescens* CCM 303
- *Kocuria rosea* CCM 839
- *Micrococcus luteus* CCM 169
- *Bacillus cereus* CCM 2010
- *Staphylococcus aureus* SA 812
- *Saccharomyces cerevisiae*

Postup

Do kultury ani média nesmí vniknout cizí mikroorganismy ze vzduchu, z pomůcek, vlastní mikroflóry, dodržujeme zásady **aseptické práce**. Pracujeme co nejrychleji v zavřené místnosti, omytými rukama a na dezinfikovaném stole, blízko plamene kahanu. Hrdla nádob i zátek před a po práci ožehneme plamenem. **Zátky nikdy nepokládáme**, ale držíme mezi malíčkem a prsteníčkem (obr. 3). Nádoby s kulturou necháváme otevřené jen po nezbytně dlouhou dobu a s hrdlem poblíž plamene.



Obr. 3: Aseptická práce při očkování mikroorganismů (archiv autorek)

Ve cvičení kultivujeme mikroorganismy **staticky, aerobní kultivací na agarech** (misky a šikmé agary) a v **tekutém médiu ve zkumavkách**. Kmeny jsou kultivovány na doporučených médiích v termostatu při optimální teplotě růstu dané kultury. Kultury na Petriho miskách kultivujeme vždy dnem vzhůru z důvodu udržení vlhkosti média a zabránění tvorby kondenzní vody na víčku, která by jinak skapávala na povrch média. Došlo by ke smíchání kultury na misce. Médium zároveň pomaleji vysychá.

Ve cvičení každý pracuje samostatně.

Všechny zkumavky i Petriho misky popsat permanentním popisovačem na sklo (druh, datum, označení skupiny, iniciály) vždy před začátkem očkovacích prací.

Každý student očkuje:

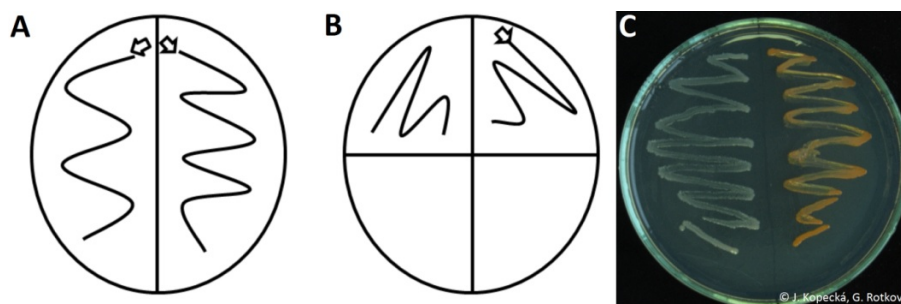
- 1 kmen do tekutého média
- 1 kmen na šikmý agar
- dva nebo čtyři různé kmeny na 1 misku do 2 nebo 4 „hádků“
- 1 až 3 kmeny na Petriho misku křížovým roztěrem
- směs dvou kmenů na Petriho misku křížovým roztěrem – cílem je izolace 2 typů kolonií (vhodné je naočkovat směs dvou různě pigmentovaných kmenů či grampozitivní a gramnegativní kulturu)

Očkování kultur na šikmý agar

- Vyžítat bakteriologickou kličkou a nechat vychladnout.
- Do levé ruky uchopit obě zkumavky se šikmým agarem, malíčkem pravé ruky vytáhnout zátku ze zkumavky s kulturou (obr. 3).
- Hrdlo zkumavky ožehnout
- Sterilní (ožehnutou a vychladlou) kličku vsunout do zkumavky s kulturou, nabrat nárůst do oka kličky. Kličku vytáhnout, ožehnout hrdlo zkumavky i zátku a zkumavku zazátkovat.
- Malíčkem pravé ruky vytáhnout zátku ze sterilní zkumavky s čistým šikmým agarem, ožehnout hrdlo zkumavky a kličkou naočkovat na šikmý agar tzv. hádka.
- Ožehnout hrdlo zkumavky i zátku, uzavřít zkumavku a vyžítat kličku.

Očkování kultur na Petriho misku do sektorů tzv. hádkem

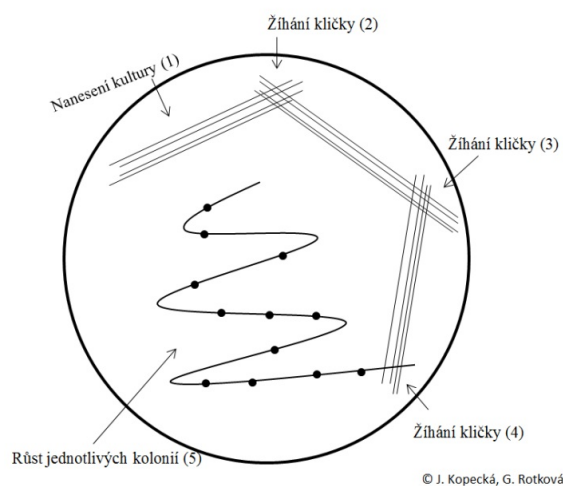
- Zespondu rozdělit misku popisovačem na sektory a označit.
- Ze zkumavky s kulturou odebrat nárůst na bakteriologickou kličku výše uvedeným postupem.
- Mírně odklopit víčko Petriho misky a nanést kulturu na příslušný sektor agaru tažením kličky, tzv. hádek (obr. 4).
- Přiklopit víčko a vyžítat kličku.



Obr. 4: Nákres očkování na Petriho misku tzv. hádkem (A, B) a praktická ukázka, *K. rosea* a *P. putida* (C) (archiv autorem)

Očkování kultur na Petriho misku – křížový roztěr (obr. 5)

- Ze zkumavky s kulturou odebrat nárůst na bakteriologickou kličku výše uvedeným postupem.
- Mírně odklopit víčko Petriho misky a nanést kulturu na agar tažením kličky po agaru v několika pruzích (1).
- Vyžít kličku, nechat vychladnout a několika tahy kličkou rozetřít kulturu v koncové části nanesené kultury (2).
- Vyžít kličku, nechat vychladnout a několika tahy kličkou rozetřít kulturu v koncové části nanesené kultury (3).
- Vyžít kličku, nechat vychladnout a plynulým tahem, tzv. hádkem, rozetřít naředěnou kulturu (4). V místě tzv. hádky by měly vyrůst jednotlivé kolonie (5)



Obr. 5: Křížový roztěr (archiv autorem)

Očkování do tekutého média

- Kulturu odebrat z tuhého média kličkou (z Petriho misek odebrat jednu kolonii).
- Zkumavku s tekutým médiem uchopit do levé ruky, malíkem pravé ruky vytáhnout zátku a ožehnout hrdlo zkumavky.

- Odebraný vzorek rozetřít po stěně zkumavky nad hladinou média a postupně buňky převádět do jeho objemu.
- Ožehnout hrdlo zkumavky i zátku, uzavřít a vyžítat kličku.

Očkování kultur z tekutého do tekutého média

- Uchopit sterilní pipetu do pravé ruky (skleněnou nebo automatickou), malíkem vytáhnout zátku z baňky/zkumavky, hrdlo ožehnout a pipetou odebrat požadovaný objem kultury. Ožehnout zátku a uzavřít baňku.
- Malíkem pravé ruky vytáhnout zátku z baňky/zkumavky se sterilním tekutým médiem a ožehnout hrdlo.
- Vypustit kulturu z pipety do sterilního média, ožehnout zátku i hrdlo, baňku/zkumavku uzavřít a mírně protřepat.

Očkování z tekutého média na Petriho misku

- Uchopit sterilní pipetu do pravé ruky (skleněnou nebo automatickou), malíkem vytáhnout zátku z baňky nebo zkumavky, hrdlo ožehnout a pipetou odebrat požadovaný objem kultury (obvykle 100 μ l). Ožehnout zátku a uzavřít baňku.
- Daný objem vypustit do středu Petriho misky s agarem.
- Sterilní hokejkou (též L kličkou) kulturu rozetřít po povrchu misky, ihned přiklopit víčko misky a chvíli nechat kulturu vsáknout do agaru.

Kultivace

- Kultivace probíhá při 30 či 37 °C po dobu 24–48 hodin.



Zhodnocení cvičení

- Prokázala se sterilita práce při přípravě médií v minulém cvičení?
- Do jakých typů médií a jakým způsobem byly kmeny očkovány?
- Co je účelem křížového roztěru?
- Při jaké teplotě budou kmeny kultivovány?
- Jak odvodíme správné podmínky kultivace?
- Závisí morfologie kolonií na podmínkách kultivace?



Další informace k této problematice najdete v následující literatuře

- *Miniatlas mikroorganismů* (<http://sci.muni.cz/mikrob/Miniatlas/mikr.htm>)
- Greenwood D., Slack R. C. B., Peuthere a kol., *Lékařská mikrobiologie*. GRADA Publishing, 1999, ISBN 80-7169-365-0.

- Němec M., Matoulková D., *Základy obecné mikrobiologie*, Masarykova univerzita, Brno, 2015, ISBN 978-80-210-7923-6.
- Sedláček I., *Taxonomie prokaryot*, Masarykova univerzita, Brno, 2007, ISBN 80-210-4207-9.



Kontrolní otázky

1. K čemu slouží kultivace kultury na misce a k čemu kultivace na šikmém agaru?
2. Jaké jsou základní fáze růstové křivky? Sledujeme jednu buňku nebo celou populaci?
3. Je možno posuzovat čistotu kultury v tekutém médiu? Pokud ne, jak by se při posouzení přítomnosti jediné bakteriální kultury dokázalo?
4. Proč se kultury mikroorganismů přeočkovávají?
5. Co ovlivňuje morfologii bakteriální kolonie?
6. Poroste fakultativní anaerob za přístupu kyslíku? Pokud ano, proč tomu tak je?
7. Jakými prostředky a podmínkami kultivace můžeme vyselektovat určité skupiny bakterií?
8. Jak ověříme „čistotu“ kmene kultivací?
9. Co znamená a jak se provádí izolace bakteriálního kmene?
10. Jaký je princip křížového roztěru?
11. Co způsobilo, že na misce křížového roztěru kultura vůbec nevyrostla?
12. Co zajišťuje aseptickou práci při přeočkování kultury?
13. Co způsobilo, že v poslední části křížového roztěru nevyrostají izolované bakteriální kolonie, ale „souvislý hádek“?
14. K čemu slouží selektivní média?
15. Jak rozdělujeme mikroorganismy podle vztahu ke kyslíku a do jakých skupin podle teplotního optima?
16. K čemu slouží očkovací klička a k čemu L-klička (= hokejka)?
17. Porovnejte kultivaci statickou a kontinuální z hlediska dostupnosti živin a hromadění metabolitů.
18. Která fáze růstové křivky a proč se nejvíce hodí pro odečet parametrů růstu kultury?
19. Jaký je rozdíl mezi obligátním a fakultativním anaerobem co se týče tolerance ke kyslíku?
20. Co je to smíšená bakteriální kultura?
21. Co je to čistá bakteriální kultura?
22. Jaký je rozdíl mezi termofilem a termotolerantním mezofilem co se týče citlivosti k teplotě?
23. Jaké jsou metody očkování mikroorganismů, které pomůcky pro něj můžeme použít?

3 Mikroorganismy kolem nás



Cíl cvičení

Cílem je prokázat, kde se v prostředí, potravinách či na lidském těle vyskytnou mikroorganismy.

Úvodní slovo

Mikroflóra je souhrn všech mikroorganismů vyskytujících se v definovaném prostoru přírodního prostředí, např. vodní nádrž, potraviny, tělo člověka. Mikroflóra zahrnuje viry, bakterie, kvasinky a vláknité houby (plísňe). Pokud se berou v potaz pouze bakterie, hovoří se o bakteriální mikroflóře. Každé prostředí má svoji typickou autochtou mikroflóru, tzn. přirozeně se vyskytující mikroorganismy. Např. pro jogurty je typická přirozená mikroflóra *Lactobacillus delbrueckii* a *Streptococcus salivarius*; pro sýry s plísněmi to je *Penicillium roquefortii* nebo *P. camemberti*; pro pivo kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* nebo *S. pastorianus*.

Fyziologická mikroflóra těla je přirozená mikroflóra vyskytující se na povrchu těla člověka či zvířat nebo uvnitř jejich orgánů. Dělí se na dvě skupiny. Rezidentní mikroflóra jsou mikroorganismy, které osídlují lidské tělo a nezpůsobují mu onemocnění ani škodu či újmu. Mikroflóra tranzitní zahrnuje mikroorganismy, které se dočasně nacházejí v určité oblasti makroorganismu (ústní dutina po konzumaci potravin, kůže) a které mohou být i patogenní. Přirozená mikroflóra účinně chrání před osídlením choroboplodnými mikroby z vnějšku a jejich rozmnožením, účastní se antigenní stimulace tvorby protilátek, zejména imunoglobulinů třídy IgA. Pro vymezení přirozené mikroflóry neexistuje přesná hranice – mikroby, které jsou u někoho přirozené, mohou u jiného vyvolat onemocnění.

Mikroorganismy jsou využívány po staletí, protože jejich činnost je schopna zastavit růst nežádoucích mikroorganismů v potravinách a tím se prodlužuje skladovatelnost potravin (mléčné kvašení zelí, okurek, výroba sýrů, mléčné a ovocné kvašené nápoje). Rody *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus* (bakterie mléčného kvašení) jsou široce využívány v mlékárenském průmyslu pro výrobu másla, jogurtů, sýrů a uzenářských výrobků, zakysání smetany, atd. Kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* se využívají pro výrobu svrchně kvašených piv (Ale, pšeničné pivo, stout, porter) a vína. Pro výrobu spodně kvašených piv typu ležák se používá kvasinka *S. pastorianus* schopná kvasit za nižších teplot.

MRS médium – agar pro laktobacily podle DeMana, Rogosiho a Sharpého s octanem sodným, který potlačuje růst dalších bakterií (kromě některých mléčných bakterií, např. *Leuconostoc*, *Pediococcus*).

Seznam přístrojů a mikroorganismů

- Živná média na miskách - MPA, MRS, sladinový agar
- Sterilní vatové tyčinky, pipety, hokejky
- Destilovaná voda

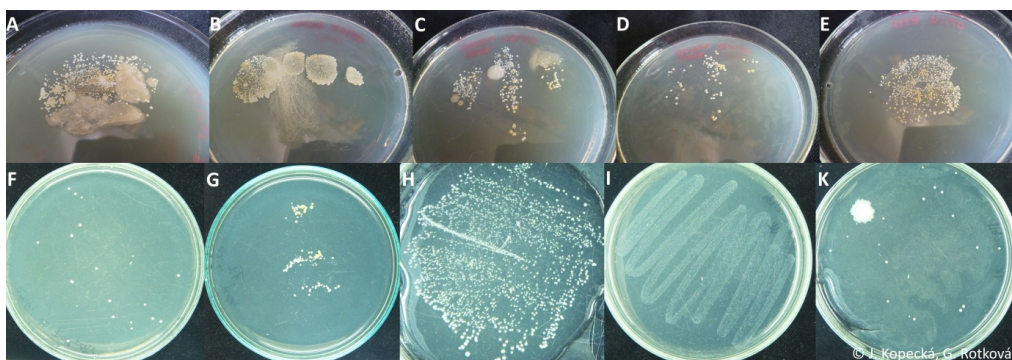
Postup

Stěry z prostředí a z těla

(obr. 6)

- Sterilní vatovou tyčinku namočit do sterilní destilované vody.
- Setřít plochu předmětu (ústa, klika, mobilní telefon, klíče, boty, pokožka, hodinky, atd.)
- Tamponem potříť médium v misce.
- Kultivace probíhá při 30 °C po dobu 24–48 hodin.
- Krátce přiložit daný předmět či část těla (prst, mince) na miskou.
- Kultivace probíhá při 35 °C po dobu 24–48 hodin.

Otisk z prostředí a z těla



Obr. 6: Stěr či otisk mikroflóry: z paty (A), prstů na noze (B), prstů na ruce před umytím (C), prstů na ruce po umytí (D), rtů (E), podpaží (F), rtů a nosu (G), ucha (H), úst (I) a mobilu (K) (archiv autorek)

Spad z ovzduší

- Misku s MPA nechat otevřenou na stole (roh místnosti, u okna) po dobu min. 30 minut.
- Kultivace probíhá při 30 °C po dobu 24–48 hodin.

Očkování piva (neředěné, nefiltrované)

- 0,3 ml neředěného vzorku pipetovat na sladinový agar a rovnoměrně rozetřít hokejkou.
- Kultivace probíhá při 30 °C po dobu 24–48 hodin.

Očkování jogurtu, kefiru, nepasterizovaného mléka

- 0,3 ml neředěného vzorku pipetovat na MRS agar a rovnoměrně rozetřít hokejkou.
- Kultivace probíhá při 30 °C po dobu 24–48 hodin.



Zhodnocení cvičení

- Došlo k nárůstu na miskách? Které části těla vykazovaly největší druhovou diverzitu?



Další informace k této problematice najdete v následující literatuře

- Klaban V., *Ilustrovaný mikrobiologický slovník*, Galén, Praha, 2005, ISBN 80-7262-341-9.
- Nester E. W., Roberts C. E., Pearsall N. N., Anderson D. G., Nester M. T., *Microbiology, A human perspective*, WBC/McGraw-Hill, 1998, ISBN 978-0073522593.
- Šilhánková L., *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*, Academia, 2002, ISBN 80-200-1024-6.



Kontrolní otázky

1. Které části těla jsou nejvíce osídleny a proč?
2. Jaké druhy mikroorganismů se nejčastěji vyskytují na pokožce?
3. Co je to přechodná mikroflóra?
4. Je mikroflóra lidského těla škodlivá?
5. Vyjmenuj některé rody bakterií mléčného kvašení
6. Proč se pro výrobu spodně kvašených piv typu ležák jiný druh kvasinky?

4 Úvod pro práci s mikroskopem



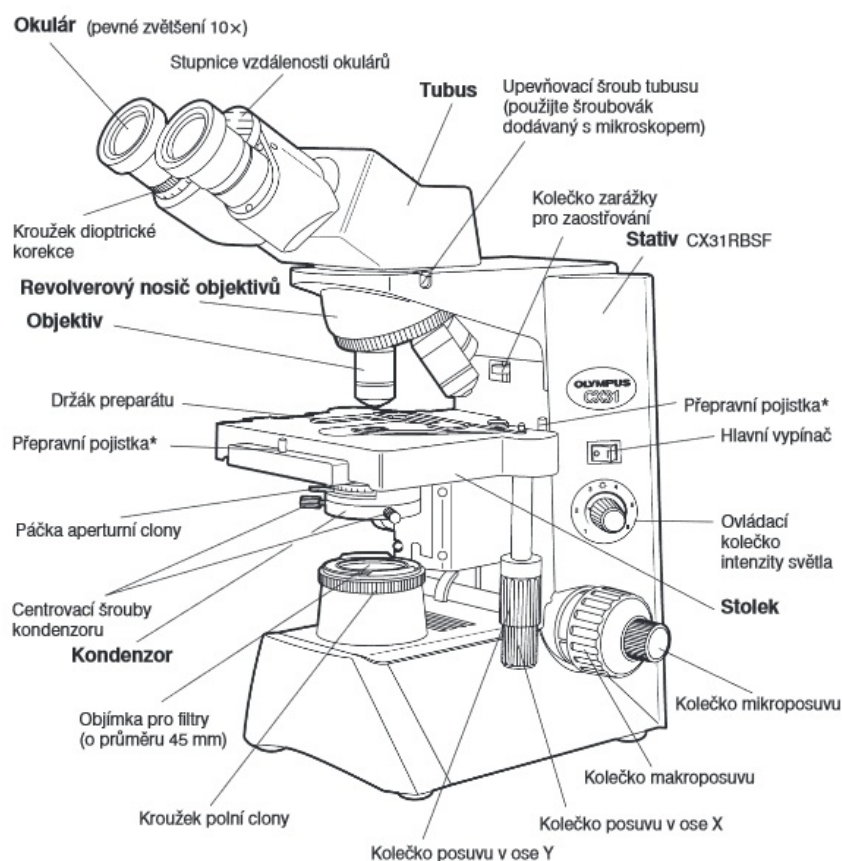
Cíl cvičení

Cílem je seznámit se s mikroskopem a s různými mikroskopickými technikami.

Úvodní slovo

Lupa vytváří přímý obraz zvětšený 10–15x. Lupa je dvojnásobná či ploškovypuklá čočka. Předmět, který pozorujeme lupou, klademe do vzdálenosti menší, než je ohnisková vzdálenost. Slouží pro pozorování makroskopických znaků kolonií.

Mikroskop (obr. 7) se skládá z mechanické části (podstavec, stojan a stolek s křížovým posunem), osvětlovací části (zdroj světla, kondenzor, clona) a optické části (objektivy a okuláry). Objektív je soustava čoček s velmi krátkou ohniskovou vzdáleností, která vytváří skutečný převrácený obraz objektu, jež se promítá mezi ohnisko okuláru a okulár. Okulárem tento obraz pozorujeme jako pod lupou a vidíme neskutečný zvětšený obraz.



Obr. 7: Části mikroskopu (zdroj: Návod k obsluze Olympus CX31)

Pro mikroskopii lze využít jakékoli vlnění s vlnovou délkou kratší, než jsou rozměry objektu. Rozlišujeme mikroskopii optickou (zobrazení struktur lišících se vzájemně absorpcí viditelného

světla), elektronovou a akustickou.

Optická (světelná) mikroskopie

Suchý objektiv

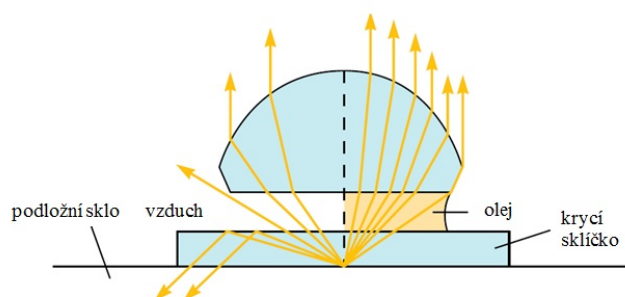
paprsek vystupující z preparátu pod úhlem α se na rozhraní mezi krycím sklíčkem a vzduchem láme od kolmice a nemůže se již podílet na tvorbě obrazu.

Imerzní objektiv

paprsek přecházející ze skla do imerzního prostředí svůj směr nemění a může se podílet na tvorbě obrazu, na vzniku obrazu se podílí více paprsků (obr. 8).

Imerzní prostředí

kapalina o stejném indexu lomu (n) jako krycí sklíčko, často cedrový olej ($n = 1,52$).



Obr. 8: Průchod paprsků suchým a olejovým imerzním objektivem (Prescott, 2013, upraveno)

Vznik obrazu

Podstatou tvorby ostrého obrazu čočkou jsou světelné paprsky šířící se z určitého bodu předmětu různými směry a dopadající na čočku, v obrazové rovině se sbíhají opět do jednoho bodu a skládají tak ostrý obraz předmětu. Vzhled obrazu u konvexních čoček závisí na vzdálenosti předmětu od čočky. Pokud je předmět vzdálený více než dvojnásobek ohniskové vzdálenosti, vzniká skutečný zmenšený a převrácený obraz (fotoaparát). Pokud leží předmět mezi dvojnásobkem ohniskové vzdálenosti a ohniskem, je vzniklý obraz převrácený, skutečný a zvětšený (objektiv mikroskopu). Pokud je předmět mezi ohniskem a čočkou, je vzniklý obraz zvětšený a neskutečný (lupa, okulár mikroskopu). Zvětšení čočky roste se zkracující se ohniskovou vzdáleností.

Fyzikální podstata vzniku obrazu v optickém mikroskopu

Ernst Abbe podal vysvětlení, které se opírá o Huygensův princip – každý bod osvětleného objektu se stává zdrojem sekundárních sférických vln. Zaostřená rovina preparátu je takovým objektem. Podle optických vlastností jednotlivých bodů objektu se dopadající světlo v každém z bodů transformuje (ohýbá se, láme, mění se jeho amplituda, fáze) a vznikají sekundární vlny. Ty spolu interferují, jako po průchodu světla štěrbinou nebo optickou mřížkou. Výsledné vlnění, které obsahuje informaci o vzhledu objektu, vstupuje do objektivu. V jednotlivých bodech zadní ohniskové roviny objektivu se setkávají sekundární vlny, které opustily rovinu předmětu rovnoběžně. Dochází k jejich interferenci a v souladu s Huygensovým principem se stávají zdrojem nových vln, které v obrazové rovině mikroskopu skládají zvětšený a převrácený obraz.

Základní pojmy v mikroskopii jsou **zvětšení** (násobek zvětšení objektivu a okuláru), **kontrast** a **rozišení**.

Rozlišovací schopnost je vzdálenost dvou bodů, které mikroskop zobrazí jako dva samostatné body. Maximální rozlišovací schopnost světelného mikroskopu je 0,2 mm. Je dána zářením, kterým objekt osvětlujeme, a vlastnostmi objektivu. Okulár pouze zvětšuje obraz tvořený objektivem. Obecně platí, že není možné rozlišit body bližší než polovina vlnové délky záření, u světla je to zhruba 250 nm. Rozlišovací schopnost u mikroskopu je dále omezena množstvím světelných paprsků, které mohou vstoupit do objektivu (světelnost objektivu).

Abbého zákon

$$\alpha = \frac{0.61 \cdot \lambda}{n \cdot \sin \alpha}$$

λ – vlnová délka světla, n – index lomu prostředí před objektivem, α – polovina otvorového úhlu kužele paprsků, které mohou vstoupit do objektivu

n a α jsou pro daný objektiv konstanty a celý jmenovatel ve vzorci ($n \cdot \sin \alpha$) se označuje jako **numerická apertura objektivu (NA)**. Je to jedna ze základních charakteristik objektivu a její hodnota je na objektivu uvedena. Numerická apertura nejkvalitnějších imerzních objektivů je 1,3–1,4, pro suché objektivy pak max. 1. Pro nejkratší vlnové délky (400 nm) se rozlišovací schopnost mikroskopů blíží hodnotě 0,17 μm . Rozlišovací schopnost mikroskopu lze zvýšit snížením λ – použitím modrého světla (modrý filtr), proudy elektronů (elektronová mikroskopie) nebo zvyšováním n – použitím imerzního oleje, vody. Přidáním imerzního oleje, který má vyšší index lomu než vzduch, mezi preparát a objektiv se předchází ztrátám světla, které se láme na rozhraní preparát/prostředí. Do objektivu dopadne větší množství paprsků.

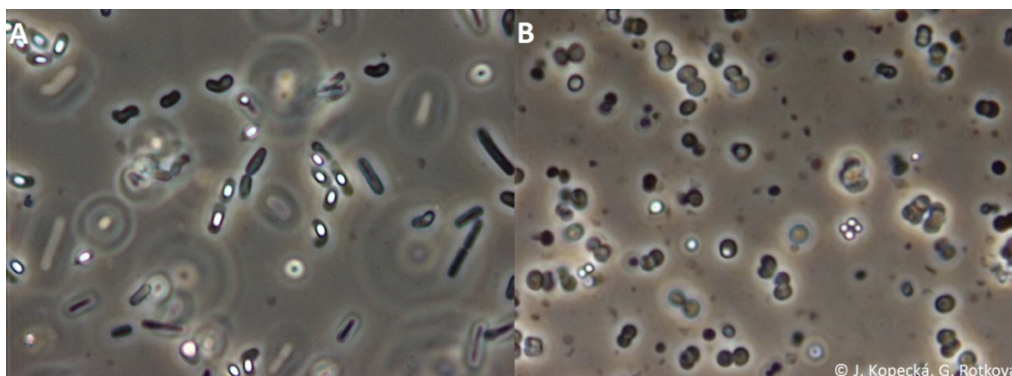
Metody zvyšující kontrast zobrazení ve světelném mikroskopu jsou:

Zástin

clona zachycuje paprsky procházející přímo do objektivu. Objekty jsou osvětleny z boku a my pozorujeme pouze světlo, které se na nich láme nebo odráží. Podobného efektu dosáhneme tím, že na zdroj světla položíme minci.

Fázový kontrast

(obr. 9) slouží k pozorování nativního preparátu (živé nebarvené nefixované buňky). Na kondenzor se umístí maska s kruhovou šterbinou, kterou proniká světlo do objektu. V objektivu, v místě obrazu kondenzorové masky, je umístěna fázová maska (označení objektivu Ph). V místě šterbiny u kondenzorové masky je u fázové masky napařena polopropustná vrstva kovu, který mění fázi světla o čtvrtinu vlnové délky. Díky tomuto uspořádání prochází nedifraktované (neohnuté) záření ze zdroje částí fázové masky, která mění fázi světla. Ostatní vlnění, které se na objektu ohnulo nebo zlomilo, projde beze změny. Tato technika převádí rozdíly v posunu fáze světla procházejícího různými částmi objektu, které nevidíme, na rozdíly v intenzitě světla, které můžeme pozorovat. Lze pozorovat tvar buněk, pohyb. „Husté“ části buňky s vysokým indexem lomu jsou zářivé. Toho se využívá při pozorování endospor vně i uvnitř buněk, pokud je buňka tvoří. Pro fázový kontrast je charakteristický tzv. „haló“ efekt (zářivá korona) kolem buněk.



Obr. 9: Fázový kontrast. *Bacillus cereus* (A), haló efekt kolem buněk a zářící endospory; *Sporosarcina ureae* (B), z balíčku jsou vidět pouze horní 4 buňky tvořící endospory (archiv autorek)

Nomarského diferenciální interferenční kontrast

pracuje se dvěma koherentními (interference schopnými) paprsky, jeden prochází objektem, druhý mimo objekt. Hranol dělí původně lineárně polarizované světlo na dvě vzájemně kolmo polarizované složky. Polarizátor srovnává vlny, jež jsou v různých rovinách. Nomarského destička v kondenzoru je hranol, jež zpracovává polarizované světlo tak, že na preparát jdou dva paprsky souběžně vedle sebe. V analyzátoru vidíme 3D obraz v závislosti na různém indexu lomu různých částí buňky. Zvýrazněním i malých rozdílů vznikne plastický obraz povrchu buňky (obr. 10).



Obr. 10: Nomarského kontrast, *Bacillus cereus* (archiv autorek)

Postup

- Zapnout zdroj světla a na stolek vsunout preparát.
- Regulátor světla a kondenzor není potřeba nastavovat.
- Objekt hledat pomocí makroposuvu a doostřit mikroposuvem.
- Postupně zvyšovat zvětšení výměnou objektivů na revolveru, objektiv nesmí narazit na sklíčko preparátu!
- Objektivy na revolveru jsou obvykle parfokální (zaostřeny na přibližně stejnou vzdálenost), po výměně objektivu není třeba objekt znovu hledat, ale stačí doostřit mikroposuvem.
- Revolverový měnič objektivů slouží pro výběr vhodného objektivu.
- Objektivy označené Ph slouží pro pozorování preparátů při fázovém kontrastu.
- Pro objektivy s černým a bílým pruhem (objektiv 100x) je vždy nutné použít imerzní olej! Pro objektivy zvětšení 10x, 20x a 40x se imerzní olej nepoužívá!
- Při použití imerzního oleje je objektiv nezbytné po skončení pozorování vyčistit směsí etanolu a etheru!

Použití imerzního oleje

- Zaostřit objekt největším neimerzním objektivem (nejčastěji 40x).
- Otočit revolver do polohy mezi tento a imerzní objektiv a na místo preparátu, které pozorujeme, kápnout kapku imerzního oleje.
- Otočit revolver na **imerzní objektiv**, který se musí **ponořit do oleje** a doostřit mikroposuvem.
- Pokud objekt není vidět, je třeba přiblížit objektiv k preparátu, nesmí do něj narazit. Zboku sledovat objektiv a stolek s preparátem.
- Následně je třeba pomalu pohybovat objektivem směrem od preparátu a pozorovat, dokud není vidět preparát v okulárech. Pokud stále není nic vidět, ostření opakujeme.



Zhodnocení cvičení

- Podarilo se zaostřit na preparát? Byl patrný rozdíl při pozorování vzorku v jasném poli, fázovém a Nomarského kontrastu?



Další informace k této problematice najdete v následující literatuře

- Matis D., *Mikroskopická technika*. ISBN: 80-968522-0-5, 2001.
- Plášek J., *Nové metody optické mikroskopie*. Pokroky matematiky, fyziky a astronomie, 1996, 41: 1-24.
- Harley J., *Laboratory exercises in microbiology*, 2013, ISBN-10: 0077510550.

- Hrazdára I., Mornstein V., *Lékařská biofyzika a přístrojová technika*, Neptun, Brno, 2004, ISBN-10: 80-902896-1-4.
- *Virtuální mikroskopování* <http://olympus.magnet.fsu.edu/primer/virtual/virtual.html>, 18. 2. 2017
- *Vlnová optika* <http://www.sweb.cz/radek.jandora/f11.htm>
- Davidson M., W., Abramowitz M., *Optical microscopy*, dostupné z https://cw.fel.cvut.cz/wiki/_media/courses/a6m33zsl/davidson-abramowitz-optical_microscopy.pdf (18. 2. 2017)



Kontrolní otázky

1. K čemu slouží makro- a mikroposuv?
2. Proč se nesmí po použití imerzního oleje znovu použít neimerzní objektiv?
3. K čemu slouží imerzní olej?
4. Co je podstatou fázového kontrastu?

5 Makroskopické a mikroskopické pozorování mikroorganismů, Gramovo barvení



Cíl cvičení

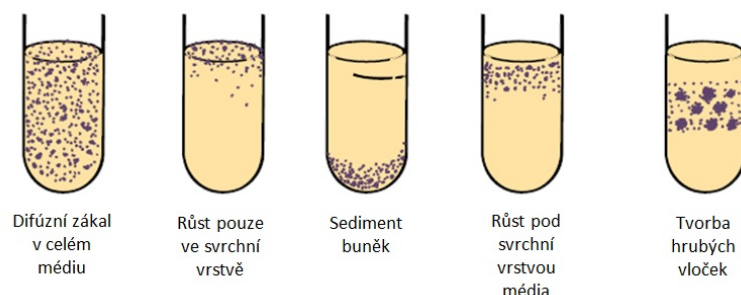
Zjištění morfologie mikrobiálních kultur – makroskopicky. Gramovo barvení. Pozorování a hodnocení mikroskopických preparátů.

Úvodní slovo

Morfologické a cytologické znaky pomáhají identifikaci, jejich pomocí se provádí kontrola kontaminace kultury a může se posoudit fyziologický stav kultury. Makroskopické a mikroskopické znaky se hodnotí vždy současně.

Makroskopické znaky

V **tekutých půdách** makroskopické znaky nelze hodnotit. Při růstu v tekutém médiu lze hodnotit charakter růstu (obr. 11) přítomností *sedimentu* (fakultativně aerobní kultury), *difúzního zákalu* (aerobní kultury mají zákal v celém médiu), *blanky na povrchu kapaliny* (špatná smáčivost buněk či mycelia, povrchové napětí, u většiny kultur tvořících drsné vrásčité kolonie), *hrubých vloček* (aerobní kultury), *mázdry* (povrchový útvar sedlinotvorných kvasinek, po vyčerpání sacharidů dochází k aerobnímu využití vyprodukovaného etanolu) a *zbarvení*.



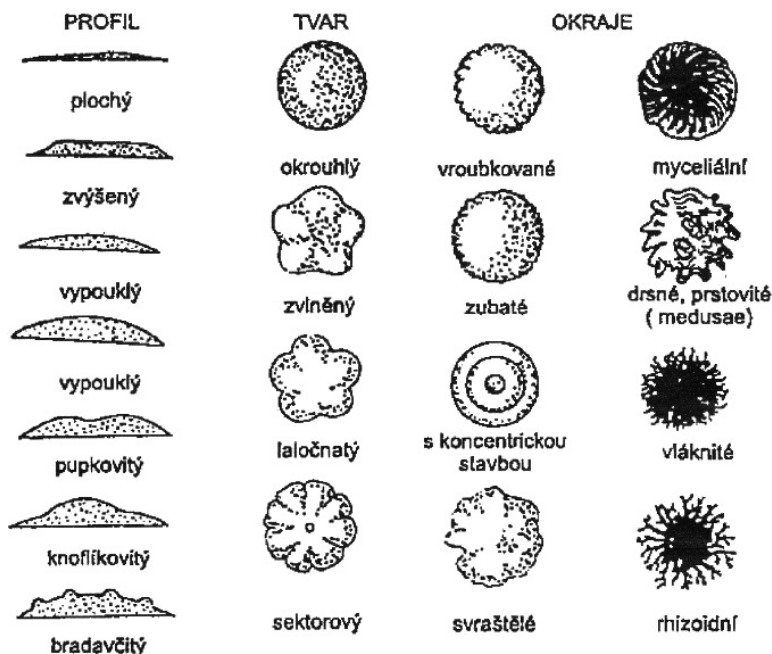
Obr. 11: Růst mikroorganismů v tekutém médiu (Prescott, 2013, upraveno)

Makroskopické hodnocení spočívá v popisu kolonií. Vzhled kolonií je ovlivněn typem živného média, stářím kultury a typem kultivace.

Na **šikmém agaru** nelze hodnotit jednotlivé kolonie. Lze posoudit rychlost růstu, tvar nátěru (rovný, plný, bodový, ostnitý, rhizoidní), profil nátěru (plochý, vypouklý), povrch nátěru (lesklý, drsný, suchý), konzistenci a pigmenty. Pomocí růstu ve vpichu šikmého agaru lze určit nároky mikroorganismu na kyslík: aerobní rostou v horní části vpichu, anaerobní u dna a fakultativně anaerobní po celé délce vpichu.

Kolonie je klon buněk narostlý z jednotlivé buňky. Na **Petriho miskách** lze při správně provedeném křížovém roztěru pozorovat a hodnotit **jednotlivé kolonie** (obr. 12): *velikost* (průměr; mm), *tvar* (pravidelný, kulatý, oválný, nepravidelně laločnatý, vláknitý, rhizoidní, plazící se), *profil* (vyvýšený, plochý, pupkovitý, miskovitý), *okraj* (pravidelný, filiformní, laločnatý, okrouhlý), *povrch* (hladký, lesklý- S - fáze, matný, drsný - R- fáze), *transparence* (průhledná, průsvitná, neprůsvitná), *barva* (bezbarvá, pigmentace). Další charakteristiky, které se mohou posuzovat, jsou

vůně, zápach (po jasmínu, žluklém másle, ovocný), tvorba mycelia, změny média (dvorec zbarvení, hemolýza, precipitát), konzistence, která se zjišťuje bakteriální kličkou (viskózní, mazlavá, drobná, zarůstající do agaru).



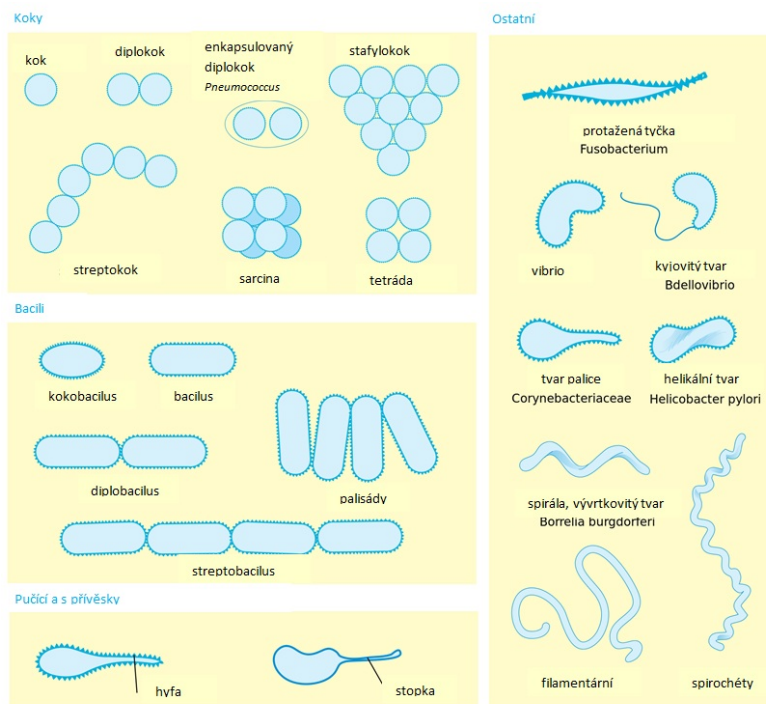
Obr. 12: Tvary bakteriálních kolonií (Rosypal, 1981)

Nerovnosti růstu kolonií mohou být způsobeny stářím kultury. *Mukoidní* (M) charakter růstu se projevuje jako vlhké, slizovité a velmi lesklé kolonie tvořené opouzdrěnými buňkami (např. *Azotobacter*, *Leuconostoc*). *Hladké* (S) kolonie mají rovný okraj s leskem nebo bez lesku u neopouzdrěných buněk. *Drsné* (R) kolonie se vyznačují suchými, nerovnými okraji. Liší se výškou vrásnění. V drsných koloniích rostou buňky tvořící řetězky, mycelia či pseudomycelia (např. *Bacillus*, *Trichosporon*, kvasinky *Pichia*, *Hansenula*, *Candida*). Změny typu kolonií M – S – R jsou důsledkem mutací. Například mikroorganismy z infekčního materiálu jsou většinou typu M, ale po několika přeočkováních se makroskopicky změny na typ S; zpětná změna z S na M typ je výjimečná. Fenotyp S, M a R je ovlivněn složením média. Zkvasitelné sacharidy (20 %) podporují S a M typ. Tenzidy způsobují hladké až lesklé fenotypy R typů.

Mikroskopické znaky

U mikroskopických preparátů se hodnotí *tvar*, *velikost* a *uspořádání buněk*, přítomnost *zvláštních útvarů* na buňce, *způsob rozmnožování viditelný* v preparátu. Preparáty lze pozorovat v nativním preparátu ve fázovém kontrastu nebo zvýraznit morfologii buňky a jejích struktur fixací a barvením (např. Gramovo, Ziehl-Nielsenovo barvení). U nativního preparátu (pozorování suspenze) se na podložní sklíčko vždy přikládá krycí sklíčko. Při pozorování plísní, kvasinek či aktinomycet se využívá sklíčkových kultur (krycí sklíčko je vytaženo z agaru, ve kterém bylo během kultivace zapáchnuto, je kulturou porostlé).

Buňky mohou mít rozmanité tvary (obr. 13): koky (sférické, zploštělé, diplokoky, streptokoky, tetrády, sarciny, stafylokoky), tyčinky (rovné, zakřivené, větví se, palisády, pleomorfní), kokobacily, buňky s pupeny či prostěkami, spirily, hvězdice, mycelia.



Obr. 13: Tvary bakteriálních buněk

Zdroj (upraveno): Wikipedia.org – Bacterial cellular morphologies

Velikost vybraných bakteriálních buněk je uvedena v Tab. 1.

Tab. 1: Velikost bakteriálních buněk

Mikroorganismus	Velikost (μm)
Chlamydia	$0,3 \times 0,3$
Bdellovibrio	$0,8 \times 0,3$
Rickettsia	$1 \times 0,3$
Staphylococcus aureus	$0,8-1 \times 0,8-1$
Escherichia coli	$2-3 \times 0,4-0,6$
Bacillus subtilis	$1,8-4,8 \times 0,9-1,1$
Streptomyces	vlákno $\times 0,7-1,6$
Chromatium	25×10
Spirochety	500

Nativní preparát

Při pozorování suspenze nativního preparátu buňky nikdy nefixujeme. Preparát je nebarvený, slouží ke zjištění skutečného tvaru a struktury buněk neporušených fixací a barvením. Využívá se při pozorování růstu a množení, pohybu bakterií. Význam má při studiu buněčných útvarů, které se obtížně barví, např. spor. Pro pozorování struktur se využívá jasné pole, fázový nebo

Nomarského kontrast.

Fixace preparátu

Podstatou fixace je vysrážení buněčných koloidů, zejména bílkovin. Fixací buňky lépe přilnou ke sklíčku, nespálchnou se aplikací barviva či rozpouštědla a lépe přijímají barvivo. Preparát se fixuje až ve chvíli, kdy je nátěr buněk suchý, aby nedošlo k uvaření buněk. Fixace se provádí protažením podložního skla s nátěrem buněk, který je umístěn na horní straně sklíčka, nesvítivou částí plamene. Pokud byly buňky kultivovány v tekutém cukerném prostředí, je nutné buňky od média separovat centrifugací a následně je promýt vodou či pufrem. Buňky kvasinek a plísni jsou větší než buňky bakterií, tepelná fixace může pozměnit jejich tvar. Proto se většinou fixují chemikáliemi. Fixace i barvení mírně buňku deformují, jejich charakteristický tvar zůstává. Pro měření přesné velikosti buněk se využívá nefixovaný preparát negativně obarvený (obarvení okolí buňky).

Barvené preparáty

Slouží ke zjištění typu buněčné stěny, tvaru buněk a uspořádání jejich shluků, přítomnosti a uložení endospor, přítomnosti pouzder a vnitřních buněčných struktur (inkluzí) a životaschopnosti buněk. Pro určení morfologie buňky a charakteristických shluků stačí jednoduché barvení buněčné stěny (např. krystalovou violetí) bez rozlišování grampozitivního či gramnegativního typu. Vitální test ukazuje poměr živých a mrtvých buněk v nefixovaném preparátu. Vitální barvení je barvením mrtvých buněk, protože mrtvé buňky přijímají barvivo nebo ho efluxními systémy nevyklučují (např. zředěnou Löfflerovu modř). Struktury buňky se rozlišují diferenciacním barvením, a to jak vnitřní a vnější morfologické útvary (endospory, exospory, pouzdra, buněčné stěny), tak chemické složky (barvení volutinu, glykogenu, škrobu). Diagnostické barvení napomáhá identifikaci bakterií (např. Gramovo, acidorezistentní barvení karbolfuchsinem, barvení dle Giemsky). Při negativním barvení se buňky nefixují ani se nebarví, obarveno je pouze jejich okolí (např. tuší, nigrosinem). Využívá se pro měření přesné velikosti buněk nedeformovaných fixací a barvením.

Preparát se před barvením fixuje vždy kromě negativního barvení a vitálního testu. K barvení se používají zředěné vodné roztoky organických barviv, obvykle soli. Bazická barviva mají barevný kationt, kyselá potom aniont. Při barvení bakterií se většinou používají bazická barviva (např. krystalová violet, methylenová modř, safranin, bazický fuchsin, malachitová zeleň). Barvení lze zvýraznit mořením buněk (např. fenolem, taninem), při kterém má mořidlo roli prostředníka s vyšší afinitou k buňce a zároveň k barvivu, než je afinita buňky k samotnému barvivu.

Gramovo barvení

Gramovo barvení je jednou z nejdůležitějších diagnostických metod při identifikaci bakterií. Rozlišuje skupinu grampozitivních (barví se modrofialově) a gramnegativních buněk (barví se červeno-růžově) a udává některé fyziologické a chemické vlastnosti buňky. Podstata rozdílného chování při Gramově barvení nebyla dosud uspokojivě objasněna, s největší pravděpodobností se zde však uplatňují rozdíly ve složení buněčné stěny obou skupin bakterií. Jde o barvení fixovaného preparátu krystalovou violetí a následné moření buněk jódem v roztoku KI. Vzniká komplex barvivo-jód-buněčná stěna. Rozdíl při barvení vzniká při promývání preparátu organickým rozpouštědlem (acetone nebo alkoholem). U gramnegativních buněk odbarvovací činidlo rozpustí vnější lipopolysacharidovou vrstvu, komplex krystalové violeti s jódem se vymyje přes tenkou vrstvu peptidoglykanu a buňky se odbarví, naopak grampozitivní bakterie si zbarvení ponechávají. Pro zvýraznění rozdílu se gramnegativní bakterie dobarvují jiným kontrastním barvivem (např. bazickým safraninem, karbolfuchsinem) a barví se do červena, růžova. Grampozitivní buňky mají v buněčné stěně navázanu krystalovou violet, která se alkoholem nevyplavila a zůstávají zbarveny do modra, modrofialova. Chyby, které mohou nastat při barvení, jsou: příliš silný nátěr buněk na sklíčku; uvaření

buněk při fixaci; příliš dlouhé odbarvování buněk alkoholem.

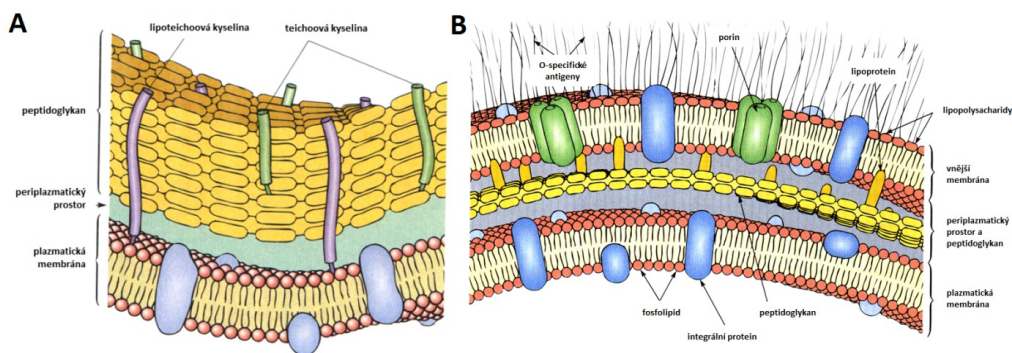
Gramovo barvení je do jisté míry ovlivněno fyziologickým stavem buněk, stářím kultury a složením kultivačního média. Pro barvení se využívají buňky staré 24 hodin. Buňky mohou ztratit svoji grampozitivitu např. mechanickým poškozením, UV zářením, působením kyselin, zásad či rozpouštědel. Mikroorganismy, které se někdy barví pozitivně a někdy negativně, označujeme jako gramlabilní/gramvariabilní. Některé bakteriální rody Gramovým barvením nelze obarvit, jsou to rody bez buněčné stěny (mykoplazmata), spirálovité bakterie a silně acidorezistentní rody (mykobakterie); např. *Borrelia burgdorferi*, *B. recurrentis*, *Bartonella henselae*, *Chlamydia trachomatis*, *C. pneumoniae*, *Chlamydophila psittaci*, *Coxiella burnetii*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Legionella sp.*, *Leptospira sp.*, *Mycobacterium bovis*, *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. leprae*, *M. marinum*, *A.*, *Orientia tsutsugamushi*, *Treponema pallidum*.

Buněčná stěna bakterií

Buňky gramnegativního typu (obr. 14B) mají buněčnou stěnu složenou z vnější lipopolysacharidové membrány a vnitřní relativně tenké peptidoglykanové (zhruba 5-10 % buněčné stěny) vrstvy obsahující kyselinu muramovou. Spojení mezi peptidoglykanem a vnější membránou zajišťují lipoproteiny. Lipopolysacharidy jsou složeny z lipidu A, jaderného (též základního, dřevňového) polysacharidu a O-antigenů (též O-řetězec). Vnější membrána slouží jako ochranná bariéra před vnějším prostředím, brání prostupu látek nebo postup alespoň zpomaluje (žlučové soli, antibiotika, jedy, atd.).

V buněčné stěně grampozitivního typu (obr. 14A) chybí vnější membrána a peptidoglykanová vrstva je poměrně tlustá. Někteří zástupci mohou mít jako složku buněčné stěny kyselinu teichoovou, lipoteichoovou anebo neutrální polysacharidy, u několika zástupců jsou ve stěně přítomny mykolové kyseliny.

Zvláštní skupinou jsou bakterie bez buněčné stěny, tzv. mykoplazmata, které nejsou schopny syntetizovat prekurzory peptidoglykanu. Buňky jsou obklopeny pouze cytoplazmatickou membránou.



Obr. 14: Buněčná stěna grampozitivního (A) a gramnegativního (B) typu (Prescott a kol., 1996, upraveno)

Seznam přístrojů a mikroorganismů

Pomůcky a chemikálie

- Podložní a krycí skla, očkovací kličky, lupy
- Barviva pro Gramovo barvení (krystalová violet, Lugolův roztok, safranin)

- Destilovaná voda

Mikroorganizmy

- *Escherichia coli* CCM 3954
- *Pseudomonas putida*,
- *P. fluorescens* CCM 2115T
- *Serratia marcescens* CCM 303
- *Kocuria rosea* CCM 839
- *Micrococcus luteus* CCM 169
- *Bacillus cereus* CCM 2010
- *Bacillus subtilis* CCM 2216
- *Staphylococcus aureus* SA 812
- *Saccharomyces cerevisiae*

Postup

- Ve cvičení každý pracuje samostatně.
- Preparáty popsat buď na sklíčko či papírek přilepený ke sklíčku.

Každý hodnotí a barví:

- Morfologii kolonií a růstu na agarech a v tekutém médiu
- Gramovo barvení – čistá a směsná kultura
- Mikroskopicky pozorovat všechny kultury ve cvičení a vyhodnotit tvar buněk, tvorbu shluků a typ buněčné stěny
- Nativní preparát

Nativní preparát – aseptická práce při nanášení buněk na sklíčko

- Dobře očištěné podložní sklíčko vyjmout z alkoholu a protáhnout plamenem.
- Označit sklíčko číslem vyšetřované kultury.
- Doprostřed sklíčka nanést kapku sterilní destilované vody.
- Ožehnutou, vychladlou očkovací kličkou vnést do kapky malé množství kultury, rozmíchat. Kultury stačí nepatrné množství, aby preparát nebyl hustý.
- Kapka se neroztírá, překrývá se krycím sklíčkem tak, aby v preparátu nebyly vzduchové bublinky (nepřikládat svrchu na kapku, ale nejprve jednou hranou, nepřitlačovat).
- Přebytečnou kapalinu odsát filtračním papírem.
- Buňky z tekutého média pozorovat přímo v médiu bez ředění v kapce vody.

- Pro nativní preparát zvolit objektiv s fázovým kontrastem (Ph).
- Preparát pozorovat do 5 minut od přípravy z důvodu rychlého vysychání.

Gramovo barvení

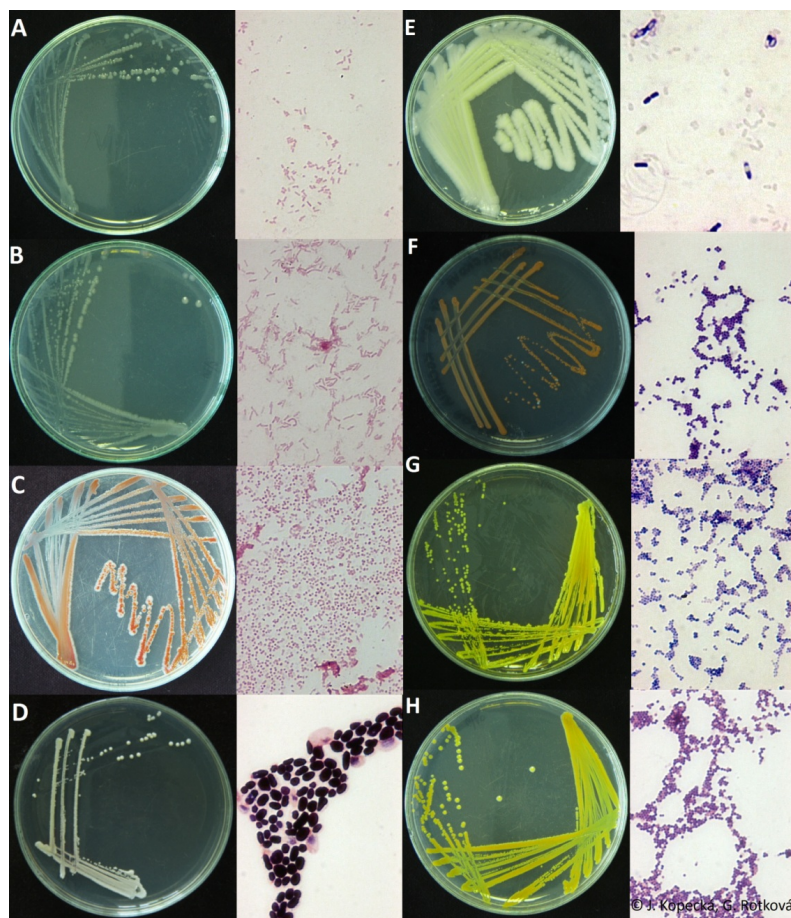
- Dobře očištěné podložní sklíčko vyjmout z alkoholu a protáhnout plamenem.
- Označit sklíčko číslem vyšetřované kultury.
- Doprostřed sklíčka nanést kapku sterilní destilované vody.
- Ožehnutou, vychladlou očkovací kličkou vnést do kapky malé množství kultury.
- Suspenzi z kultury rozetřít po sklíčku, nechat dobře zaschnout a fixovat plamenem (několikrát sklíčko protáhnout plamenem).
- Preparát ponořit do roztoku krystalové violeti (30 sekund), barvivo opláchnout vodou.
- Preparát ponořit do Lugolova roztoku (30 sekund), barvivo opláchnout vodou.
- Preparát převrstvit etanolem (nebo acetonem), maximálně na 15-20 sekund.
- Opláchnout slabým proudem vody.
- Preparát ponořit do safraninu na 1 minutu (takto se dobarví pouze buňky gramnegativní, u kterých došlo k vyplavení krystalové violeti; safraninem však dobarvujeme každý preparát, i když předpokládáme přítomnost grampozitivních buněk – předem nevíme, o jaký typ buněčné stěny se v preparátu jedná).
- Preparát osušit mezi dvěma filtračními papíry a pozorovat při zvětšení 1000x (s imerzním objektivem) v jasném poli (označení objektivu BF).



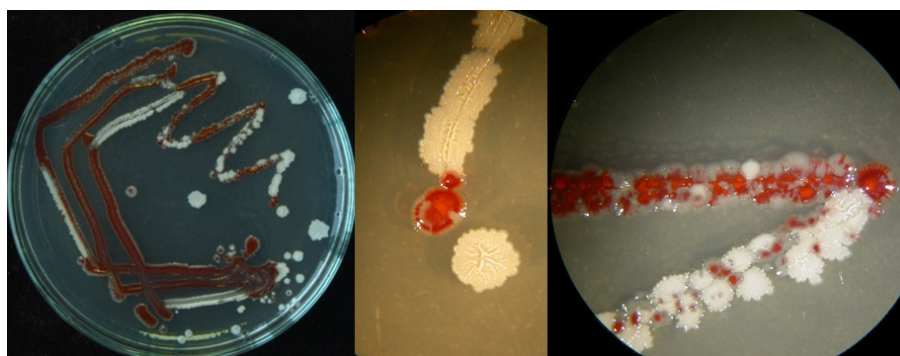
Zhodnocení cvičení

- Podařilo se správně obarvit a pozorovat kultury?
- Pokud ne, proč?

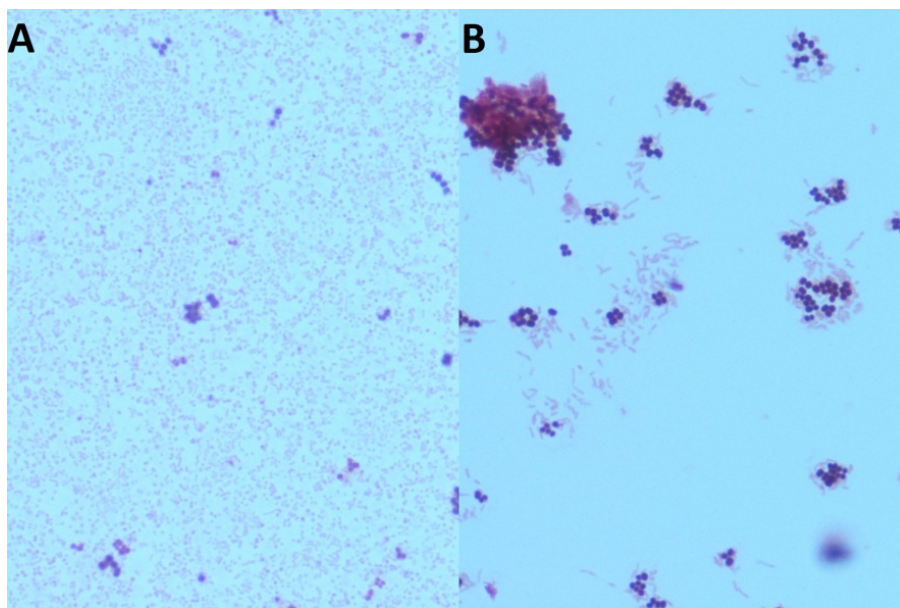
Na obr. 15, 16 a 17 si můžete prohlédnout křížové roztěry a mikroskopické preparáty (Gramovo barvení) kultur používaných ve cvičení.



Obr. 15: Čistě kultury bakterií na agaru a obarvené dle Grama. *Escherichia coli* (A), *Pseudomonas putida* (B), *Serratia marcescens* (C), *Saccharomyces cerevisiae* (D), *Bacillus cereus* (E), *Kocuria rosea* (F), *Micrococcus luteus* (G), *Staphylococcus aureus* SA 812 (H) (archiv autorek)



Obr. 16: Smišené kultury bakterií. *S. marcescens* a *B. subtilis* (archiv autorek)



Obr. 17: Směsné kultury obarvené dle Grama. *S. marcescens* a *K. rosea* (A), *M. luteus* a *P. putida* (B) (archiv autorek)



Další informace k této problematice najdete v následující literatuře

1. *Miniatlas mikroorganismů* (23. 2. 2017)
2. Prescott L., M., Harley J. P., Klein D. A., *Microbiology*, WCB, Dubuque, 1996, ISBN 0-697-29390-4.
3. Rosypal S., *Obecná bakteriologie*, SPN Praha, 1981.
4. Šilhánková L., Demnerová K., *Návody pro laboratoře z mikrobiologie*, VŠCHT, Praha, 1993.
5. *Atlas mykologie*, <http://www.mycology.adelaide.edu.au/> (23.2.2017)
6. *Centers for Disease Control and Prevention*, <http://www.cdc.gov/az/a.html> (23.2.2017)



Kontrolní otázky

1. Jaká barviva se používají při barvení dle Grama a co zde působí jako mořidlo?
2. Co všechno můžeme v preparátu (v buňce) barvit?
3. Které morfologické znaky se popisují u kolonií mikroorganismů?
4. Jsou všechny bakterie barvitelné Gramem? Pokud ne, uveďte nějaké příklady.
5. Na čem závisí morfologie bakteriální kolonie?
6. Jaké vlastnosti bakteriálních kolonií se popisují?
7. Proč se provádí fixace preparátu?

8. Uveďte alespoň 2 příklady bakteriálního rodu tvořícího kokovité buňky a 2 příklady buněk tyčinkovitých.
9. Jaká struktura buňky se barví Gramovým barvením a co z takto obarveného preparátu můžeme vyčíst?
10. Který objektiv poskytuje větší zvětšení – imerzní nebo suchý? K čemu imerze slouží?
11. Jak se dle Grama barví kvasinky; jaký mají typ buněčné stěny?
12. Jak se dle Grama barví *Escherichia coli*?
13. Co je to peptidoglykan?
14. Jaké jsou hlavní rozdíly v přípravě a účelu preparátu barveného podle Grama a nativního preparátu?
15. K čemu slouží různé typy barvení buněk?

6 Bakteriofág



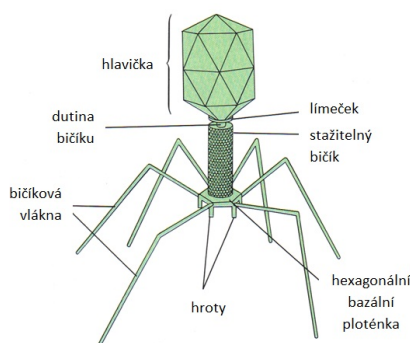
Cíl cvičení

Stanovit titer fágového lyzátu metodou dvouvrstvého agaru.

Úvodní slovo

Bakteriofágy (též fágy) jsou viry napadající bakteriální buňky. Velikost bakteriofágů se pohybuje od 20 do 200 nm, velikost genomu 2 až 200 kb, jsou menší než bakterie. Jejich počet je v prostředí asi desetkrát vyšší než počet bakteriálních buněk. Ze 20–50 % jsou příčinou jejich mortality, napomáhají koloběhu látek, zvyšování množství organických látek v prostředí. Geneticky se neshodují s ostatními viry (viry živočichů a rostlin). Evoluce fágů probíhá současně s evolucí bakterií, jsou kontinuálně se vyvíjejícím rezervoárem genů.

Nukleová kyselina bakteriofága (jedno nebo dvouřetězcová, kruhová nebo lineární, DNA nebo RNA) je uložena v proteinové kapsidě většinou tvaru ikosaedru, která je pomocí krčku spojena s bičíkem umístěným v kontraktilní pochvě. Na bazální ploténku bičíku jsou napojena bičíková vlákna pro přichycení na povrchové receptory bakteriálního hostitele (obr. 18).



Obr. 18: Struktura T4 bakteriofága (Prescott a kol., 1996, upraveno)

Rozmezí bakteriálního hostitele může být u fágů velice úzké či naopak široké. Některé fágy jsou natolik specifické, že se množí jen v určitých kmenech konkrétního bakteriálního druhu. Fágy se širokým spektrem hostitele se nazývají fágy polyvalentní. Chimérický fág vzniká homologní rekombinací mezi dvěma fágy, má vlastnosti od obou původních fágů.

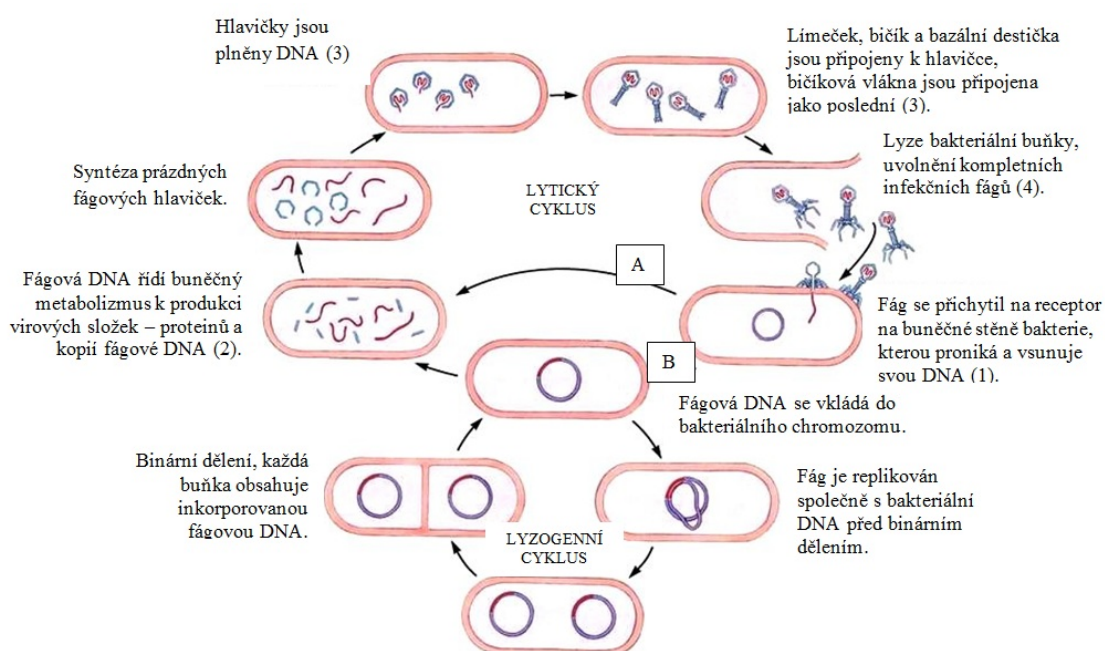
Podle průběhu životního cyklu se fágy dělí na dvě skupiny:

Virulentní fágy s lytickým životním cyklem (obr. 19A) způsobují lyzi hostitelského kmene bakterie. Životní cyklus má tyto fáze:

1. adsorpce virionu na povrch vnímavé buňky (u grampozitivních bakterií většinou na teichoové kyseliny), penetrace nukleové kyseliny fága do cytoplazmy buňky,
2. replikace fágové DNA s využitím RNA polymerázy hostitele, syntéza rané mRNA fága a proteinů kontrolujících syntézu dalších virů, syntéza pozdních bílkovin fága,
3. kompletace nových virových částic (virionů),
4. uvolnění virionů do vnějšího prostředí umožněné syntézou endolysinů a lyzí buňky. Uvolněné viriony pak mohou infikovat další citlivé buňky.

Pokud lytická infekce probíhá v tekutém médiu s narostlými buňkami hostitelského kmene, dojde po určité době k vyčerení a dostaneme tzv. fágový lyzát (kultivační prostředí obsahující aktivní virové částice, zbytky membrán a vylitý buněčný obsah). Pokud probíhá lyze u hostitelského kmene na agaru, vznikají plaky, projasněná místa.

Temperované fágy s lyzogenním cyklem (obr. 19B) se rekombinací začleňují do genomu hostitele, jejich nukleová kyselina se replikuje a přenáší na potomstvo spolu s genomem. Takový fág se nazývá profág, může se uvolnit a vyčlenit z nukleové kyseliny bakteriální buňky po působení některých vnějších faktorů (např. UV záření, působení mutagenů či stresových faktorů). Při chybném vyčlenění (tj. při posunutí čtecího rámce) se může spolu s genetickou informací fága vyčlenit i část genomu hostitelské bakterie, která je součástí nové virové částice a může být šířena dál. Tento proces se nazývá transdukce a např. u druhu *Staphylococcus aureus* je nejčastějším způsobem horizontálního přenosu genů, který viru může přinášet určitým způsobem výhodné geny. Stejně tak i bakteriím, neboť bakteriofágy napomáhají například v shiftech sérotypů bakterií (serotype-converting phages).



Obr. 19: Životní cyklus fága (zdroj: Virtual Learning Environment – Viruses; upraveno)

Infekce bakteriální buňky fágem nemusí být vždy úspěšná. Některé bakterie překrývají receptory pro navázání fágů např. proteinem A, anebo pokud infekce a penetrace proběhne, bakterie aktivují restriktivně modifikační systémy a endonukleázy rozštěpí cizorodou nukleovou kyselinu. To jsou hlavní problémy fágové terapie. Řešením je izolace fágových mutantů, které jsou schopné překonat obranné mechanismy hostitele a lyzovat původně necitlivé kmeny.

Fágová terapie je použití fágů k léčbě bakteriálních infekcí. Bakteriofágy schopné lyze patogenních bakterií se dostaly do popředí zájmu po objevu bakteriálních kmenů rezistentních na záložní antibiotika (např. meticilin). Jedny z prvních výzkumů fágové terapie probíhaly od 60. let v zemích bývalého Sovětského svazu; v Gruzii bylo do studií zahrnuto až 31 tisíc dětských pacientů trpících průjmy. Západní Evropa a USA se k výzkumu připojily později.

Bakteriofágy byly v minulosti hojně užívány k léčbě a prevenci infekcí. Zatímco dříve byly pro fágovou terapii využívány preparáty obsahující celé fágové částice, v současnosti otevírá nové možnosti v boji proti obtížně léčitelným infekcím izolace dobře charakterizovaných purifikovaných fágových komponent s antimikrobiálními vlastnostmi. Dnes je fágová terapie rozvíjena zejména

u infekcí vyvolaných bakteriálními rody *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Shigella*, *Salmonella*, *Escherichia*, *Enterococcus* a *Listeria*.

Výhodou fágové terapie je vysoká specifita k cílovému kmeni hostitele, fágy nejsou nebezpečné pro přirozenou mikroflóru pacienta. Specifita fága však vyžaduje velmi přesnou diagnostiku patogena a stanovení jeho citlivosti k danému fágu. Výhodné je používat polyvalentní fágy nebo jejich směsi, které jsou schopné lyzovat většinu patogenních kmenů daného druhu, které se podílejí na vzniku infekce. Bakteriofágy jsou schopny pomnožit se v místě infekce, proto je možné podat pacientovi malou jednorázovou dávku preparátu. Naproti tomu antibiotika jsou metabolizována, eliminována z organismu a nekonztrují se v místě infekce, což vyžaduje opakované dávky.

U fágových preparátů nebyly, až na několik výjimek, dosud pozorovány závažné vedlejší účinky, ve srovnání s antibiotiky. Problém může nastat při uvolnění endotoxinů do organismu pacienta v důsledku lyze bakteriálních buněk. Případný vznik rezistence na určitého fága je často spjat se ztrátou patogenity příslušného bakteriálního kmene. Povrchové buněčné komponenty, fágové receptory, bývají spojené s bakteriální virulencí a jejich mutace vede současně ke ztrátě obou uvedených funkcí. Naproti tomu kmeny rezistentní na antibiotika si uchovávají vlastnosti virulence. Vývoj nových antibiotik je zdlouhavý a nákladný. Vyhledání nového terapeutického fága proti rezistentnímu bakteriálnímu kmeni je rychlejší a levnější proces.

Fágová terapie se nevyužívá pouze v medicíně, ale také při ošetřování potravin proti bakteriálnímu napadení, ve fytoterapii, v pěstitelství a rostlinné výrobě proti bakteriálnímu onemocnění rostlin.

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

Seznam přístrojů a mikroorganismů

Pomůcky a chemikálie

- masopeptonový bujón (MPB)
- masopeptonový agar (MPA) – 2 % a 0,7 %
- sterilní tris HCl pufr (pH 7,2)
- sterilní 0,22 % CaCl₂
- sterilní Petriho misky, pipety, zkumavky, vodní lázeň, termostat

Mikroorganismy

- *Staphylococcus aureus* SA 812, stafylofág 812

Postup

Příprava fágového lyzátu

- 2 ml narostlého 24 hodinového inokula *S. aureus* SA 812 naočkovat do 100 ml čerstvého MPB v provzdušňovací láhvi a za intenzivního provzdušňování pokračovat v kultivaci další 4 hodiny při teplotě 30 °C.
- Po 4 hodinách asepticky přidat 10 ml sterilního 0,22% CaCl₂ a 5 ml zásobního lyzátu fága 812 a pokračovat v kultivaci.
- Po 60 minutách přemístit provzdušňovací láhev do temna a laboratorní teploty.
- Za 12–24 hodin se médium vyčeří, přesto v něm zůstává určitý počet necitlivých buněk.
- Lyzát sterilizovat přidavkem chloroformu (5–10 kapek na 10 ml lyzátu), nechat působit 1–2 hodiny, lyzát stáhnout sterilní pipetou a přenést do sterilní baňky.
- V takto připraveném lyzátu se při teplotě 4 °C významně nemění počet aktivních fágových částic po dobu 1–2 měsíců.

Příprava hostitelských buněk

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

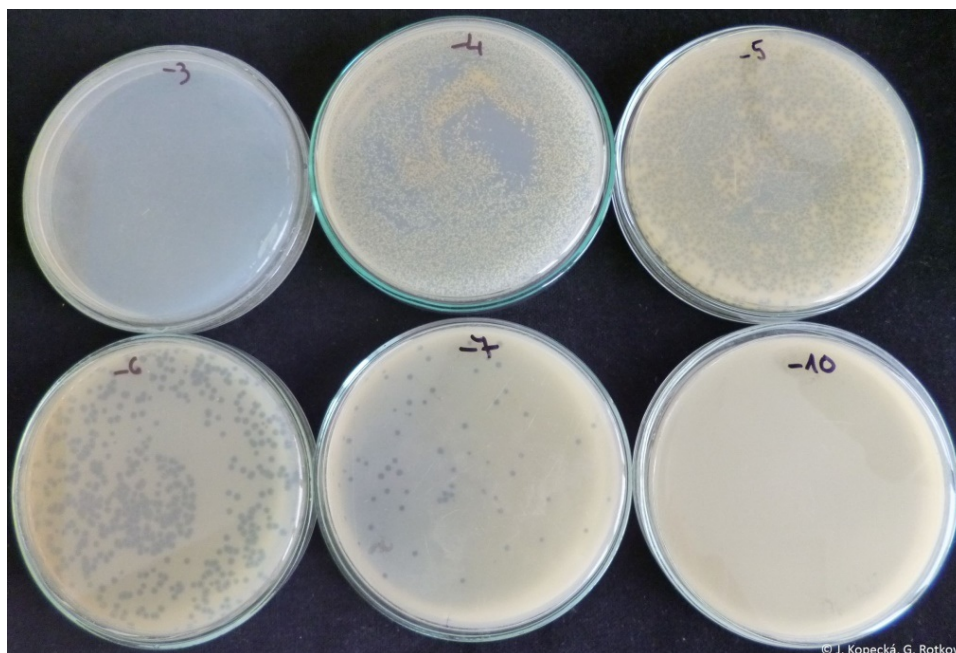
Stanovení počtu virionů:

- Lyzát fága 812 zředit ve sterilním tris HCl pufru, vždy sterilně přenášet 0,1 ml lyzátu nebo předchozího ředění do 0,9 ml pufru, na každé ředění použít novou sterilní špičku, dobře promíchávat!
- Připravit sterilní zkumavky, které budou obsahovat 3 ml 0,7% MPA, rozvařeného a vytemperovaného na 45 °C.
- K 20 ml hostitelských buněk sterilně přidat 2 ml 0,22% CaCl₂ a pipetovat 0,3 ml inokula do každé zkumavky.
- Na bakteriologické plotny s 2% MPA pipetovat 0,1 ml příslušných ředění fága, ihned po pipetování misku zalít obsahem jedné zkumavky, krouživým pohybem agar promíchat s pipetovanou kapkou a ve vodorovné poloze nechat utuhnout.
- Misky umístit dnem vzhůru do termostatu a kultivovat při 30 °C 12–24 hodin.



Zhodnocení cvičení

- Spočítat počet plak na miskách (obr. 20) s nejhodnějším ředěním (na misce okolo 20–200 plak). K miskám, na kterých je méně než 10 plak při hodnocení nepřihlízet. Výsledek je v jednotkách PFU/ml (plaques forming units, počet fágových částic schopných vytvářet plaky v 1 ml, nikoliv absolutní počet virionů).



Obr. 20: Plaky vzniklé vyšetím řady ředění (ředění 10^{-3} až 10^{-10}) fágového lyzátu (archiv autorky)

U ředění 10^{-3} došlo k lyzi veškerých buněk, naopak u ředění 10^{-10} k lyzi buněk nedošlo. Pro výpočet je nejvhodnější ředění 10^{-7} .

Příklad výpočtu: Na 3 miskách (0,1 ml vzorku ředění 10^{-5} /miska) se vytvořilo 122, 132, 139 plak, aritmetický průměr je 131 plak.

Titř lyzátu je $= 131 \cdot 10^5 = 1,31 \cdot 10^7$ v 0,1 ml, tedy $1,31 \cdot 10^8$ PFU/ml



Další informace k této problematice najdete v následující literatuře

- Eyer L., Pantůček, R., Růžičková V., Doškař J., Nové perspektivy fágové terapie, přehledový článek v *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství*, 2007.
- Skripta Praktikum z mikrobiologie
- Otradovcová L., Izolace a charakterizace mutant polyvalentního stafylokokového bakteriofága účinných proti methicilin-rezistentním kmenům *Staphylococcus aureus*, Diplomová práce, MU, Brno, 2012.



Kontrolní otázky

1. Čím se liší bakteriofágy od virů rostlin a živočichů?
2. Jaký je význam virů pro přenos genetické informace v prostředí?
3. Čím jsou viry prospěšné při terapii onemocnění?
4. Co je nutné mít pro kultivaci bakteriofága?
5. K čemu slouží CaCl_2 ?

7 Bakteriofág – transdukce



Cíl cvičení

Ověřit správný průběh transdukce přenesením rezistence k antibiotiku z donorových na recipientní bakteriální buňky.

Úvodní slovo

Transdukce je přenos genetického materiálu prostřednictvím viru z buňky donorové do buňky recipientní. Pomocí bakteriálních virů (též bakteriofágů či fágů) lze přenést jakýkoli fragment chromozomu z donorové bakteriální buňky do buňky recipientní, jedná se o horizontální výměnu genetické informace. Přenesený fragment pak rekombinuje s homologickým úsekem recipientní buňky, integruje se do jejího genomu, což se projeví v jejím fenotypu. Mechanismus přenosu není zcela objasněn, ale pravděpodobně jde o chybu při sbalování DNA do fágové hlavy během sestavování fágových částic v infikované buňce. Místo replikované fágové DNA je do fágové hlavy zabalena DNA donorové buňky, část chromozomu nebo plazmid, který může být přenesen fágem do recipientní buňky.

V literatuře je v současnosti popsáno více než 250 stafylokokových bakteriofágů. Schopnost transdukce mají pouze některé z nich, a to fágy náležící do sérologické skupiny B a příbuzné skupiny F. Za prototyp transdukujícího fága je považován fág $\phi 11$ sérologické skupiny B, který je schopen zabalit do své hlavy chromozomální nebo plazmidovou DNA až do velikosti svého genomu, t.j. 45 kb. Indukovat fága lze UV zářením nebo mitomycinem C z chromozomu kmene NCTC 8325, kde je integrován ve formě profága. Dalšími bakteriofágy s vysokou efektivitou transdukce jsou např. fágy 52A, 53 a 80.

V současnosti je u *Staphylococcus aureus* metoda transdukce využívána k cílenému vnášení mobilních genetických elementů do kmenů a k přípravě pozměněných variant kmenů, ke studiu horizontálního přenosu genů a k identifikaci přenášených genů.

Seznam přístrojů a mikroorganismů

Pomůcky a chemikálie

- MPA, MPB
- roztok CaCl_2 , citrát sodný
- tetracyklin
- centrifuga

Mikroorganismy

- Donorový kmen *Staphylococcus aureus* Jevons B (obsahuje 2 plazmidy, rezistence na kadmiu a tetracyklin)
- Recipientní kmen *Staphylococcus aureus* RN4220
- Transdukující fág JB CCM 7872

Postup

Příprava transdukujícího fágového lyzátu

- Očkovat donorový kmen (20 μ l zamražené kultury do 20 ml MPB) a inkubovat při 37 °C po dobu 18 hodin.
- Přenést 2 ml 18hodinové kultury do 50 ml čerstvého MPB v provzdušňovací láhvi a inkubovat při 37 °C po dobu 2 hodin za intenzivního provzdušňování.
- Přidat 6 ml lyzátu fága, roztok CaCl_2 do výsledné koncentrace 2 mM a inkubovat za stejných podmínek jako při 37 °C po dobu 2 hodin za intenzivního provzdušňování (zásobní roztok CaCl_2 o koncentraci 0,02 M, pro dosažení výsledné koncentrace přidat 1/10 objemu).
- Uskladnit lyzát přes noc v lednici (dokončení lyze, v případě úplné lyze bakteriální kultury bezprostředně po ukončení inkubace lze tento krok vynechat).
- Odstranit zbytky buněk donorového kmene centrifugací (5000 rpm / 30 minut) a filtrovat přes 0,45 μ m bakteriologický filtr.
- Stanovit titr fágových částic v lyzátu metodou dvouvrstvého agaru (pro výpočet frekvence transdukce).

Transdukce plazmidů

- Očkovat recipientní kmen (20 μ l zamražené kultury do 20 ml MPB) a inkubovat při 37 °C po dobu 18 hodin.
- Stanovit titr recipientního kmene (pro výpočet frekvence transdukce).
- Přidat roztok CaCl_2 ke kultuře recipientního kmene do výsledné koncentrace 2 mM (zásobní roztok CaCl_2 o koncentraci 0,02 M, pro dosažení výsledné koncentrace přidat 1/10 objemu).
- Smíchat 1 ml kultury recipienta s 1 ml transdukujícího fágového lyzátu tak, že hodnota multiplicity infekce (poměr počtu fágových částic k počtu buněk) bude max. 1.
- Inkubovat transdukční směsi při 37 °C po dobu 25 minut za stálého třepání.
- Přidat roztok citrátu sodného k transdukční směsi do výsledné koncentrace 15 mM, centrifugovat (3000 rpm / 10 minut / 4–8 °C) a resuspendovat pelet v roztoku 17 mM citrátu sodného. Objem pro resuspendaci závisí na počtu misek, na které se bude transdukční směs vysévat a na množství směsi vyseté na jednu misku, ideálně 100–300 μ l (roztok citrátu sodného se zásobní koncentrací 0,03 M - k transdukční směsi se přidá v poměru 1:1; roztok se zásobní koncentrací 0,017 M - pro resuspendaci peletu).
- Vyset transdukční směs na misky s MPA obohaceným o citrát sodný (20 mM) a tetracyklin, 5 μ g/ml (roztok citrátu sodného se zásobní koncentrací 1 M - do 100 ml rozvařeného sterilního média přidat 2 ml. Tetracyklin v zásobní koncentraci 5 mg/ml - do rozvařeného sterilního média přidat 1/1000 objemu).
- Inkubovat misky při 37 °C po dobu 24 hodin.
- Zjistit počet kolonií transduktant na miskách. Výpočet frekvence transdukce je podíl počtu transduktant (CFU/ml – colony-forming units/1 ml) k počtu fágových částic v transdukujícím lyzátu (PFU/ml – plaque-forming units/1 ml).



Zhodnocení cvičení

- Došlo k přenosu plazmidu?
- Jak jsme přenos ověřili?



Další informace k této problematice najdete v následující literatuře

- Rosypal S., Doškař J., Pantůček R., Kailerová J., Relichová J., Růžičková V., Šmarda J. ml., Šmarda J., Štěpán J., *Terminologie molekulární biologie*, MU Brno, 2001.
- Varga M., Charakterizace systému nespecifické transdukce plazmidů u *Staphylococcus aureus*. Dizertační práce, MU Brno, 2013.
- Varga M., Transdukce plazmidů zprostředkovaná profágy kmenů *Staphylococcus aureus*. Diplomová práce, MU Brno, 2009.



Kontrolní otázky

1. Co ověříme pomocí kontrol?
 - (a) Miska s antibiotiky + donorový kmen
 - (b) Miska s antibiotiky + recipientní kmen před transdukcí
 - (c) Miska bez antibiotik + recipientní kmen před transdukcí
2. Na jaké z kontrolních misek buňky narůst mají/nemají?
3. Co je transdukce?
4. Používají se pro transdukcí fágy s lytickým nebo lyzogenním cyklem? Proč?

8 Nepřímé stanovení počtu životaschopných bakterií plotnovou metodou



Cíl cvičení

Získání řady ředění kultury mikroorganismu. Stanovit počet životaschopných buněk.

Úvodní slovo

Pro stanovení počtu buněk ve vzorku se využívají přímé a nepřímé metody.

Mezi **přímé metody** patří stanovení počtu buněk pomocí mikroskopu, počítání samotných buněk v preparátu ze vzorku, bez kultivace. Výhodou je rychlost a stanovení počtu jak živých tak mrtvých buněk či jejich poměr, např. porovnáním poměru neobarvených živých buněk s počtem mrtvých, které se obarvují.

Mezi **nepřímé metody** patří metody kultivační. Kultivační části vzorku zjistíme počet životaschopných buněk, které vytvoří kolonie. Při některých fyziologických a genetických experimentech je nutné znát počet buněk ve vzorku. Počet buněk slouží jako standard pro porovnávání výsledků. Jednotkou výpočtu plotnové metody je počet životaschopných (na plotnách rostoucích) buněk v 1 ml média/vzorku, tzv. **colony forming units - CFU/ml**.

Plotnová metoda (kultivační nepřímá metoda) spočívá ve stanovení počtu narostlých kolonií za předpokladu, že každá buňka vytvoří jednu izolovanou kolonii. Plotnovou metodu lze provést dvěma způsoby, smícháním vzorku s tekutým temperovaným agarem nebo pipetováním vzorku na misku s agarem a rozetřením L-kličkou (obr. 21).



Obr. 21: Očkování suspenze buněk na misku - rozetření bakteriologickou L-kličkou (archiv autorem)

Nefelometrické stanovení využívá intenzity světla odraženého od buněk, stanovení optické denzity suspenze buněk. Výhodou této metody je stanovení kalibrační křivky, počet buněk lze odečíst z lineární části křivky. Při ředění vzorku a pipetování buněk do ředícího roztoku je třeba dát pozor na rozbití buněk osmotickým šokem. Podle hustoty výchozí suspenze se určí počet zkumavek ředící řady. Pokud se očekává $0-10^3$ CFU/ml, suspenze se jeví bez opalescence; při počtu 10^5 CFU/ml suspenze lehce opaleskuje; množství 10^7 až 10^9 CFU/ml vytváří mléčný zákal dle velikosti a tvaru buněk.

V protokolech bývá uvedeno, s jakým počtem buněk (CFU/ml) se pracovalo případně s jakým zákalem (%). Zákal je méně přesná hodnota, která slouží pro rychlou orientaci. Ve spektrofotometru lze měřit zákal média či ředícího roztoku, který obsahuje i mrtvé buňky. Pokud se při stejné metodě opakovaně pracuje za stejných podmínek se stejnou starou kulturou, tedy i stejným zákalem, lze předpokládat přibližně stejný počet živých a mrtvých buněk. V rámci daného expe-

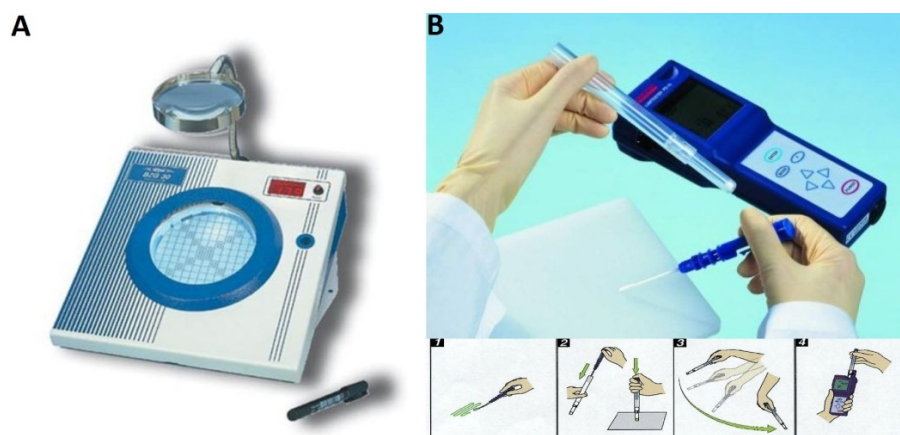
rimentu je při opakování metody hodnota extinkce víceméně konstantní.

Pro stanovení počtu buněk v různých prostředích je k dispozici řada metod, pro daný účel se volí metoda nejlépe vyhovující. Stanovení počtu mikroorganismů se provádí v daném objemu a přepočítává se obvykle na 1 ml původního vzorku. Těmito výsledky jsou pak korigovány získané výsledky experimentů.

Pomocí CFU/ml lze **sledovat přírůstek** buněk v čase. Pokud jsou během kultivace v tekutém médiu odebrány dobře promíchané vzorky, porovnáním počtu buněk v čase lze získat obraz o fyziologickém stavu kultury, o jejím prospívání či odumírání (účinky fyzikálních či chemických zásahů do rostoucí kultury, podpůrné či inhibující látky v potravinářství, v mikrobiálních technologiích atd.).

Grafickým vynesemím hodnot CFU/ml odebíraných ze vzorku v tekutém médiu (bez dodávání živin) po stejných časových intervalech lze sestavit **růstovou křivku** mikroorganismu v daném prostředí. Díky stanovení počtu buněk lze hodnotit **podíly jednotlivých skupin bakterií** smíšené kultury v jejich celkovém zastoupení. Lze porovnávat makroskopické znaky kultivovaných zástupců a pracovat na médiích základních i selektivních, případně selektivně diagnostických.

V praxi lze využít tzv. automatické počítáče kolonií (obr. 22A) nebo stěrovou a výplachovou metodu pomocí analyzátoru (obr. 22B). Přístroj Lumitester PD (obr. 22B) dokáže rychle určit celkový stupeň kontaminace ovšem bez rozlišení druhů a rodů mikroorganismů (měření luminescence). Tento přístroj se využívá např. v potravinářských provozech.



Obr. 22: Přístroje pro automatické počítání kolonií (A) a celkový stupeň kontaminace (B).
Zdroj: www.marconi.sk (A; upraveno), Qualifood.cz (B; upraveno)

Seznam přístrojů a mikroorganismů

Pomůcky a chemikálie

- Sterilní bakteriologické plotny s MPA
- Sterilní zkumavky, pipety, L-kličky
- Sterilní fosfátový pufr nebo fyziologický roztok

Mikroorganismy

- *Micrococcus luteus* CCM 169

Postup

Ředění kultury

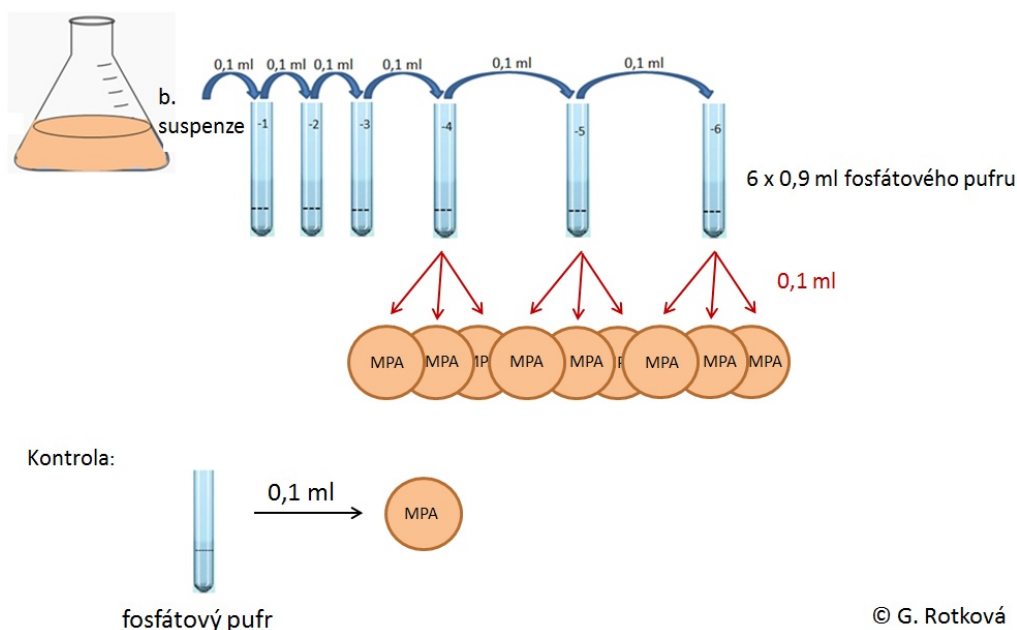
- Do sady sterilních zkumavek pipetovat po 0,9 ml sterilního fyziologického roztoku.
- Z dobře promíchaného vzorku s kulturou odebrat 0,1 ml suspenze a přenést do první zkumavky.
- Promíchat čistou špičkou obsah první zkumavky (celkový objem 1 ml), odebrat 0,1 ml a přenést do další zkumavky.
- Promíchat obsah druhé zkumavky a 0,1 ml přenést do třetí zkumavky. Takto pokračovat až na konec ředící řady (Obr. 23).

Očkování

- Popsat Petriho misky s MPA na víčko (kolonie se budou počítat tečkováním dna misky popisovačem).
- Ze zkumavek s ředěním 10^{-4} až 10^{-6} pipetovat 0,1 ml suspenze do misky. Pro každé ředění používat minimálně dvě misky, lépe tři, pro vytvoření průměru z ředění.
- Pipetovaný objem rozetřít sterilní L-kličkou krouživým pohybem po celém agar, dnem misky otáčet proti pohybu roztírání, netlačit na L-kličku. Při pipetování a roztírání otvírat misky co nejméně. Vzorek rozetřít rovnoměrně, aby kolonie narostly izolovaně.
- Misky kultivovat dnem vzhůru 2–3 dny při 30 °C.

Kontrola sterility ředícího roztoku

- Ze zásobního fyziologického roztoku odebrat 0,1 ml, pipetovat na misku a rozetřít sterilní čistou L-kličkou. Kultivovat dnem vzhůru 2–3 dny při 30 °C.



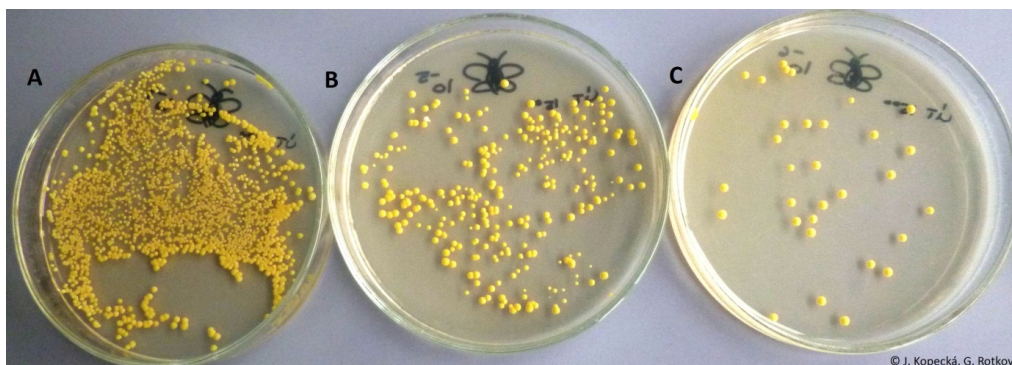
Obr. 23: Schéma postupu plotnové metody (archiv autorské)

Hodnocení

K hodnocení vybrat dvojici (trojici) misek vhodného ředění (obr. 24, misky se zhruba 20–200 koloniemi) a spočítat počet kolonií. Kolonie počítat ze dna misky a označit popisovačem na sklo tečkou. Ze získaných hodnot vypočítat průměr, číslo vynásobit kladnou hodnotou ředění a hodnotou 10 (na misku se nanášelo 0,1 ml, výsledek je přepočítaný na 1 ml). Získaný údaj je hodnota **CFU/ml** (colony forming units, počet bakterií schopných vytvořit kolonii/ml).

$\text{CFU/ml} = \text{průměrný počet kolonií} \cdot \text{hodnota ředění (kladný exponent)} \cdot 10$

Správný formát výsledku je např. $2,4 \cdot 10^4$ CFU/ml, nikoli $24 \cdot 10^3$ CFU/ml.



Obr. 24: Plotnová metoda. Vhodné ředění pro počítání kolonií je v tomto případě ředění 10^{-6} (C), ředění 10^{-4} (A) a 10^{-5} (B) obsahuje příliš vysoký počet kolonií (archiv autorek)



Zhodnocení cvičení

- Které ředění při odečítání výsledků (počtu kolonií) bylo nejvhodnější?
- Jaký byl počet (CFU/ml) buněk v původním vzorku? Probíhala práce asepticky? Pokud ne, proč?
- Byl zaznamenán velký rozdíl v počtu kolonií mezi miskami jednoho ředění (nesprávně promíchaný vzorek)?
- Došlo k nárůstu bakterií na kontrolních miskách s rozetřeným pufrem?
- Mohla kontaminace ovlivnit celkový počet CFU/ml, proč (morfotyp kolonií)?
- Byl vzorek dobře počítatelný (špatně rozetřený vzorek)?



Další informace k této problematice najdete v následující literatuře

- Klaban V., *Ilustrovaný mikrobiologický slovník*, Galén, Praha, 2005, ISBN 80-7262-341-9.



Kontrolní otázky

1. Jaký je výpočet CFU/ml u plotnové metody, co znamenají jednotlivé členy vzorce?
2. Plotnovou metodu jsme prováděli na neselektivním médiu a pracovali jsme s čistou kulturou. Kdy se využívá plotnová metoda na selektivních médiích?
3. Pokud bychom při plotnové metodě místo kultury mikrokoka použili např. rybníční vodu. Stanovíme CFU/ml, jak a proč se bude lišit morfologie narostlých kolonií od nárůstu ředěné kultury mikrokoka? Budou kolonie rybníční vody také jediného morfologického typu?
4. Podle čeho zvažujeme množství zkumavek s pufrem (délku ředící řady) plotnové metody, kdy stačí využít jednu či dvě zkumavky a kdy je potřeba mnohem vyššího počtu?
5. Jaká jednotka se používá pro výpočet nárůstu při použití plotnové metody?
6. Proč a jak se při plotnové metodě provádí kontrola ředícího roztoku?
7. Co znamená zkratka CFU/ml a co vyjadřuje?
8. Proč se při plotnové metodě neočkuje bakteriologickou kličkou?
9. Vypočtete CFU/ml, pokud byl stanoven počet kolonií 210 a 190 v ředění 10^{-6} . Do 0,9 ml pufru v první zkumavce se pipetovalo 0,1 ml kultury.
10. Popište podstatu plotnové metody.
11. Jaký je rozdíl mezi přímým a nepřímým stanovením počtu buněk?
12. Proč je nutno promíchat zásobní vzorek a dále dobře promíchávat obsah zkumavek ředící řady?
13. Jak poznáme kontaminaci ředícího roztoku?
14. Proč se na misku při plotnové metodě neroztírá např. 1 ml vzorku?
15. Podle čeho odvodíte vhodný typ kultivačního média pro plotnovou metodu?

9 Přímé stanovení počtu buněk v Bürkerově komůrce, vitální test, kvasinky



Cíl cvičení

Stanovit procento přežívajících buněk v závislosti na době inkubace při zvýšené teplotě.

Úvodní slovo

Pro stanovení počtu buněk ve vzorku se využívají přímé a nepřímé metody. Mezi **nepřímé metody** patří metody kultivační. Mezi **přímé metody** patří stanovení počtu buněk pomocí mikroskopu, počítání samotných buněk v preparátu ze vzorku, bez kultivace. Výhodou je rychlost a stanovení počtu jak živých tak mrtvých buněk či jejich poměr.

Pro počítání buněk v preparátu je třeba mít suspenzi s vhodnou hustotou buněk. Pro odlišení živých a mrtvých buněk se využívají barvené preparáty. Buňky se mohou spočítat i pomocí fixovaného barveného preparátu či preparát nebarveného, živé a mrtvé buňky se ale neodliší. Pro přímé stanovení se používají počítací komůrky, např. Thomova, Bürkerova (obr. 25), což je skleněná destička s počítací mřížkou různé velikosti. Prostor mezi podložním a krycím sklíčkem je na komůrce vždy vyznačen. Pracuje se s určitým objemem vzorku, ze známého objemu se dopočítává objem vzorku pro 1 ml. Po nakápnutí promíchaného vzorku na mřížku se buňky usadí na dně a mikroskopicky lze stanovit počet buněk na daných ploškách sítě.



Obr. 25: Bürkerova počítací komůrka (archiv A. Vávrové)

Vitální test (barvení nativního preparátu) slouží ke zjištění okamžitého stavu populace sledovaných buněk. Je založen na propustnosti membrány mrtvých buněk. Cytoplazmatická membrána mrtvých buněk není semipermeabilní, barvivo se dostává dovnitř. Živé buňky se naopak průniku barviva „brání“ svými kanálky v membráně; barvivo nepropustí nebo ho odbourají. K barvení mrtvých buněk v prostředí buněk živých se využívá netoxických barviv, např. roztok metylenové modři zředěný a pufovaný fosfátem s pH 4,6. Pomocí vitálního testu lze sledovat např. působení zvýšené teploty na přežívání buněk v čase. Výhodou testu je rychlost, nízká spotřeba materiálu oproti plotnové metodě a možnost rozlišení poměru živých a mrtvých buněk. Nevýhodou je, že sledované buňky nelze dále kultivovat.

Vitální test se využívá v praxi při kontrole životaschopnosti mikroorganismů během technologických procesů. Sleduje se jejich odpověď (změna počtu či poměru) na přídavek či úbytek různých látek či na probíhající fyzikální proces. Z výsledků testu vitality lze okamžitě rozhodovat o zasažení do technologického procesu během kultivace buněk.

Seznam přístrojů a mikroorganismů

Pomůcky a chemikálie

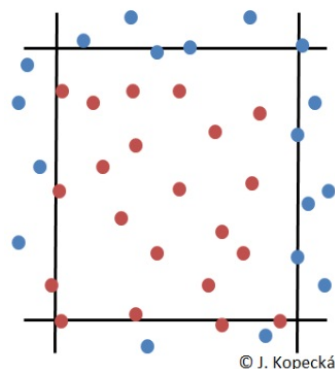
- Erlenmeyerova baňka, zkumavky, pipety, kapátko
- Sterilní destilovaná voda
- Vodní lázeň, teploměr, mikroskop
- Bürkerova komůrka
- Metylenová modř

Mikroorganismy

- Kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, pekařské droždí

Postup

- Připravit suspenzi kvasinkových buněk z pekařského droždí či z nárůstu sbírkové kultury ve sterilní destilované vodě v baňce.
- Pipetovat po 1 ml suspenze do 4 zkumavek.
- První zkumavku zpracovat jako kontrolní vzorek pro zjištění počtu živých buněk při pokojové teplotě při začátku pokusu (0 minut).
- Stanovit počet živých a mrtvých buněk. Do prohlubně Bürkerovy komůrky nanést kapku suspenze a zakrýt krycím sklem. K okraji krycího sklíčka přikápnout metylenovou modř, na opačné straně ji odsát filtračním papírem, až je celý preparát zbarven modře.
- Po usazení buněk (1–2 minuty) pozorovat a spočítat živé (neobarvené) a mrtvé (modré) buňky při zvětšení 400×.
- Pro každý čas spočítat buňky v min. 10 čtvercích. Do součtu zahrnout i buňky ležící na 2 hranách políčka (buď pravá a horní nebo levá a spodní hrana, obr. 26)

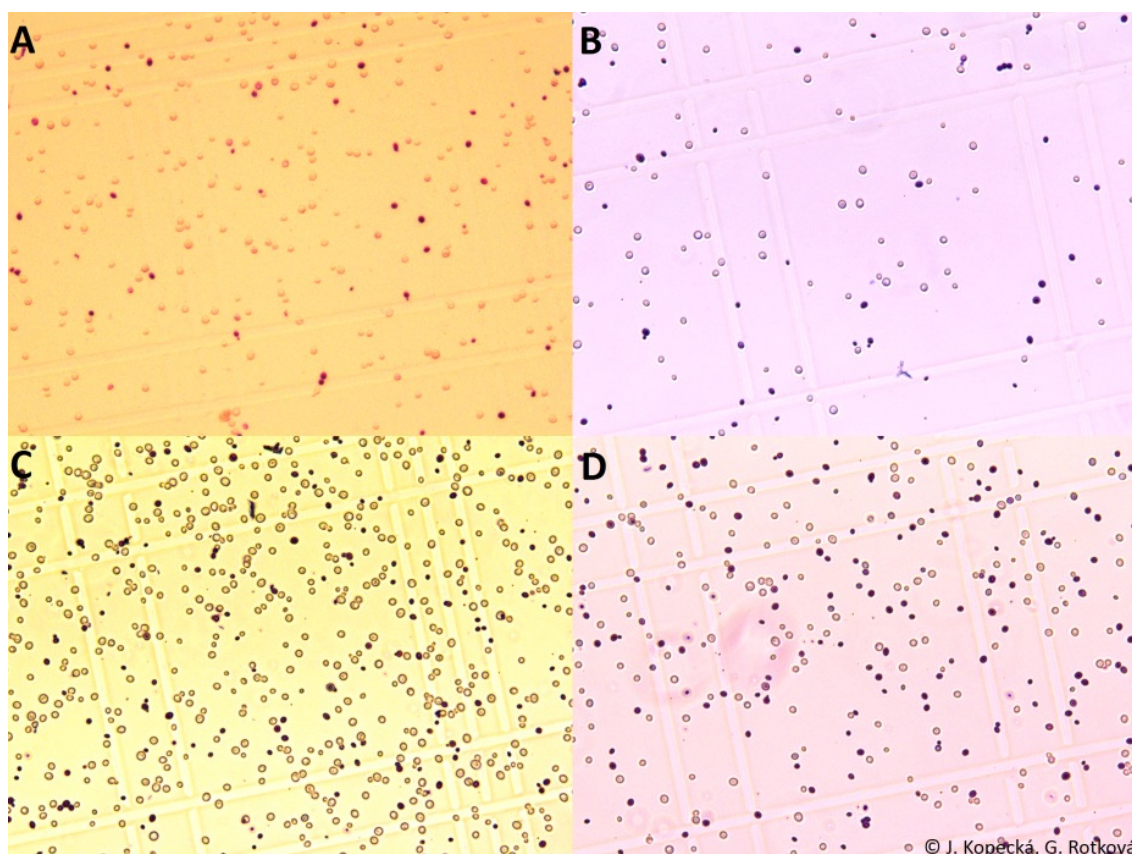


Obr. 26: Počítání buněk při vitálním testu. Červeně jsou znázorněny buňky, které se započítávají do celkového počtu buněk v políčku (archiv autorem)

- Zbylé zkumavky umístit do vodní lázně o teplotě 61 °C. Stanovit počet živých a mrtvých buněk po 7, 14 a 21 minutách (obr. 27) postupem popsáním výše.
- Dle vzorce vypočítat celkový počet buněk (mrtvé + živé).

$$\text{celkový počet buněk/ml} = \frac{\text{součet živých a mrtvých buněk}}{10 \times \text{počet políček}} \times 250 \times 1000$$

- V MS Excel sestavit graf závislosti přežívajících buněk na délce vystavení zvýšené teplotě (osa x, % přežívajících buněk; osa y, čas).



Obr. 27: Obarvené buňky při vitálním testu v čase 0 (A), 7 (B), 14 (C) a 21 minut (D) (archiv autorek)



Zhodnocení cvičení

- Docházelo k plynulému úbytku buněk?
- Byly dobře rozeznatelné mrtvé a živé buňky?
- V jakém čase se projevil znatelný úbytek buněk?



Další informace k této problematice najdete v následující literatuře

- Klaban V., *Ilustrovaný mikrobiologický slovník*, Galén, Praha, 2005, ISBN 80-7262-341-9.



Kontrolní otázky

1. Jaký je princip vitálního testu?
2. Jak lze zjistit aktuální stav populace s ohledem na poměr živých a mrtvých buněk?

10 AP-test (test acidifikační schopnosti)



Cíl cvičení

Stanovení fyziologického stavu kvasinek pomocí AP-testu.

Úvodní slovo

Jedním z faktorů ovlivňujících zásadním způsobem kvalitu konečného produktu při výrobě piva je fyziologický stav a metabolická kompetence násadních kvasinek. Viabilita (tj. životaschopnost, kterou lze vyjádřit jako poměr počtu živých buněk k jejich celkovému počtu v kultuře) a vitalita (fermentační a obecně metabolická schopnost buněk) kvasinek hrají při výrobě piva důležitou úlohu. Vitalita se snižuje u buněk stárnoucích či starých nebo buněk vystavených stresu. Nové druhy stresu mohou vznikat např. při zavádění moderních technologií (vysoký hydrostatický tlak v cylindrokónických tancích) nebo nových surovin.

Na stanovení viability a vitality kvasinek byla vyvinuta řada metod, které lze rozdělit na metody založené na vitálním barvení, stanovení reprodukční schopnosti buněk, měření obsahu důležitých látek, stanovení aktivity důležitých enzymů, stanovení metabolické rychlosti buněk, stanovení energetického stavu buněk. Tyto metody mají své výhody i omezení a optimální stanovení „kondice“ buněk násadních kvasinek jak během propagace, tak během fermentace a skladování, a především předpověď jejich chování během následujících fermentací zahrnuje současné použití několika technik. To vyžaduje pestré a často poměrně nákladné přístrojové vybavení.

AP-test se používá ke stanovení metabolické kompetence pivovarských kvasinek opakovaně nasazovaných v provozu, je založen na znalosti řady membránových pochodů probíhajících v kvasinkách metabolizujících endogenní i exogenní substráty. Hlavní pochod podílející se na acidifikační schopnosti kvasinek, tj. činnost H^+ -ATPázy, závisí nejen na stavu buněk (čerstvé buňky, buňky po skladování, praní atd.), ale velmi silně i na růstové fázi. Během diauxického přechodu a těsně po něm se aktivita H^+ -ATPázy u *S. cerevisiae* prudce snižuje a zůstává nízká během post-diauxické a stacionární fáze. To souvisí s přechodem buněk na energeticky úsporný režim, při němž je minimalizován provoz energeticky náročných pochodů zahrnujících vysokou spotřebu ATP.

Principem AP-testu je měření změny pH prostředí vyvolané kvasinkami. Při testu se 10 minut měří změna pH extracelulárního prostředí, poté se k suspenzi přidá glukóza a měří se dalších 10 minut. Po přidání cukru pH kvasničné suspenze výrazně klesne. Pokles pH je způsoben vznikem elektrochemického gradientu protonů přes plazmatickou membránu při absorpci živin. Gradient pH vytváří membránová ATPáza. Kromě ATPázy se na acidifikační schopnosti podílí i vylučování metabolických produktů, převážně slabých kyselin do prostředí. Při nedostatku metabolizovatelného cukru kvasinka pro udržení poměru extracelulárního a intracelulárního pH využívá energii zásobních polysacharidů, glykogenu a trehalózy. Za přítomnosti cukru v prostředí využívá kvasinka k udržení homeostáze jak endogenní, tak exogenní metabolismus.

Změna pH v prvních 10 minutách po přidání kvasinek do vody (v nepřítomnosti vnějšího zdroje glukózy) se nazývá spontánní acidifikační schopnost, která vyjadřuje růstovou schopnost kvasinek a souvisí s obsahem zásobních polysacharidů v buňce.

Za 10 minut od přidání cukru do roztoku se měří další pokles pH. Glukózou indukovaná acidifikační schopnost značí aktivitu kvasinek při kvašení a rychlost glykolýzy. Základem reprodukovatelnosti výsledků je přesné měření pH a velmi dobrá kalibrace pH metru. Při dodržení nastavení pH metru neovlivní výsledky ani kolísání v navázce kvasnic o $\pm 11\%$. Proto není nutné dodatečné stanovení sušiny.

Seznam přístrojů a mikroorganismů

Pomůcky a chemikálie

- destilovaná voda, centrifuga, pH metr, elektromagnetické míchadlo, roztok glukózy (50 %)

Mikroorganismy

- Kvasnice: sušené lisované či vážené pekařské kvasnice, pivovarské kvasinky

Postup

Modifikace AP-testu dle Hollerové a kol., 2005

- Navážít $9 \pm 0,1$ g pekařských kvasnic, přidat je do 50 ml vychlazené destilované vody a promýt.
- Centrifugovat suspenzi (3000 x g/10 minut), promýt. Opakovat 2x.
- Resuspendovat kvasnice v 50 ml destilované vody o pokojové teplotě.
- V tuto chvíli začíná měření pH (ponořit pH metr do roztoku) – **čas 0 (pH₀)**.
- Vzorek míchat pomocí elektromagnetického míchadla.
- Po 10 minutách přidat 5 ml glukózy (50 % roztok) a **zapsat hodnotu pH (pH₁₀)**.
- Odečíst hodnotu **pH ve 20. minutě (pH₂₀)**.

Výpočet hodnoty AP

Veličina AP₁₀ odpovídá výsledku spontánní acidifikace před přidáním glukózy, vypočítá se z hodnoty pH v 10. minutě měření (pH₁₀):

$$AP_{10} = 6,3 - pH_{10}$$

kde 6,3 je hodnota pK systému CO₂/HCO₃⁻, přibližně rovna vnitrobuněčnému pH.

Veličina AP₂₀ odpovídá výsledku glukózou indukované acidifikace. Vypočítá se z hodnoty pH ve 20. minutě (pH₂₀):

$$AP_{20} = 6,3 - pH_{20}$$

Výsledná hodnota AP₂₀ odráží fyziologický stav buněk:



Zhodnocení cvičení

- V jakém fyziologickém stavu byly používané kvasnice?
- Jaký byl výsledek vitálního barvení ve srovnání s AP testem?



Další informace k této problematice najdete v následující literatuře

- Gabriel P., Dienstbier M., Matoulková D., Kosář K., Sigler K., Optimised acidification power test of yeast vitality and its use in brewing practice. *J. Inst. Brew.*, 2008, 114: 270–276.
- Hollerová, I. a kol., Vitalita a viabilita násadních kvasnic: metody posuzování a vliv buněčných systémů pro stresovou resistenci. *Kvasny Prum.*, 2005, 51:3-7.
- Košin P., Šavel J., Kolouchová I., Brož A., Viabilita a vitalita kvasnic v provozním kvašení. *Kvasny Prum.*, 2007, 53: 30-34.
- Sigler K., Matoulková D., Stress responses in brewing yeast. *Kvasny Prum.*, 2011, 57:277-284.
- Šavel J., Měření aktivity pivovarských kvasinek. *Kvasny Prum.*, 1999, 45:258-261.



Kontrolní otázky

1. Jaké metody pro testování stavu kvasinky znáte?
2. Jsou kvasinky, které rychle využívají přidanou glukózu při AP testu, vhodné pro použití v technologickém procesu?
3. Jsou kvasinky, které pomalu využívají přidanou glukózu při AP testu, vhodné pro použití v technologickém procesu?
4. Jaká aktivita kvasinek se hodnotí (hodnoty pH) v 10. a 20. minutě? Je mezi nimi rozdíl?

11 Fyzikální a chemické prostředky kontroly růstu mikroorganismů



Cíl cvičení

Testování účinku vybraných fyzikálních a chemických prostředků pro kontrolu růstu mikroorganismů v závislosti na době kontaktu a koncentraci (UV záření, dezinfekční látky: SAVO, Incidur a Ajatin).

Úvodní slovo

Faktory vnějšího prostředí mohou na mikroorganismy působit **mikrobicidně**, což je nevratný inhibiční účinek s letálním koncem, nebo **mikrobistaticky**, kdy je účinek reverzibilní a po odeznění faktoru, který změnu vyvolal (např. vyředění na minimální koncentraci), buňky pokračují v růstu.

Inhibiční účinek faktorů je závislý na povaze a intenzitě působení, ale i na fyziologickém stavu buňky (stáří) a prostředí, ve kterém se nachází. Buňky ve vegetativní formě jsou citlivější než klidové formy, endospory, myxospory a cysty. Citlivost je ovlivněna složením buňky a buněčné stěny a rodovou, případně druhovou příslušností organismu. Organismy, které vytváří pigmenty, jsou např. lépe chráněny proti UV záření, záření je odráženo a pohlcováno barvivem (možné srovnání s tmavými slunečními brýlemi). Barviva v pigmentech pohlcují určitou vlnovou délku světla, která může být využita jako energie pro syntézu živin a další mechanismy důležité pro život.

Dekontaminace je odstranění mikrobiální, chemické a radioaktivní kontaminace z předmětů. Může být zabezpečena různým způsobem a tomu odpovídá též dosažený efekt. Prostý úklid, mytí nebo praní a zehlení snižuje výskyt mikroorganismů až o 90 %.

Antiseptice je zneškodňování choroboplodných zárodků v prostředí živých tkání, v ranách, na sliznicích a na kůži s použitím antiseptik. Je namířena hlavně proti mikrobům vyvolávajícím hnisání. U antiseptik není striktní požadavek na baktericidní účinek, stačí bakteriostatické působení. Antiseptika musí splňovat požadavek nejedovatosti a dobré snášenlivosti živými tkáněmi, podléhají schválení jako každý jiný lék. U antiseptik není nutná dobrá rozpustnost ve vodě.

Asepsy je souhrn opatření vedoucích ke stavu, kdy je v prostředí minimum mikroorganismů. Asepsy brání přístupu mikroorganismů k živým tkáním při chirurgických operacích používáním sterilních nástrojů, obvazových látek, šicího materiálu, pryžových rukavic, přípravou operačního pole, dezinfekcí chirurgových rukou, používáním ústenek apod. Pojem asepsy zahrnuje také laboratorní a výrobní metody, u nichž je snaha zabránit mikrobiální kontaminaci např. u mikrobiologických laboratorních prací a při výrobě některých léků.

Dezinfekce je definována jako ničení či zneškodňování kontaminujících mikroorganismů na neživých předmětech, ve vnějším prostředí (ve vodě, ve vzduchu) a v infekčním materiálu. Zahrnuje širokou paletu účinnosti proti virům, vegetativním formám bakterií a hub, ne však proti endosporám. Účinnost dezinfekce je závislá na rezistenci mikroorganismů vůči dezinfekčním prostředkům.

Sterilizace je zbavení prostředí všech živých organismů, včetně virů, bakterií, bakteriálních endo- i exospor, mikroskopických hub a jejich exospor. Sterilizace je v praxi zatížena určitou pravděpodobností selhání. Předmět může být považován za sterilní, je-li možno prokázat, že pravděpodobnost přítomnosti mikrobů je nejvýše 10^{-6} .

Fyzikální metody sterilizace

Mezi sterilizaci **vlhkým teplem** patří frakcionovaná sterilizace, tyndalizace a sterilizace nasycenou vodní parou.

Přerušovaná, **frakcionovaná sterilizace** je sterilizace varem (100 °C) působícím po dobu 30 minut v 18-24 hodinových intervalech 3 dny po sobě. Sterilizovaná látka musí být v mezidobí uložena při pokojové teplotě, aby termorezistentní endospory, které var přežily, mohly vyklíčit. Následující var je pak ničící jako vegetativní formy bakterií.

Tyndalizace se používá ke sterilizaci termolabilních roztoků bílkovin, které koagulují již při teplotě 60 °C. Postup je podobný jako při frakcionované sterilizaci. Roztok se zahřívá ve vodní lázni při 56–58 °C (resp. při 60–80 °C) po 30–60 minut 3 dny po sobě.

Sterilizace nasycenou vodní parou pod tlakem (v autoklávu) se provádí nejčastěji za přetlaku 100 kPa při teplotě 120 °C po dobu 20-30 minut. Tento způsob sterilizace umožňuje zničit bezpečně všechny formy mikroorganismů. Autokláv je tlakový sterilizátor opatřený vodoznakem pro stav vody ve vyvíječi páry (pokud není přímo napojen na přívod páry z centrálního zdroje). Je vybaven pojistným ventilem, dvěma manometry (jeden k měření přetlaku páry ve vyvíječi, druhý v pracovním prostoru), odvzdušňovacím ventilem, vodní vývěvou a teploměrem. Dokonalé odvzdušnění pracovního prostoru na začátku sterilizace je předpokladem úspěšného autoklávování (směs páry se vzduchem při 120 °C a 30 minutové expozici nemá spolehlivý sterilizační efekt). V autoklávu lze sterilizovat obvazový materiál, operační prádlo, různé roztoky, kovové lékařské nástroje, pryžový materiál. Při sterilizaci bakteriologických půd je třeba dát pozor na možnost hydrolyzy disacharidů a poškození termolabilních látek. Textilní materiál se ukládá do sterilizačních bubnů, které se vkládají do autoklávu otevřené a po skončení sterilizace jsou ihned uzavřeny. Materiál uzavřený v bubnu se považuje za sterilní jen dva dny po sterilizaci. Potom je nutno buben znovu sterilizovat, i když nebyl otevřen.

Suché teplo je méně účinné než pára pod tlakem. Má nižší koeficient vodivosti, sterilizace probíhá při vyšší teplotě a po delší expoziční dobu. Otevřený plamen se používá při žíhání bakteriologické kličky, k likvidaci pokusných zvířat a některých předmětů malé hmotnosti, např. kontaminovaných obvazů.

Horkovzdušná sterilizace skla, porcelánu a kovů se provádí v horkovzdušných sterilizátorech. Doba vlastní sterilizace se počítá od okamžiku dosažení předepsaných teplot. V přístrojích s nucenou cirkulací vzduchu se sterilizuje obvykle buď při 160 °C 60 minut nebo při 180 °C 20 minut.

Sterilizace filtrací slouží k odstraňování mikroorganismů z tekutin tam, kde je jiný způsob dekontaminace nevhodný. Viry procházejí většinou bakteriálních filtrů. Filtry se liší dle konstrukce, velikosti pórů a použitého materiálu. Azbestové Seitzovy filtry jsou lisované z azbestu a celulózy. Filtry zadržující bakterie jsou označeny EK (Entkeimung). Filtrační vložky jsou jednoúčelové a sterilizují se i s filtračními nálevkami v autoklávu. Skleněné jenské filtry jsou z borosilikátového skla ve formě porézních destiček zatavených v nálevkách. Používají se opakovaně. Po použití se čistí koncentrovanou kyselinou sírovou nebo chromsírovou a důkladně se promývají vodou. Sterilizují se horkým vzduchem nebo v autoklávu. Membránové ultrafiltry z nitrocelulózy s různou velikostí pórů a průměru se u nás vyrábějí pod názvem Synpor. Vkládají se do speciálních kovových bubínků a sterilizují se v autoklávu. Filtrace se provádí za použití podtlaku pomocí vývěvy.

Sterilizace zářením se provádí pomocí UV nebo ionizujícího záření.

Ultrafialové záření (UV) má optimální baktericidní účinek při vlnové délce okolo 254 nm, kdy je záření maximálně absorbováno nukleovými kyselinami. Jako zářiče se používají obvykle germicidní lampy. UV záření slouží k dekontaminaci vzduchu a pracovních ploch přímo vystavených paprskům. Používá se k vyzářování operačních sálů, aseptických boxů, piteven, odběrových místností v léčebnách tuberkulózy apod. Vyzáření nemůže nahradit úklid pomocí dezinfekčních prostředků. Účinnost UV klesá se vzdáleností ozařovaného objektu.

Ionizující záření penetruje, ale nezahřívá sterilizovaný předmět a nemění vlastnosti většiny sterilizovaných látek. Zdrojem gama záření v praxi je obvykle radioaktivní kobalt. Gama záření se

používá k průmyslové sterilizaci (obvazový materiál, plasty). Mezinárodně stanovená sterilizační dávka je 27 kGy.

Chemické prostředky dezinfekce

Vzorkování a mikrobiologické vyšetření používaných dezinfekčních roztoků se testuje na standardních kmenech mikroorganismů. Výsledky se odborně interpretují s ohledem na specifické důvody prováděné kontroly. Ve zdravotnických zařízeních se odebírají vzorky nařazených používaných dezinfekčních roztoků, a co nejrychleji se transportují do mikrobiologické laboratoře ke stanovení jejich účinnosti na kontrolních kmenech, případně účinnosti na mikroby izolované na konkrétním zdravotnickém pracovišti.

Dezinfekční účinnost může být baktericidní, bakteriostatická, fungicidní (vláknité a kvasinkovité houby), fungistatická, tuberkulocidní, mykobaktericidní, sporicidní, sporistatická, virucidní (obalené a neobalené viry). Testování lze přizpůsobit podmínkám čistého, špinavého, vysoce nebo málo znečištěného prostředí. Specifický účinek chemických látek na mikroorganismy se projevuje v závislosti na jejich koncentraci a době působení (expozice).

Kritéria kvality dezinfekčních prostředků pro volbu jejich použití: široké spektrum účinku (baktericidní, virucidní i fungicidní účinek zároveň), při trvalém používání nevzniká rezistence, netoxické, rychlý dezinfekční účinek, afinita k mikroorganismům, k dezinfikovanému předmětu jsou inertní, stálý dezinfekční účinek za různých změn vnějších podmínek (teplota, vlhkost vzduchu, pH).

Antimikrobní látky nejčastěji přímo poškozují strukturu mikroorganismů nebo narušují jejich základní metabolické procesy např. oxidací (sloučeniny chlóru, peroxidy, peroxid kyseliny), redukcí (aldehydy), hydrolýzou (kyseliny, louhy), dehydratací (alkoholy), koagulací bílkovin (alkoholy, fenoly), změnou permeability (detergenční látky).

Zásady a kyseliny

Silně anorganické kyseliny a zásady se pro své toxické a agresivní účinky používají v praxi zřídka. Např. vápenné mléko, kyselina boritá, kyselina peroctová, persteril (32–36% roztok kyseliny peroctové s 10% H₂O₂ a 1% H₂SO₄)

Oxidační prostředky

peroxid vodíku, manganistan draselný

Sloučeniny halogenů

chlorové vápno, Chloramin B, Dikonit

Jód a jeho sloučeniny

jódová tinktura, jodofory, Jodonal B, Jodisol

Sloučeniny těžkých kovů

Famosept, Merfen, Merthiolát, Thiomersal

Alkoholy

etanol, *n*-propanol, etylenoxid

Aldehydy

formaldehyd, formalin, glutaraldehyd

Fenolové deriváty

krezoly, Lysol, Orthosan BF 12

Povrchové aktivní látky

Ajatin, Septonex, Ophthalmol-Septonex

Ke kontrole účinnosti dezinfekce a sterilizace se používá řada testů podle povahy sterilizované látky a způsobu provádění sterilizace nebo dezinfekce, např. papírové indikátory nebo bioindikátory, stěry sterilním vatovým tampónem.

Seznam přístrojů a mikroorganismů

Pomůcky a chemikálie

- Petriho misky s MPA, zkumavky s 10 ml MPB
- sterilní vatové tyčinky, zkumavky, pinzety a destilovaná voda
- papír, alobal, pipety
- UV lampa
- dezinfekční činidla (Savo, Incidur, Ajatin)

Mikroorganismy

- *Pseudomonas fluorescens* CCM 2115T
- *Staphylococcus aureus* SA 812
- *Escherichia coli* CCM 3954
- *Saccharomyces cerevisiae*
- *Serratia marcescens* CCM 303
- *Bacillus cereus* CCM 2010

Postup

Vliv doby působení UV záření na růst mikroorganismů

- Pomocí vatové tyčinky pečlivě rozetřít mikrobiální kulturu po celém povrchu agaru v dostatečném množství a hustotě (3 skleněné misky s MPA).
- Misky rozdělit popisovačem zespodu na poloviny, umístit do boxu s UV lampou a odklopit víčko. Polovinu každé misky zakrýt alobalem.
- První misku ozařovat 10 sekund, druhou 30 sekund a poslední 60 sekund.
- Po ozaření misky zakrýt víčkem a inkubovat dnem vzhůru 24 hodin při 30 °C.

Hodnocení: Prohlédnout agarové plotny, výsledky zaznamenat. Zhodnotit vliv UV záření na růst mikroorganismu podle jeho délky účinku. Zhodnotit i růst v zakryté části agarové plotny (kontrola). Při jaké době ozařování je znatelný úbytek kultury? Byly mikroorganismy ovlivněny UV zářením? Závisel tento vliv na druhu mikroorganismu a na době expozice?

Vliv doby kontaktu na růst mikroorganismů

- Do sterilní zkumavky připravit dezinfekční prostředek v koncentraci doporučené na obalu výrobcem
 - Incidur: 0,5% roztok, celkový objem 5 ml, 25 μ l prostředku a 4,975 ml vody
 - Savo: 100 ml do 3 l, tj. 3,33% roztok, do 4,833 ml pipetovat 166,7 μ l Sava
 - Ajatin: 1% roztok
- Misku s MPA rozdělit na 3 sektory, které označíme 0; 1 a 10 minut.
- Do sektoru 0 naočkovat kulturu vatovou tyčinkou „hádkiem“ (kontrola).
- Do zkumavky s dezinfekčním prostředkem přidat 500 μ l kultury a protřepat.
- Ze zkumavky po 1 a 10 minutách očkovat „hádkiem“ vatovou tyčinkou do odpovídajících sektorů na misce.
- Inkubovat 24 hodin při 37 °C.

Hodnocení: Prohlédnout agarové plotny, výsledky zaznamenat. Zhodnotit vliv doby působení dezinfekční látky na růst bakterie. Porovnat hustotu nárůstu. Má doba působení dezinfekční látky vliv na růst mikroorganismu?

Vliv koncentrace na růst mikroorganismů, stanovení minimální inhibiční koncentrace

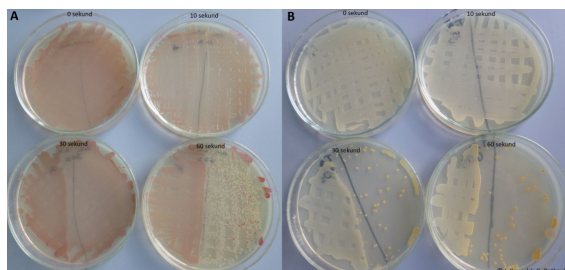
- Sterilní zkumavky označit čísly 1 až 6.
- Do první zkumavky připravit 2% roztok Inciduru nebo 3% roztok Sava v MPB do celkového objemu 2 ml (40 μ l Inciduru doplnit 1,960 ml MPB; 60 μ l Sava doplnit 1,940 ml MPB).
- Do dalších 5 zkumavek pipetovat 1 ml MPB.
- Z první zkumavky odebrat 1 ml roztoku, pipetovat ho do druhé zkumavky a promíchat.
- Postupovat obdobně až k předposlední zkumavce (zkumavka 5), z ní 1 ml odebrat a vypustit do odpadní nádoby.
- Poslední zkumavka (6) neobsahuje žádný dezinfekční prostředek (kontrola růstu). Zkumavky 1 až 5 obsahují 1 ml roztoku dezinfekčního činidla s klesající koncentrací v MPB. Koncentrace prostředku v každé následující zkumavce je poloviční ve srovnání s předcházející zkumavkou.
- Do každé zkumavky naočkovat 50 μ l kultury. Inkubovat 24 hodin při 37 °C.

Hodnocení: porovnat růst v různých koncentracích dezinfekční látky. Která koncentrace je dostatečná k inaktivaci dané kultury? Je ovlivněna minimální inhibiční koncentrace dezinfekce podle bakteriálního druhu a podle použité dezinfekce?

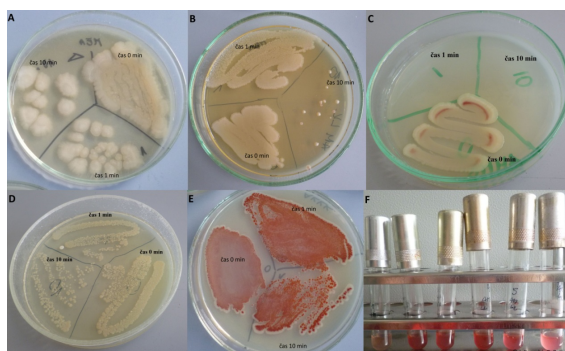


Zhodnocení cvičení

Výsledky úloh jsou zobrazeny na obr. 28 a 29.



Obr. 28: Působení UV záření na růst *Serratia marcescens* (A) a *Staphylococcus aureus* (B) (archiv autorek)



Obr. 29: Vliv doby působení různých dezinfekčních látek na růst *B. cereus* (A), *S. cerevisiae* (B), *S. marcescens* (C), *E. coli* (D), *S. marcescens* (E) a vliv koncentrace dezinfekční látky na růst *S. marcescens* (F) (archiv autorek)



Další informace k této problematice najdete v následující literatuře

- Kneiflová J., Hodnocení baktericidní účinnosti dezinfekčních přípravků suspenzní mikrometodou. Čs. epidemiol. 1988, 37:97–103.
- Standardní metody pro hodnocení dezinfekční účinnosti chemických látek. AHEM, příloha č. 1, 1985, 1–25.
- Melicherčíková V., Sterilizace a dezinfekce ve zdravotnictví. Praha, Grada Publishing, 1998.



Kontrolní otázky

1. Proč je při ozařování agarů na misce UV světlem nutno odstranit skleněné víčko?
2. Mnohé mikroorganismy nacházející se v prostředí jsou zbarvené. Jakou výhodu může pigment představovat pro organismus?
3. Na čem závisí účinnost fyzikálních a chemických prostředků v boji proti mikroorganismům?

4. Vysvětlete pojem mikrobistatický.
5. Vysvětlete pojem mikrobicidní.
6. Prochází UV záření alobalem?
7. Kde se můžeme setkat se sterilizací UV zářením?

a inhibitoru růstu - chemikálií (sloučeniny teluru, selenu, lithia), bazických barviv, látek snižující povrchové napětí (žluč, soli žlučových kyselin, deoxycholát sodný), selektivně toxických sloučenin (azid sodný), antibiotik atd. Nežádoucí mikroflóru lze inhibovat rovněž kyselým nebo zásaditým charakterem média nebo jeho zvýšenou osmolalitou (vysoké koncentrace solí či sacharidů).

Rozdílné typy stavby buněčné stěny mikroorganismů mají za následek odlišnou citlivost k vybraným barvivům či chemickým látkám. Složení buněčné stěny je popsáno v kapitole Makroskopické a mikroskopické pozorování mikroorganismů.

Alkoholické nápoje obsahují látky, které brání množení a růstu mikroorganismů. Ve vínu to jsou třísloviny a flavonoidy. Mikrobiologickou stálost vína ovlivňuje i šíření vína a vyšší obsah alkoholu. U lihovin je to vysoký obsah alkoholu (nad 20 %). Pivo má nízké pH a obsah alkoholu je poměrně nízký (0,5–8 %). Největší vliv na mikrobiologickou stabilitu má v pivu chmel a jeho složky (humulony, lupulony, chmelové silice, třísloviny).

Seznam přístrojů a mikroorganismů

Pomůcky a chemikálie

- 1% vodný roztok krystalové violeti
- sterilní zkumavky, destilovaná voda, pipety a Petriho misky
- zkumavky s 18 ml MPA
- pivo, chmelové extrakty, víno, lihoviny

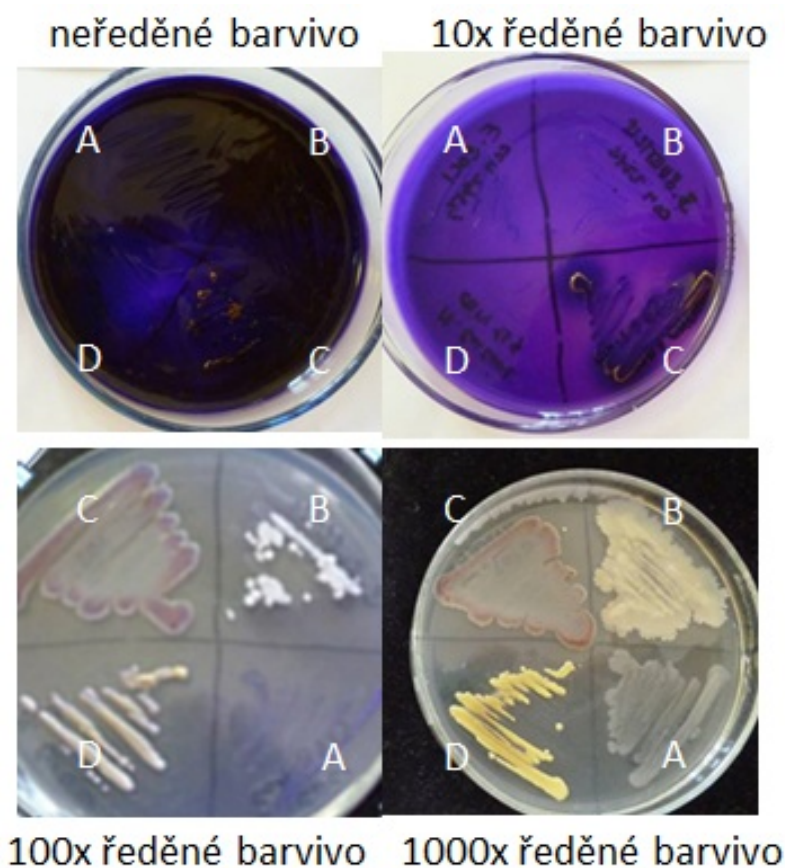
Mikroorganismy

- *Bacillus subtilis* CCM 2216
- *Serratia marcescens* CCM 303
- *Escherichia coli* CCM 3954
- *Micrococcus luteus* CCM 169

Postup

Bakteriostatické působení roztoku krystalové violeti

- Naředit roztok krystalové violeti v poměru 1:10, 1:100 a 1:1000.
- Připravit 4 zkumavky s 18 ml MPA rozvařeného a vytemperovaného na 45 °C.
- Pipetovat 1ml každého ředění barviva zvlášť do 4 Petriho misek. Každou misku zalít 18 ml MPA a jemně promíchat.
- Po ztuhnutí rozdělit fixem dno misek na čtvrtiny. Do sektorů očkovat kultury bakterií.
- Inkubovat při teplotě 37 °C po dobu 48 hodin.
- Odečíst růst bakterií (obr. 30) a výsledky zapsat do tabulky. Porovnat růst gramnegativních bakterií s růstem grampozitivních.



Obr. 30: Vliv krystalové violeti na růst mikroorganizmů. *Escherichia coli* (A), *Bacillus subtilis* (B), *Serratia marcescens* (C), *Micrococcus luteus* (D) (archiv autorek)

Vliv nápojů na růst bakterií

- Připravit zkumavky s 18 ml MPA rozvařeného a vytemperovaného na 45 °C..
- Pipetovat 1 ml každého nápoje (pivo, víno, lihoviny, chmelový extrakt) zvlášť do Petriho misek. Každou misku zalít 18 ml MPA a jemně promíchat.
- Jednu misku připravit pouze s MPA, bude sloužit jako kontrola růstu.
- Po ztuhnutí rozdělit fixem dno misek na čtvrtiny. Do sektorů očkovat kultury bakterií.
- Inkubovat při 37 °C po dobu 48 hodin.
- Odečíst růst bakterií (obr. 31) a výsledky zapsat do tabulky. Porovnat růst gramnegativních bakterií s růstem grampozitivních.



Obr. 31: Vliv nápojů na růst mikroorganismů. *Escherichia coli* (A), *Bacillus subtilis* (B), *Serratia marcescens* (C), *Micrococcus luteus* (D) (archiv autorský)



Zhodnocení cvičení

- Došlo k inhibici růstu mikroorganismů?
- Byla inhibice růstu pouze u některé skupiny mikroorganismů (grampozitivní, gramnegativní)?
- Změnily přidané látky v médiu charakter růstu mikroorganismů (vzhled, pigment)?



Další informace k této problematice najdete v následující literatuře

- Fung D. Y. C., Miller R. D., Effect of dyes on bacterial growth. *Appl. Microbiol.*, 1973, 25:793-799.
- Krumwiede C., Pratt J. S., Further observations on the growth of bacteria on media containing various anilin dyes, with special reference to an enrichment method for typhoid and paratyphoid bacilli. *J. Exp. Med.*, 1914, 19:501-512.
- Votava M., *Kultivační půdy v lékařské mikrobiologii*. Nakladatelství Hortus, Brno, 2000, ISBN 80-238-5058-X.



Kontrolní otázky

1. V čem spočívá rozdíl citlivosti u různých druhů mikroorganismů?
2. Čím je zajištěna mikrobiologická stabilita piva?
3. Čím je zajištěna mikrobiologická stabilita vína?
4. Co se přidává do selektivních médií? Jakou vlastnost má daná látka mít?

13 Stanovení citlivosti mikroorganismů k antibiotikům, stanovení koncentrace antibiotik



Cíl cvičení

Stanovit a porovnat citlivost mikroorganismů k různým antibiotikům. Stanovit koncentraci neznámého vzorku antibiotika.

Úvodní slovo

Antibiotika (ATB) jsou sekundární metabolity mikroorganismů, jsou přirozeně syntetizovaná pro potlačení růstu konkurenčních organismů. Poskytují výhodu při soutěži o ekologickou niku a o substrát. V prostředí patří mezi největší producenty ATB vláknité mikroskopické houby, např. *Penicillium*, *Aspergillus*, *Acremonium* („*Cephalosporium*“), *Paecilomyces*, a dále vláknité aktinobakterie. Vzhledem ke schopnosti působit na růst mikrobů, včetně patogenů, jsou ATB využívána jako chemoterapeutické látky.

Prvním nalezeným ATB byl penicilin produkovaný plísní *Penicillium chrysogenum* (Fleming 1928), následoval streptomycin produkovaný zástupci rodu *Streptomyces*. Mezi bakteriální producenty ATB patří právě aktinobakterie; vybraní producenti: *Streptomyces griseus* (streptomycin), *S. kanamyceticus* (kanamycin), *S. erythaeus* (erythromycin), *S. venezuelae* (chloramfenikol), *S. aureofaciens* (chlortetracyklin), *S. fradiae* (neomycin); a ojediněle i zástupci kmene Firmicutes, jako např. *Bacillus subtilis* (bacitracin), *Paenibacillus polymyxa* (polymyxin).

Antimikrobiální látky patří spolu s dezinfekčními prostředky mezi chemické metody kontroly mikrobiálního růstu. Mezi antimikrobiální látky patří i antiparazitika, antimykotika, antivirotika, antituberkulóza. V praxi se využívají přirozená či modifikovaná ATB.

Podle spektra účinku rozeznáváme úzko- a širokospektrá ATB podávaná lokálně, orálně nebo injekčně. Používají se i jejich kombinace (např. při smíšených infekcích). Antimikrobiální látky jsou používány s ohledem na bakteriální druh, pH, rozpustnost, toxicitu a cenu. Při rozhodování o nejvhodnější kombinaci ATB by měl lékař přihlížet k anamnéze pacienta.

Vedlejšími účinky ATB bývá jejich toxická aktivita (ledviny, játra, placenta) a propuknutí sekundární infekce poškozením vlastní mikroflóry. Důležitými kritérii pro zhodnocení účinku antimikrobiální látky je její koncentrace, doba kontaktu a je-li pro bakterii letální (baktericidní) nebo způsobuje pouze přechodnou inhibici růstu (bakteriostatická).

Mechanismy účinku ATB

Inhibice proteosyntézy konkurenčního kmene brání iniciaci proteosyntézy, interferuje s translací vazbou na ribozom, brání vazbě peptidylové tRNA na peptidylové místo (P-místo), brání elongaci polypeptidu na 30S nebo 50S podjednotce ribozomu, např. aminoglykosidy, makrolidy, tetracykliny, linkosamidy, amfenikoly, kyselina fusidová.

Ovlivnění **syntézy DNA a RNA** vyvázáním podjednotky DNA gyrázy, brání transkripci vyvázáním RNA polymerázy, interference s bakteriální DNA a RNA, baktericidní, např. sulfonamidy, diaminopyrimidiny, chinolony, rifampicin.

Antibiotika pro **inhibici propustnosti cytoplazmatické membrány** jsou baktericidní, např. polypeptidy, antimykotika polyenového charakteru.

Působení na **syntézu buněčné stěny**, na syntézu peptidoglykanu, ovlivňuje baktericidně pouze rostoucí buňky inhibicí tvorby vazeb peptidoglykanu, brání pohybu prekurzorů peptidoglykanu, např. β -laktamy, glykopeptidy (penicilin, cefalosporin, vankomycin, teikoplanin, bacitracin, cykloserin, fosfomycin).

Antagonismus a kompetitivní inhibice, působení na syntézu kyseliny listové, trimetoprim, dapson, izoniazid.

Infekční onemocnění jsou celosvětově zodpovědná za přibližně 40 % všech úmrtí i vzhledem k narůstající rezistenci patogenů vůči ATB. Rezistentní kmeny bakterií mají schopnost nepřijímat (absence receptorů, efluxní systémy), štěpit, inaktivovat (např. β -laktamáza inaktivuje β -laktamová ATB) a vylučovat ATB, modifikovat cílové struktury (metylace rRNA) anebo modifikovat enzymatickou dráhu.

Rezistence může být primární, která vyplývá z přirozených vlastností a funkcí buňky (chybějící receptor, transportní systém či cílové místo působení ATB), a sekundární, získaná, která je způsobena spontánními změnami v genomu mutacemi či přenosem genetické informace plazmidem či transdukcí. Sekundární rezistenci přispívá nevhodné zacházení s ATB. Rezistentní bakterie jsou krátce přítomny v nízké frekvenci (frekvence výskytu mutantních kmenů pro danou vlastnost je stabilně 10^{-8}), ale vzhledem k horizontálnímu přenosu plazmidů konjugací a rychlému množení buněk s plazmidem (vertikálně = na potomstvo) frekvence rychle roste. K šíření rezistence přispívají i chovatelé zvířat a preventivní podávání ATB zvířatům.

Boj proti šíření bakteriálních rezistencí probíhá v mnoha oblastech: zpřísnění hygienických a epidemiologických opatření, omezení podávání ATB u zvířat pouze na závažné infekce, dohled nad podáváním a užíváním ATB. Důraz se klade i na evidenci a kontrolu nozokomiálních infekcí a informovanost lékařů i nemocných. Podle odhadů jsou ATB podávána často zbytečně nebo chybně (virové infekce, léčba neinfekčních chorob, neracionální střídání řady ATB, předčasné podávání ATB poslední generace, ustupování požadavkům pacientů, předčasné ukončení užívání ATB).

Sám Fleming varoval před nesprávným užíváním penicilinu. Postupným zvyšováním jeho koncentrace se mu podařilo získat značně odolné bakterie. Jeho obavy se splnily už v roce 1945, kdy byly pozorovány pneumonie a šoky vyvolané na penicilin rezistentními kmeny *Staphylococcus aureus*. V roce 1966 pak bylo už 35 % *S. aureus* plně odolných k meticilinu. V roce 1967 byla zaznamenána i rezistence pneumokoků. V polovině 70. let v Japonsku zjistili, že 62 % streptokoků skupiny A získalo rezistenci na erytromycin. Fluorochinolony zavedené v roce 1980 zabíjely zprvu 95 % na meticilin rezistentních stafylokoků, ale za pouhý rok k nim získalo rezistenci 80 % stafylokoků. V posledním desetiletí se objevily rezistentní kmeny *Escherichia coli*, klebsiel, enterokoků, *Proteus mirabilis*, mykobakterií, salmonel i dalších bakterií a jejich výskyt se trvale zvyšuje. V současnosti existují bakteriální kmeny odolné k více ATB zároveň, tzv. multirezistentní kmeny.

Důležitou roli sehrávají průzkumy a monitorování rezistentních kmenů v rámci projektu EARS-Net (European Antimicrobial Resistance Surveillance Network), který sbírá, analyzuje a sdílí data. V ČR na projektu spolupracuje mnoho nemocnic a zdravotnických zařízení, které mají vyspělý systém monitorování rezistencí na ATB. Mezi problémové rody v ČR s četnými rezistencemi patří např. rody *Escherichia*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Mycobacterium*, některé kmeny jsou navíc multirezistentní. Rezistence závisí do jisté míry na selekčním tlaku ATB, kdy bakterie mobilizuje plazmid s geny pro rezistenci. Funkční operon se vymění za jiný a dochází k předání plazmidu horizontální cestou i mezi různými rody.

V současnosti probíhá výzkum biosyntézy nových, zejména hybridních ATB pomocí genového inženýrství a kombinatoriální biochemie. Alternativou použití antibiotik je fágová terapie s cíleným účinkem na přítomného patogena. Při fágové terapii nedochází k ovlivnění přirozené mikroflóry jako u většiny ATB.

Z hlediska aplikace v humánní nebo veterinární medicíně je důležité určit citlivost mikroorganismu k aplikované látce, což napomáhá jeho identifikaci. Souhrn testů citlivosti na ATB se nazývá antibiogram. U všech mikrobiologických metod je nutno zachovávat stejnou dobu a tep-

lotu kultivace pro daný mikroorganismus a testovanou látku. 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, přípravu agaru s absolutně rovným povrchem. Pro testování citlivosti k ATB se standardně využívá **Mueller–Hinton agar**, který je bohatý na živiny, má nižší obsah ztužovačů a standardní difúzní schopnost. Kromě stanovení citlivosti k ATB se Mueller–Hinton agar využívá pro izolaci rodů *Neisseria* a *Moraxella*.

Pro stanovení koncentrace látek, které inhibují nebo stimulují růst mikroorganismů, se využívají metody zřed'ovací, nefelometrické, titrimetrické a difúzní.

Nejnižší koncentrace antimikrobiální látky, při které ještě nepozorujeme bakteriální růst, se nazývá **minimální inhibiční koncentrace (MIC)** antibiotika. Vyjadřuje množství ATB (g/ml, mg/l), které úplně potlačí růst kmene pěstovaného *in vitro*. MIC je možné určit pomocí kvantitativní zřed'ovací metody, která se provádí ve zkumavce nebo na mikrotitrační destičce. Za citlivý se považuje kmen, jehož MIC je 2–4× menší než koncentrace dosahovaná terapeuticky v krvi. Za rezistentní se považuje kmen, který se množí při koncentraci ATB výrazně vyšší, než je průměrná MIC u kmenů téhož druhu.

Difúzní stanovení citlivosti k ATB (kvalitativní test) se dělí dle způsobu nanášení testované látky. **Kapkové** metody, kdy se látka kape na povrch tuhého média. **Diskové** metody využívají disky filtračního papíru, které jsou nasyceny testovanou látkou a kladou se na agarové plotny (rutinní testování citlivosti patogenních mikroorganismů na ATB). Při **komínkové** metodě se do agarové vrstvy vtlačují komínky ze skla, porcelánu nebo nerezavějící oceli (ne až na dno, stejně hluboko) a do nich se pipetují roztoky testovaných látek. Jamková metoda využívá jamek vyhloubených korkovrtem přímo do agarové vrstvy, do kterých se pipetují testované látky. **Kvantitativní diluční E–test** sestává z proužkového nosiče napuštěného klesající koncentrací ATB. Sleduje se projasnění nárůstu ve tvaru hruškovité zóny citlivosti na ATB a hodnota MIC.

Postup stanovení citlivosti k antibiotikům difúzním testem – disková metoda

Stanovení citlivosti se nejčastěji provádí pomocí kvalitativního difúzního testu v agarovém médiu. Inokulum o hustotě 0,5 McF se rovnoměrně rozetře po povrchu agaru a potom se na roztěr aplikují papírové disky napuštěné ATB (komerčně dodávané, napuštěné definovaným množstvím). Důležitou informací je rovněž koncentrace ATB uvedená na každém disku.

Během kultivace difunduje látka z disku horizontálně do okolního agaru v koncentračním gradientu. Účinná látka se projeví vytvořením kruhové, tzv. inhibiční zóny kolem disku. Citlivost mikroorganismu k testované látce se určí z velikosti inhibiční zóny. Velikost zóny je ovlivněna schopností antimikrobiální látky difundovat agarem a rychlostí růstu mikroorganismu. Hraniční hodnota rezistence je individuální pro každý mikrobiální druh a dané ATB. Správnost testu je kontrolována za pomoci standardních bakteriálních kmenů. Za dodržení přesných podmínek, tzn. kvality agaru, pH, koncentrace iontů, velikosti inokula jsou průměry inhibičních zón srovnatelné s hodnotami MIC (semikvantitativní metoda).

Stanovení koncentrace ATB

Pro stanovení koncentrace látky inhibující růst bakteriálního kmene můžeme využít difúzní jamkovou metodu. Z kalibrační přímky se stanoví neznámá koncentrace vzorků ATB. Hodnoty pro sestavení kalibrační přímky vychází ze známé velikosti zón měřených na několika miskách se známou koncentrací testovaného ATB. Zóny se vytváří kolem 4 jamek, do kterých byl pipetován roztok ATB o známé koncentraci. Z hodnot průměrů inhibičních zón se standardními roztoky se sestaví kalibrační přímka (závislost průměru zóny v mm na logaritmu koncentrace). Výhodou 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 přelití testované látky při manipulaci s miskami.

Seznam přístrojů a mikroorganismů

Pomůcky a chemikálie

- Petriho misky s Mueller–Hintonovým agarem
- L–klička (hokejka), pinzeta, korkovrty, skalpely
- Antimikrobiální disky, standardy a testované vzorky oxacilinu
- Automatická pipeta, sterilní špičky, pravítko
- ATB: vankomycin – 30 µg (glykopeptidy), rifampicin – 5 µg (ansamyciny), chloramfenikol – 30 µg (amfenikoly), cefalotin – 30 µg (cefalosporiny I. generace), nitrofurantoin – 100 µg, oxacilin – 1 µg (isoxazolylpeniciliny, penicilináza rezistentní), tetracyklin – 30 µg (cykliny), ko–trimoxazol – 25 µg (sulfonamidy s potencovaným antimikrobním účinkem), penicilin – 10 MJ (β -laktamy, dipeptidy)

MJ (mezinárodní jednotka; **IU** = International Unit) je měrná jednotka pro množství účinné látky, založená nikoli na hmotnosti, nýbrž na naměřeném biologickém působení nebo účinku

Mikroorganizmy

- *Micrococcus luteus* CCM 169
- *Staphylococcus saprophyticus* subsp. *saprophyticus* CCM 2354
- *Bacillus cereus* CCM 2010
- *Proteus vulgaris* CCM 1799
- *Escherichia coli* CCM 3954
- *Staphylococcus aureus* NCTC 8511
- *Providencia rettgeri* CCM 5618

Postup

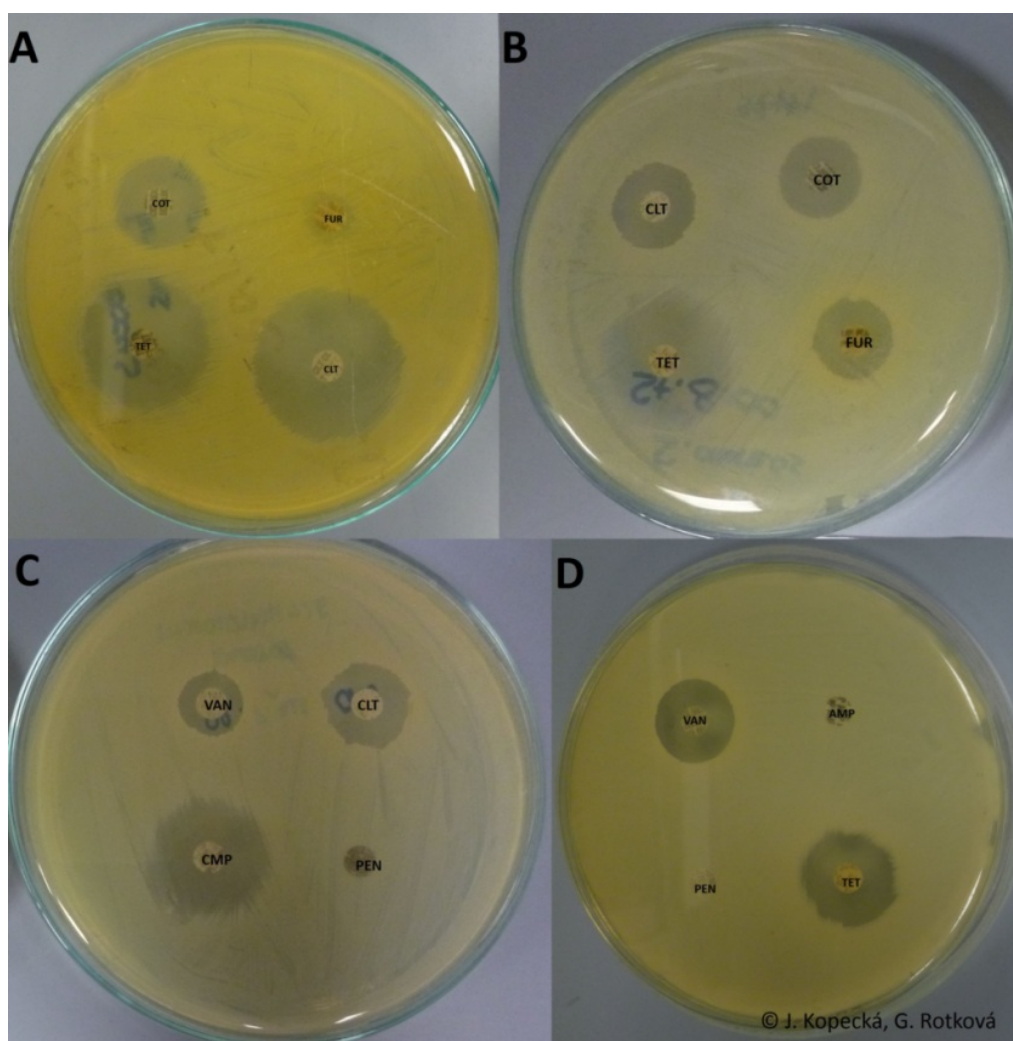
Stanovení citlivosti mikroorganismu k ATB – disková difúzní metoda

- Na povrch Mueller–Hinton agaru pipetovat 0,2 ml bujonové kultury a rozetřít sterilní L–kličkou.
- Na misku **sterilně** pomocí jehly rozložit 4 testovací disky s ATB v dostatečné vzdálenosti od sebe a od kraje misky.
- Inkubovat 24–36 hodin při 37 °C.

Hodnocení

- Pozorovat růst mikroorganismu kolem ATB disků (obr. 32).
- Měřit velikost inhibičních zón jako délku úseček průměrů zóny měřených ve dvou na sebe kolmých směrech (velikost disku je v hodnocení započítána).
- Vypočítat aritmetický průměr a stanovit citlivost: necitlivý mikroorganismus (inhibiční zóna do 11 mm), citlivý mikroorganismus (inhibiční zóna 11–17 mm), velmi citlivý mikroorganismus (inhibiční zóna nad 17 mm).

Pozn. Zmíněné rozsahy inhibičních zón pro určení citlivosti kmene jsou pouze orientační. V praxi se výsledky odečítají za pomoci stále aktualizovaných tabulek, které uvádí velikost zón citlivosti určitého ATB pro daný druh. Důvodem aktualizací tabulek je vzrůstající rezistence k ATB.



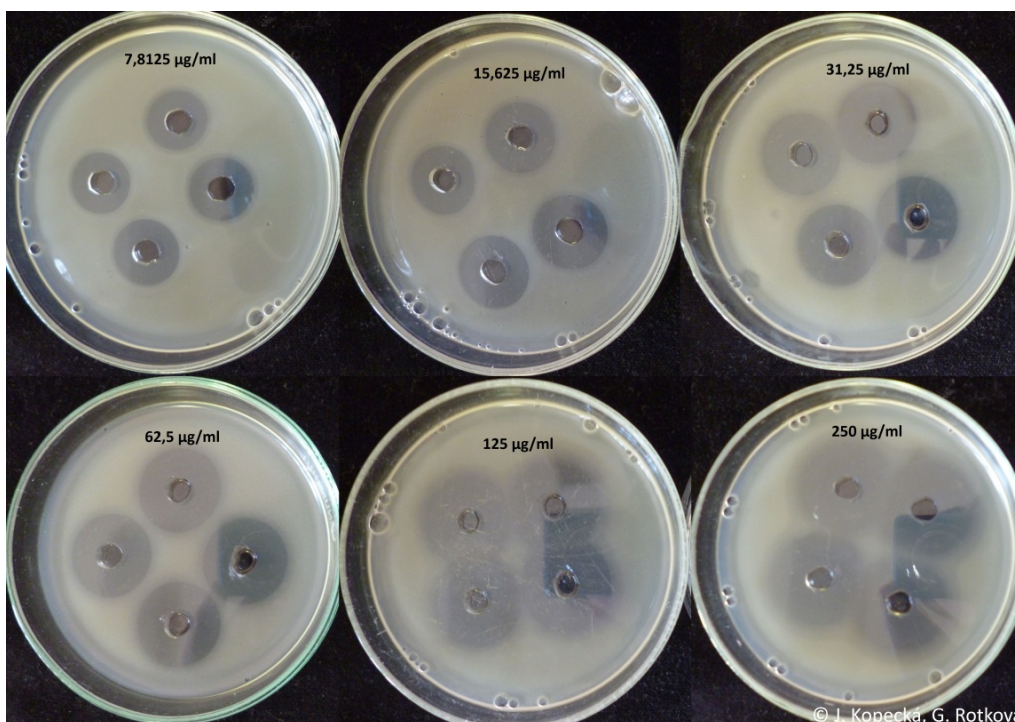
Obr. 32: Stanovení citlivosti bakterií k ATB diskovou metodou, *M. luteus* (A), *S. aureus* (B, C), *B. cereus* (D); vankomycin (VAN), chloramfenikol (CMP), ampicilin (AMP), cefalotin (CLT), nitrofurantoin (FUR), tetracyklin (TET), ko-trimoxazol (COT), penicilin (PEN) (archiv autorek)

Stanovení koncentrace oxacilinu difúzní jamkovou metodou

- Rozvařit Mueller–Hinton agar (15 ml ve zkumavkách) a temperovat na 45 °C.
- Do zkumavek očkovat 0,5 ml inokula *S. aureus* NCTC 8511.
- Obsah zkumavek promíchat, vylít do sterilních misek a nechat utuhnout na rovné podložce.
- Připravit standardní řadu ředění oxacilinu, ředit v destilované vodě na koncentrace: 250; 125; 62,5; 31,25; 15,625; 7,81 µg/ml.
- Po utužení agaru vyhloubit korkovrtem a skalpelem na miskách 4 jamky; korkovrt a skalpel sterilizovat ožehnutím po namočení v etanolu. Vyhloubené kousky agaru odkládat do Petriho misky (k likvidaci, obsahují *S. aureus*). Korkovrt a skalpel je nutné po skončení práce sterilizovat.
- Misky popsat, na 1 misce je vždy 1 standardní koncentrace nebo 1 testovaný vzorek.
- Do každé jamky pipetovat 40 µl roztoku ATB, vždy roztok jedné koncentrace na misku. Je třeba pipetovat i přemísťovat misky opatrně, aby roztoky nepřetékały přes okraje jamek.
- Inkubovat 24 hodin při 37 °C.

Hodnocení

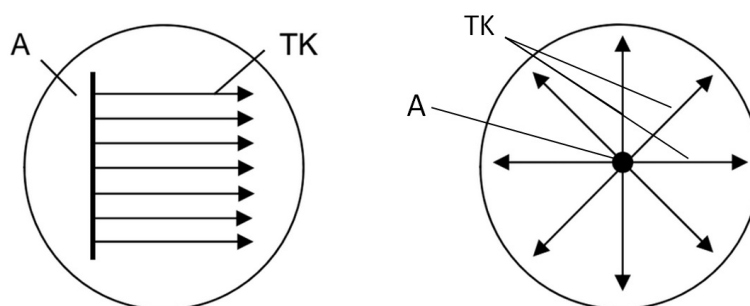
- Změřit průměry zón ve dvou na sebe kolmých směrech.
- Pro každou zónu vypočítat průměrnou hodnotu, ze 4 zón na misce vypočítat průměrnou hodnotu pro danou koncentraci.
- Z hodnot standardních roztoků (obr. 33) sestavit kalibrační přímkou v MS Excel (závislost průměru zóny v mm na logaritmu koncentrace oxacilinu).
- Z kalibrační přímkou (rovnice regrese) stanovit koncentraci neznámých vzorků (µg/ml).
- V protokolu bude uvedeno označení vzorku a jeho koncentrace.



Obr. 33: Standardní řada ředění ATB (oxacilin) na Mueller–Hinton agaru a velikost inhibičních zón u kmene *S. aureus* NCTC 8511 (archiv autorek)

Stanovení antagonistů – přirozených producentů antibiotik

- Na povrch agarové plotny s Mueller–Hinton agarem očkovat v jednom pruhu pravděpodobného producenta antimikrobiálních látek (*Streptomyces*, *B. subtilis*, *P. polymyxa* nebo *S. marcescens*), viz. obr. 34.
- Kolmo k producentovi očkovat v pruzích testované kmeny bakterií.
- Inkubovat 24–36 hodin při 37 °C.
- Vyhodnotit, zda došlo k inhibici růstu testovaných kmenů bakterií.



Obr. 34: Očkování pravděpodobného producenta antimikrobiálních látek (P) a testovaných kmenů (archiv autorek)



Zhodnocení cvičení

- Porovnat citlivost mikroorganismů k různým ATB, je citlivost různých druhů k jednomu ATB stejná?
- Je stejný účinek jednoho ATB na různé mikroorganismy?
- Podařilo se sestrojít kalibrační přímku a určit koncentraci neznámého vzorku antibiotika?



Další informace k této problematice najdete v následující literatuře

- Greenwood D., Slack R. C. B., Peuthere a kol., Lékařská mikrobiologie. GRADA Publishing, 1999, ISBN 80-7169-365-0.
- Votava M., Kultivační půdy v lékařské mikrobiologii. Nakladatelství Hortus, Brno, 2000, ISBN 80-238-5058-X.
- Určování citlivosti a rezistence bakteriální kultury k antibakteriálním látkám (zdroj: http://fv12.vfu.cz/sekce_ustavy/mikrobiologie/obrazova_priloha/mikrob/6.html; 2. 3. 2016)
- Nová látka klíčem ke stovkám antibiotik (zdroj: <http://www.gate2biotech.cz/nova-latka-klicem-ke-stovkam-antibiotik/>; 2. 3. 2016)
- Nouza K., Nouza M., Antibiotika – hrozí konec éry? Medicína 3, VI, 1999. (zdroj: http://www.zdrava-rodina.cz/med/med399/med399_42.html)
- European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (<http://ecdc.europa.eu/en/activities/surveillance/EARS-Net/Pages/index.aspx>, 3. 3. 2016)



Kontrolní otázky

1. Jaké jsou mechanismy rezistence bakterií na antibiotika?
2. Je antibiotikum produkt primárního metabolismu? K čemu je bakteriální buňce v prostředí prospěšné?
3. Vysvětlete pojem inhibiční zóna.
4. Čím se liší antibiotikum od chemoterapeutika?
5. K čemu se používá disková difúzní metoda a jaký je její postup?
6. Jak se nazývá médium používané pro testování citlivosti na ATB?
7. Proč se při stanovení koncentrace antibiotika připravuje ředící řada tohoto antibiotika?
8. Co je to MIC?

14 Bakteriociny



Cíl cvičení

- Důkaz produkce antibakteriálních látek – bakteriocinů.

Úvodní slovo

Bakteriociny představují skupinu mikrobiálních proteinů charakteristických úzkým spektrem účinnosti. Produkce bakteriocinů zvýhodňuje bakterie v jejich životním prostředí. Umožňuje eliminovat ostatní bakterie stejného nebo blízkce příbuzného druhu, se kterými by soupeřily o společné energetické zdroje. V současnosti jsou definované 3 základní skupiny bakteriocinů gramnegativních bakterií - koliciny, mikrocinny a korpuskulární bakteriociny.

Koliciny jsou vysokomolekulární proteiny (25–80 kDa) produkované *Escherichia coli* a jinými druhy z čeledi *Enterobacteriaceae*. Mikrocinny jsou nízkomolekulární látky (do 10 kDa) peptidové povahy, produkované zástupci čeledi *Enterobacteriaceae*. V současnosti je detailně charakterizovaných 25 typů kolicinů a 12 typů mikrocinů. Mikrocinny se od kolicinů liší širším spektrem účinku, vyšší stabilitou k extrémnímu pH, teplotě a vyšší rezistencí k proteázám. Koliciny jsou kódovány plazmidově zatímco mikrocinny mohou být kódovány na plazmidu či chromozomálně. Korpuskulární bakteriociny jsou vysokomolekulární částice podobné fágovému bičíku (phage tail-like bacteriocins). Výskyt korpuskulárních bakteriocinů byl pozorovaný např. u druhů *Budvicia aquatica*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Pragia fontium*.

Předpokládá se, že bakteriociny produkované *E. coli* mohou působit jako probiotika a antibiotika. Často používaným probiotickým kmenem je nepatogenní kmen *E. coli* Nissle 1917, producent mikrocinů H47 a M. Tento kmen byl izolovaný německým bakteriologem Alfredem Nisslem v období 1. světové války. Používal se jako ochrana vojáků před infekčními průjmy. V současnosti je aktivní látkou probiotika Mutaflor®. U novorozenců, kterým byl aplikovaný kmen Nissle 1917, došlo k výraznému zvýšení hladiny imunoglobulinů IgA a IgM v krevním séru a filtrátu stolice, rovněž došlo ke zvýšení hladiny IgA ve slinách. Při studiu nespecifického imunitního systému na myších došlo ke zvýšení sekrečních schopností makrofágů, stoupla tvorba interleukinu 6, kyslíkových radikálů a byla zjištěna zvýšená produkce faktoru nádorové nekrózy po indukcii makrofágů kmenem Nissle 1917. Probiotikum Mutaflor® se používá při léčbě poruch tlustého střeva – průjmy, zácpa, meteorismus, chronická onemocnění střeva, např. ulcerózní kolitida a Crohnova choroba, alergie, ekzémy atd.

Užívání probiotik vede k aktivaci obranyschopnosti organismu. Účinek kmene Nissle 1917 a tím pádem i účinek produkce mikrocinů H47 a M byl vyzkoušený i na adherentně invazivních *E. coli* (AIEC) kmenech izolovaných z biopsií pacientů trpících Crohnovou chorobou. Tento kmen výrazně snižoval schopnost AIEC kmenů adherovat a invadovat do epitelálních buněk a doporučuje se jeho užívání při terapii chronických onemocnění střev.

Seznam přístrojů a mikroorganismů

Pomůcky a chemikálie

- Indikátorový kmen – *E. coli* K12 – ROW
- 1,2 % TYEA (8 g enzymatického lyzátu kaseinu, 5 g kvasničného extraktu, 5 g NaCl, 1 l H₂O, 12 g agaru)
- MPA (28 g agaru, 1 l H₂O)

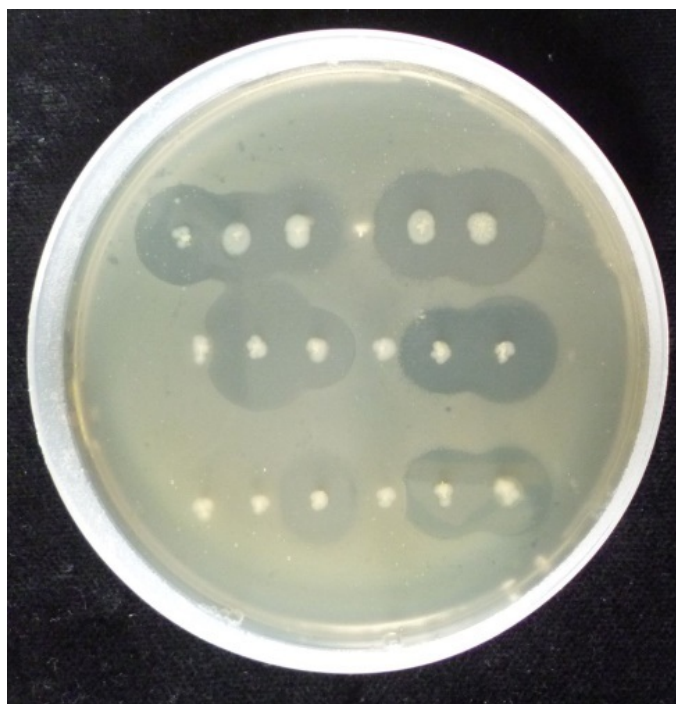
- Chloroform

Mikroorganizmy

- *Escherichia coli* – izoláty ze střev člověka

Postup

- Kmeny *E. coli* očkovat vpichem do agaru (12 vpichů/kmenů na misku).
- Lze využít základní 1,2 % TYEA, 1,2 % TYEA agar s mitomycinem C (indikace SOS odpovědi, zvýšení produkce některých typů bakteriocinů), 1,2 % TYEA s trypsinem (rozklad bakteriocinů proteinového charakteru) nebo MPA (médium s málo živinami, zvýšení produkce některých typů bakteriocinů).
- Kultivace 48 hodin při 37 °C.
- Inaktivovat kmeny přidáním chloroformu pro uvolnění bakteriocinů do média. Na víčko misky umístit buničitou vatu, pipetovat 1 ml chloroformu a nechat působit 30 minut.
- Do 3 ml 0,66 % TYEA temperovaného na teplotu zhruba 45 °C přidat 100 µl indikátorové kultury.
- Médium s usmrcenými kmeny přelít 3 ml 0,66 % TYEA temperovaného na teplotu zhruba 45 °C a nechat ztuhnout.
- Kultivovat 24 hodin při 37 °C.
- Na základě tvorby inhibičních zón odlišit kmeny, které produkují bakteriociny (obr. 35).



Obr. 35: Tvorba inhibičních zón u *E. coli* produkujících bakteriociny, ke kterým je indikátorový kmen citlivý (archiv autorské)



Zhodnocení cvičení

- Došlo k produkci (tzn. tvorbě inhibičních zón) u všech kmenů?



Další informace k této problematice najdete v následující literatuře

- Micenková L., Bactericinogeny in pathogenic and commensal *Escherichia coli* strains. Dizertační práce, MU Brno, 2016.
- Micenková L., Molekulárna typizácia bakteriocínov z ľudských kmeňov *E. coli*. Diplomová práce, MU Brno, 2011.



Kontrolní otázky

1. Co je předpokladem vhodného indikátorového kmene?
2. Které typy bakteriocinů znáte?
3. Jaký mají bakteriociny význam pro bakterii žijící ve střevě?
4. Proč je nutné produkční bakterie usmrtit?

15 Průkaz a izolace některých půdních mikroorganismů



Cíl cvičení

Izolace a průkaz 3 skupin mikroorganismů (*Azotobacter*, *Clostridium*, celulolytické bakterie) ze vzorku půdy pomocí selektivních podmínek kultivace.

Úvodní slovo

Při hodnocení kvalitativního či kvantitativního zastoupení mikroorganismů v půdě zvažujeme charakteristiku zkoumaného vzorku půdy (úrodnost, množství humusu, textura, množství kyslíku, kyselost půdy, profil půdy a hloubka odběru). Většina mikroorganismů žije v hloubce do 10 cm. V jednom gramu půdy je přítomno několik bilionů buněk. Prokázat je můžeme in situ detekcí (fluorescence, nukleotidové sondy) anebo kultivačně podle některých jejich charakteristických metabolických aktivit: fixace dusíku, oxidace síry, redukce síranů, rozklad močoviny, celulózy atd. Preparát připravený z půdního extraktu doplňuje informaci o morfologii a barvitelnosti buněk zástupců společenstva.

Mezi běžnou půdní mikroflórou náleží bakterie rodu *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Streptomyces* a také řada vláknitých hub (*Aspergillus*, *Fusarium*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizopus*). Některé mohou být patogeny rostlin i živočichů (*Actinomyces*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*). V přírodě se mikroorganismy vyskytují v čistých kulturách výjimečně, vytvářejí mikrobiální společenstva. Za normálních podmínek (neutrální pH, nadbytek živin, dostatek vody) se v prostředí vyskytuje značný počet mikrobiálních druhů v průměrném množství. V půdách určitého charakteru převažuje určitá skupina bakterií, např. zamokřené půdy podporují růst anaerobů, termofilní bakterie se vyskytují hlavně v kompostu a v kyselých půdách převládají vláknité houby. V extrémních podmínkách je přítomno méně druhů a více jedinců jednoho odolného druhu. Dominantní druh se v populaci vyskytuje s vyšší hodnotou CFU/g než druhy ostatní. Společenstvo mikroorganismů je otevřený a dynamický systém.

Winogradsky vymezil dvě základní skupiny bakterií podle kulminujícího počtu jejich zástupců v závislosti na zdrojích živin. **Autochtonní bakterie** - přirozené organizmy, které jsou po celé roční období zastoupeny v relativně vysokém a konstantním počtu nezávisle na množství živin. Je pro ně charakteristická nízká metabolická aktivita. Klasifikují se většinou jen podle morfologie buněk (barvený preparát), např. aktinomycety, *Agrobacterium*, *Streptomyces*, *Nocardia*. **Zymogenní (alochtonní) bakterie** jsou druhy, jejichž přítomnost závisí na aktuálně zvýšené koncentraci živin nebo dodání zvláštních látek, které rychle vyčerpávají. Vyznačují se mohutnou metabolickou aktivitou a významně se podílejí na procesech mineralizace půdy, zajišťují koloběh jednotlivých prvků v biosféře, např. nitrifikační bakterie, celulolytické, oxidující síru, myxobakterie, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*.

Mikroorganismy se podílí na přeměnách půdy a modifikují svou činností vnější prostředí. Energie vstupuje do ekosystému půdy ve formě slunečního záření či organických a anorganických sloučenin. Organické sloučeniny jsou oxidovány na CO₂ respirační nebo jsou fermentovány na redukované sloučeniny. Chemolitotrofní organizmy oxidují anorganické sloučeniny a přispívají k syntéze organických látek autotrofními aktivitami. Obecně se jedná o procesy mineralizace (přeměna organicky vázaného prvku na anorganickou formu), imobilizace (přeměna anorganických prvků na organické komplexy), oxidace, redukce, fixace nebo volatilizace (přeměna plynné formy na neplynnou a naopak), procesy dekompozice (humifikace, mineralizace), účast v koloběhu prvků, oxidace jedovatých dusitanů na dusičnany (nitrifikační bakterie), oxidace nedostupných sulfidů

na sulfáty (*Thiobacillus*), bioremediace, rozklad těžko odbouratelných látek (např. pesticidy, celulóza, chitin), produkce řady látek ovlivňujících růst rostlin, fixace dusíku symbiotickými (*Rhizobium*) i volně žijícími (asociativně symbiotické *Agrobacterium*, *Azotobacter*, *Clostridium*) bakteriemi, návrat dusíku do koloběhu v podobě amonných iontů vstřebatelných rostlinami, produkce sekundárních metabolitů (bakteriociny, antibiotika), suprese mikromycetových onemocnění rostlin (*Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*).

Pro práci s vybranou skupinou bakterií je nutno mikroorganismy izolovat a kultivovat v čistých kulturách. Lze využít selektivních médií. Při průkazu přítomnosti bakterií fixujících dusík se využije bezdusíkatého média, které zvyhodňuje pro růst druhu schopné tuto molekulu fixovat z ovzduší. Dusíku jako biogenního prvku je v atmosféře omezené množství. Některé fototrofní i chemotrofní bakterie (symbiotické i volně žijící) (*Azotobacter*, *Klebsiella*, *Rhizobium*, *Clostridium pasteurianum*) a cyanobakterie (*Anabena*, *Nostoc*) disponují enzymem nitrogenázou, pomocí kterého dusík fixují z atmosféry. Je to energeticky náročný proces (spotřeba 15 ATP na 1 molekulu N₂).

Štěpení celulózy lze dokázat charakteristickým růstem na materiálech obsahujících celulózu jako zdroj uhlíku. Ukazatelem úrodnosti půdy je přítomnost **celulolytických bakterií**. V intenzivně obdělávaných půdách se vyskytují rychle rostoucí zástupci rodů *Cytophaga*, *Cellvibrio*, *Cellfalcicula*, *Sporocytophaga*. Ve středně obdělávaných půdách pak myxobakterie a ve slabě obdělávaných a v kyselých půdách převládají mikroskopické houby. V přírodě nejrozšířenější a ve vodě nerozpustný polysacharid celulóza je podstatnou součástí buněčných stěn rostlinných buněk, je doprovázena hemicelulózami, pektiny, ligninem a tuky. Je štěpena z větší části aerobně, může však být i anaerobně zkvašována. Celulóza je mimo buňku hydrolyticky štěpená exoenzymem celulázou na celobiózu, která je po transportu dovnitř buňky štěpena endoenzymem celobiázou na dvě podjednotky glukózy. Rychlost rozkladu celulózy je ovlivněna množstvím celulolytických bakterií a přítomností doprovodných látek, v přítomnosti ligninu je štěpena hůře.

Příklady půdních bakterií

Rod *Clostridium*

Pleomorfní grampozitivní tyčky, jednotlivě, ve dvojicích či v krátkých řetězcích. Peritrichální, tvoří oválné či kulaté endospory. Obligátně anaerobní, některé druhy aerotolerantní. Široký rozsah teplotního optima růstu 10–65 °C. Některé druhy fixují plyný dusík a tvoří toxiny. Vyskytují se v půdě, stočném kalu, mořských sedimentech, rostlinných zbytcích, v gastrointestinálním traktu živočichů a člověka (jícen, střeva), v klinickém materiálu. Identifikaci napomáhá rozlišení do tří skupin podle využívání bílkovin a sacharidů, sacharolytické, proteolytické a štěpící jak bílkoviny, tak i sacharidy. Do rodu *Clostridium* patří primární i oportunní patogeny.

C. pasteurianum patří do skupiny přísně anaerobních bakterií máselného kvašení, toleruje kyselost a promáčenost půdy a nižší teploty; tyto vlastnosti spolu s tvorbou spor umožňují jeho rozšíření téměř ve všech typech půd (103–105 CFU/g).

Rod *Azotobacter*

Gramnegativní ovoidní pleomorfní tyčky až koky, jednotlivě, ve dvojicích i v nepravidelných shlucích. Peritrichální, aerobní, chemoorganotrofní. Tvoří cysty a pigmentují. Dusík fixují nesymbioticky či asociativně symbioticky (*Azotobacter paspali* s trávou *Paspalum notatum*). V médiu vyžadují molybden či vanad. Vyskytují se v půdě či vodě.

A. chroococcum je náročný na podmínky vnějšího prostředí. Vyskytuje se v nízkých počtech (102–104 CFU/g) v dobře provzdušňované a hnojené půdě o neutrálním až slabě alkalickém pH v blízkosti kořenového systému rostlin. V kyselých půdách dusík nefixuje. Vyžaduje přítomnost cukrů, jednoduchých alkoholů, fosforu, vápníku, molybdenu, bóru, vanadu, železa a manganu. Teplotní optimum je úzké, mezi 25 a 30 °C.

Seznam přístrojů a mikroorganismů

Pomůcky a chemikálie

- Petriho misky s Ashbyho agarem, prázdné plastové Petriho misky
- MPB s 5% glukózou
- Zkumavky, pipety, kličky, kahan, vodní lázeň
- Sterilní parafínový olej
- Filtrační papír, ústřížky časopisu, novin, buničina
- Zemina z vlastních zdrojů (skleník, lesní půda z lesa, zahrada, pískoviště, květináč, kompost)

Postup

Izolace zástupců rodu *Azotobacter*

- Petriho misky s Ashbyho agarem (selektivní bezdusíkaté médium eliminuje druhy vyžadující přítomnost dusíku, nezaručí eliminaci mikroskopických hub) očkovat přímo drobnými zrníčky zeminy.
- Kultivovat 72 hodin při 25–30 °C, misky neotáčet

Hodnocení

Růst azotobakterů se projeví slizovitými koloniemi kolem zrníček hlíny (obr. 36). Kolonie jsou v prvních dnech bělavé, stářím hnědnou. Z misky je cítit charakteristický zápach půdy. Při mikroskopické kontrole lze v preparátu pozorovat gramnegativní tyčky vyskytující se často ve dvojicích. Buňky jsou ohraničeny pouzdrem, které se nejlépe zvýrazní negativním barvením. V preparátu lze pozorovat klidová stádia, cysty.



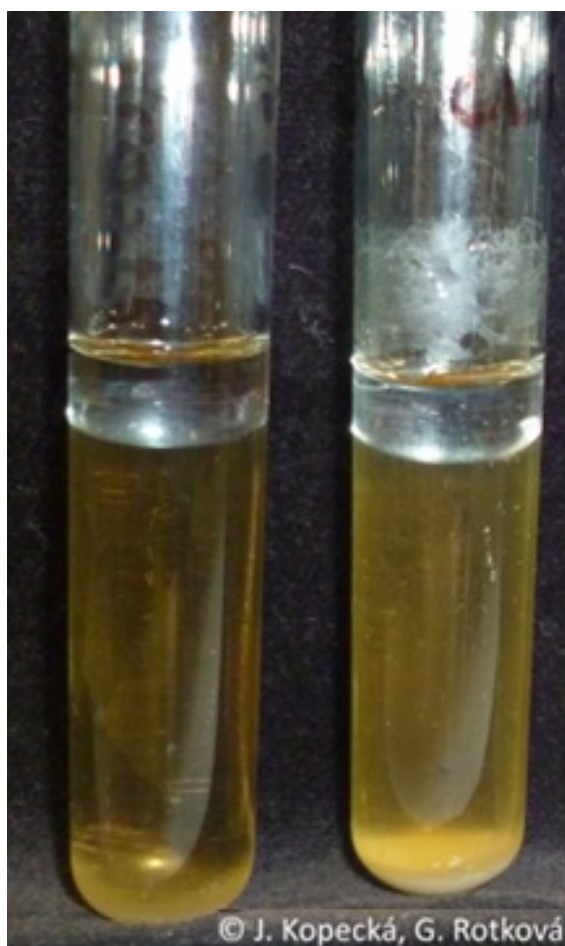
Obr. 36: Izolace zástupců rodu *Azotobacter* na Ashbyho agaru (archiv A. Vávrové)

Izolace zástupců rodu *Clostridium*

- Připravit půdní extrakt smícháním 10 g zeminy se 100 ml sterilní destilované vody, protřepávat 10 minut a filtrovat vrchní část extraktu přes dvojitý sterilní filtrační papír do sterilní baňky.
- Suspenzi (cca 2 ml) přelít do sterilní zkumavky a umístit do vodní lázně (75–80 °C) na 15 minut (pasterizace, usmrcení vegetativních buněk, endospory přežijí).
- Do horkého sterilního média (MPB 5 % glukózy) pipetovat 1 ml pasterizovaného půdního extraktu a ihned převrstvit 1 ml sterilního parafínu pro zajištění anaerobního prostředí.

Hodnocení

V přítomnosti klostridií vzniká sedlina (obr. 37), plyn a charakteristický zápach máselného kvašení. Při mikroskopické kontrole (Gramovo barvení) jsou v preparátu vidět grampozitivní tyčky, případně endospory v nativním preparátu při použití fázového kontrastu.



Obr. 37: Přítomnost sedliny po vyklíčení anaerobních endospor rodu *Clostridium* (archiv autorek)

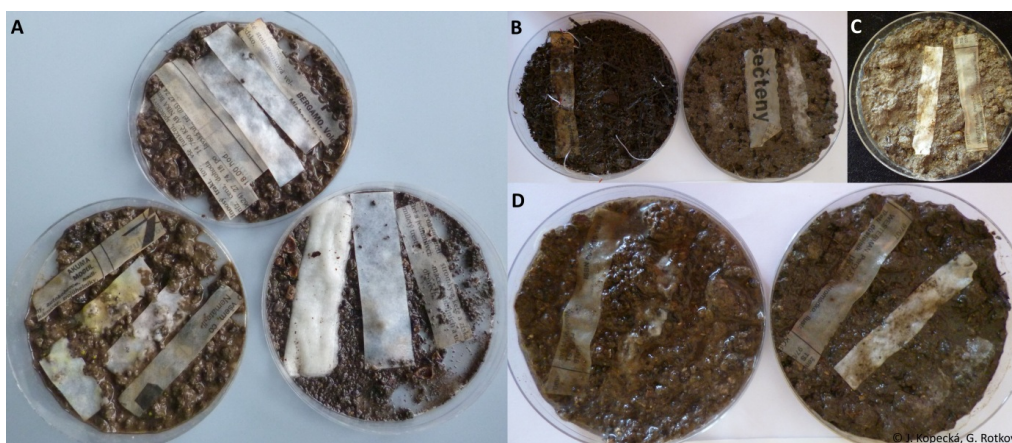
Průkaz celulolytických bakterií

- Zeminu nasypat do Petriho misek zhruba do výšky 2/3 misky a důkladně navlhčit.
- Pinzetou položit jednotlivě sterilní proužky filtračního papíru, buničité vaty a novin (1cm mezery) a opět navlhčit.

- Inkubovat při pokojové teplotě, zeminu průběžně vlhčit. Inkubace probíhá 3 týdny, hodnocení se provádí vždy po týdnu (obr. 38).

Hodnocení

Po každém týdnu pozorovat případný rozklad a změny zabarvení (přítomnost skvrn různých barev) zdrojů celulózy. Nejintenzivnější rozklad by měl být u buničiny (cca 50 %), méně pak (30 %) u filtračního papíru a nejméně u novinového papíru vzhledem k inhibujícímu tiskařskému barvivu v papíru. Nejvíce celulolytických mikroorganismů se vyskytuje v půdách s vyšším množstvím humusu, méně v půdách písčitých.



Obr. 38: Rozklad různých zdrojů celulózy celulolytickými mikroorganismy po jednom (A) a třech (B, C, D) týdnech kultivace (archiv autorek)



Zhodnocení cvičení

- Podařilo se izolovat jednotlivé zástupce půdních mikroorganismů?
- Co výsledek vypovídá o úrodnosti půdy?



Další informace k této problematice najdete v následující literatuře

- Němec M., Mazal P., Cvičení z mikrobiologie, Učební text VŠ. 1989, Brno.
- Möllerová J., Symbiotická fixace dusíku, Živa, 2006 (zdroj: <http://ziva.avcr.cz/files/ziva/pdf/symbioticka-fixace-dusiku-bakterie-rhizobium-s-l-a.pdf>; 7. 3. 2016)
- Enzym nitrogenáza a chemismus dusíku (zdroj: <http://chem.rochester.edu/~plhgrp/nitrfix.html>; 7. 3. 2016)



Kontrolní otázky

1. Jaký je princip izolace námi zvolených bakteriálních skupin?
2. Proč v postupu izolace klostridií vyklíčí pouze jejich endospory?

3. V jakém prostředí (ve vztahu ke kyslíku) klíčí endospory klostridií? Jakým způsobem se izolují a jaké znaky sledujeme v případě pozitivního růstu?
4. Jmenujte některé funkce půdních mikroorganismů.
5. Jmenujte některé bakteriální rody vyskytující se běžně v půdě.
6. Jaké selektivní médium se využívá pro izolaci azotobaktera a na základě které vlastnosti ho na tomto médiu izolujeme?
7. Potřebují bakterie pro fixaci dusíku symbiózu s rostlinami?
8. Jak se jmenuje enzym, pomocí kterého bakterie fixují vzdušný dusík? Funguje aerobně na misce?
9. Vysvětlete pojem autochtonní/ alochtonní.

16 Winogradského kolona



Cíl cvičení

Vytvořit Winogradského kolonu a pozorovat rozdělení jednotlivých vrstev v čase.

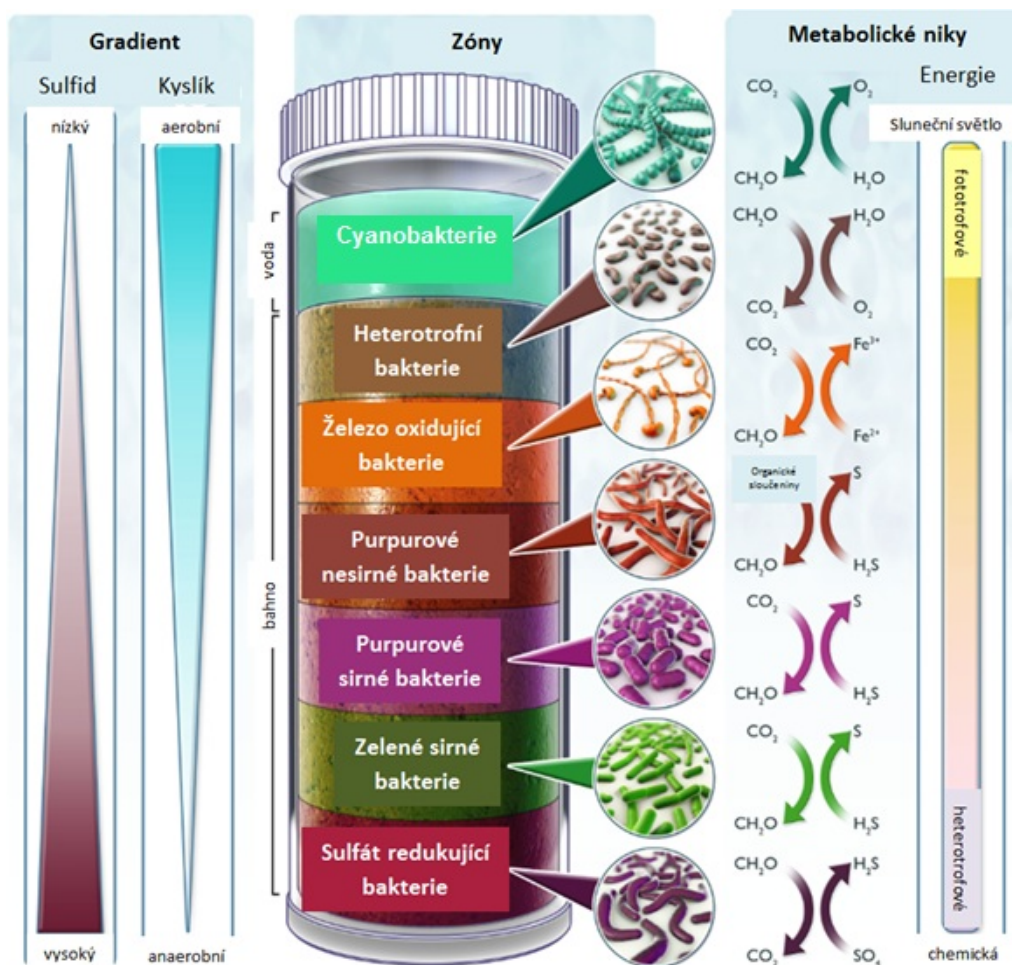
Úvodní slovo

Sergei Nikolaievich Winogradsky, ruský mikrobiolog, se věnoval převážně půdní mikrobiologii. Objevil bakterie, které oxidují železo, síru a amoniak a které jsou schopny zabudovat CO₂ do organické hmoty. Izoloval anaerobní bakterie fixující dusík a studoval rozklad celulózy. **Winogradského kolona** (obr. 39) je forma mikrokosmu, ve kterém mikroorganismy a živiny interagují ve vertikálním gradientu. Kolona demonstruje různé úlohy mikroorganismů v přírodě, kdy aktivita jednoho organismu umožňuje růst jiného a naopak. Kolona je kompletní, soběstačný a recyklační systém, který je doplňován pouze světelnou energií. Produkty kvašení a sulfidy stoupají z redukovaných zón, kyslík proniká do kolony z povrchu. Tím jsou vytvořeny vrstvy podobné jako u sedimentů bohatých na živiny. Fotosyntetizující organismy získávají energii ze světla.

Bahno je smícháno se síranem sodným, uhličitanem sodným a natrhanými novinami (zdroj celulózy). Do kolony se následně přidá voda, inkubace probíhá na světle. V koloně začne probíhat série reakcí, kdy určité mikroorganismy vytváří speciální mikroklima jako odpověď na chemické gradienty.

Na dně kolony je degradována celulóza (rod *Clostridium*). Produkty kvašení jsou pro další mikroorganismy dostupné jako reduktanty a síran je využíván jako oxidant. Rod *Desulfovibrio* produkuje sirovodík, který stoupá vzhůru do oxypenní zóny a vytváří stabilní gradient sirovodíku, ve kterém fototrofní *Chlorobium* a *Chromatium* vytváří viditelnou olivově zelenou a purpurovou zónu. Tyto mikroorganismy využívají sirovodík jako zdroj elektronů a CO₂ z uhličitanu sodného jako zdroj uhlíku. Nad touto vrstvou mohou růst purpurové nesírné bakterie rodu *Rhodospirillum* a *Rhodopseudomonas*. Tito fotoheterotrofové využívají organický materiál jako donory elektronů v anaerobních podmínkách. Kyslík i sirovodík může být přítomen výše v koloně, kde jsou využívány adaptovanými mikroorganismy (*Beggiatoa*, *Thiothrix*), které využívají redukované sírné sloučeniny. Ve svrchní vrstvě mohou být viditelné řasy (rozsivky) a cyanobakterie.

Kyslík a CO₂ vytváří v koloně koncentrační gradient. Kyslík je ve vodě omezeně rozpustný v závislosti na teplotě vody, tlaku a rozpuštěných solích. Teplota a tlak výrazně ovlivňují množství kyslíku, které je dostupné pro mikroorganismy. Při nižších teplotách může být koncentrace kyslíku výrazně vyšší. Rychlé snížení rozpuštěného kyslíku ve vodě může nastat při kontaminaci vody živinami, což často vede k úhynu ryb. Oxid uhličitý se účastní mnoha chemických a biologických procesů, např. ovlivňuje pH vody. Pokud autotrofní mikroorganismy, jako jsou řasy, využívají CO₂, pH vody se zvyšuje.



Obr. 39: Winogradského kolona, mikrobiální evoluce v lahvi (zdroj: <http://www.hhmi.org/biointeractive/poster-winogradsky-column-microbial-evolution-bottle>; upraveno)

Seznam přístrojů a mikroorganismů

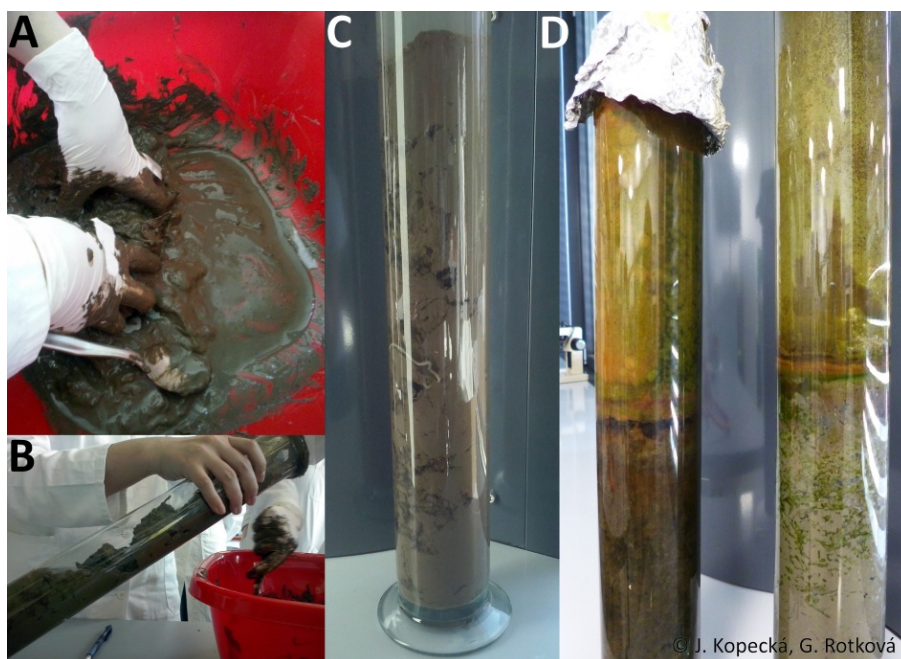
Pomůcky a chemikálie

- Bahno a voda z řeky
- Vejce, filtrační papír

Postup

Izolace zástupců rodu *Azotobacter*

- Bahno smíchat se žlutkem (Na₂S), nadrcenou skořápkou (CaCO₃), natrhaným filtračním papírem (celulóza) a vodou.
- Směsí naplnit válec, dolít vodou a uzavřít.
- Inkubovat na světle při pokojové teplotě a pozorovat rozdělení vrstev (obr. 40).



Obr. 40: Příprava Winogradského kolony (A, B), stav na začátku inkubace (C) a rozdělení vrstev po několika měsících inkubace (D) (archiv autorek)



Zhodnocení cvičení

- Došlo k rozdělení vrstev?
- Byly jednotlivé vrstvy dobře pozorovatelné?
- Po jaké době se vrstvy rozdělily?



Další informace k této problematice najdete v následující literatuře

- Prescott L., M., Harley J. P., Klein D. A., Microbiology, WCB, Dubuque, 1996, ISBN 0-697-29390-4.



Kontrolní otázky

1. Proč se do kolony přidává žloutek a skořápka?
2. Jako zdroj čeho se do kolony přidává filtrační papír?
3. Je v průběhu inkubace do kolony nutné přidávat živiny?
4. Jaké vrstvy v koloně lze pozorovat?

17 Pozorování bakteriálních endospor a jejich barvení, negativní barvení



Cíl cvičení

- Zvýraznění buněk rodu *Bacillus* negativním barvením (nefixovaný preparát).
- Pozorování bakteriálních endospor rodu *Bacillus* v nativním preparátu (fázový kontrast).
- Zvýraznění pouzder rodu *Azotobacter* negativním barvením (nefixovaný preparát).
- Barvení spor.

Úvodní slovo

Kromě rostoucích a dělicích se vegetativních buněk nacházíme u prokaryot i struktury dovolující přežití nepříznivých podmínek – **endospory**. Endospory jsou odolná klidová stádia. V buňce prokaryot je přítomna pouze jedna endospora, která obsahuje peptidoglykan zcela odlišného charakteru než peptidoglykan v buněčné stěně buňky. Makromolekuly jsou v endospoře stabilizovány přítomností specifických bílkovin, snížením množství vody a zvýšením obsahu vápníku. Vápník je v endospoře vázán v kyselině dipikolinové, která je v přírodě přítomna pouze uvnitř bakteriálních endospor a zajišťuje její termorezistenci. Endospory jsou díky četným obalům různého charakteru odolné k působení UV a γ záření, vysoušení, lysozymu, teplotním změnám, nedostatku živin a působení mnoha dezinfekčních prostředků, v etanolu mohou přežívat i několik měsíců. Endospory jsou prostředkem šíření bakterií i na značné vzdálenosti a v různém prostředí. Tvorba endospor není odpovědí na vnější prostředí, ale přípravou na nepříznivé podmínky. Endospory jsou vysoce světlolomné útvary. Endospory jsou nereproduktivní struktury tvořené malým počtem převážně grampozitivních bakterií (např. *Bacillus*, *Clostridium*, *Thermoactinomyces*, *Desulfotomaculum*, *Sporosarcina*, *Sporolactobacillus*, *Oscillospira*).

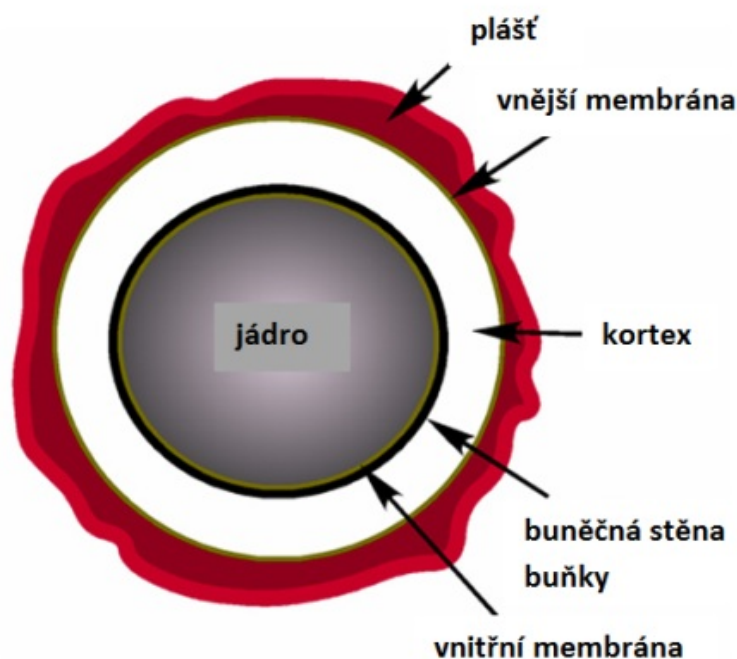
Klinicky, farmaceuticky a technologicky významné jsou termostabilní endospory zejména rodů *Bacillus* a *Clostridium*. Bakteriální endospory jsou významným prostředkem bioterorizmu (např. *Bacillus anthracis* - anthrax). Některé endospory jsou používány jako biopesticidy (např. Bt toxin, bílkovina spor *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*). Endospory obsahují na svém povrchu proteiny, peptidy či enzymy, které se využívají jako specifické sondy nebo mají biokatalytickou funkci. Modifikované endospory *B. subtilis* se používají jako vehikula vakcín a jiných farmak, např. povrchové proteiny endospor *B. subtilis*, které obsahují fragment C tetanového toxinu; alfa toxin *Clostridium perfringens* používaný pro orální a nazální imunizaci člověka i zvířat. Endospory jako transportéry farmak dodávají teplotní stabilitu, flexibilitu pro genetické modifikace a nenákladný proces přípravy.

Zatímco toxiny sporulujících druhů jsou většinou termolabilní, jsou inaktivovány již po 5 minutách při teplotě 60 °C, endospory jsou velmi odolné. U druhu *Clostridium botulinum* sporulující buňky odolávají 90 minut teplotě 100 °C, nesporulující buňky hynou po 30 minutách při 70 °C. Endospory *Clostridium tetani* (původce tetanu) jsou inaktivovány po 20 minutách při 121 °C při tlaku 0,2 Mpa a po 90 – 180 minutách při 160 - 200 °C suchého tepla. Endospory jsou vysoce termorezistentní, přežijí až pětihodinový var. Pro ověření správného průběhu sterilizace se využívají endospory *Geobacillus stearothermophilus*, které přežijí při 120 °C až 12 minut.

Sporicidních látek je málo a jsou nákladné. Příkladem je etylenoxid, β -propionlakton, koncentrované louhy a kyseliny, formaldehyd při prodloužené expozici, kyselina peroctová, jodové preparáty, chloramin.

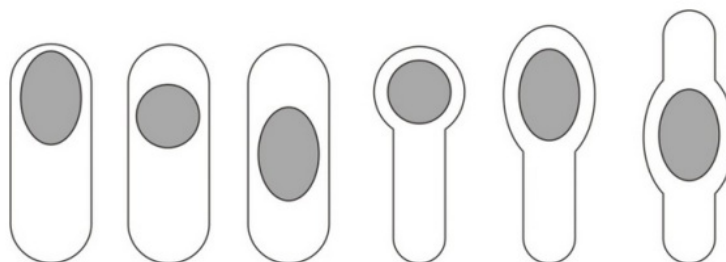
Stavba zralé bakteriální endospory (obr. 41)

Jádro spory tvoří sporoplast (též protoplast). Stroma endospory představuje gelovou matrix tvořenou bakteriálním jaderným ekvivalentem (nukleoidem), ribozomy, kalcium dipikolinátem (až 10 % sušiny endospory) nebo pyridin-2,6-dikarboxylovou kyselinou, která nahrazuje vodu při udržování kvarterní struktury při vazbách, SASPs (small acid-soluble proteins), které jsou pevně svázané s nukleovou kyselinou a zabezpečují její kondenzaci a rezistenci vůči UV záření a DNA-ničícím chemickým látkám. Přítomny jsou polyaminy, aminokyseliny a 3-fosfoglycerát. V jádře endospory jsou u některých druhů přítomny specifické látky ve formě krystalků, toxinů. Jádro je obaleno vnitřní lipoproteinovou membránou, intinou, která brání prostupu chemických látek z prostředí. Zbytky původní buněčné stěny mateřské buňky slouží jako základ nové buněčné stěny při klíčení endospory. Kortex, který se skládá z vnitřní (20 %) a zevní části (80 %), zajišťuje nepropustnost a po dehydrataci jádra termorezistenci, je nebarvitelný a je tvořen peptidoglykany. Zhruba 20–30 % peptidoglykanových jednotek je shodných s jednotkami peptidoglykanu buněčné stěny, zbylých 50–60 % jednotek představuje *N*-acetylmuramovou kyselinu modifikovanou na *N*-acetylmuramyl-laktam, dalších 18–20 % kyseliny *N*-acetylmuramové je spojeno s L-alaninem namísto tetrapeptidu. Tyto modifikace jsou zajišťovány membránově vázanými enzymy. Perikortikální vnější lipoproteinová membrána pláště, extina, se skládá z proteinů bohatých na cystein, zajišťuje odolnost k působení chemikálií. Exosporium není přítomno u všech taxonů, uděluje buňce odolnost vůči chemickým látkám a enzymům.



Obr. 41: Struktura bakteriální endospory (zdroj: <https://micro.cornell.edu/research/epulopiscium/bacterial-endospores>; upraveno)

Tvar a umístění endospory (obr. 42) v buňce je významný charakteristický znak, který pomáhá identifikaci. Např. druhy *Bacillus anthracis*, *B. cereus*, *Clostridium botulinum* mají vždy oválné endospory, druhy *Clostridium tetani*, *Bacillus sphaericus* mají kulaté endospory. Hodnotí se, zda a ve kterém místě endospora vyklenuje buňku. Uložení v buňce může být terminální (na konci tyčinky, např. *C. tetani* - paličky, *Geobacillus stearothermophilus*), centrální (*C. histolyticum*, *C. novyi*, *C. septicum*, *B. anthracis*, *B. cereus*) nebo nejčastěji subterminální, též paracentrální, (mezi středem a pólem buňky, např. *C. botulinum*, *C. sporogenes*, *B. brevis*).



Obr. 42: Možné umístění endospory a případné vyklenutí buňky jako identifikační znak (zdroj: http://tktamop.elte.hu/online-tananyagok/practical_microbiology/ch06s04.html; upraveno)

Neobarvené endospory můžeme pozorovat **fázovým** (zářící spory; až po vzniku kortexu, který udává světlolomnost) a **Nomarského kontrastem** (plastický povrch buňky, pouze pokud spora vykluje buňku), **jednoduchým barvením** (pouze pokud spora vykluje buňku).

Přímé **obarvení endospory** je možné při vzniku prospory (vznik kortexu), která je pro barvivo propustná. Spory špatně přijímají barvivo i po fixaci preparátu vzhledem k rigidnímu špatně propustnému kortexu, proto se obarví až během varu pomocí koncentrovaných barviv nebo mořidel (podobně např. acidorezistentní bakterie, které se Gramovým barvením neobarví vzhledem k obsahu mykolových kyselin v buněčné stěně). Příkladem barvení endospor je Wirtz-Conklinova a Schaeffer-Fultonova metoda. Obarvené endospory se těžko odbarvují kyselinami a jinými sloučeninami (např. alkoholem).

Barvitelnost endospor závisí na vývojovém stádiu sporulující buňky, je podmíněna stářím kultury, kvalitou živné půdy, individuálními vlastnostmi mikroorganismů, a proto nelze barvicích metod používat schematicky. Barvitelnost endospor se zlepší použitím sporulačních médií s přidávkou manganu.

Nativní preparát pozorovaný fázovým či Nomarského kontrastem umožňuje pozorování skutečného tvaru a struktury buněk neporušených fixací a barvením, dále pozorování růstu, množení a pohybu bakterií. V diagnostické praxi má význam při studiu světlolomných buněčných útvarů, které se obtížně barví (např. endospory).

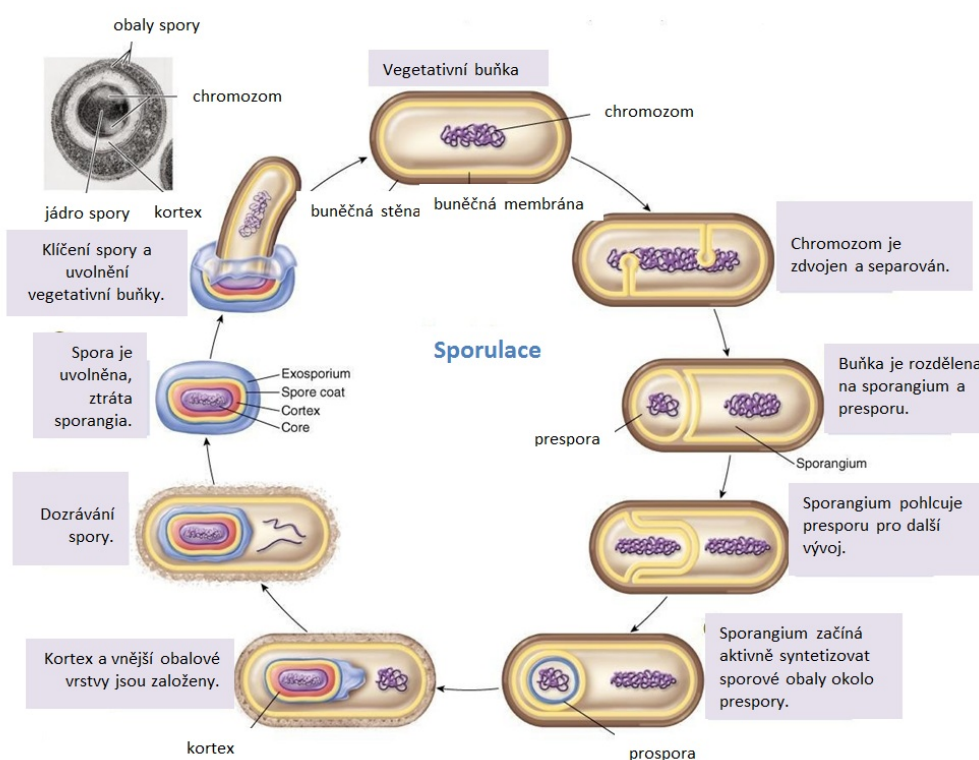
Fázový kontrast využívá odlišné světlolomnosti částic v pozorovaném objektu. Různé struktury buňky mají různé indexy lomu světla a vznikající obraz je výsledkem složení obrazů vln s posunutou fází a vln odkloněných od preparátu. Tmavé endospory se v preparátu jeví jako zářící objekty.

Sporulace - proces vzniku endospory

Ke studiu sporulace se využívá zejména rodu *Bacillus*, především druh *B. subtilis*. Sporulace probíhá i při dostatku živin zejména ve stacionární fázi. Během sporulace *B. subtilis* lze rozlišit několik fází (obr. 43), které lze charakterizovat morfologicky a na molekulárně biologické úrovni. Za vznik endospory zodpovídá asi 50 genů a celý proces trvá průměrně 6–7 hodin. V průběhu vzniku přepážky je jasné, zda vznikne vegetativní buňka nebo endospora. V případě vzniku endospory buňka přechází od binárního dělení k dělení asymetrickému.

Prospora se utváří v tzv. sporogenní zóně. Primárně se přepisují geny, které připraví prostor pro endosporu, zvyšuje se množství volutinu, které lze zjistit barvením. Dochází ke zvýšení množství enzymů, buňka zvyšuje spotřebu acetátu, a navyšuje počet enzymů Krebsova cyklu a hydroláz. Na procesu sporulace se podílí amylázy, proteázy, fosfatázy, DNázy. Axiálních filamenta slouží k rozbalení nukleoidu do dlouhého vlákna a replikaci. Vytváří se septum, které postupně rozdělí buňku na dvě nestejně části, je ukončena replikace buněčného genetického materiálu, který se rozestoupí pólům buňky. DNA endospory již není aktivní. Sporogenní zóna je homogenizovaná a zahuštěná. Má vždy jinou hustotu než zbylý obsah buňky. Cytoplazmatická membrána prolifere-

ruje kolem obou částí buňky, u prespory dochází k zaobalení dvěma membránami, intina a extina, vchlípením cytoplazmatické membrány. Do prespory se vkládá mnoho vápníku a syntetizuje se v ní kyselina dipikolinová, vzniká prospora. Ubývá volutinu. Prospora není světlolomná, nesvítlí při mikroskopii ve fázovém kontrastu. Proces sporulace je již nevratný. Tvorba kortexu spory s odlišným složením peptidoglykanu od složení peptidoglykanu buněčné stěny je řízena chromozomem mateřské buňky. Při vzniku kortexu je obsah volutinu již minimální. Ve spoře je obsažena kyselina dipikolinová, která je syntetizována mateřskou buňkou, její množství je regulováno. Kalcium dipikolinát je charakteristická složka přítomná pouze v endosporách bakterií. Endospora je již světlolomná, se vznikem kortexu je nepropustná pro barvivo, obarvitelná až při výstupu par. Probíhá syntéza dvouvrstevného pláště. U zástupců rodu *Bacillus* vzniká exosporium složené z 10 proteinů, polysacharidů a lipidů. Unikátnost bílkovin pláště je sledována chemotaxonomickými metodami. Probíhá maturace endospory, lyze mateřské buňky a uvolnění zralých spor. Následuje kryptobiotická fáze volné zralé endospory, která ve vhodných podmínkách může a nemusí klíčit. Její vnější architektura, počet a tvar pláštěů je druhově specifická.



Obr. 43: Obr. 43 Průběh sporulace (zdroj: <https://www.quora.com/What-is-microbial-spore>; upraveno)

Germinace bakteriální endospory

Germinace (klíčení endospory, obr. 44) začíná spontánní aktivací endospory. Dochází k destabilizaci pláště, v laboratorních podmínkách při působení teploty 70–85 °C po 5–10 minutách, dalšími aktivátory jsou malé organické molekuly. Aktivovaná endospora přijímá vodu a ztrácí rezistenci. Bílkovinné stabilizátory jako vnitřní součásti se začínají rozkládat. Vzniklé aminokyseliny slouží pro tvorbu nových proteinů. Nejprve je ovlivněna proteosyntéza (degradační enzymy). V momentě, kdy buňka vytváří energii, začíná fungovat regulační aparát chromozomu (ATP = signál aktivace chromozomu). Prvními funkčními enzymy jsou glykozidázy pro metabolizování kortexu. Následuje rozklad extiny (fosfolipidy, bílkovina, polysacharid). Lytický enzym kortikohydroláza depolymer-

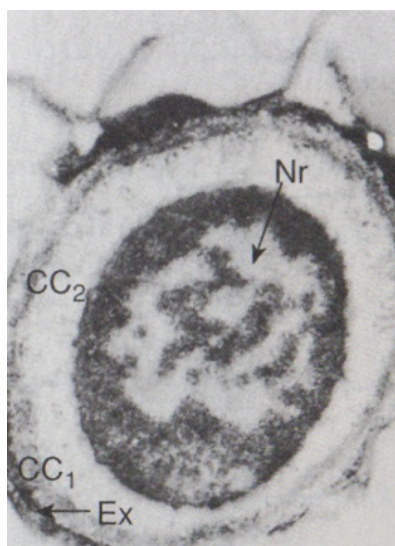
rizuje kortex pro průnik vody. Dvě hodiny po germinaci endospory dochází k dělení vegetativní buňky. Podle lokalizace klíčení endospory rozeznáváme germinaci terminální (na pólech buňky) a centrální. Germinaci je možné inhibovat přítomností aminokyseliny D-Ala, $MgCl_2$ a inhibitorem proteáz, fenylmetylsulfonylfluoridem.



Obr. 44: Klíčení endospory *Clostridium pectinovorum* (Prescott a kol., 1996)

Cysty rodu *Azotobacter*

Cysty jsou klidová stádia obklopená pláštěm (obr. 45), který je chrání před chemickým a fyzikálním stresem (např. vysychání, záření). Cysty rodu *Azotobacter* obsahují alkylresorcinol, alginát, polyhydroxybutyrát a polysacharidy. Cysta se skládá z oválné buňky, centrálního těla obklopeného dvouvrstvou kapsulou. Cysty jsou vůči nepříznivým podmínkám více odolné než vegetativní buňky, ale méně než endospory.



Obr. 45: Stavba cysty rodu *Azotobacter*, jaderná oblast (N_r), vnější obaly (CC_1 , CC_2), exosporium (Ex) (Prescott a kol., 1996, upraveno)

Bakteriální pouzdra

Polysacharidové či bílkovinné pouzdro lemuje bakteriální buňku a v prostředí ji chrání proti vysychání, jedům a nepříznivým faktorům. V živočišném těle bakterii maskuje před imunitní od-

povědí makroorganismu (maskování antigenu, větší odolnost, faktor virulence). Bakterie, které tvoří pouzdra, na misce rozeznáme podle charakteristického mohutně slizovitého vzhledu. Velké kolonie téměř splývají na médiu a za kličkou se táhnou. Pouzdro je jasně oddělené od prostředí, na rozdíl od slizu, který je více rozptýlen kolem buňky. Vysoké množství sacharidů v médiu či prostředí zintenzivňuje tvorbu pouzdra. Schopnost tvorby pouzdra je možné ztratit (mutací), z původní mukózní formy se stává R forma (reverzibilní, drsná) až S forma, která již pouzdro není schopna tvořit.

Stejně jako endospory jsou i pouzdra omezeně barvitelná. Pouzdra se nabarví po povaření v barvivu. Pro zvýraznění pouzdra se využívá negativního barvení. Pouzdro je v preparátu nezbarveno a je výrazně světlé.

Negativní barvení

Negativním barvením se obarví okolí buněk, nikoli buňky samotné. Velikost ani tvar buňky není deformovaný fixací a barvivem. Využívá se pro měření přesné velikosti a tvaru bakteriální buňky, pro stanovení pouzder, kapsulí a slizů.

Seznam přístrojů a mikroorganismů

Pomůcky a chemikálie

- podložní a krycí skla, bakteriologická klička
- filtrační papír, sterilní destilovaná voda
- nigrosin, Kongo červeně, metylenová modř, malachitová zeleň

Mikroorganismy

- *Bacillus megaterium* CCM 2007 – spory kulaté, nezduřují buňku, subterminální umístění
- *Bacillus sphaericus* CCM 1615 – spory kulaté, zduřují buňku, terminální umístění
- *Bacillus cereus* CCM 2010 – spory oválné, nezduřují buňku, centrální umístění
- *Bacillus thuringiensis* CCM 19 – spory oválné, nezduřují buňku, subterminální umístění
- *Bacillus subtilis* CCM 2216 – spory oválné, nezduřují buňku
- *Paenibacillus polymyxa* CCM 1459 – spory oválné, zduřují buňku, centrální umístění
- *Azotobacter vinelandii* CCM 289 (případně izolát z půdy)

Postup

Při fázovém kontrastu jsou v preparátu zvýrazněny endospory, jejich tvar, velikost a umístění.

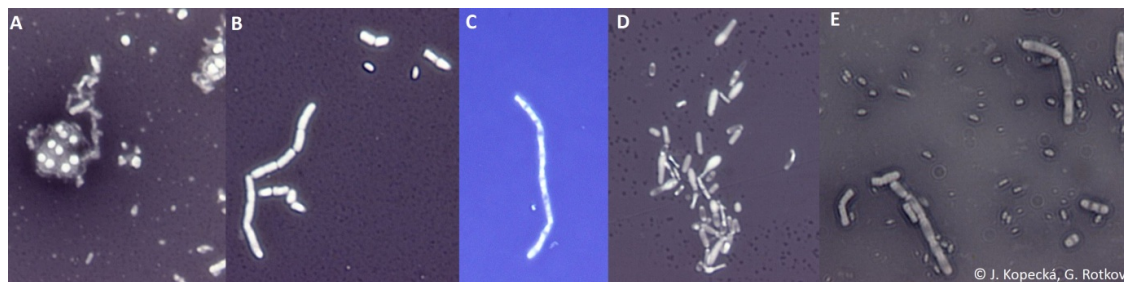
Pro pozorování endospor je vhodná kultura určitého stáří narostlá na médiu podporující sporulaci, např. u rodu *Bacillus* kultury staré 2-3 dny.

Negativní barvení nigrosinem

- Asepticky přenést buňky do malé kapky destilované vody na podložním sklíčku, vedle přidat malou kapku nigrosinu.
- Kapky smíchat kličkou, rozetřít jemným tahem druhého sklíčka (přiloženého pod úhlem 45° po celé ploše podložního skla) a bez oplachování nechat zaschnout na vzduchu.
- Důležité je vytvořit tenký film barviva s dostatečně zředěnými buňkami.
- Pozorovat při zvětšení 1000× s imerzí.

Hodnocení

V preparátu jsou viditelné neobarvené buňky na šedém pozadí (obr. 46). Porovnat mezi preparáty tvar a velikost buněk různých druhů jednoho bakteriálního rodu. Výsledek ovlivňuje tloušťka vrstvy barviva (silný nános může po zaschnutí praskat) a koncentrace barviva.



Obr. 46: Negativní barvení nigrosinem, *Azotobacter vinelandii* (A), *Bacillus megaterium* (B), *B. mycoides* (C), *B. sphaericus* (D), *B. thuringiensis* (E) (archiv autorek)

Negativní barvení Kongo červení

- Asepticky přenést buňky do malé kapky Kongo červeně na podložním sklíčku.
- Rozetřít jemným tahem druhého sklíčka (přiloženého pod úhlem 45° po celé ploše podložního skla) a nechat zaschnout na vzduchu.
- Opláchnout 1 % HCl, ihned slít, neoplachovat, případně dosušit filtračním papírem.
- Pozorovat při zvětšení 1000× s imerzí.

Negativní barvení pouzder nigrosinem u zástupců rodu *Azotobacter*

- Do kapky vody na podložním sklíčku přenést malé množství buněk ze slizovité kolonie, smíchat s kapkou nigrosinu a přikrýt krycím sklíčkem.
- Zbytek tekutiny odsát a pozorovat pod objektivem 60×.
- Šedavé buňky jsou obklopeny bílými pouzdry a pozadí je tmavé. Nigrosin nabarví buňky a pozadí, nikoli pouzdra, ta jsou takto nebarvitelná.

Negativní barvení pouzder nigrosinem u zástupců rodu *Azotobacter*, dobarvení buněk metylenovou modří

- Rozmíchat kapku nigrosinu s kapkou vody na podložním sklíčku, do suspenze přenést buňky, rozetřít po sklíčku a nechat zaschnout.
- Nátěr pokrýt na 3 minuty roztokem metylenové modře, opláchnout vodou a osušit.
- Pozorovat při zvětšení 1000× s imerzí.

Hodnocení

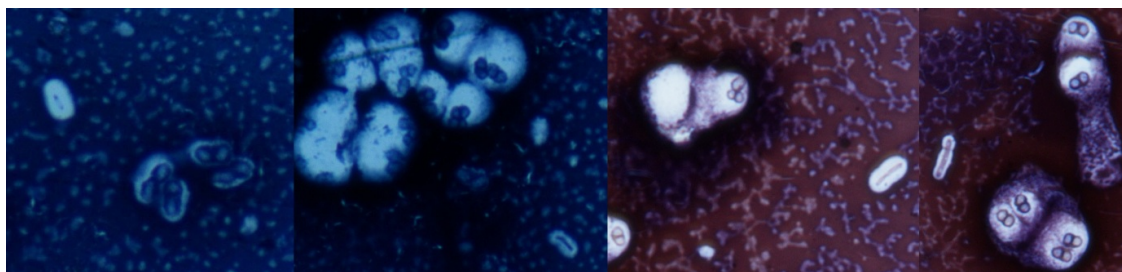
Modré buňky jsou obklopeny světlými pouzdry, pozadí je tmavé.

Negativní barvení pouzder Kongo červení u zástupců rodu *Azotobacter*, dobarvení buněk metylenovou modří

- Do kapky Kongo červeně na podložním sklíčku nanést kulturu, suspenzi rozetřít a nechat zaschnout.
- Převrstvit na několik sekund HCl. Kyselinu slít, neoplachovat, dosušit filtračním papírem.
- Na 3 minuty převrstvit metylenovou modří, slít, opláchnout vodou a usušit na vzduchu.
- Pozorovat při zvětšení 1000× s imerzí.

Hodnocení (obr. 47)

Modré buňky a cysty obklopené světlými pouzdry na tmavém pozadí.



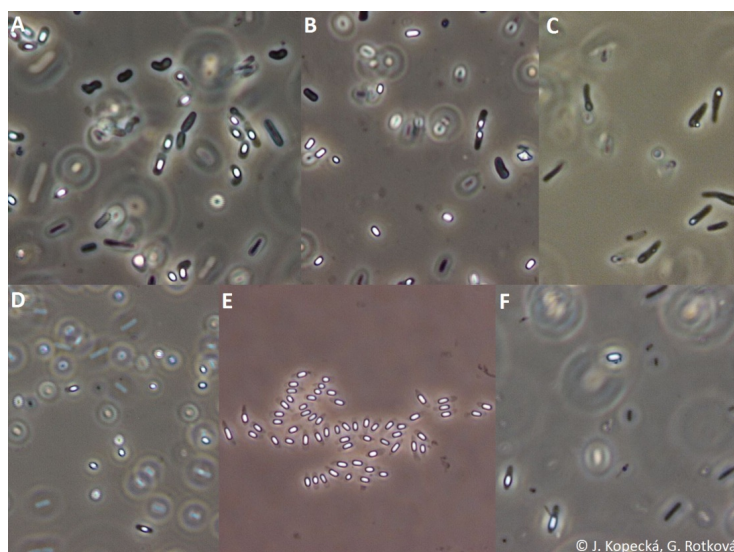
Obr. 47: Negativní barvení zástupců rodu *Azotobacter* (archiv autorské)

Přímé barvení pouzder horkým karbolfuchsinem

Výpary karbolfuchsinu jsou jedovaté, ve cvičení se neprovádí.

Nativní preparát pro pozorování endospor u zástupců rodu *Bacillus* (obr. 48)

- Do kapky sterilní destilované vody na podložním sklíčku nanést kulturu, rozmíchat a překrýt krycím sklíčkem (nepřikládat svrchu na kapku, ale nejprve jednou hranou, nepřítlačovat).
- Buňky z tekutého média pozorovat přímo v bujónu bez ředění v kapce vody.
- Ihned pozorovat při fázovém kontrastu (objektiv 60× nebo 100×), preparát rychle vysychá.



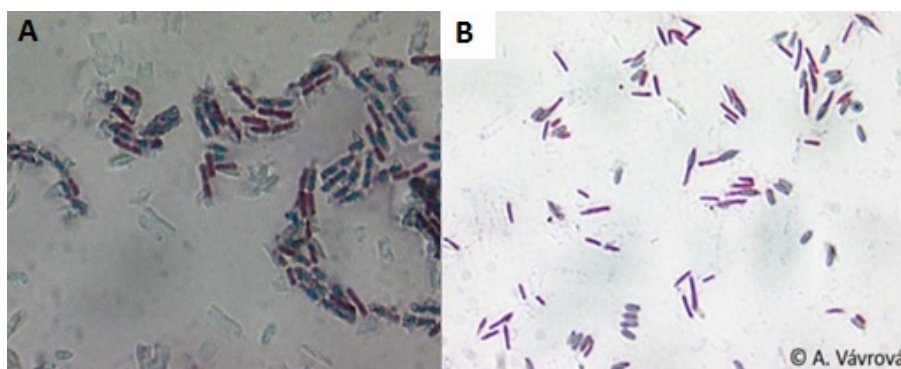
Obr. 48: Použití fázového kontrastu u sporulujících bakterií; *Bacillus cereus* (A), *B. megaterium* (B), *B. sphaericus* (C), *B. subtilis* (D), *B. thuringiensis* (E), *Paenibacillus polymyxa* (F) (archiv autorek)

Barvení endospor malachitovou zelení - Schaeffer-Fultonova metoda

- Zaschlý nátěr buněk na podložním sklíčku fixovat trojím protažením v plamenu.
- Nátěr převrstvit malachitovou zelení, zahřívát 3-4× do výstupu par po dobu 5 minut, průběžně doplňovat barvivo.
- Opláchnout vodou, převrstvit na 1-3 minuty bez zahřívání pro dobarvení kontrastním barvivem (Kongo červeně).
- Opláchnout vodou, usušit, pozorovat při zvětšení 1000× s imerzí.

Hodnocení

Zelené endospory uvnitř červených buněk, lze hodnotit tvar a umístění endospor uvnitř buněk i uvolněných endospor (obr. 49).



Obr. 49: Endospory *Bacillus cereus* (A) a *Paenibacillus alvei* (B) obarvené Schaeffer-Fultonovou metodou (archiv A. Vávrové)



Zhodnocení cvičení

- Byly endospory, pouzdra, cysty a buňky dobře odlišitelné a pozorovatelné?
- Byl rozdíl ve velikosti pouzdra u izolátu z půdy a sbírkové kultury?
- Byly endospory u různých kultur umístěné stejně?
- Měly endospory stejný tvar a velikost?



Další informace k této problematice najdete v následující literatuře

- Prescott L., M., Harley J. P., Klein D. A., Microbiology, WCB, Dubuque, 1996, ISBN 0-697-29390-4.
- Songer J. G., Clostridia as agents of zoonotic disease. Vet. Microbiol., 2010, 140: 399-404.
- Seznam proteinů zahrnutých do procesu sporulace (zdroj: . 3. 2016).



Kontrolní otázky

1. Kterou část preparátu barvíme při negativním barvení?
2. Jak je možno v preparátu zvýraznit pouzdra?
3. K čemu slouží preparát barvený Schaeffer-Fultonovou metodou, jaká barviva a k čemu se při této metodě používají?
4. Kolik je v bakteriální buňce přítomno endospor a jak je můžeme pozorovat?
5. Kde v buňce mohou být endospory umístěny?
6. Lze endospory pozorovat pod fázovým kontrastem? Pokud ano, jak se v preparátu jeví?
7. Co je germinace?
8. Zvláštnosti endospor (počet, umístění, tvar, složení).
9. Jmenujte 2 rody sporulujících bakterií.
10. Jaké výhody poskytuje negativně barvený a nativní preparát pro pozorování morfologie bakteriálních buněk?
11. Jakými mikroskopickými technikami se pozorují endospory?
12. K čemu slouží posouzení různého tvaru a umístění endospor u různých druhů rodu Bacillus?
13. Proč je barvení spor problematické?
14. Jsou negativním barvením obarveny buňky?

18 Základní mikrobiologický rozbor vody



Cíl cvičení

Stanovit celkový počet psychrofilních a mezofilních bakterií na univerzálním médiu a indikátorové skupiny bakterií na selektivně diagnostických médiích ze vzorku pitné (studna, kohoutková voda) nebo povrchové (rybník, řeka, přehrada, atd.) vody.

Úvodní slovo

Voda je jedním z přirozených stanovišť bakterií. Jejich množství a druhové zastoupení závisí na zdrojích uhlíku a dusíku a na přítomnosti kyslíku. Množství mikroorganismů závisí na vlastnostech prostředí (hloubka, přítomnost živočichů a rostlin, proud vody, pH, teplota, vzdálenost od břehu, atd.).

Mezi **typické** vodní bakterie (**autochtonní** vodní bakterie) patří např. *Chromobacterium*, *Flavobacterium*, *Sphaerotilus*, *Leptothrix* a *Spirillum*.

Pokud je ve vodě velké množství organické hmoty, více se vyskytují anaerobní nebo fakultativně anaerobní bakterie (např. *Clostridium*).

Splavováním půdy se do vody navíc dostávají aerobní **půdní bakterie**, např. *Micrococcus*, *Streptomyces* a koryneformní bakterie *Corynebacterium*, *Brevibacterium*. Vzhledem k mohutnému enzymatickému systému je jejich výskyt limitován koncentrací živin.

Krátkodobě se ve vodě mohou vyskytovat pro člověka závažnější bakteriální kontaminanty, především zástupci termotolerantních (fekálních) koliformních bakterií a intestinálních enterokoků a některé druhy rodu *Clostridium*. Za určitých podmínek můžeme izolovat i patogenní bakterie (např. *Salmonella typhi*), ale voda pro ně není vhodným stanovištěm, přežívají jen omezeně.

Cyanobakterie mají gramnegativní typ buněčné stěny a běžně se vyskytují ve vodě, půdě ale i na pouštích a v polárních oblastech. Mají schopnost fotosyntézy, buňky obsahují chlorofyl v tylakoidech a fykobilizomy (ostatní bakterie schopné fotosyntézy obsahují bakteriochlorofyl). Od ostatních prokaryot se odlišují přítomností vnějšího obalu z polysacharidů či polypeptidů (glykokalyx), plyných měchýřků a přítomností enzymu RUBISCO v karboxyzomech. Další zvláštností jsou diferencované buňky: heterocysty (fixace N₂), akinety (klidová stádia), baeocyty (reprodukční funkce). Pro masivní rozvoj ve vodě potřebují fosfor, vyšší teploty, určité pH a dostatek živin. Mohou do prostředí uvolňovat cyanotoxiny a způsobovat tzv. vodní květ. Vybraní zástupci: *Spirulina*, *Nostoc*, *Anabaena*, *Chroococcus*, *Cyanobacterium*, *Microcystis*.

Specifické prostředí pro mikroorganismy jsou moře a oceány. Mikroorganismy jsou součástí planktonu a účastní se koloběhu prvků, musí být tolerantní k soli, teplotě i tlaku, např. *Shewanella*, *Vibrio*, *Marinobacter*, *Colwellia*, *Thiomargarita namibiensis*. V hlubokomořských příkopech se vyskytují extremofilní mikroorganismy (teplota, tlak), především z domény *Archaea*.

Rutiní mikrobiologický rozbor vody je složkou komplexního posouzení kvality vody a jeho provedení a vyhodnocení se řídí státní normou. Při rozboru vody nelze pro materiálovou a časovou náročnost stanovit všechny přítomné mikroorganismy včetně patogenních. Proto se pro zjištění výskytu z hygienického hlediska závadných bakterií využívá **stanovení tzv. indikátorových skupin bakterií**, které mají stejný ekologický charakter a lze je rychle a jednoduše stanovit. Stanovení indikátorových skupin (koliformní bakterie, fekální koliformní bakterie, enterokoky, mezofilní bakterie, psychofilní bakterie, bezbarví bičíkovci a další mrtvé a živé organizmy) napoví, jaké skupiny mikrobů voda obsahuje. Pitná voda nesmí obsahovat termotolerantní (fekální) koliformní bakterie a intestinální enterokoky. Termotolerantní koliformní, fermentující střevní bakterie jsou důkazem fekálního znečištění vody, což může znamenat i přítomnost patogenů. Na selektivních médiích pro stanovení indikátorů se test na využívání substrátů projeví určitým zbarvením kolonie.

Indikátorová hodnota intestinálních enterokoků a fekálních koliformních bakterií není a nemůže být jednoznačná, je diskutována, zatím však nebyly jako základní organizmy hygienického hlediska uspokojivě nahrazeny.

Endo agar je selektivně diagnostické médium s bazickým fuchsinem, který eliminuje růst grampozitivních bakterií, a s laktózou jako zdrojem uhlíku. Štěpení laktózy je typické pro fermentující koliformní bakterie. Indikátorem proběhlé biochemické reakce štěpení substrátu laktózy je Schiffovo reagens, které indikuje acetaldehydy. Na Endově půdě roste většina nenáročných gramnegativních aerobních a fakultativně anaerobních bakterií. Při hodnocení se počítají kolonie laktóza pozitivních bakterií, které rostou v tmavorudých koloniích (médium zčervená), *Escherichia coli* většinou i s kovově zlatým leskem. Laktózu neštěpící druhy rostou v růžových až průhledných koloniích a do výpočtu se nezahrnují. Kultivace probíhá při 37 °C.

Slanetz-Bartley agar se využívá pro stanovení enterokoků. Médium obsahuje trifenyl-tetrazolium chlorid, který enterokoky redukuje na červený formazan, kolonie s tmavě rudým pigmentem. Azid sodný slouží jako selektivní činidlo pro potlačení růstu gramnegativních bakterií. Doporučuje se kultivace při 44 °C, protože při 37 °C mohou na médiu vyrůst i streptokoky. Další konfirmační testy pro odlišení od ostatních streptokoků je např. využití antibiotik. Při hodnocení se počítají červené kolonie nebo kolonie s červeným středem a růžovými okraji; bílé a bezbarvé kolonie či malé červené kolonie (menší než 2 mm) se nepočítají.

Agar mFC obsahuje laktózu. Selektivní činidlo pro grampozitivní organizmy jsou žlučové soli. Médium obsahuje anilínovou modř, která kolonie zbarví do modra. Při hodnocení se nepočítají světle růžové a šedé kolonie. Kultivace probíhá při 44 °C.

TYEA agar obsahuje trypton, kvasničný extrakt a agar. Je to univerzální půda (neselektivní médium), která slouží pro stanovení celkového počtu mikroorganismů (obecné znečištění vody). Při hodnocení se počítají všechny narostlé typy kolonií schopné růst za určité teploty. Kultivace probíhá při 22 °C pro psychrofilní a při 37 °C pro mezofilní mikroorganismy.

Psychrofilní mikroorganismy jsou bakterie s optimem růstu okolo 20 °C, které 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. Pouze jejich velmi vysoký počet znamená přítomnost mnoha organických látek ve vodě. Psychrofilní bakterie jsou přirozenými autochtony vod.

Mezofilní bakterie jsou bakterie s optimem růstu okolo 37 °C, které indikují znečištění mikroflórou teplokrevných živočichů a člověka, včetně možných patogenních mikrobů. Ve vodě je povolen pouze jejich nízký počet.

Jako **koliformní bakterie** se označují některé druhy gramnegativních bakterií z čeledi *Enterobacteriaceae*, které při kultivaci na selektivně-diagnostických půdách rozkládají laktózu během 24–48 hodin. Typický a běžně rozšířený zástupce je druh *Escherichia coli* žijící převážně v trávicím traktu teplokrevných živočichů včetně člověka. Je indikátorem fekálního znečištění se schopností růstu i při teplotách 42–44 °C. Kromě *E. coli* patří ke koliformním termotolerantním bakteriím i druhy rodů *Enterobacter*, *Citrobacter* a *Klebsiella*, které se kromě trávicího traktu mohou vyskytovat i v jiných prostředích. Pro kultivaci koliformních bakterií se používá řada živých médií, většinou s obsahem laktózy. Přítomnost termotolerantních koliformních bakterií ve vodě je možným důkazem znečištění fekáliemi, tedy i případného znečištění střevními patogenními bakteriemi (*Salmonella*, enterotoxigenní *Escherichia coli*). V případě, že je podezření na přítomnost patogenů, je potřeba rozšířit základní rozbor o jejich stanovení.

Stanovení **termotolerantních fekálních koliformních bakterií** provedením tzv. teplotního testu potvrdí **čerstvé fekální znečištění**. Odliší bakterie pocházející ze staršího znečištění, které jsou již součástí heterotrofního společenstva dané lokality. Test se provádí při teplotě 44 °C na mFC médiu.

Enterokoky (např. *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. gallinarium*, *E. avium*) jsou skupina fakultativně anaerobních grampozitivních koků, která se vyskytuje v trávicím traktu člověka a živočichů, ale i běžně v prostředí. Enterokoky, na rozdíl od ostatních streptokoků, rostou za přítomnosti

chloridu sodného (6,5%), při zásaditém pH 9,6 a v rozmezí 10–45 °C. Vyznačují se relativně vyšší termorezistencí a odolností vůči dalším fyzikálním a chemickým vlivům okolního prostředí. Pouze intestinální enterokoky (*E. faecalis*, *E. faecium*) jsou považovány za významný indikátor čerstvého fekálního znečištění, především ve vodách pitných, upravovaných dezinfekcí.

Pravidla odběru vzorku před jeho kultivací - mikrobiologické rozboru

Nádoby na vzorky musí být z průhledného a nezabarveného materiálu (sklo, polyetylen, polypropylen). Nádoby na vzorky musí být sterilizovány v autoklávu při 121 °C po dobu nejméně 15 minut (sklo, polypropylen), projít suchou sterilizací při 160 °C až 170 °C po dobu nejméně 1 hodiny (sklo) nebo musí být deklarované jako sterilní přímo od výrobce. Při odběru vzorku musí být dodržena aseptická práce. Vzorky je nutno chránit během celé přepravy před vystavením světlu, zejména přímému slunečnímu záření. Vzorek je třeba až do příjezdu do laboratoře uchovávat v chladicím boxu nebo chladničce (podle klimatických podmínek) při teplotě okolo 4 °C. Potrvá-li přeprava do laboratoře déle než 4 hodiny, je nutná přeprava v chladničce. Doba mezi odběrem vzorku a provedením rozboru musí být co nejkratší, ideálně do 24 hodin při uchování vzorku v temnu při teplotě 4 °C ± 3 °C. Dojde-li k prodloužení mezi odběrem vzorků a provedením rozboru, upraví se naměřená koncentrace bakterií podle známých vzorců rozkladu, aby byla stanovena koncentrace bakterií v okamžiku odběru.

Pitná voda

Problematiku pitných vod řeší vyhláška 252/2004 Sb. Posouzení kvality pitné vody se provádí rozboru 2 typů. Při kráceném rozboru jsou měřeny pouze některé chemické a mikrobiologické parametry. Většinou je vyžadován příslušným úřadem u kolaudací studen soukromých osob. V lokalitách, kde se nachází např. uran, arsen, antimon a další prvky, jejichž kvalitu je potřeba rovněž sledovat, je rozbor nutno rozšířit i o geologické souvislosti. Majitelé studní by si měli pravidelně nechávat provádět laboratorní rozboru pitné vody, které provádějí zdravotní ústavy i některé akreditované soukromé firmy. Zkrácený rozbor, který přijde řádově asi na 1500 - 3000 Kč, obsahuje vyšetření na mikroby, barvu, zákal, chemickou spotřebu kyslíku a velice omezené množství chemických látek. Zkoumají se látky obsahující dusík, tj. dusičnany, dusitany a amoniak. Kompletní rozbor vody, který je měřen dle celého rozsahu vyhlášky 252/2004 Sb. je požadován zdravotními ústavu u provozovatelů veřejných vodovodů, u podniků veřejného stravování, hotelů atd. s vlastním zdrojem pitné vody. Četnost rozborů určuje příslušný zdravotní ústav. Od roku 2004 se všechna data z měření vodovodů a také z bazénů, veřejných koupališť apod. zasílají do databáze pitných vod tzv. PiVo Ministerstva zdravotnictví ČR.

Povrchová voda

Sledování kvality vod ve vodních tocích a nádržích spravují jednotlivá povodí - Povodí Labe, Vltavy, Odry, Ohře a Moravy. Další měření provádí Český hydrometeorologický ústav, Výzkumný ústav vodohospodářský TGM a Státní meliorační správa. Jakost vod se významně zlepšila především díky výstavbě nových čistíren odpadních vod, omezením používání hnojiv v zemědělství a omezením průmyslových výrob. Problémem zůstává mikrobiální znečištění, které pochází především z komunálních zdrojů znečištění. Nárůst počtu bakterií způsobený vypouštěním komunálních odpadních vod je příčinou, proč velké vodní toky většinou nejsou vhodné ke koupání. Mikrobiologické parametry nejsou při rozborech odpadních vod platnou legislativou vyžadovány (Nařízení vlády 61/2003). Samotné sledování vzniklou situaci neřeší a možnost, jak snížit stupeň mikrobiálního znečištění odpadních vod je jejich dezinfekce, která je problematická z hlediska technologií a také finančně náročná.

Odpadní vody

Velmi obecně lze říci, že odpadní vody jsou vody, které mají po použití změněnou jakost. U průmyslových odpadních vod jsou dány emisní limity pro jejich vypouštění, hodnoty průměrné a hodnoty maximální, tj. nepřekročitelné hodnoty, které stanovuje vodoprávní úřad. Analýza odpadních vod je prováděna v akreditovaných laboratořích periodicky na základě rozhodnutí příslušného úřadu. Pro některé typy odpadních vod bývá nařízen i tzv. 2hodinový, nebo i 24hodinový odběr, aby se zajistila průměrná hodnota měnících se parametrů v těchto vodách.

Seznam přístrojů a mikroorganismů

- TYEA (trypton, yeast extract, agar)
- Slanetz-Bartley (SB) agar, Endo agar, mFC agar
- Fyziologický roztok, pipety, hokejky, zkumavky
- Vzorek vody (pitná/povrchová voda)

Postup

Pitná voda – neočekáváme znečištění, používat **neřaděný vzorek a ředění** 10^{-1} .

Povrchová voda – očekáváme znečištění, používat **ředění** 10^{-1} a 10^{-2} .

V protokolu vždy uvést zdroj vody!

Každé ředění očkovat na min. 2 misky pro vytvoření aritmetického průměru (obr. 50).

Postup ve cvičení vychází z normy ČSN 830521; v dnešní době je však platný postup dle Vyhlášky č. 252/2004 Sb. (modifikace použitých médií k záchytu daných bakteriálních druhů; upravená média pro jiné indikátorové skupiny bakterií po filtraci vody).

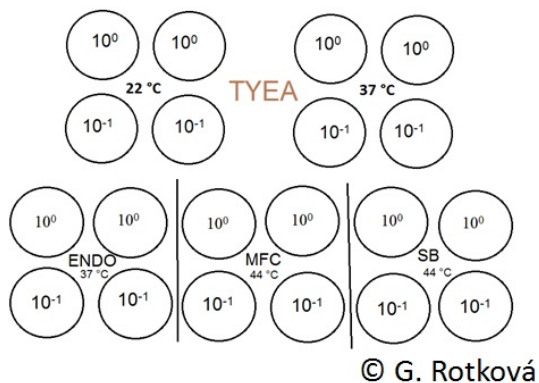
Obecné znečištění

- Vzorek vody naředit na koncentraci 10^{-1} , případně 10^{-2} dle typu vzorku (0,5 ml vzorku do 4,5 ml fyziologického roztoku).
- Vzorek dobře promíchat a 1 ml každého ředění pipetovat do sterilních Petriho misek.
- Přelít zhruba 15 ml temperovaného TYEA média.
- Kultivace probíhá při 22 (psychrofilové) a 37 °C (mezofilové).
- Celkem je potřeba 8 misek pro jeden vzorek (2 ředění po 2 miskách a teploty kultivace 22 a 37 °C).

Stanovení indikátorů pomocí selektivně diagnostických médií

- Vzorek vody naředit na koncentraci 10^{-1} , případně 10^{-2} dle typu vzorku (0,5 ml vzorku do 4,5 ml fyziologického roztoku).
- Vzorek dobře promíchat a 0,1 ml vzorku každého ředění pipetovat na připravené agary v Petriho miskách (SB, ENDO a mFC agar) a rozetřít bakteriologickou L-kličkou.
- Kultivace probíhá při 37 (ENDO agar) a při 44 °C (SB a mFC agar).

- Při stanovení enterokoků z pitné vody (SB agar) je možné koncentrovat vzorek pomocí filtrace vzorku před kultivací.

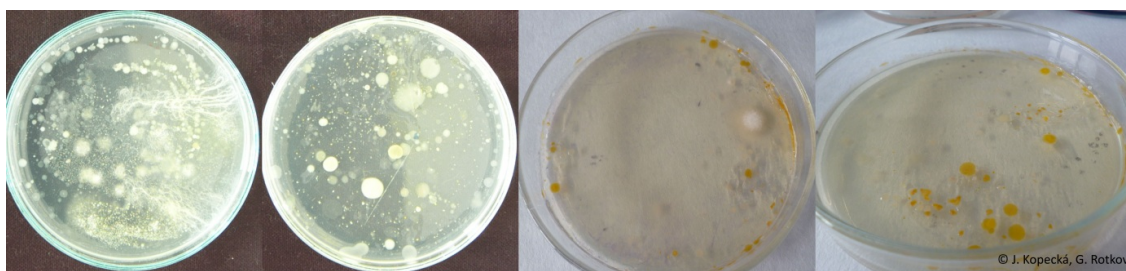


Obr. 50: Počet misek pro 1 vzorek při rozboru vody (ředění jsou uvedena pro pitnou vodu) (archiv autorky)



Zhodnocení cvičení

Na **TYEA agaru** počítat všechny typy narostlých kolonií (obr. 51).



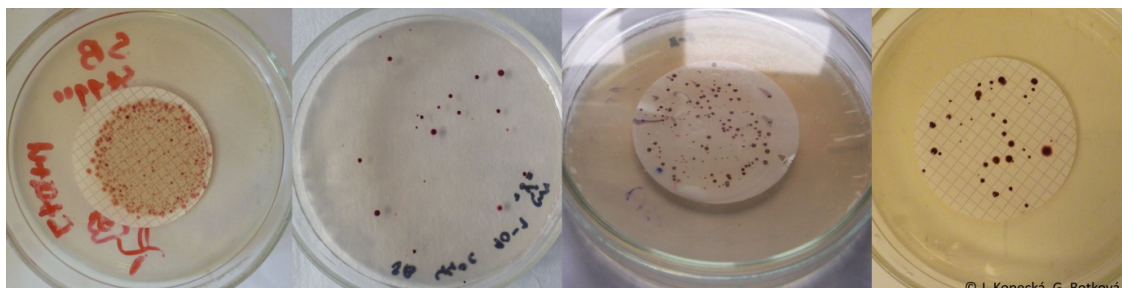
Obr. 51: Růst bakterií na TYEA agaru (archiv autorky)

Na **Endo agaru** (obr. 52) počítat kovově lesklé kolonie *E. coli*, tmavě červené kolonie ostatních koliformních bakterií. Růžové či průhledné kolonie značí laktóza negativní bakteriální izoláty, nepočítají se.



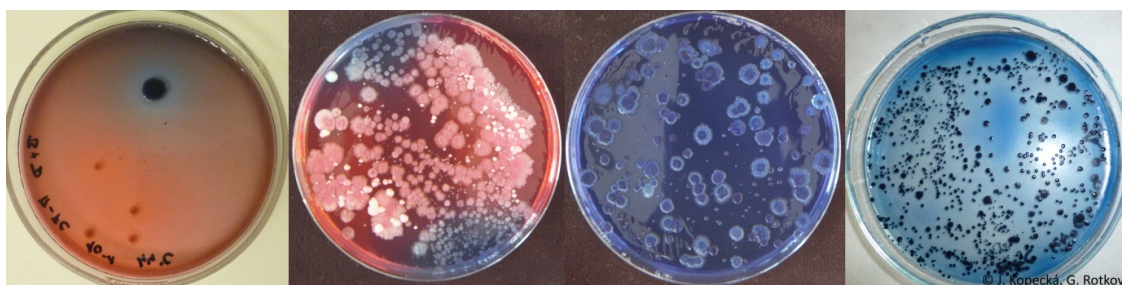
Obr. 52: Růst bakterií na Endo agaru (archiv autorky)

Na **SB agaru** (obr. 53) počítat temně červené kolonie či kolonie s červeným středem a růžovým okrajem = presumptivní intestinální enterokoky.



Obr. 53: Růst presumptivních enterokoků na SB agaru (archiv autorek)

Na **mFC agaru** (obr. 54) počítat fialové až tmavomodré laktóza pozitivní kolonie (presumptivní intestinální enterokoky), nepočítat světle růžové a šedé kolonie.



Obr. 54: Růst bakterií na mFC agaru (archiv autorek)

Pro posouzení výsledků je nutné výsledky přepočítat na **CFU/ml** v původním vzorku. K hodnocení vybrat dvojici misek vhodného ředění (misky se zhruba 20 - 200 koloniemi) a spočítat počet kolonií. Kolonie počítat ze dna misky a označit fixou na sklo tečkou. Ze získaných hodnot vypočítat průměr, číslo vynásobit kladnou hodnotou ředění. V případě nanášení 0,1 ml vzorku na misku (selektivní média) navíc hodnotou 10 (přepočet na 1 ml). Výsledky porovnat s tabulkami hodnot pro rozbor vody Vyhlášky č. 252/2004 Sb. (obr. 55).

Pitná voda

Vyhláška č. 252/2004 Sb., kterou se stanoví hygienické požadavky na pitnou a teplou vodu a četnost a rozsah kontroly pitné vody.
Změny: vyhláška č. 187/2005 Sb., č. 293/2006 Sb.

	Pitná voda	Balená voda	Pitná voda upravovaná z povrchového zdroje	Náhradní zásobování, studny
Escherichia coli	0 KTJ/100 ml	0 KTJ/250 ml	0 KTJ/100 ml	0 KTJ/100 ml
Koliformní bakterie	0 KTJ/100 ml	0 KTJ/100 ml	0 KTJ/100 ml	0 KTJ/100 ml
Clostridium perfringens			0 KTJ/100 ml	
Pseudomonas aeruginosa		0 KTJ/250 ml	-	
Počty kolonií při 22 °C	200 KTJ/1 ml	100 KTJ/1 ml	200 KTJ/1 ml	500 KTJ/1 ml
Počty kolonií při 36 °C	20 KTJ/1 ml	20 KTJ/1 ml	20 KTJ/1 ml	100 KTJ/1 ml
enterokoky	0 KTJ/100 ml	0 KTJ/250 ml	0 KTJ/100 ml	0 KTJ/100 ml

Povrchová voda

Nařízení vlády č. 61/2003 Sb., o ukazatelích a hodnotách přípustného znečištění povrchových vod a odpadních vod, náležitostech povolení k vypouštění odpadních vod do vod povrchových a do kanalizací a o citlivých oblastech.

	Pro rozlišení úpravy na pitnou vodu			Povrchová voda	Povrchová voda na koupání	
	A1	A2	A3		Cílová hodnota	Přípustná hodnota
Koliformní bakterie	50 KTJ/100 ml	5000 KTJ/100 ml	50000 KTJ/100 ml	200 KTJ/1 ml	500 KTJ/100 ml	10000 KTJ/100 ml
Termotolerantní koliformní bakterie	20 KTJ/100 ml	2000 KTJ/100 ml	20000 KTJ/100 ml	40 KTJ/1 ml	100 KTJ/100 ml	2000 KTJ/100 ml
Enterokoky	20 KTJ/100 ml	1000 KTJ/100 ml	10000 KTJ/100 ml	20 KTJ/1 ml	100 KTJ/100 ml	400 KTJ/100 ml
Salmonely	0 KTJ/5000 ml	0 KTJ/5000 ml			<1/1000 ml	0 KTJ/1000 ml
Mikroskopický obraz živé organismy	50 KTJ/1 ml	3000 KTJ/1 ml	10000 KTJ/1 ml			

Kategorie standardních metod úpravy surové vody na pitnou vodu

Kategorie A1

Jednoduchá fyzikální úprava a desinfekce, například rychlá filtrace a desinfekce.

Kategorie A2

Běžná fyzikální úprava, chemická úprava a desinfekce, například chlorování nefiltrované vody, srážení, vložkování, usazování, filtrace, desinfekce (závěrečné chlorování).

Kategorie A3

Intenzivní fyzikální a chemická úprava, rozšířená úprava a desinfekce, například chlorování do bodu zlomu, srážení, vložkování, usazování, filtrace, adsorpce (aktivní uhlí), desinfekce (ozonizace, závěrečné chlorování).

Rozsah analýz kráceného rozboru pitné vody podle 252/2004

	pitná voda	balená voda	upravovaná z povrchového zdroje	náhradní zásobování, studny
Escherichia coli	0 KTJ/100 ml	0 KTJ/250 ml	0 KTJ/100 ml	0 KTJ/100 ml
koliformní bakterie	0 KTJ/100 ml		0 KTJ/100 ml	0 KTJ/100 ml
Clostridium perfringens			0 KTJ/100 ml	
Pseudomonas aeruginosa		0 KTJ/250 ml		
počty kolonií při 22 °C	200 KTJ/1 ml	500 KTJ/1 ml	200 KTJ/1 ml	500 KTJ/1 ml
počty kolonií při 36 °C	100 KTJ/1 ml	20 KTJ/1 ml	100 KTJ/1 ml	100 KTJ/1 ml

Rozsah analýz základního rozboru pitné vody podle 252/2004

	pitná voda	balená voda	upravovaná z povrchového zdroje	náhradní zásobování, studny
Escherichia coli	0 KTJ/100 ml	0 KTJ/250 ml	0 KTJ/100 ml	0 KTJ/100 ml
koliformní bakterie	0 KTJ/100 ml		0 KTJ/100 ml	0 KTJ/100 ml
Clostridium perfringens			0 KTJ/100 ml	
Pseudomonas aeruginosa		0 KTJ/250 ml		
počty kolonií při 22 °C	200 KTJ/1 ml	100 KTJ/1 ml	200 KTJ/1 ml	500 KTJ/1 ml
počty kolonií při 36 °C	20 KTJ/1 ml	20 KTJ/1 ml	100 KTJ/1 ml	100 KTJ/1 ml
enterokoky	0 KTJ/100 ml	0 KTJ/250 ml	0 KTJ/100 ml	0 KTJ/100 ml

Rozsah analýz rozboru teplé vody podle 252/2004

	teplá voda	nemocnice
legionely	100 KTJ/100 ml	0 KTJ/50 ml
počty kolonií při 36 °C	200 KTJ/1 ml	

Rozsah analýz rozboru teplé vody z individuálního zdroje pro hygienu zaměstnanců podle 252/2004

atypická mykobakteria	0 KTJ/100 ml
Escherichia coli	0 KTJ/100 ml
legionely	100 KTJ/100 ml
počty kolonií při 36 °C	200 KTJ/1 ml
Pseudomonas aeruginosa	0 KTJ/100 ml
Staphylococcus aureus	0 KTJ/100 ml

Obr. 55: Výběr požadavků na mikrobiologickou a biologickou analýzu pitné a povrchové vody (Vyhláška č. 252/2004 Sb.)



Další informace k této problematice najdete v následující literatuře

- Baudišová D., Správnost a přesnost výsledků při mikrobiologických analýzách vody, VÚV, 1998 (zdroj: <http://www.mzp.cz/ris/ais-ris-info-copy.nsf/4d735ff9c7e64b58c12569e7001a2d9c/3e5d5bba30e14c0a8025680e003396c6?OpenDocument>; 13. 3. 2016)
- Centrum pro cyanobakterie a jejich toxiny, www.sinice.cz (13. 3. 2016)
- Fykologická laboratoř Přírodovědecké fakulty Jihočeské univerzity, www.sinicearasy.cz (13. 3. 2016)
- Kvalita pitné vody, <http://sweb.cz/Hlavaty.Vaclav/kvalita.htm> (13. 3. 2016)
- Vyhláška č. 252/2004 Sb. (zdroj: <http://sweb.cz/Hlavaty.Vaclav/vyhl.htm>, 13. 3. 2016)



Kontrolní otázky

1. Jaké mohou být zdroje nepřesností při mikrobiologickém rozboru vody?
2. Jak se liší postup při základním mikrobiologickém rozboru vody povrchové a pitné?
3. Jaký je postup stanovení celkového počtu psychrofilních a mezofilních bakterií ve vzorku vody pitné nebo povrchové?
4. Jaká selektivně diagnostická média můžeme použít při základním mikrobiologickém rozboru vody? Počítáme na nich všechny kolonie?
5. Jaká je bakteriální indikátorová skupina pro základní mikrobiologický rozbor vody?
6. Využívání jakého cukru se sleduje na Endově agaru?
7. Počítají se na selektivně diagnostických médiích všechny bakteriální kolonie?
8. Jmenujte alespoň 4 druhy bakterií přirozeně osídlující vody.

19 Úvod do identifikace bakterií, biochemické testy a standardizované identifikační systémy



Cíl cvičení

- Identifikace neznámého izolátu pomocí fenotypových vlastností.
- Výběr vhodného kmene pro identifikaci pomocí ENTEROtestu 16.

Úvodní slovo

Základním předpokladem správné identifikace je práce s čistou kulturou a její základní kultivace pro pomnožení vzorku. U některých vzorků kultivace na diagnostických půdách napovídá, o kterou taxonomickou skupinu se jedná.

Identifikace neznámých vzorků bakterií spočívá krok za krokem v hodnocení jejich **morfologie** (makroskopické a mikroskopické znaky, charakter růstu kolonií, identifikační barvení – Gramovo, acidorezistentní, tvorba endospor, tvorba pouzdra aj.), **fyziologických** (vztah ke kyslíku, teplota růstu, rezistence a tolerance k NaCl, žlučovým solím, antibiotikům, typ metabolismu aj.) a **biochemických vlastností** (zdroje uhlíku, redukce nitrátů, tvorba indolu aj.). Pokud tyto testy nevedou k úspěšné identifikaci, použijí se doplňující testy, např. serotypizace, fagotypizace, imunochemické reakce, chemická analýza buněčné stěny, produkce toxinu, průkaz specifických antigenů, aglutinace nebo genotypizace - PCR reakce, sekvenace 16S rRNA, ribotypizace, hybridizace aj.

Testy je možno dělit na několik skupin: skličkové (KOH test, katalázový test), zkumavkové (OF test, TSI test), papírkové (ONPG test, oxidázový test), mikrotesty (ENTEROtest). Destičkové mikrotesty oproti zkumavkovým (jeden test = jedna zkumavka) šetří materiál, energii, čas, prostor a jsou snadno proveditelné. Souprava zpravidla obsahuje reprezentativní soubor 10 až 20 biochemických testů. Mikrotesty pomáhají odstraňovat nesrovnalosti dané individuálními rozdíly v přípravě médií, provedení i hodnocení. K hodnocení se používají diagnostické tabulky a počítačové programy. Testy mají dostatečně dlouhou skladovací dobu. Pro identifikaci se u nás často využívají Mikro-LA-Testy (Erba-Lachema); pro identifikaci gramnegativních fermentujících tyčků (čeleď *Enterobacteriaceae*) se využívá ENTEROtest a ENTERO Rapid, pro identifikaci anaerobů ANAEROtest 23, pro stafylokoky a mikrokoky STAPHYtest 24, pro rozlišení streptokoků a enterokoků STREPTOtest 24, pro identifikaci gramnegativních nefermentujících tyčků NEFERMtest 24N.

Příklad identifikace neznámého vzorku

1. KOH test – odlišení grampozitivních a gramnegativních buněk
2. Kultivace na MPA a krevním agaru, porovnání vzhledu kolonií a různé teploty kultivace
3. Gramovo barvení, mikroskopie
4. U grampozitivních buněk se hodnotí tvar buněk a další vlastnosti
 - (a) tyčky – po barvení endospor – sporulující (dle vzhledu určíme rod *Bacillus*), nesporulující (*Lactobacillus*)
 - (b) koky – dle morfolgie shluků, hrozníčků (*Staphylococcus*) dvojic, čtveřic (*Micrococcus*), balíčků, sarcin (*Sporosarcina*), řetízků (streptokoky).

- (c) katalázový test – pozitivní např. u rodu *Staphylococcus*
5. U gramnegativních buněk se hodnotí tvar buněk (gramnegativní koky jsou méně časté, většinou jde o patogeny) a další vlastnosti
- (a) OF test - bakterie fermentující (fakultativně anaerobní metabolismus, např. enterobakterie); bakterie s respiratorním metabolismem (např. pseudomonády).
- (b) Oxidázový test slouží k odlišení bakterií s respiratorním a fermentatorním metabolismem.

Čeď *Enterobacteriaceae* je klinicky nejdůležitější početná čeď (cca 150 druhů) gramnegativních tyčinek (1–6 μm dlouhé a 0,3–1 μm široké), která je důležitá i pro neklinická odvětví mikrobiologie. Enterobakterie netvoří endospory ani cysty; jsou to nepohyblivé nebo peritrichální, nenáročné chemoautotrofní bakterie. Rostou v rozmezí 18–40 °C s optimem při 37 °C. Čeď zahrnuje fakultativně anaerobní druhy, většina žije v prostředí a dále často v trávicím traktu obratlovců jako běžná součást mikroflóry. Většina zástupců je nepatogenních, některé druhy jsou však závažnými původci onemocnění. Mezi nejzávažnější patogeny způsobující celkové infekce patří *Yersinia pestis*, tzv. antropopatogenní serovary salmonel (serovary Typhi, Paratyphi A, Paratyphi B a Paratyphi C) a některé kmeny *Escherichia coli*. Protože se střevní enterobakterie spolu s výkaly dostávají do vnějšího prostředí, jejich přítomnost (např. ve vodě) ukazuje na fekální znečištění. Rody se navzájem rozlišují podle acidifikace cukrů a cukerných alkoholů, redukce nitrátů, tvorby sulfanu, hydrolýzy močoviny, KCN-testu, glycerolového testu, tvorby indolu, testu na pohyblivost aj.. Diagnostická média speciálně pro enterobakterie jsou např. Endův a MacConkey agar, desoxycholát-citrátový agar, Salmonella-Shigella agar, agar s brilantovou zelení, Simmons-citrát agar. Jsou oxidáza negativní (kromě rodu *Plesiomonas*), tvoří katalázu, vždy štěpí glukózu a redukují nitráty.

Testy použité ve cvičení

KOH test slouží k rychlému odlišení grampozitivních a gramnegativních bakterií. Hydroxid draselný naruší tenkou peptidoglykanovou vrstvu buněčné stěny u gramnegativních bakterií. Buněčný lysát tvoří viskózní suspenzi, která se táhne za kličkou. Nelze použít u bakterií tvořících sliz.

Kataláza je enzym rozkládající peroxid vodíku na volný kyslík a vodu. Některé bakterie jsou schopny redukovat kyslík na peroxid vodíku, který je pro buňky toxický. Obranný mechanismus snižující toto poškození spočívá v rozkladu peroxidu vodíku na vodu a kyslík.

Pro **OF test, test na oxidaci/fermentaci** (aerobní/anaerobní metabolismus), se používá médium s glukózou a acidobazickým indikátorem bromthymolovou modří. Při štěpení glukózy dochází ke vzniku kyselin a vzniká žluté zbarvení (pozitivní reakce), v zásaditém prostředí indikátor modrá alkalizací a při neutrální reakci je barva média zelená. Médium ve 2 zkumavkách (bez parafinu pro aerobní podmínky, s parafinem pro zajištění anaerobních podmínek) je očkováno vpichem, ve sloupci je možno odečíst i pohyb bakterií.

Pozitivní oxidaci i fermentaci glukózy (obě zkumavky žluté) mají fakultativně anaerobní mikroorganismy. Pozitivní oxidaci a zároveň negativní fermentaci glukózy se vyznačují aerobní nefermentující druhy, např. *Pseudomonas*. Negativní oxidaci i fermentaci glukózy mají druhy, které glukózu nefermentují a ani aerobně neštěpí. Glukóza vstupuje do buňky a je dále katabolizována. Některé mikroorganismy katabolizují glukózu oxidativně za tvorby oxidu uhličitého a vody. Většina však katabolizuje glukózu fermentativně bez použití kyslíku, někdy i v přítomnosti kyslíku. Mikroorganismy jsou schopny kromě glukózy fermentovat další monosacharidy, disacharidy či polysacharidy. Koncovými produkty fermentace jsou malé organické molekuly, obvykle organické kyseliny (např. kyselina mléčná). Některé mikroorganismy vytvářejí při fermentaci plyny (vodík, oxid uhličitý). Tvorba kyseliny a plynu se testuje pomocí fermentační zkumavky. Pro zkvašování cukrů platí následující pravidla: pokud kultura nekvasí glukózu, nekvasí ani jiný cukr.

TSI test (triple-sugar iron) slouží pro stanovení využití laktózy, glukózy, sacharózy a produkci H_2S pomocí indikátoru železa podle Hajny či jiných plynů. Jako indikátor okyselení cukrů se využívá acidobazická bromkrezolová červeň, indikátor produkce H_2S je železo. Některé bakterie uvolňují sirovodík z aminokyselin obsahujících síru. Některé enterobakterie tvoří sirovodík redukcí kyslíkatých siřných sloučenin. Produkce sirovodíku je detekována pomocí síranu železnatého (vytváří se černý, nerozpustný sulfid železnatý). Při produkci plynu kvašením glukózy dole ve zkumavce vznikají bubliny. Médium je očkováno vpichem a po šikmé části agarů tzv. hádkem. Využití glukózy jako zdroje uhlíku a energie se posuzuje ve sloupci, využití laktózy a sacharózy v šikmé části agarů.

Oxidázový test identifikuje organizmy, které vytvářejí enzym cytochrom c oxidázu (poslední enzym dýchacího řetězce) účastníci se přenosu elektronů v elektronovém transportním řetězci aerobních bakterií na kyslík. Oxidázové činidlo obsahuje chromogenní oxidačně-redukční činidlo, které oxidací mění barvu do modré až tmavě fialové. Test se používá k diferenciaci druhů rodu *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*. Oxidáza pozitivní jsou např. *Pseudomonas aeruginosa*, *P. putida*, *P. fluorescens*, *Plesiomonas* atd.

ONPG test slouží k důkazu produkce β -galaktozidázy, která štěpí laktózu. K provedení testu je používán bezbarvý o-nitrofenyl- β -D-galaktopyranozid, který je v pozitivním případě hydrolyzován na žlutý ortho-nitrofenol.

ENTEROtest 16 se využívá pro identifikaci fermentujících (pozitivní test fermentace, negativní oxidázový test) zástupců čeledi Enterobacteriaceae izolovaných např. na Endově agaru. Jedná se o komerční systém 16 jamkových testů ve 2 řádcích. Na jedné destičce je možno zpracovávat 6 kmenů. Test je doplněn papírkovým testem pro přítomnost oxidázy. Potvrzení čeledi se provádí testem na fermentaci glukózy. Pro odlišení od čeledi Vibrionaceae se provádí oxidázový test, vibria či aeromonády jsou oxidáza pozitivní.

Nejčastější příčiny neúspěšné identifikace jsou kontaminace vzorku, jiná hustota nebo objem suspenze, kápnutí inokula do sousední řady nebo činidla do jiného sloupce, druh nebo atypický kmen, jehož údaje nejsou uvedeny v tabulce.

Testy v jamkách: produkce sirovodíku (H_2S), 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).

Protože se v prostředí běžně vyskytují bakterie s vnitrodruhovou variabilitou fenotypových znaků, přechází se od identifikačních klíčů, které uváděly pouze pozitivní či negativní reakce, k tabulkám, které obsahují procento kmenů daného druhu, u něhož je test pozitivní. Při vyhodnocení se výsledky (+ či -) zapisují pod příslušné reakce (obr. 56), případně se využije automatizovaného readeru pro odečet s následným vyhodnocením pomocí příslušného softwaru. Každá reakce má pod svým označením uvedenu číslici, která slouží pro výpočet číselného kódu. Pokud je reakce pozitivní, hodnotu číslice přičteme. Pokud je reakce negativní, číslici nebereme v potaz, tzn. neodečítáme. Číselné kódy slouží ke snadnějšímu vyhodnocení a orientaci v tabulkách.

MIKROTEST® ENTEROtest 16

Erba Lachema s.r.o. Karásek 1d 621 33 Brno, CZ

Kmen č./Kmeň č./Strain No./No. анализа:
 Poznámky/Notes/Примечания:

Proužek Průžok Strip Полоска		Řádek/Riadok/Strip/Стрив 1										Řádek/Riadok/Strip/Стрив 2																			
OXI	ONP	H ₂ S	LYS	IND	ORN	URE	PHE	ESL	SCI	MAL	INO	ADO	CEL	SUC	SOR	TRE	MAN	H	G	F	E	D	C	B	A						
-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	2	0	0	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2
		Profil/Profile/Профиль: 2 5 1 0 2 0																													

Dodatečné testy/Additional tests/Дополнительные тесты:

Identifikace/Identifikácia/Identification/Идентификация: *Proteus vulgaris* T index = 1 Id.skóre = 99,46%

MIKROTEST® ENTEROtest 16

Erba Lachema s.r.o. Karásek 1d 621 33 Brno, CZ

Kmen č./Kmeň č./Strain No./No. анализа: **17**
 Poznámky/Notes/Примечания:

Proužek Průžok Strip Полоска		Řádek/Riadok/Strip/Стрив 1										Řádek/Riadok/Strip/Стрив 2													
OXI	ONP	H ₂ S	LYS	IND	ORN	URE	PHE	ESL	SCI	MAL	INO	ADO	CEL	SUC	SOR	TRE	MAN	H	G	F	E	D	C	B	A
-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+								
		Profil/Profile/Профиль:																							

Dodatečné testy/Additional tests/Дополнительные тесты:

Identifikace/Identifikácia/Identification/Идентификация: *Providencia neubergii* T_i = 0,687 Identif. skóre 100%

© J. Kopecká, G. Rotková

Obr. 56: Vyhodnocení ENTEROtestu 16 (archiv autorek)

Pro vyhodnocení lze využít program TNW, který u vybraného výsledku vypočte **identifikační skóre** a **T index**. Identifikační skóre je míra výlučnosti identifikace, procento pravděpodobnosti, že kmen náleží právě k tomuto taxonu (druhu) a žádnému jinému: > 99 % je výborné odlišení; 96–99 % značí velmi dobré odlišení; 90–96 % kmen je odlišen a < 90% značí neodlišený kmen. T index určuje typičnost identifikovaného kmene vzhledem k vypsanému taxonu: > 75 typický kmen; 0,5 – 7,75 méně typický kmen; 0,25–0,5 netypický kmen; < 0,25 zcela netypický kmen. Pro atypický kmen program TNW doporučí další rozlišující testy, případně ukáže nestandardní výsledky.

Jako kontrola kvality použitých chemikálií a kontrola interpretace barevných reakcí se používají kontrolní kmeny bakterií, které dávají standardní výsledky. Kontrolní kmeny jsou dodávány Českou sbírkou mikroorganismů v lyofilizovaném stavu nebo na želatinových discích.

Závěrem je třeba zdůraznit, že neznámý izolát je vždy nutné posuzovat komplexně, tzn. přihlídnout k charakteru růstu kolonií, optimálním kultivačním teplotám, původu vzorku, druhu materiálu a nakládání se vzorkem.

Seznam přístrojů a mikroorganismů

Pomůcky a chemikálie

- Sterilní destilovaná voda, fyziologický roztok
- Očkovací kličky, podložní sklíčka, automatické pipety
- Mikrotest ENTEROtest 16
- Oxidázové a ONPG proužky
- 3 % peroxid vodíku, 3% KOH

Mikroorganismy

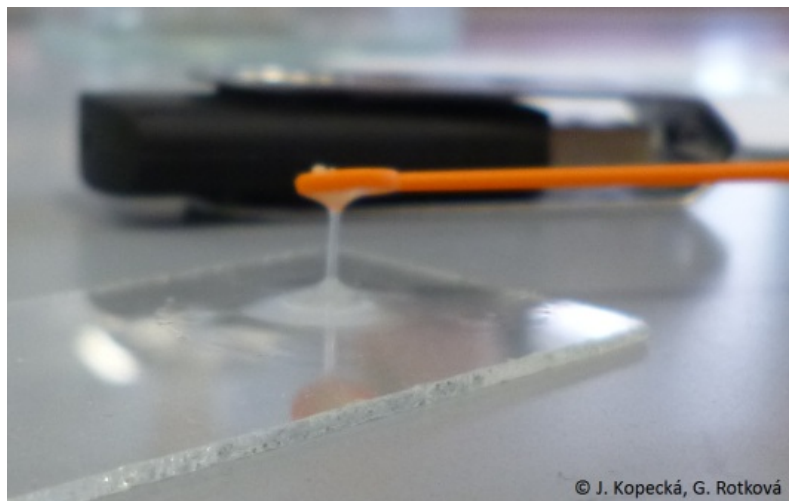
- Neznámý bakteriální kmen

Postup

Ve cvičení se používá kombinace testů, některé jsou pouze demonstrační pro odečtení výsledků.

KOH test

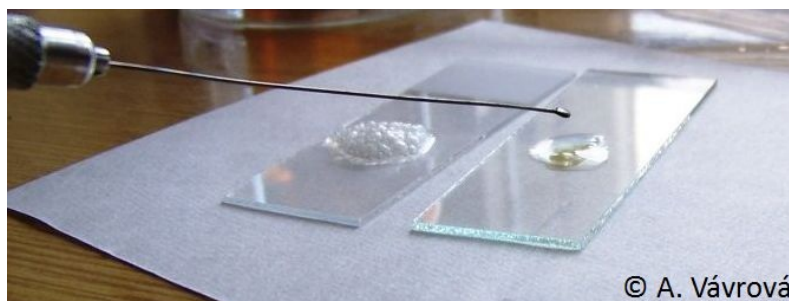
- Do kapky 3% KOH na podložním sklíčku nanést kulturu.
- Pokud kultura po rozmíchání kličkou tvoří viskózní suspenzi, která se táhne se za kličkou (lyze stěny a vylití obsahu buňky), je kultura gramnegativní (obr. 57).



Obr. 57: Provedení KOH testu u gramnegativní kultury (viskózní suspenze táhnoucí se za kličkou) (archiv autorek)

Katalázový test

- Do kapky 3% H₂O₂ na podložním sklíčku nanést kulturu.
- Pozitivní test se ihned projeví uvolňováním bublinek kyslíku (obr. 58)



Obr. 58: Provedení katalázového testu (archiv A. Vávrové)

OF test, test na oxidaci/fermentaci glukózy (aerobní/anaerobní metabolismus)

- Test je demonstrační pouze pro odečet výsledků. Pro každý kmen jsou připraveny 2 zkumavky, jedna s parafínem (anaerobní prostředí pro zkvašování glukózy) a jedna bez parafínu (aerobní prostředí pro oxidativní využívání glukózy).
- Žluté zbarvení média značí pozitivní reakci; modrá a zelená barva média značí negativní reakci (obr. 59). Ve sloupci je možno odečíst i pohyb bakterií.



Obr. 59: Vyhodnocení OF testu. Obě reakce pozitivní (žluté) – kmen využívá glukózu jak aerobně, tak anaerobně; pozitivní aerobní reakce, negativní anaerobní reakce – kmen je schopen glukózu využívat pouze aerobně; obě reakce negativní (zelené až modré) – kmen nevyužívá glukózu jak aerobně, tak ani anaerobně (archiv autorek)

TSI test (triple-sugar iron)

- Test je demonstrační pouze pro odečet výsledků.
- Médium ve zkumavce je očkováno vpichem a vzápětí rovně šroubovým roztěrem po šikmém agaru v jediné zkumavce.

- Sleduje se zabarvení média a roztrhání agaru (obr. 60). Zkvašuje-li kultura pouze glukózu, zežloutne pouze sloupec a šikmá plocha zůstane červená (např. salmonely). Pokud bakteriální kultura zkvašuje současně s glukózou laktózu nebo sacharózu, zežloutne sloupec i šikmá část agaru. Produkce H₂S se projeví zčernáním média ve sloupci (pozor na odečet fermentace glukózy, kdy černá barva překryje žlutou!). Potrhání agaru či jeho nadzvednutí značí tvorbu plynu (CO₂) z glukózy.



Obr. 60: TSI test (archiv autorek)

Oxidázový test

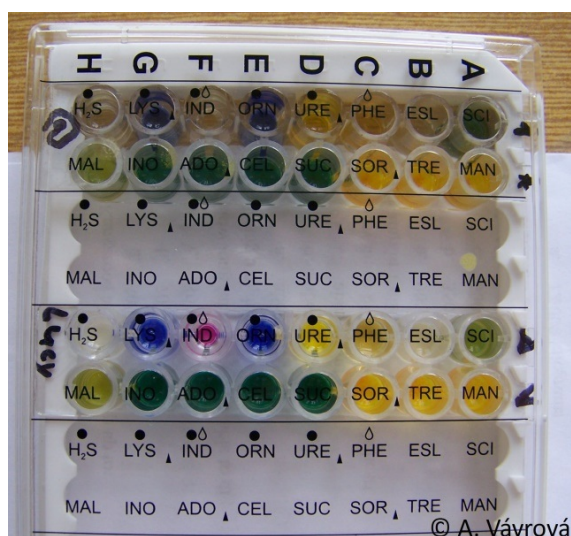
- Na detekční zónu proužkového testu plastovou kličkou (NE kovovou!) nanést 24hodinovou kulturu nebo papírek přímo zatlačit do kultury.
- Médium, ze kterého se kultura odebírá, nesmí obsahovat glukózu nebo nitráty.
- Pokud reakční plocha do 30 sekund intenzivně modrá, je reakce pozitivní; pokud zmodrá do 2 minut, je reakce opožděně pozitivní. Pokud zůstane barva beze změny nebo se objeví reakce po 2 minutách, reakce je negativní (obr. 61).



Obr. 61: Oxidázový test (archiv autorek)

ENTEROtest 16

- Pro ENTEROtest je důležité vybrat vhodný kmen, tzn. kmen, který pravděpodobně patří do čeledi *Enterobacteriaceae* (gramnegativní, kataláza pozitivní, fermentuje i oxiduje glukózu, oxidáza negativní).
- Z 24 hodinové kultury připravit suspenzi buněk ve 3 ml fyziologického roztoku se zákalem o hodnotě 1 podle stupnice McFarlanda.
- Destičku orientovat na výšku, odříznout krycí folii a označit destičku číslem kmene.
- Pipetovat 100 µl důkladně protřepané suspenze do každé jamky příslušného řádku.
- Některé testy probíhají v anaerobních podmínkách, příslušné jamky zakápnout dvěma kapkami sterilního parafinového oleje: test pro sirovodík (H₂S), lysin (LYS), indol (IND), ornitin (ORN), ureáza (URE), arginin (ARG).
- Testy před kultivací uložit do sáčku, aby jamky nevysychaly.
- Kultivace probíhá při 37 °C po dobu 18 až 24 hodin.
- Při hodnocení zakápnout jamku (IND) činidlem pro indol, jamku (PHE) činidlem pro fenylalanin a jamku (VPT) činidlem pro acetoin dle návodu.
- Odečíst všechny reakce ENTEROtestu (obr. 62), fenylalanin do 3 minut, protože po této době pozitivní reakce mizí. Orientovat se dle interpretační tabulky (obr. 63) přiložené k soupravě (případně dle barevné srovnávací stupnice).



Obr. 62: ENTEROtest 16 (archiv A. Vávrové)

ENTEROtest 16



Barevná škála / Farebná stupnica / Colour scale / Цветная шкала / Porównawcza skala barw / Színskála / Farbskala / Escala de colores

1	H	G	F	E	D	C	B	A
	H ₂ S	LYS	IND	ORN	URE	PHE	ESL	SCI
(+)								
(-)								

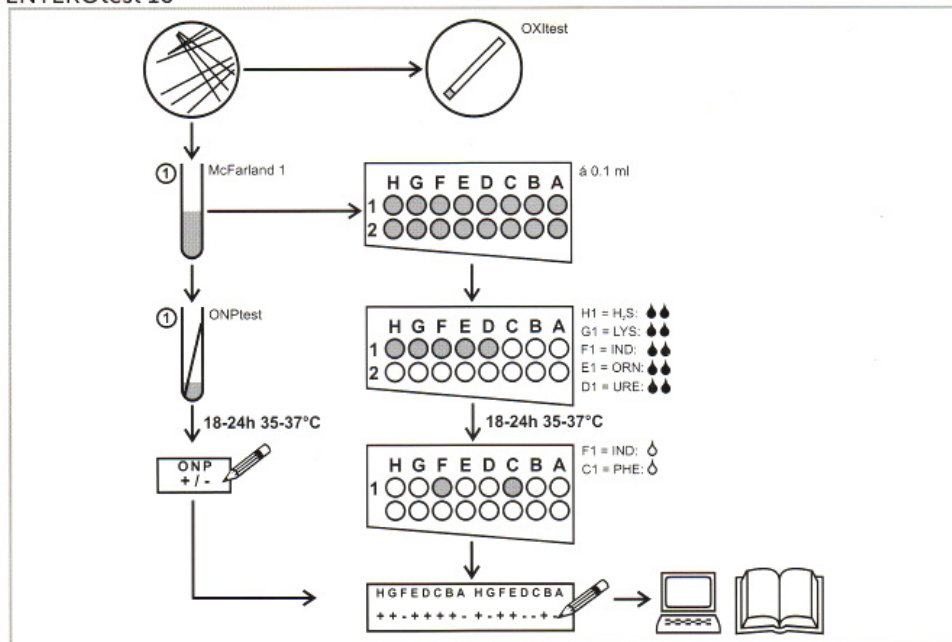
2	H	G	F	E	D	C	B	A
	MAL	INO	ADO	CEL	SUC	SOR	TRE	MAN
(+)								
(-)								

	OXItest			ONPtest	
(+)			(+)		
(-)			(-)		

MIKROTEST®

BLUE POINT OF QUALITY

ENTEROtest 16



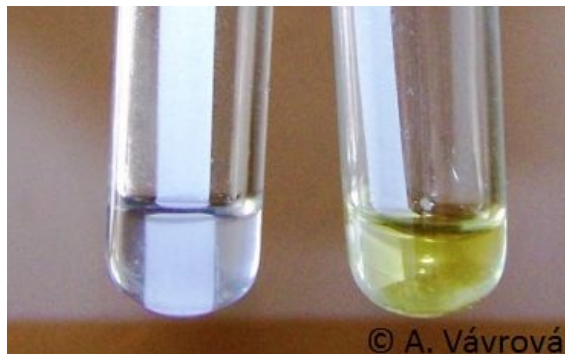
● = Parafinový olej - Paraffin oil - Пар.масло - Olej parafinowy - Paraffinolaj - Paraffinöl - Aceite de parafina
 ⚗ = Činidlo - Reagent - Реактив - Odczynnik - Reagens - Reagenzmittel - Reactivo
 ① = Fyziologický roztok - Saline - Физиcтвop - Roztwór soli fizjologicznej - Fiziológias sóldatban - Physiologische Lösung - Solucion fisiologica salina

Obr. 63: Interpretací tabulka pro ENTEROtest 16 (zdroj: Manuál MikroLaTest, Erba Lachema)

ONPG test

- Do zbylé suspenze po provedení ENTEROtestu sterilně vložit papírek s ONPG testem.

- Kultivace probíhá spolu s ENTEROtestem 24 hodin při 37 °C.
- Pozitivní výsledek je jasně žluté zbarvení (obr. 64).



Obr. 64: Test produkce β -galaktozidázy (archiv A. Vávrové)



Zhodnocení cvičení

- Identifikace neznámého vzorku.



Další informace k této problematice najdete v následující literatuře

- Systém MIKROLA (zdroj: <https://www.erbalachema.com/produkty-a-reseni/mikrobiologie/system-mikrola/>; 21. 3. 2016)
- Česká sbírka mikroorganismů (zdroj: <http://www.sci.muni.cz/ccm/>; 21. 3. 2016)



Kontrolní otázky

1. K čemu slouží KOH test?
2. Proč se místo Gramova barvení používá k rozlišení grampozitivních a gramnegativních buněk KOH test? Je možno tím úplně nahradit Gramovo barvení?
3. Co se stane, pokud vybereme pro ENTEROtest bakterie z jiné skupiny (např. nefermentující)?
4. Co je důležité pro správnou identifikaci neznámého vzorku?
5. Jaké jsou výhody mikrotěstů oproti testům zkumavkovým?
6. Využití jakého cukru se sleduje u OF testu?

Část II

Cytologie a morfologie bakterií

1 Gramovo barvení, negativní barvení, nativní preparát



Cíl cvičení

Barvení a pozorování mikroskopických preparátů.

Úvodní slovo

Nativní preparát

Při pozorování suspenze nativního preparátu buňky nikdy nefixujeme. Preparát je nebarvený, slouží ke zjištění skutečného tvaru a struktury buněk neporušených fixací a barvením. Využívá se při pozorování růstu, množení a pohybu bakterií. Význam má při studiu buněčných útvarů, které se obtížně barví, např. spor. Pro pozorování struktur se využívá jasné pole, fázový nebo Nomarského kontrast.

Fixace preparátu

Podstatou fixace je vysrážení buněčných koloidů, zejména bílkovin. Fixací buňky lépe přilnou ke sklíčku, nespláchnou se aplikací barviva či rozpouštědla a lépe přijímají barvivo. Preparát se fixuje až ve chvíli, kdy je nátěr suchý, aby nedošlo k uvaření buněk. Fixace se provádí 3x protažením podložního skla s nátěrem buněk, který je umístěn na horní straně sklíčka, nesvítivou částí plamene. Pokud byly buňky kultivovány v tekutém cukerném prostředí, je nutné buňky od média separovat centrifugací a následně je promýt vodou či puftrem. Buňky kvasinek a vláknitých hub jsou větší než buňky bakterií, tepelná fixace může pozměnit jejich tvar. Proto se většinou fixují chemikáliemi. Fixace i barvení mírně buňky deformují, jejich charakteristický tvar zůstává. Pro měření přesné velikosti buněk se využívá nefixovaný preparát negativně obarvený (obarvení okolí buňky).

Barvené preparáty

Slouží ke zjištění typu buněčné stěny, tvaru buněk a uspořádání jejich shluků, přítomnosti a uložení endospor, přítomnosti pouzder a vnitřních buněčných struktur (inkluzí) a životaschopnosti buněk. Pro určení morfologie buňky a charakteristických shluků stačí jednoduché barvení buněčné stěny (např. krystalovou violetí) bez rozlišování grampozitivního či gramnegativního typu. Vitální barvení je barvením mrtvých buněk, protože mrtvé buňky přijímají barvivo nebo ho efluxními systémy nevylučují. Struktury buňky se rozlišují diferenciačním barvením, a to jak vnitřní a vnější morfologické útvary (endospory, pouzdra, buněčné stěny), tak chemické složky (volutin, glykogen, škrob). Diagnostické barvení napomáhá identifikaci bakterií (např. Gramovo, acidorezistentní barvení karbolfuchsinem, barvení dle Giemsey). Při negativním barvení se buňky nefixují ani nebarví, obarveno je pouze jejich okolí (např. tuší, nigrosinem). Využívá se pro měření přesné velikosti buněk nedeformovaných fixací a barvením.

Preparát se před barvením fixuje vždy kromě barvení negativního a vitálního testu. K barvení se používají zředěné vodné roztoky organických barviv, obvykle soli. Bazická barviva mají barevný kationt, kyselá aniont. Při barvení bakterií se většinou používají bazická barviva (např. krystalová violeť, metylenová modř, safranin, bazický fuchsin, malachitová zeleň). Barvení lze zvýraznit mořením buněk (např. fenolem, taninem), při kterém má mořidlo roli prostředníka s vyšší afinitou k buňce a zároveň k barvivu, než je afinita buňky k samotnému barvivu.

Gramovo barvení

Gramovo barvení je jednou z nejdůležitějších diagnostických metod při identifikaci bakterií. Rozlišuje skupinu grampozitivních (barví se modrofialově) a gramnegativních buněk (barví se červenorůžově) a udává některé fyziologické a chemické vlastnosti buňky.

Podstata rozdílného chování při Gramově barvení nebyla dosud uspokojivě objasněna, s největší pravděpodobností se uplatňují rozdíly ve složení buněčné stěny obou skupin bakterií. Jde o barvení fixovaného preparátu krystalovou violetí a následné moření buněk jódem v roztoku KI. Vzniká komplex barvivo-jód-buněčná stěna.

Rozdíl při barvení vzniká při promývání preparátu organickým rozpouštědlem (acetone nebo alkoholem). U gramnegativních buněk odbarvovací činidlo rozpustí vnější lipopolysacharidovou vrstvu, komplex krystalové violeti s jódem se vymyje přes tenkou vrstvu peptidoglykanu a buňky se odbarví, naopak grampozitivní bakterie si zbarvení ponechávají.

Pro zvýraznění rozdílu se gramnegativní bakterie dobarvují jiným kontrastním barvivem (např. bazickým safraninem, karbolfuchsinem) a barví se do červena, růžova. Grampozitivní buňky mají v buněčné stěně navázanu krystalovou violet, která se alkoholem nevyplavila a zůstávají zbarveny do modra, modrofialova. Chyby, které mohou nastat při barvení, jsou: příliš silný nátěr buněk na sklíčku; uvaření buněk při fixaci; příliš dlouhé odbarvování buněk alkoholem.

Gramovo barvení je do jisté míry ovlivněno fyziologickým stavem buněk, stářím kultury a složením kultivačního média. Pro barvení se využívají buňky staré 24 hodin. Buňky mohou ztratit svoji grampozitivitu např. mechanickým poškozením, UV zářením, působením kyselin, zásad či rozpouštědel. Mikroorganismy, které se někdy barví pozitivně a někdy negativně, označujeme jako gramlabilní/gramvariabilní.

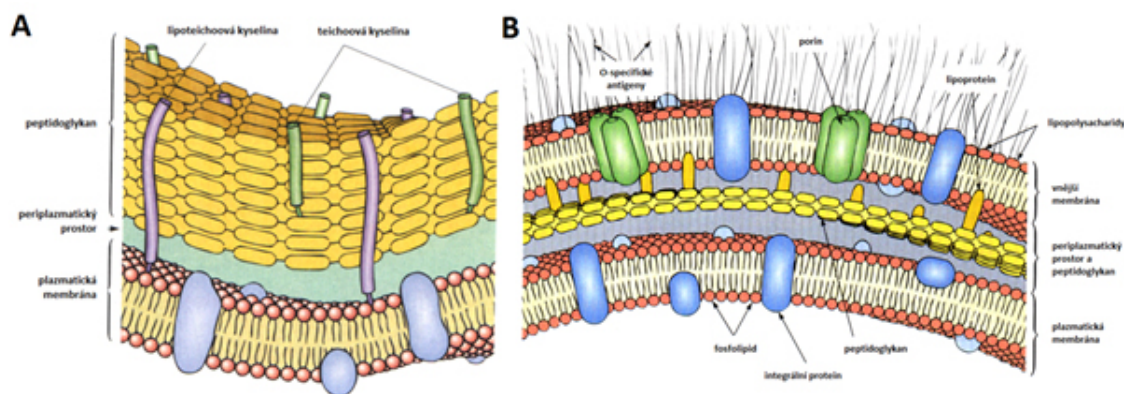
Některé bakteriální rody Gramovým barvením nelze obarvit, jsou to rody bez buněčné stěny (mykoplazmata), spirálovité bakterie a silně acidorezistentní rody (mykobakterie); např. *Mycobacterium bovis*, *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. leprae*, *M. marinum*, a dále patogenní *Borrelia burgdorferi*, *B. recurrentis*, *Bartonella henselae*, *Chlamydia trachomatis*, *C. pneumoniae*, *Chlamydophila psittaci*, *Coxiella burnetii*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Legionella* spp., *Leptospira* spp., *Rickettsia rickettsii*, *Orientia tsutsugamushi*, *Treponema pallidum*.

Buněčná stěna bakterií

Buňky gramnegativního typu (obr. 65B) mají buněčnou stěnu složenou z vnější lipopolysacharidové membrány a vnitřní relativně tenké peptidoglykanové (zhruba 5–10 % buněčné stěny) vrstvy obsahující kyselinu muramovou. Spojení mezi peptidoglykanem a vnější membránou zajišťují lipoproteiny. Lipopolysacharidy jsou složeny z lipidu A, jaderného (též základního, dřevného) polysacharidu a O-antigeny (též O-řetězec). Vnější membrána slouží jako ochranná bariéra před vnějším prostředím, brání prostupu látek nebo postup alespoň zpomaluje (žlučové soli, antibiotika, jedy, atd.).

V buněčné stěně grampozitivního typu (obr. 65A) chybí vnější membrána a peptidoglykanová vrstva je poměrně tlustá. Někteří zástupci mohou mít jako složku buněčné stěny kyselinu teichoovou, lipoteichoovou anebo neutrální polysacharidy, u několika zástupců jsou ve stěně přítomny mykolové kyseliny.

Zvláštní skupinou jsou bakterie bez buněčné stěny, tzv. mykoplazmata, které nejsou schopny syntetizovat prekurzory peptidoglykanu. Buňky jsou obklopeny pouze cytoplazmatickou membránou.



Obr. 65: Buněčná stěna grampozitivního (A) a gramnegativního (B) typu (Prescott a kol., 1996, upraveno).

Negativní barvení

Negativním barvením se obarví okolí buněk, nikoli buňky samotné. Velikost ani tvar buňky není deformovaný fixací a barvivem. Využívá se pro měření přesné velikosti a tvaru bakteriální buňky, pro stanovení pouzder, kapsul a slizu.

Vlastnosti vybraných mikroorganismů

Haloarcula

extrémně pleomorfní tyčky, většinou plochého průměru a tvaru trojúhelníků a čtvercových nebo nepravidelných disků; gramnegativní; extrémně halofilní (2–5,2 M NaCl); bakterioruberiny a žluté pigmenty

Haloferax

extrémně pleomorfní, většinou tvar plochých disků nebo pohárků; gramnegativní; kolonie s mukózním vzhledem, extrémně halofilní (1,5–4,5 M NaCl); bakterioruberiny a žluté pigmenty

Sporosarcina

kulaté či oválné buňky uspořádané jako diplokoky, tetrády nebo krychlovité balíčky; grampozitivní; pohyblivé několika bičíky; tvorba spor; krémově až oranžově zbarvené kolonie

Leuconostoc

sférické či ovoidní buňky uspořádané po dvou či v řetězcích, občas jako krátké tyčky v dlouhých řetězcích; grampozitivní

Azotobacter

velké ovoidní a pleomorfní buňky, jednotlivě, po dvou, v nepravidelných shlucích či řetězcích; tvorba cyst; gramnegativní

Yarrowia lipolytica

kvasinky, rozmnožování vegetativně pučením; pseudohyfy i pravé hyfy; jednotlivé vejčité nebo kulovité asky vyrůstající laterálně nebo terminálně; barví se jako grampozitivní bakterie

Saccharomyces cerevisiae

kvasinky, elipsoidní, kulovité někdy i protáhlé buňky; v některých případech tvoří větvené pseudomycelium; pravé mycelium nevytváří; rozmnožování pučením; haplo-diplobiotický životní cyklus, spory diploidních kmenů po 1-4 v asku; barví se jako grampozitivní bakterie

Seznam přístrojů a mikroorganismů

Pomůcky a chemikálie

- Krystalová violet, Lugolův roztok, safranin
- Nigrosin, Kongo červeně, metylenová modř, HCl

Mikroorganizmy

- Bacily, G+ tyčky různé tvary (48 hodinová kultura se sporama – fázový kontrast)
 - *Bacillus thuringiensis* CCM 19
 - *Bacillus sphaericus* CCM 1615
 - *Bacillus mycoides* CCM 145
 - *Bacillus cereus* CCM 2010
 - *Bacillus megaterium* CCM 2007
 - *Bacillus subtilis* CCM 2216
- G+ koky, krátké tyčky
 - *Azotobacter vinelandii* CCM 289 – slizovité kolonie, pouzdra
 - *Leuconostoc mesenteroides* CCM 1803 – řetízky, pouzdra, sliz
 - *Sporosarcina ureae* CCM 860
 - *Staphylococcus aureus*
 - *Micrococcus luteus* CCM 169
- G- tyčky
 - *Serratia marcescens* CCM 303
 - *Escherichia coli* CCM 3954
 - *Pseudomonas putida*
- Archaea
 - *Haloarcula hispanica* CCM 3601T
 - *Haloferax mediterranei* CCM 3361T
- Eukaryota
 - *Saccharomyces cerevisiae*
 - *Yarrowia lipolytica*

Postup

Nativní preparát

- Doprostřed podložního sklíčka nanést kapku sterilní destilované vody.
- Ožehnutou, vychladlou očkovací kličkou vnést do kapky malé množství kultury, rozmíchat. Kultury stačí nepatrné množství, aby preparát nebyl hustý.

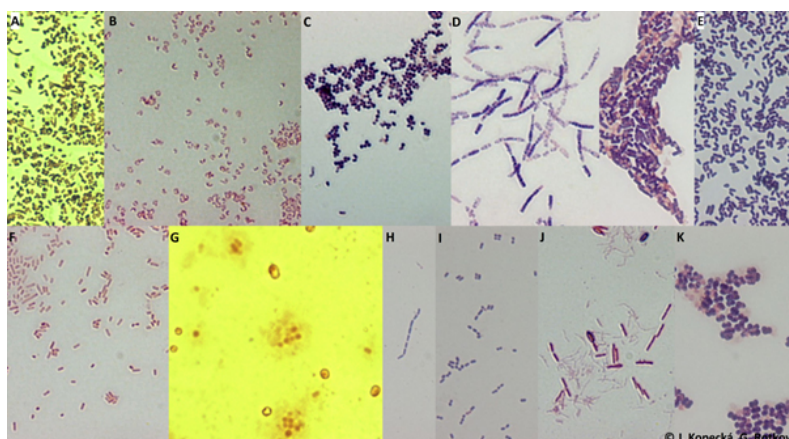
- Kapka se neroztírá, překrývá se krycím sklíčkem tak, aby v preparátu nebyly vzduchové bublinky (nepřikládat svrchu na kapku, ale nejprve jednou hranou, nepřitlačovat).
- Přebytečnou kapalinu odsát filtračním papírem.
- Buňky z tekutého média pozorovat přímo v médiu bez ředění v kapce vody.
- Pro nativní preparát zvolit objektiv s fázovým kontrastem (Ph).
- Preparát pozorovat do 5 minut z důvodu rychlého vysychání.

Jednoduché bavení

- Zaschlý nátěr buněk na sklíčku fixovat plamenem.
- Ponořit do roztoku krystalové violeti nebo safraninu na 15–20 sekund.
- Opláchnout slabým proudem vody, usušit a pozorovat při zvětšení 1000×.

Gramovo barvení (obr. 66)

- Doprostřed podložního sklíčka nanést kapku sterilní destilované vody.
- Ožehnutou, vychladlou očkovací kličkou vnést do kapky malé množství kultury.
- Suspenzi z kultury rozetřít po sklíčku, nechat dobře zaschnout a fixovat plamenem (několikrát sklíčko protáhnout plamenem).
- Preparát ponořit do roztoku krystalové violeti na 30 sekund, opláchnout vodou.
- Preparát ponořit do Lugolova roztoku na 30 sekund, opláchnout vodou.
- Preparát převrstvit etanolem/acetone, maximálně na 15–20 sekund, opláchnout vodou.
- Preparát ponořit do safraninu na 1 minutu (takto se dobarví pouze buňky gramnegativní, u kterých došlo k vyplavení krystalové violeti; safraninem však dobarvujeme každý preparát, i když předpokládáme přítomnost grampozitivních buněk – předem nevíme, o jaký typ buněčné stěny se v preparátu jedná).
- Preparát osušit mezi dvěma filtračními papíry a pozorovat při zvětšení 1000× v jasném poli (objektiv BF).



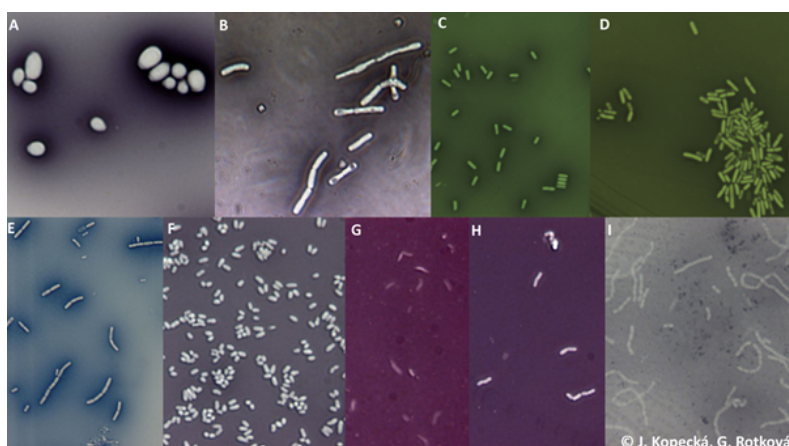
Obr. 66: Čisté kultury bakterií obarvené dle Grama. *Acinetobacter grimontii* (A), *Arthrobacter* sp. (B), *Bacillus mycoides* (C), *B. subtilis* (D), *Corynebacterium glutamicum* (E), *Escherichia coli* (F), *Haloarcula hispanica* (G), *Lactobacillus casei* (H), *Leuconostoc mesenteroides* (I), *Paenibacillus polymyxa* (J), *Sporosarcina ureae* (H) (archiv autorek)

Negativní barvení nigrosinem

- Asepticky přenést buňky do kapky destilované vody na podložním sklíčku, přidat kapku nigrosinu.
- Kapky smíchat kličkou a rozetřít jemným tahem druhého sklíčka (přiloženého pod úhlem 45° po celé ploše podložního skla), nechat zaschnout na vzduchu.
- Pozorovat při zvětšení 1000× s imerzí.

Hodnocení

V preparátu jsou viditelné neobarvené buňky na šedém pozadí (obr. 67). Porovnat mezi preparáty tvar a velikost buněk různých druhů jednoho bakteriálního rodu. Výsledek ovlivňuje tloušťka vrstvy barviva (silný nános může po zaschnutí praskat) a koncentrace barviva.



Obr. 67: Negativní barvení *Saccharomyces cerevisiae* (A), *Bacillus cereus* (B), *B. subtilis* (C), *B. subtilis* (D), *Bacillus* sp. (E), *Corynebacterium glutamicum* (F), *Haloferax mediterranei* (G), *Lactobacillus brevis* (H), *Lactobacillus casei* (I) (archiv autorek)

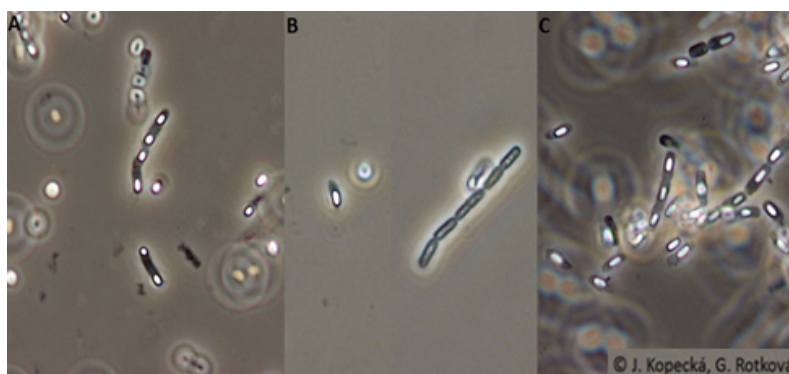
Negativní barvení Kongo červení

- Asepticky přenést buňky do malé kapky Kongo červeně na podložním sklíčku.
- Rozetřít jemným tahem druhého sklíčka (přiloženého pod úhlem 45° po celé ploše podložního skla) a nechat zaschnout na vzduchu.
- Opláchnout 1 % HCl, ihned slít, neoplachovat, případně dosušit filtračním papírem.
- Pozorovat při zvětšení 1000x s imerzí.

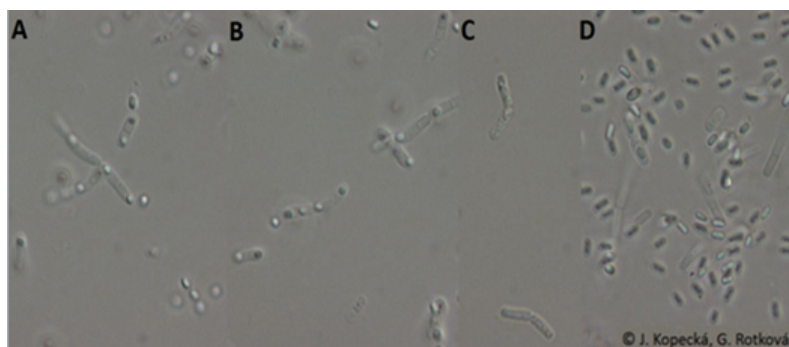
Nativní preparát pro pozorování tvaru a umístění spor rodu *Bacillus*

(fázový a Nomarského kontrast, obr. 68 a 69)

- Do kapky sterilní destilované vody na podložním sklíčku nanést kulturu, rozmíchat a překrýt krycím sklíčkem (nepřikládat svrchu na kapku, ale nejprve jednou hranou, nepřítlačovat).
- Buňky z tekutého média pozorovat přímo v bujonu bez ředění v kapce vody.
- Ihned pozorovat při fázovém kontrastu (objektiv 60x nebo 100x), preparát rychle vysychá.



Obr. 68: Fázový kontrast u sporulujících bakterií; *Bacillus megaterium* (A), *B. mycooides* (B), *B. pumilus* (C) (archiv autorem)



Obr. 69: Nomarského kontrast u sporulujících bakterií; *Bacillus megaterium* (A), *B. megaterium* (B), *B. mycooides* (C), *B. pumilus* (D) (archiv autorem)



Zhodnocení cvičení

- Všímáme si tvaru buněk, spor, poměru šířky a délky buněk, a zda je patrné vyklenutí buněk způsobené endosporami.



Další informace k této problematice najdete v následující literatuře

- Prescott L., M., Harley J. P., Klein D. A., Microbiology, WCB, Dubuque, 1996, ISBN 0-697-29390-4.
- Sedláček I., Taxonomie prokaryot, Masarykova univerzita, Brno, 2007, ISBN 80-210-4207-9.



Kontrolní otázky

1. Vysvětlete pojmy bakteriální druh a bakteriální kultura.
2. Jmenujte alespoň 4 barviva používaná v mikrobiologii.
3. Doplňte tabulku:

2 Struktury buňky (barvení inkluzí a pouzder)



Cíl cvičení

Barvení a pozorování buněčných inkluzí a pouzder.

Úvodní slovo

Inkluze či inkluzní tělíska (granule organických nebo anorganických látek) jsou viditelné ve světelném mikroskopu a jsou umístěny v buněčné matrix. Některé inkluze nemají membrány a nachází se volně v cytoplasmě (polyfosfátová a některá glykogenová granula), některé inkluze jsou obklopeny jednovrstevnou membránou (tloušťka membrány zhruba 2–4 nm), např. poly- β -hydroxybutyrát, některá glykogenová a sirná granula, karboxyzomy, plynové vezikuly. Membrány inkluzí mohou být tvořeny bílkovinami či lipidy.

Fosfáty jsou ukládány ve formě volutinových nebo polyfosfátových granulí a slouží jako zdroj fosfátu, např. pro stavbu nukleových kyselin. Polyfosfát je lineární polymer ortofosfátu spojeného esterovými vazbami. V některých případech může polyfosfát sloužit i jako zdroj energie.

Tuk se v buňce vyskytuje buď rozptýlený ve formě kapének, nebo zabudovaný v membránách. Shromažďuje se v přítomnosti kyslíku, v buňce běžně 2–3 % tuku. Tyto intracelulární inkluze se vyskytují zejména u kvasinek a mikromycet. Nejčastěji se k jejich barvení používá sudan III (0,1 g sudanu III se rozpustí ve směsi 50 ml glycerolu a 50 ml bezvodého 100 % etanolu). Do 20–30 minut se tuk zbarví do růžovo-červena (barvivo se rozpustí v tuku).

Glykogen je rozpustný polymer glukózy s α -1,4-vazbami a α -1,6 větvením na každém 8–10 monomeru. Může tvořit až 50% sušiny, je náhodně rozmístěn v celém matrix buňky jako malé granulky (20–100 nm). Ve světelném mikroskopu není viditelný. Může a nemusí mít membránu. Barví se Lugolovým roztokem. Bakteriální glykogen je silně větvený. Slouží jako pohotová rezerva. Je primární zásobní polysacharid u hub. Slouží jako zdroj uhlíku pro získání energie a biosyntézu.

Lugolovo činidlo (též Lugolův jódový roztok) je činidlo skládající se z 1 % jódu a 2 % jodidu draselného a destilované vody. Jodid draselný se přidává pro zlepšení rozpustnosti jódu ve vodě. Činidlo bylo poprvé připraveno francouzským fyzikem J. G. A. Lugolem v roce 1829. Používá se jako povrchové antiseptikum, dezinfekce a jako indikátor přítomnosti organických látek, zejména škrobů, v jejich přítomnosti mění barvu do modrofialové až černé. Barvicích schopností činidla je využíváno při Gramově barvení a dalších technikách úpravy preparátů.

Některé bakterie tvoří vrstvu materiálu, která je umístěna vně buněčné stěny. Pokud je tato vrstva organizovaná a nesmývá se snadno, jedná se o bakteriální pouzdro. Pouzdro je většinou složené s polysacharidů, ale může obsahovat i jiné látky, např. pouzdro *Bacillus anthracis* je složené z kyseliny poly-D-glutamové. Pouzdra jsou dobře viditelná ve světelném mikroskopu při negativním barvení preparátu. Pouzdro poskytuje bakterii řadu výhod: maskuje patogenní bakterii v makroorganizmu, brání vysychání díky zvýšenému obsahu vody, zadržuje řadu bakteriálních virů a hydrofobní toxické látky, např. detergenty.

Seznam přístrojů a mikroorganismů

Pomůcky a chemikálie

- Metylenová modř, Sudan III, Lugolův roztok
- Kongo červeň, nigrosin
- Krycí a podložní skla, klička, destilovaná voda

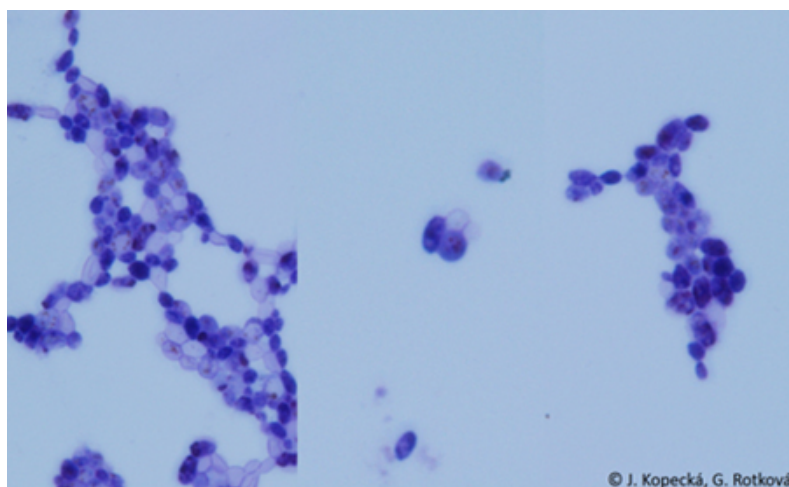
Mikroorganizmy

- *Saccharomyces cerevisiae*
- *Bacillus cereus* CCM 2010
- *Bacillus megaterium* CCM 2007
- *Azotobacter vinelandii* CCM 289
- *Leuconostoc mesenteroides* CCM 1803

Postup

Barvení volutinu polychromatickou metylenovou modří (obr. 70)

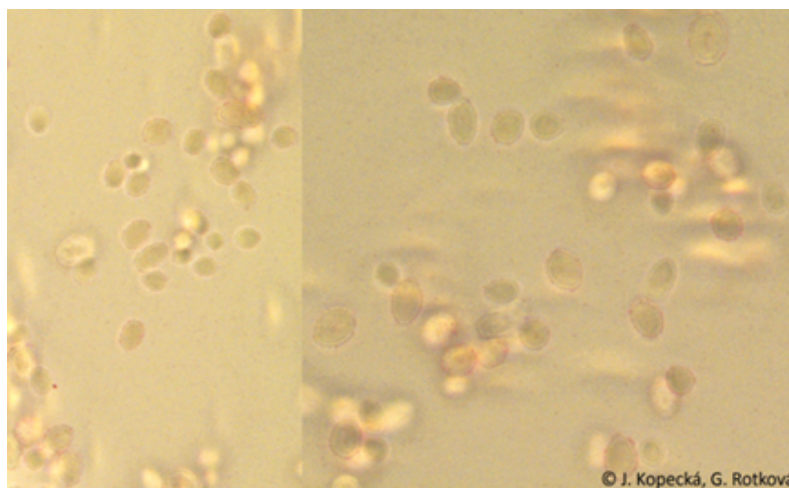
- Nátěr buněk usušit na vzduchu a převrstvit polychromatickou metylenovou modří (Löfflerova modř, vyzrálá alespoň 12 měsíců) na 1–3 minuty.
- Opláchnout, osušit a pozorovat při zvětšení 1000x.
- V preparátu jsou vidět purpurová volutinová zrna a lehce namodralá cytoplazma.



Obr. 70: Volutin u *Saccharomyces cerevisiae* (archiv autorek)

Tuk – barvení Sudanem III (obr. 71)

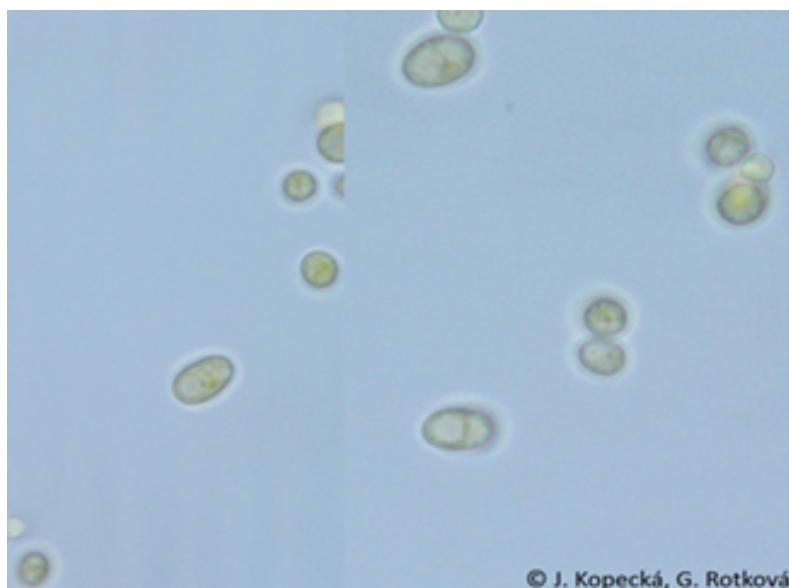
- Smíchat buňky s barvivem Sudan III, nechat působit 10–30 minut.
- Překrýt krycím sklíčkem a pozorovat cihlově červené kapičky tuku.



Obr. 71: Tuk u *Saccharomyces cerevisiae* (archiv autorek)

Glykogen (obr. 72)

- Připravit nativní preparát, vedle krycího sklíčka kápnout Lugolův roztok.
- Bezprostředně pozorovat hnědá granula glykogenu.



Obr. 72: Glykogen u *Saccharomyces cerevisiae* (archiv autorek)

Negativní barvení pouzder nigrosinem u zástupců rodu *Azotobacter*

- Do kapky vody na podložním sklíčku přenést malé množství buněk ze slizovité kolonie, smíchat s kapkou nigrosinu a přikrýt krycím sklíčkem. Zbytek tekutiny odsát a pozorovat.
- Šedavé buňky jsou obklopeny bílými pouzdry a pozadí je tmavé. Nigrosin nabarví buňky a pozadí, nikoli pouzdra, ta jsou takto nebarvitelná.

Negativní barvení pouzder nigrosinem u zástupců rodu *Azotobacter*, dobarvení buněk metylenovou modří

- Rozmíchat na podložním sklíčku kapku nigrosinu s kapkou vody, do suspenze přenést buňky, rozetřít po sklíčku a nechat zaschnout.
- Nátěr pokrýt na 3 minuty roztokem metylenové modře, opláchnout vodou a osušit.
- Pozorovat při zvětšení 1000x s imerzí.

Hodnocení

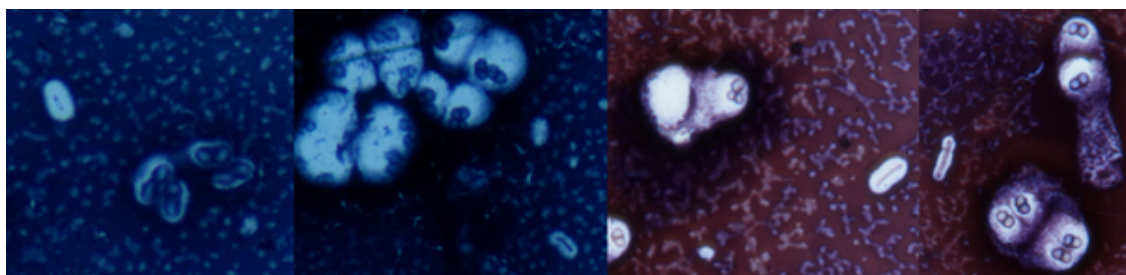
Modré buňky jsou obklopeny světlými pouzdry, pozadí je tmavé.

Negativní barvení pouzder Kongo červení u zástupců rodu *Azotobacter*, dobarvení buněk metylenovou modří

- Do kapky Kongo červeně na podložním sklíčku nanést kulturu, suspenzi rozetřít a nechat zaschnout.
- Převrstvit na několik sekund HCl. Kyselinu slít, neoplachovat, dosušit filtračním papírem.
- Na 3 minuty převrstvit metylenovou modří, slít, opláchnout vodou a usušit na vzduchu.
- Pozorovat při zvětšení 1000x s imerzí.

Hodnocení (obr. 73)

Modré buňky a cysty obklopené světlými pouzdry na tmavém pozadí.



Obr. 73: Negativní barvení rodu *Azotobacter* (archiv autorek)



Zhodnocení cvičení

- Vyfocení a popis mikroskopických preparátů.



Další informace k této problematice najdete v následující literatuře

- Prescott L., M., Harley J. P., Klein D. A., Microbiology, WCB, Dubuque, 1996, ISBN 0-697-29390-4.



Kontrolní otázky

1. Co jsou to inkluze?
2. Jsou všechny inkluze obalené membránou?
3. Jako zdroj čeho může buňka využívat volutinová granula?
4. Jako zdroj čeho může buňka využívat glykogen?
5. V čem je pro patogenní bakterii výhodné pouzdro?
6. Z čeho se skládá bakteriální pouzdro?

3 Pohyb buněk



Cíl cvičení

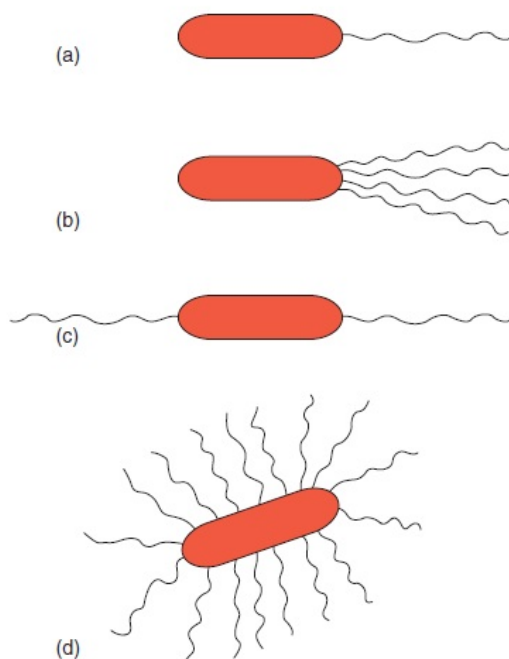
- Pozorovat pohyb buněk mikroskopicky a makroskopicky pohyb kultur na misce.
- Sledovat pohyb bičků ve visuté kapce.
- Obarvit bičky a pozorovat v jasném poli a při fázovém kontrastu.
- Očkovat polotekuté médium – na misky i do zkumavek.

Úvodní slovo

Většina pohyblivých bakterií se pohybuje pomocí bičku, který je ukotven na vnější části plazmatické membrány a v buněčné stěně. Bičik má v průměru zhruba 20 nm a je 15–20 μm dlouhý. Bičik je mikroskopicky viditelný až po obarvení, které zvětší jeho tloušťku. Umístění bičku na buňce může být různé (obr. 74).

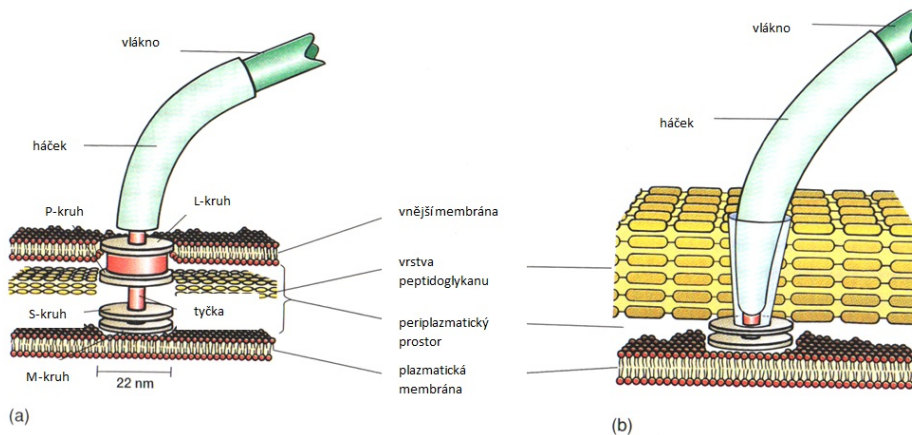
Figure 12.1 Arrangement of Flagella on Bacterial Cells.

(a) In monotrichous, polar, a single flagellum is located at one end of the cell; (b) in lophotrichous, polar, many flagella are grouped at one end of the cell; (c) in amphitrichous, polar, a single flagellum is located at both ends of the cell; and (d) in peritrichous, flagella are located all around the cell.



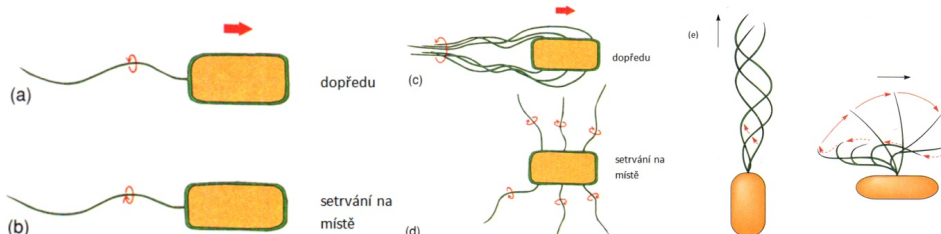
Obr. 74: Umístění bičku na bakteriální buňce. Monotricha (a), polární bičik je umístěn na jednom z konců buňky; lofotricha (b), polární umístění více bičků na jednom z konců buňky; amfitricha (c), polární bičik je umístěn na obou koncích buňky; peritricha (d), bičky jsou umístěny na celém povrchu buňky (Prescott a kol. 1996, upraveno)

Bakteriální bičík je složen ze tří základních částí. Nejdelsí část tvoří vlákno, bazální tělo je usazeno v buňce a s vláknem je spojeno háček. Vlákno je duté a pevné, složené pouze z jediného proteinu, flagelinu. Rozdíly ve stavbě bičíku u gramnegativních a grampozitivních bakterií jsou znázorněny na obr. 75.



Obr. 75: Stavba bakteriálního bičíku u gramnegativních (a) a grampozitivních (b) bakterií (Prescott a kol. 1996, upraveno)

Směr rotace bičíku určuje povahu pohybu bakterie (obr. 76). Kromě pohybu pomocí bičíku se bakterie přirozeně pohybují Brownovým pohybem. Spirochety a helikální bakterie se mohou pohybovat slizem díky tzv. axiálnímu filamentu. Dalším typem pohybu bakterií je klouzavý pohyb, např. u cyanobakterií, některých druhů myxobakterií a mykoplazmat. Ačkoli nemají žádné viditelné struktury spjaté s klouzavým pohybem, mohou dosahovat rychlosti až 3 μm za sekundu.



Obr. 76: Bakteriální pohyb. Vztah mezi rotací bičíku a pohybem bakterie, pohyb pomocí monotrichálního bičíku (a, b), peritrichálních (c, d) a polárních bičíků (e), (Prescott a kol. 1996, upraveno)

Vlastnosti vybraných mikroorganismů

Bacillus

rovné tyčky po dvojicích nebo v řetězcích se zakulacenými nebo čtvercovými konci; grampozitivní; peritrichální; tvorba endospor

Pseudomonas

gramnegativní; rovné či mírně zakřivené tyčky; jeden či několik polárních bičíků

Proteus

gramnegativní; rovné tyčky; peritrichální bičíky

E. coli

gramnegativní; jednotlivé tyčky či ve dvojicích; peritrichální bičíky

Seznam přístrojů a mikroorganismů

Mikroorganizmy

- mladé kultury (4 nebo 16 hodinové)
- *Bacillus cereus* CCM 2010
- *Pseudomonas fluorescens* CCM 2115T
- *Proteus vulgaris* CCM 1799
- *Escherichia coli* CCM 3954
- *Micrococcus luteus* CCM 169 – pro srovnání nativního preparátu, nepohyblivý

Postup

Při pozorování bičků se nesmí pracovat se skleněnými předměty (krom sklíček), protože snadno ulamují bičky. Pracovat s mladými kulturami 4-16 hodin starými vždy z tekutého média, staré buňky odhazují bičky.

Pozorování pohybu bičku

Visutá kapka

- Připravit nativní preparát, kapku suspenze buněk z média pipetovat na podložní sklo.
- Nepřekrývat krycím sklem, pozorování objektivem 20x při Nomarského kontrastu, nezanořovat!
- Pro vitalitu buněk je důležitý dostatek kyslíku, citlivější buňky se hýbou jen nahoře.
- Nutno opatrně přiosťrovat na horní část kapky.

Barvení bičků (obr. 77)

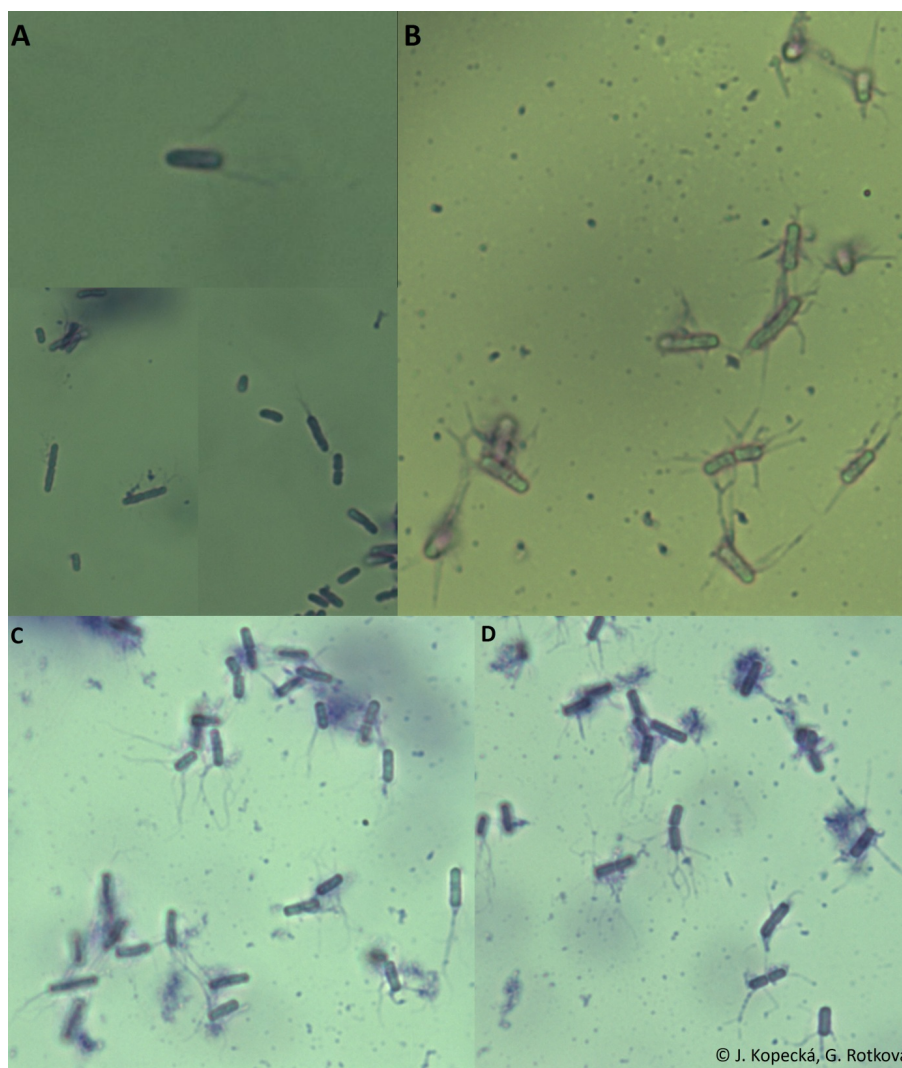
Barva obsahuje mořidlo tanin, které se obalí kolem bičku, zvětší jeho průměr a zviditelní ho.

Barvička na barvení bičků: roztok I (10 dílů) a II (1 díl), uchovávat zamraženou

Roztok I: 10 ml 5% vodného roztoku fenolu, 2 g taninu, 10 ml $KAl(SO_4)_2 \cdot 12 H_2O$

Roztok II: nasycený roztok krystalové violeti (12 g) v etanolu (10 ml, 96%)

- Připravit nativní preparát na odmaštěné podložní sklo a opatrně přikrýt krycím sklem.
- Vedle krycího sklíčka kápnout barvičku pro barvení bičků.
- Barvičku prosát filtračním papírem a preparát pozorovat při zvětšení 1000x s imerzí.



Obr. 77: Obarvené bičičky *Proteus vulgaris* (A) a *Bacillus cereus* (B, C, D) (archiv autorek)

Pozorování pohybu na agaru pro testování pohybu

Médium obsahuje nízké procentuální množství agaru, polotekuté médium (nižší viskozita prostředí).

Složení média: 100 ml demineralizované vody, 0,1 g kvasničného extraktu, 0,01 g K_2HPO_3 , 0,2 g agaru.

- Na agar se očkuje jen do středu misky, aby se rozrůstala 1 kolonie.
- Kličku s kulturou zanořit ve středu misky do agaru.
- Pohyblivé kultury udělají rozrůstající se kruh, někdy vlnící se. Nepohyblivé rostou jen v místě vpichu do určité velikosti.
- Výsledky za 3–5 dní. S miskou se nesmí hýbat.

U rodu *Proteus* lze využít jak tuhé (fenomén příbojové vlny, plazivý nárůst), tak polotekuté médium (plavání buněk v médiu).

Složení Luria-Bertani swarming média s 0,7 % agarem: 100 ml destilované vody, 1 g enzymatického hydrolyzátu kaseinu, 0,5 g kvasničného extraktu, 1 g NaCl, 0,7 g agaru.



Zhodnocení cvičení

- Pozorujeme pohyb bakterií ve visuté kapce a pohyb bakterií na miskách ve formě mohutně se rozrůstajících kolonií.
- Pomocí obarvených bičíků pozorujeme rozdíly mezi různými bakteriemi (monotricha, peritricha).



Další informace k této problematice najdete v následující literatuře

- Prescott L., M., Harley J. P., Klein D. A., Microbiology, WCB, Dubuque, 1996, ISBN 0-697-29390-4.
- Sedláček I., Taxonomie prokaryot, Masarykova univerzita, Brno, 2007, ISBN 80-210-4207-9.



Kontrolní otázky

1. Co jsou to inkluze?
2. Popište typy pohybu: Brownův pohyb, pohyb pomocí bičíků a klouzavý pohyb.
3. Popište rozdíly ve složení bičíku u grampozitivních a gramnegativních bakterií.
4. Z jakého proteinu je složen bakteriální bičík?
5. Čím lze zviditelnit bakteriální bičík pro světelnou mikroskopii?
6. Proč se při pozorování bičíků nepoužívají skleněné pomůcky?

4 Acidorezistentní barvení



Cíl cvičení

Acidorezistentní barvení a Gramovo barvení gramlabilních buněk.

Úvodní slovo

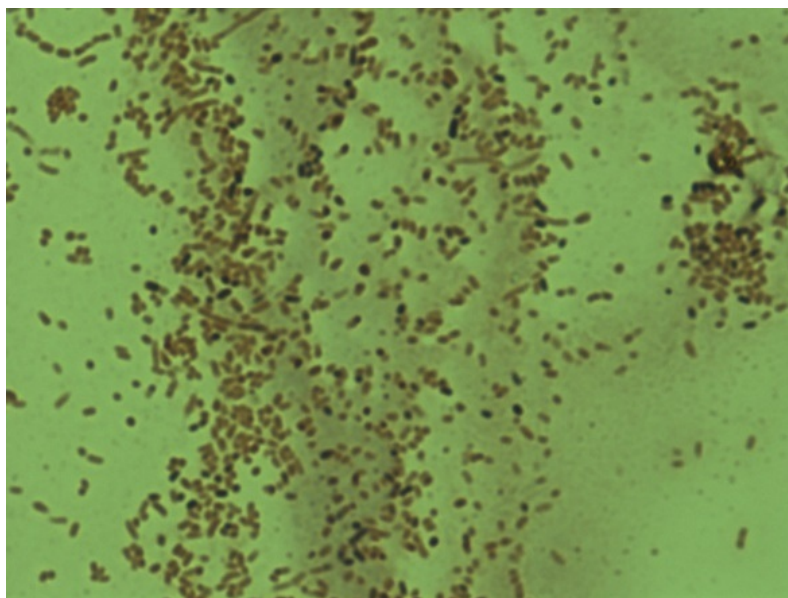
Jako gramvariabilní či gramlabilní mikroorganismy se označují ty, u nichž se v čisté kultuře část buněk obarví grampozitivně a část gramnegativně.

Acidorezistentní mikroorganismy obsahují v buněčné stěně vysoký podíl glykolipidů, zejména mykolových kyselin, mastných kyselin a vyšších alkoholů. Z toho důvodu se neodbarvují anorganickými kyselinami ani směsí kyseliny a alkoholu při barvení dle Ziehl-Neelsena. Acidorezistence má význam k odlišení některých bakteriálních druhů, např. *Mycobacterium tuberculosis* a *M. leprae*. Acidorezistentní bakterie jsou relativně nepropustné a rezistentní k slabým barvivům. Pokud se ale obarví barvivem se silnou barvicí schopností (např. bazický fuchsin rozpuštěný v 5 % fenolu), neodbarví se ani 20 % kyselinou sírovou. Acidorezistence závisí na integritě buňky, obsahu lipidů a pravděpodobně i na jejich zvláštním anatomickém uspořádání.

Vlastnosti vybraných mikroorganismů

Acinetobacter

krátké tyčky až kokotyčky ve dvojicích či řetězcích; gramnegativní či gramvariabilní (obr. 78)



Obr. 78: *Acinetobacter grimontii* obarvený metodou dle Grama (archiv autorky)

Corynebacterium

rovné či mírně zakřivené štíhlé tyčky se zúženými či ztlustělými konci (kyjovité formy) nebo v krátkých palisádách; grampozitivní; neacidorezistentní

Mycobacterium

rovné či mírně zakřivené tyčky, občas se větvící; netvoří vzdušné hyfy, konidie ani pouzdra; slabě

grampozitivní; acidorezistentní; některé druhy rostou velice pomalu (až několik týdnů)

Nocardia

mírně či silně větvená vlákna substrátového mycelia rostoucí na povrchu nebo pronikající do agaru, tvorba redukovaného vzdušného mycelia; grampozitivní až gramvariabilní; někteří zástupci acidorezistentní

Rhodococcus

tyčky tvořící silně větvené substrátové mycelium, vlákna se rozpadají do krátkých tyček a koků; někteří zástupci produkují slabé vzdušné hyfy; grampozitivní, mohou být acidorezistentní

Seznam přístrojů a mikroorganismů

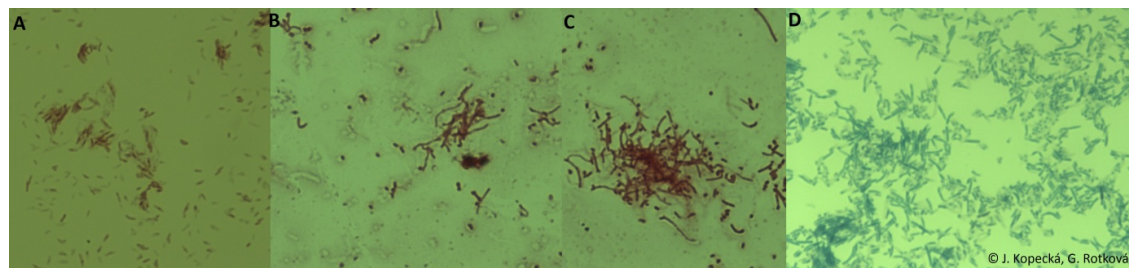
Mikroorganismy

- *Mycobacterium phlei* CCM 5639 – acidorezistentní
- *Nocardia carnea* CCM 2756 – acidorezistentní
- *Rhodococcus erythropolis* CCM 277
- *Corynebacterium glutamicum* CCM 2428
- *Acinetobacter grimontii* CCM 7198^{TT}

Postup

Acidorezistentní barvení dle Ziehl-Neelsena

- Připravit plamenem fixovaný preparát.
- Převrstvit koncentrovaným karbolfuchsinem, zahřát do výstupu par a v případě nutnosti doplňovat barvivo. Preparát zahřívát 3-5 minut (nesmí se vařit).
- Opláchnout kyselým alkoholem 2x, maximálně na 15 sekund.
- Dobarvit Löfflerovou metylenovou modří nebo malachitovou zelení po dobu 30 sekund.
- Opláchnout vodou a pozorovat při zvětšení 1000x.
- Červeně zbarvené acidorezistentní buňky by měly být dobře patrné proti zelenému či modrému pozadí (obr. 79).



Obr. 79: Barvení buněk dle Ziehl-Neelsena, *Mycobacterium phlei* (A), *Nocardia carnea* (B, C), *Rhodococcus erythropolis* (D) (archiv autorek)



Zhodnocení cvičení

- Vyfocení a popis mikroskopických preparátů obarvených dle Ziehl-Neelsena.
- Dařilo se Gramovým barvením obarvit acidorezistentní kultury?



Další informace k této problematice najdete v následující literatuře

- Greenwood D., Slack R. C. B, Peuthere J. F., a kol., Lékařská mikrobiologie, Grada Publishing, 1999, ISBN 80-7169-365-0.
- Sedláček I., Taxonomie prokaryot, Masarykova univerzita, Brno, 2007, ISBN 80-210-4207-9.



Kontrolní otázky

1. Co je cílem acidorezistentního barvení?
2. Jaký je význam dobarvení metylenovou modří při acidobazickém barvení?
3. Pro původce jakých onemocnění se využívá acidorezistentní barvení?
4. Co způsobuje, že jsou mikroorganismy acidorezistentní?

5 Sklíčkové kultury



Cíl cvičení

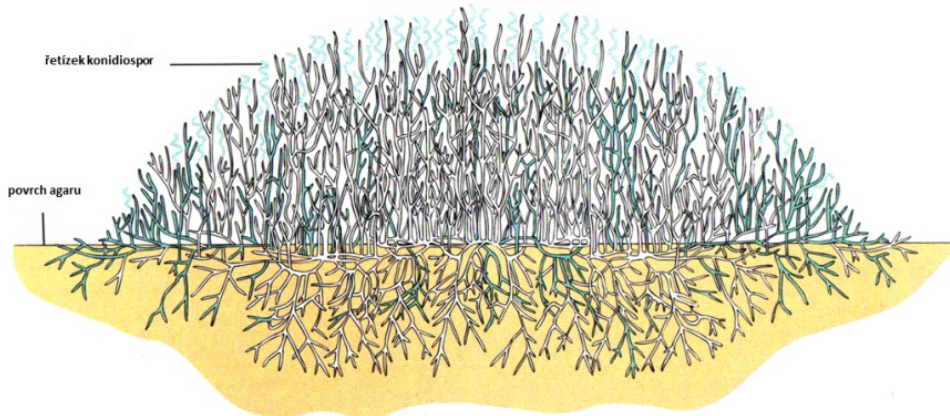
Kultivace aktinomycet. Pozorování vzdušného, substrátového mycelia a srovnání rozdílů.

Úvodní slovo

Aktinobakterie (např. *Actinomyces*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*) jsou grampozitivní bakterie s vysokým procentuálním obsahem G+C, které většinou tvoří pravé mycelium, často se rozmnožují pomocí exospor, ale na rozdíl od kvasinek a mikromycet se vyznačují prokaryotickou stavbou buňky.

Mycelium (stabilní nebo dočasné) je souborem hyf síťovité struktury. Kvasinky mohou vytvářet tzv. pseudomycelium či nepravé mycelium. Kvasinky pučí na pólech a jednotlivé buňky se od sebe neoddělují, zůstávají navzájem spojené. Vlákno pseudomycelia je složeno z protáhlých buněk a jeví se jako zaškrcované. Hyfy pravého mycelia jsou rozděleny přehrádkami a hyfa má po celé délce stejný průřez a nezaškrcovaný vzhled.

Pokud části mycelia vrůstají do substrátu, jedná se o **mycelium substrátové**, pokud jeho části vyčnívají nad povrch substrátu, jde o **mycelium vzdušné** (obr. 80). Vzdušné mycelium produkuje spory jednotlivě, ve dvojicích, v řetězcích či v různě utvářených váčcích, tzv. sporangíích neboli sporoforech (seskupení spor). Sporangia mohou být umístěna i na myceliu substrátovém, pokud se vzdušné netvoří. Tvar a umístění spor nebo sporangií je významný identifikační znak.



Obr. 80: Průřez kolonií aktinomycet, živé buňky jsou označeny zeleně, mrtvé hyfy bíle (Prescott a kol. 1996, upraveno)

Nokardioformní aktinomycety tvoří buď substrátové mycelium (*Rhodococcus*), substrátové i vzdušné mycelium (*Nocardia*) nebo výjimečně pouze vzdušné mycelium (*Sporichthya*). Streptomycety tvoří bohatě větvená, dlouhá vlákna, substrátové i vzdušné mycelium, na jehož koncích jsou kulaté spory v rovných řetězcích, převážně na vzdušném myceliu. Velikost buňky je v průměru 0,5-2,0 μm . Růst je pomalý, kolonie se objevují po 3 až 4 dnech, pokud se tvoří vzdušné mycelium, zralé se objevuje až po 7 až 14 dnech. Tyto hyfy jsou zpočátku bílé, ale s tvorbou spor nabývají různé zbarvení.

Aktinomycety mohou růst i v tekutém médiu, ale vyžadují značnou aeraci a protřepávání, protože vytváří shluky na rozdíl od rovnoměrného růstu jiných druhů bakterií. Jsou široce rozšířeny v prostředí, v půdě, na rostlinách; jsou mezi nimi patogeny člověka, zvířat a rostlin. Nokardioformní

aktinomycety i streptomycety vytváří charakteristické kolonie s drsným a vrásčitým povrchem a pigmentací.

Při snaze pozorovat neporušené substrátové a vzdušné mycelium vycházíme ze skutečnosti, že při odebrání vzorku kolonie pro mikroskopický preparát se mycelium většinou poškodí a nelze jej sledovat v původní podobě nárůstu při zachování jeho struktury. Při pozorování preparátu sklíčkové kultury lze naopak pozorovat hyfy a rozpadající se vlákna bez jejich porušení tak, jak narostly na krycím sklíčku. Očkování kultury musí být přísně sterilní, aby nedošlo ke kontaminaci kultury, nejlépe ve flowboxu, s vyžíhanou kličkou, ožehnutým skalpelem a ožehnutou pinzetou. Pro sklíčkovou kulturu neexistuje univerzální médium, vychází se z optimálního média doporučeného pro kultivaci daného typu mikroorganismu.

Vlastnosti vybraných mikroorganismů

Nocardia

mírně či silně větvená vlákna substrátového mycelia rostoucí na povrchu nebo pronikající do agaru, tvorba i vzdušného mycelia; grampozitivní až gramvariabilní; někteří zástupci acidorezistentní

Rhodococcus

tyčky tvořící silně větvené substrátové mycelium, vlákna se rozpadají do krátkých tyček a koků; někteří zástupci produkují slabé vzdušné hyfy; grampozitivní, mohou být acidorezistentní

Streptomyces

vegetativní vlákna tvoří větvené mycelium; vzdušné mycelium tvoří řetízky ze tří i více spor; produkce pigmentů; tvorba trvalých vláken; kolonie vzhledu lišejníků či kožovité, máselnaté kolonie

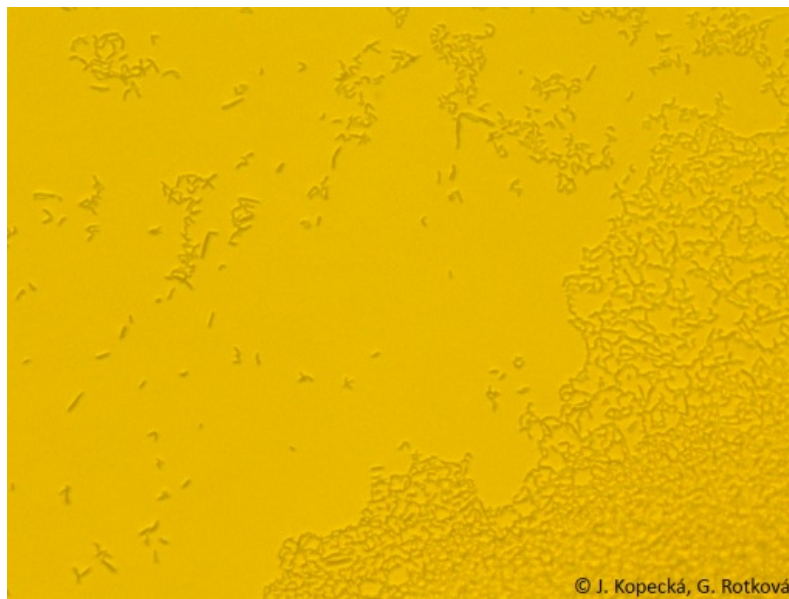
Seznam přístrojů a mikroorganismů

Pomůcky a chemikálie

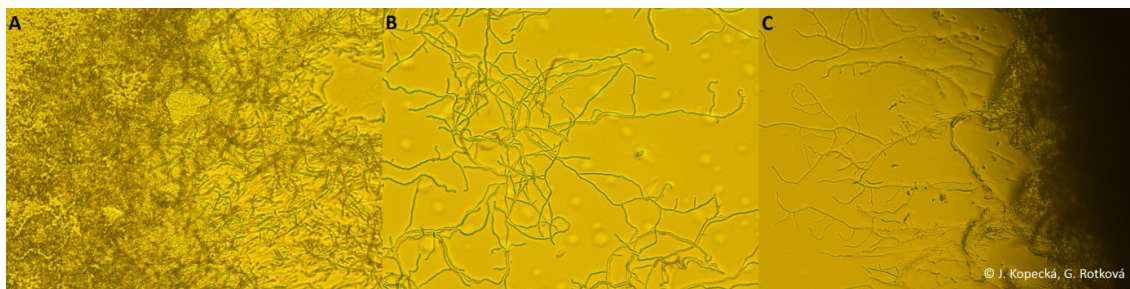
- Sterilní pinzeta, skalpel, destilovaná voda, krycí sklíčka
- Sterilní miska se skleněnými kuličkami a podložním sklíčkem
- Kultivační média podle typu kultury (v silné vrstvě pro přípravu kultivaci na krycím sklíčku, v tenké vrstvě pro kultivaci na podložním sklíčku)
- Očkovací klička

Mikroorganismy

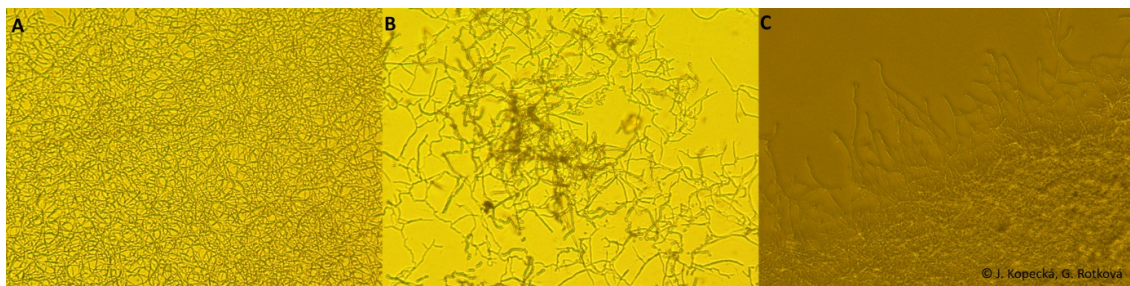
- *Rhodococcus erythropolis* CCM 277 (obr. 81)
- *Nocardia carnea* CCM 2756 (obr. 82)
- *Streptomyces griseus* subsp. *griseus* CCM 3362 (obr. 83)



Obr. 81: Substrátové mycelium *Rhodococcus erythropolis* (archiv autorek)



Obr. 82: *Nocardia carnea*, substrátové (A), vzdušné (B) mycelium a přechod mezi nimi (C) (archiv autorek)



Obr. 83: *Streptomyces griseus*, substrátové (A), vzdušné (B) mycelium a přechod mezi nimi (C) (archiv autorek)

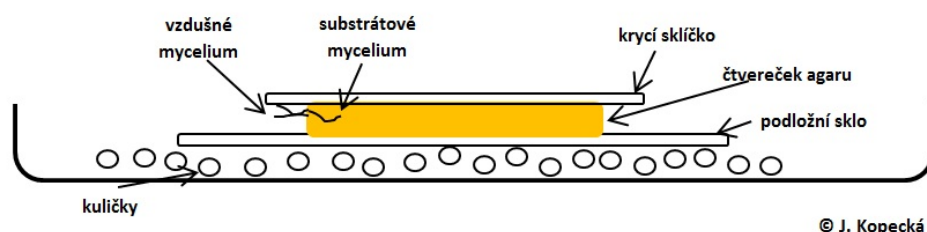
Postup

Vlhké komůrky – kultivace na podložním sklíčku (obr. 84)

- Podložní sklo asepticky umístit na kuličky ve sterilních Petriho miskách.
- Na podložní sklíčko vyžíhaným skalpelem umístit tenký čtvereček agarů.
- Typ agarů vybrat dle kultivovaného mikroorganismu: *Nocardia* - médium M8 (yeast glucose agar); *Rhodococcus* - médium MPA či M8; *Streptomyces* - médium M15 (streptomyces medium).
- Vyžíhanou kličkou očkovat podél okrajů a překrýt sterilním krycím sklíčkem (18 × 18 mm nebo 22 × 22 mm).
- Pod podložní sklíčko na kuličky pipetovat cca 5 ml sterilní destilované vody.
- Kultivovat při 30 °C po dobu 3–5 dní.

Pozorování

Přímo nárůst na sklíčku, zvětšení 200x nebo 400x, Nomarského kontrast.



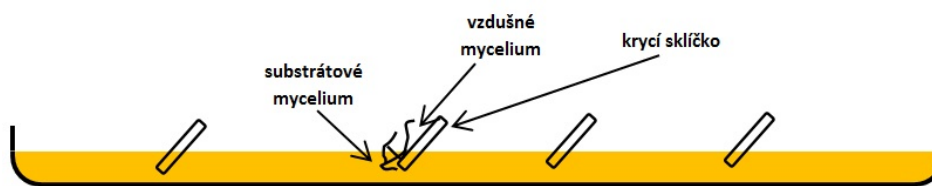
Obr. 84: Kultivace na podložním skle (archiv autorský)

Kultivace na krycím sklíčku (obr. 85)

- Použít médium dle očkovaného kmene - silnější agar na Petriho misce.
- Do agarů zapíchnout sterilní krycí sklíčko vyžíhanou pinzetou pod úhlem 45°.
- Kulturu naočkovat z horní strany podél zlábků. Substrátové mycelium prorůstá i agar.
- Před pozorováním výsledků (po 3-5 dnech) vytáhnout sklíčko a označit horní i dolní stranu pro rozpoznání vzdušného a substrátového mycelia.

Pozorování

Sklíčko s narostlou kulturou položit nárůstem na podložní sklíčko. Pozorovat při zvětšení 400× s imerzí v jasném poli nebo Nomarského kontrastem.



© J. Kopecká

Obr. 85: Kultivace na krycím sklíčku (archiv autorské)



Zhodnocení cvičení

- Podařilo se sterilně očkovat sklíčkové kultury?
- Byl patrný rozdíl mezi substrátovým a vzdušným myceliem?
- Jaký byl typ mycelia, tvar a umístění sporangií, pokud se vyskytovaly?



Další informace k této problematice najdete v následující literatuře

- Prescott L., M., Harley J. P., Klein D. A., Microbiology, WCB, Dubuque, 1996, ISBN 0-697-29390-4.
- Sedláček I., Taxonomie prokaryot, Masarykova univerzita, Brno, 2007, ISBN 80-210-4207-9.



Kontrolní otázky

1. Které bakterie a které kvasinky se kultivují technikou sklíčkové kultury a proč?
2. Jakých kultivačních médií se v tomto cvičení využívá?
3. Proč je důležitá sterilita práce?
4. Co je to mycelium, které mikroorganismy mycelium vytváří a jaké typy mycelií rozeznáváme?
5. Co je to pseudomycelium?

6 Fluorescence



Cíl cvičení

- Seznámit se s fluorescenční mikroskopií.
- Pozorovat autofluorescenci a fluorescence mikroorganismů vyvolanou fluorochromem (barvivem) při různých vlnových délkách.

Úvodní slovo

Fluorescence je schopnost některých látek po ozáření světlem o kratší vlnové délce (excitační záření) emitovat světlo o delší vlnové délce. Lze rozlišit dva typy fluorescence primární (autofluorescenci) a sekundární fluorescence. Autofluorescence je schopnost některých přirozeně se vyskytujících látek (např. chlorofyl), fluoreskovat po dopadu UV záření. Sekundární fluorescencí rozumíme fluorescence barviva tzv. fluorochromu kovalentně navázaného na sledované buněčné struktury. Mezi běžně užívané fluorochromy patří fluorescein, rhodamin, auramin a akridinová oranž.

SYBR Green je barvička vázající se na nukleové kyseliny (nejvyšší afinitu má k dsDNA). Komplex nukleová kyselina-SYBR Green absorbuje modré světlo ($\lambda_{\max} = 497 \text{ nm}$) a emituje zelené světlo ($\lambda_{\max} = 520 \text{ nm}$).

Při fluorescenční mikroskopii je vzorek vystaven ultrafialovému, fialovému nebo modrému světlu. Mikroskop musí být vybaven zdrojem krátkovlnného světla, jako jeho zdroj slouží xenonová výbojka. Světlo prochází dvěma sadami světelných filtrů. První sada (excitační) propouští pouze žádané vlnové délky a odstraní paprsky o delší vlnové délce. Excitační filtry jsou různě silná barevná skla, modrá až fialová. Druhá sada brání zábranným filtrem vstupu krátkovlnných paprsků do oka. Kondenzor s tmavým polem poskytuje černé pozadí, na kterém fluorescentní objekty září.

Pseudomonas fluorescens

produkce fluoresceinu; výskyt v půdě, vodě, potravinách, humánním klinickém materiálu

Seznam přístrojů a mikroorganismů

Pomůcky a chemikálie

- MPA, SYBR Green, PBS pufr

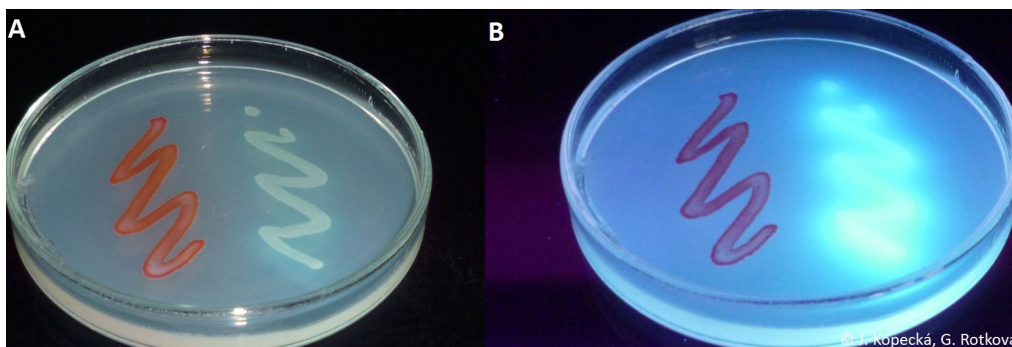
Mikroorganismy

- *Saccharomyces cerevisiae*
- *Bacillus thuringiensis* CCM 19
- *Bacillus megaterium* CCM 2007
- *Pseudomonas fluorescens* CCM 2115T

Postup

Autofluorescence (obr. 86)

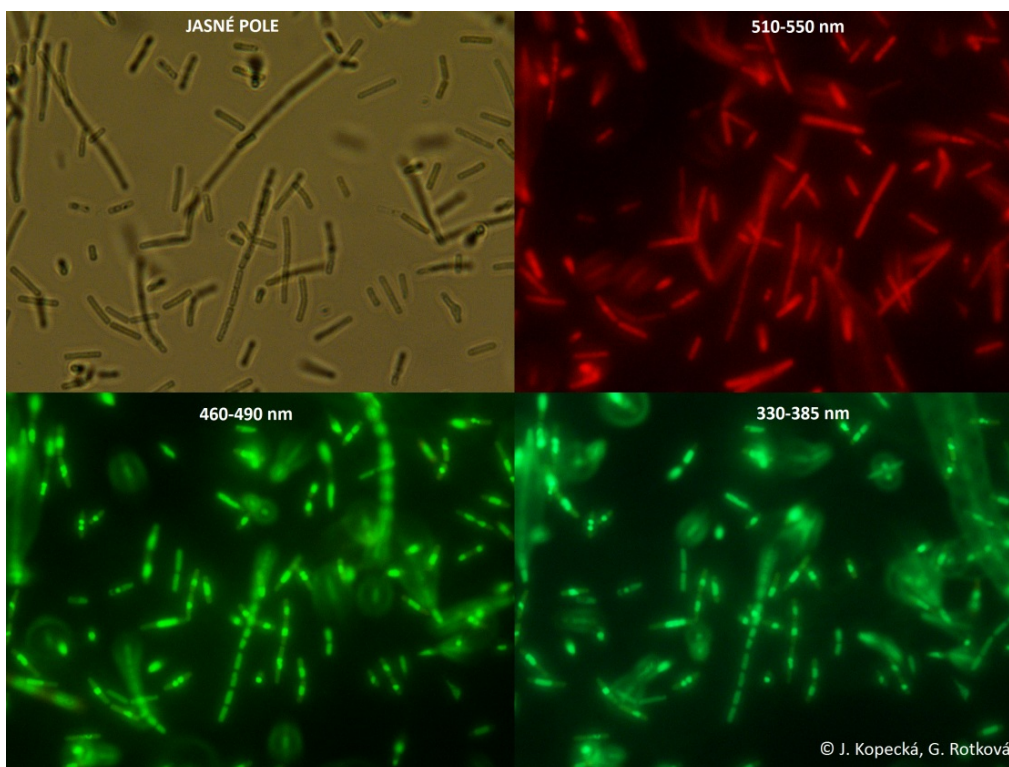
- Vystavit nárůst fluoreskující kultury UV záření.



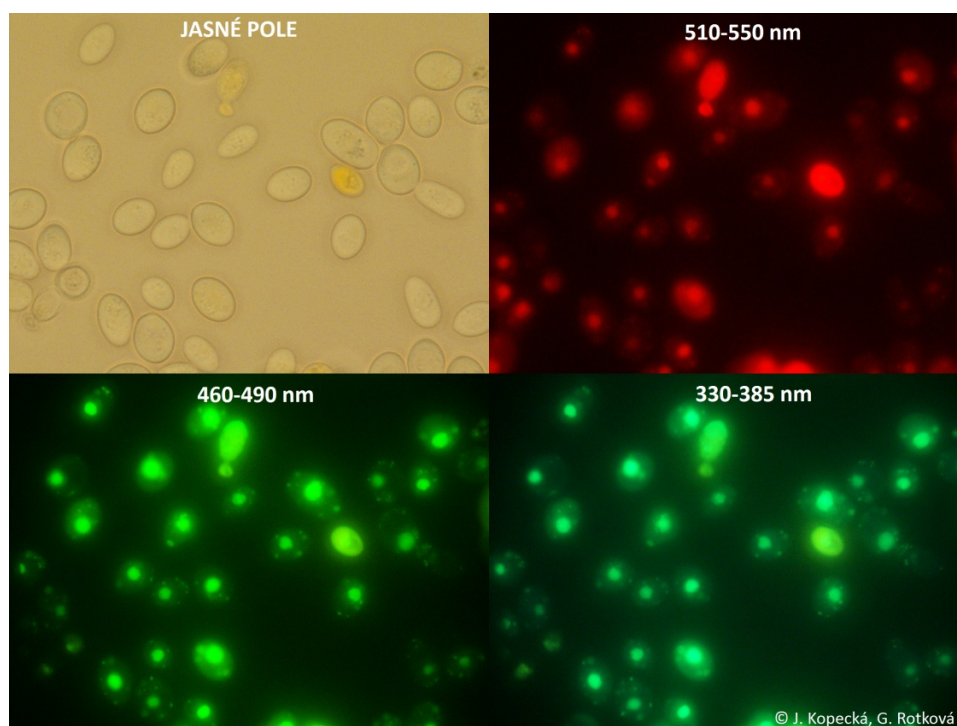
Obr. 86: Kultura *Serratia marcescens* (červený pigment) a *Pseudomonas fluorescens* bez (A) a s UV ozářením (B) (archiv autorem)

Fluorescence emitovaná barvivem SYBR Green (obr. 87 a 88)

- Narostlou kulturu promýt v PBS pufru (1,81 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$, 0,203 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 0,85 g NaCl, 100 ml H_2O , pH 7), obarvit barvivem SYBR Green a pozorovat fluorescenčním mikroskopem při různých vlnových délkách.



Obr. 87: Kultura *Bacillus thuringiensis* obarvená barvivem SYBR Green a vystavená záření o různé vlnové délce (archiv autorem)



Obr. 88: Kultura *Saccharomyces cerevisiae* obarvená barvivem SYBR Green a vystavená záření o různé vlnové délce (archiv autorky)



Zhodnocení cvičení

- Fluoreskovala samotná kultura při UV záření (miska/mikroskop)?
- Jsou rozdíly ve fluorescenci při různé vlnové délce, proč?



Další informace k této problematice najdete v následující literatuře

- Prescott L., M., Harley J. P., Klein D. A., Microbiology, WCB, Dubuque, 1996, ISBN 0-697-29390-4.
- Sedláček I., Taxonomie prokaryot, Masarykova univerzita, Brno, 2007, ISBN 80-210-4207-9.
- Votava M., Lékařská mikrobiologie – vyšetřovací metody, Brno, Neptun, 2010, ISBN 978-80-86850-04-8.



Kontrolní otázky

1. Která část buňky fluoreskuje po navázání barviva SYBR Green?
2. Co způsobuje autofluorescenci?
3. Na co se váže SYBR Green?