

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Jitka Frébortová

LABORATORNÍ CVIČENÍ Z MIKROBIOLOGIE

Olomouc

2015

Obsah

Úvod	3
Obecné instrukce	4
Zásady bezpečné práce v mikrobiologické laboratoři	5
Úloha 1 Příprava sterilního skla a ostatních pomůcek	7
Úloha 2 Kultivace mikroorganismů přítomných v prostředí	9
Úloha 3 Přenos mikroorganismů: aseptická technika	14
Úloha 4 Izolace mikroorganismů křížovým roztěrem	18
Úloha 5 Izolace a kvantifikace mikroorganismů ředícími technikami	20
Úloha 6 Přímé počítání mikroorganismů pod mikroskopem	24
Úloha 7 Stanovení růstové křivky: vliv teploty na růst mikroorganismů	26
Úloha 8 Vliv osmotického tlaku a pH na růst mikroorganismů	29
Úloha 9 Fyzikální metody kontroly mikrobiálního růstu: UV záření	31
Úloha 10 Chemické metody kontroly mikrobiálního růstu: desinfekční prostředky a antimikrobiální látky	33
Úloha 11 Mikroskopické pozorování mikroorganismů	37
Úloha 12 Základy identifikace bakterií: katabolismus cukrů	43
Úloha 13 Základy identifikace bakterií: katabolismus proteinů	46
Úloha 14 Základy identifikace bakterií: respirace	49
Úloha 15 Eukaryotické mikroorganismy: kvasinky a mikroskopické houby	52
Úloha 16 Mikroorganismy v půdě	56
Úloha 17 Mikroorganismy v potravinách	61
Úloha 18 Mikroorganismy ve vodě	64
Literatura	69
Příloha 1 Vzor protokolu	70
Příloha 2 Použití laminárního boxu	72
Příloha 3 Popis mikroskopu Olympus CX21	73

Úvod

Mikroorganismy jsou mikroskopické organismy sestávající z jedné buňky nebo buněčného seskupení zahrnující bakterie, vláknité houby, kvasinky, protozoa a některé řasy. Podle některých klasifikací jsou za mikroorganismy považovány také viry, které jsou mikroskopické avšak nebuněčné. Mikroorganismy se nacházejí prakticky všude v okolním prostředí a jsou nezbytné pro život na Zemi. Některé mikroorganismy jsou komerčně prospěšné, využívají se především při výrobě potravin a chemických látek (např. antibiotik). Většina mikroorganismů je neškodná, některé však způsobují nemoci lidí, zvířat i rostlin. Metody práce s mikroorganismy jsou nepostradatelné pro výzkum v moderní biologii.

Laboratorní cvičení z mikrobiologie je navrženo tak, aby byly demonstrovány vybrané mikrobiologické postupy a studenti získali praktické zkušenosti, které jim napomohou prohloubit znalosti získané v přednáškách. Podstatná část cvičení je věnována základním technikám práce s mikroorganismy a základním principům mikrobiologie. Ty jsou doplněny pozorováním mikroorganismů pod mikroskopem a některými metodami identifikace mikroorganismů. Základní mikrobiologické techniky jsou také aplikovány pro analýzu vody, půdy a potravin.

Obecné instrukce

1. Vždy se seznámte s programem cvičení před příchodem do laboratoře. Řada cvičení je složena z více úloh a k jejich úspěšnému zvládnutí ve vymezeném čase je třeba si vytvořit přibližný plán postupu jednotlivých prací. Některé pokusy je potřeba započít bezprostředně po začátku cvičení. Vaše znalosti budou ověřeny krátkým testem na počátku cvičení. Bez dostatečných znalostí tématu a pracovního postupu není možné cvičení absolvovat.
2. Začátek každého cvičení bude obvykle věnován zhodnocení a interpretaci výsledků z minulého cvičení. V některých případech je vhodnější zhodnotit výsledky během doby čekání na proběhnutí aktuálního experimentu (úloha 7, 12-14)
3. Výsledky cvičení zaznamenávejte do pracovního protokolu. Protokol by měl obsahovat jméno studenta, studijní obor, datum, název úlohy, stručný účel úlohy, stručný popis pracovního postupu (vždy uvést použité kultury, roztoky, pipetované a vážené množství), výsledky, závěry vyplývající z výsledků, odpovědi na otázky ke cvičení. K zaznamenání výsledků použijte přehledné nákresy a tabulky, nikoli jejich popis v textu. Při vyhodnocování věnujte pozornost všem úkolům a doplňujícím otázkám, které byly zadány v jednotlivých úlohách. Protokol odevzdejte svému školiteli ve cvičení, které následuje po cvičení, ve kterém byly zhodnoceny výsledky. Protokoly vrácené k opravě odevzdejte v následujícím cvičení. Opravy proveďte přímo v původním protokolu, rozsáhlejší opravy přiložte, ale netiskněte nový protokol. Vzor protokolu je uveden v příloze 1.
4. Cvičení je povinné, zápočet se uděluje mj. za 100 % účast. V případě nemoci je cvičení nutno nahradit po domluvě se školitelem. Mějte prosím na paměti, že cvičení jsou závislá na předchozí přípravě živých médií a bakteriálních kultur, proto je náhrada cvičení poměrně obtížná.
5. Při cvičení studenti pracují ve dvojicích, avšak každý student pracuje samostatně na celém úkolu. S partnerem ve skupině obvykle studenti zpracovávají různé mikroorganismy nebo používají různé podmínky při práci s jedním mikroorganismem. Své výsledky vzájemně porovnávají a dělají z nich závěry.

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 přísavného větracího zařízení.
6. Před příchodem do laboratorního cvičení se seznámte s jeho obsahem.
7. Před započítím a po ukončení práce je třeba desinfikovat pracovní plochu (Incidur).
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. Zabráníte tím kontaminaci materiálu a náhodnému potřísnění pracovní plochy a sebe bakteriálními kulturami.
10. Nedotýkejte se zbytečně rukama obličeje, nenanášejte v laboratoři kosmetiku, nemanipulujte s kontaktními čočkami.
11. Při barvení mikroorganismů používejte jednorázové ochranné rukavice a pracujte v digestoři. Při fixaci preparátů používejte ochranné brýle. Ochranné rukavice není nutné používat při manipulaci s mikroorganismy, pokud se však budete cítit bezpečněji, použijte je. Výjimkou je příprava nativního preparátu pro mikroskopii, v tomto případě vždy použijte rukavice.
12. Lihové kahany nechávejte hořet pouze po dobu, kdy je užíváte.
13. Použité sklo a zbytky bakteriálních kultur odkládejte na určená místa. V žádném případě nevylévejte kultury do odpadu! Veškerý kontaminovaný materiál je před likvidací a mytím nutno desinfikovat 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 bakteriální kulturou či poranění pokožky, oznamte tuto skutečnost ihned školiteli. Pokožku je nutno ošetřit vhodným desinfekčním prostředkem (ajatin, Spitaderm), 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 školitele.
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, nikoli na víčko! K označení používejte fixy 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, uklidte pracovní plochu a vydesinfikujte ji desinfekčním roztokem (Incidur ve spreji).
- 20.** Před odchodem ze cvičení si dobře umyjte ruce a vydesinfikujte desinfekčním prostředkem (Spitaderm). V případě, že potřebujete krátkou přestávku v průběhu cvičení, umyjte a vydesinfikujte si ruce před opuštěním laboratoře.

Úloha 1

Příprava sterilního skla a ostatních pomůcek

Cíle

1. Seznámit se s metodami sterilizace teplem.
2. Připravit sterilní pomůcky pro následující cvičení.

Teoretický úvod

Pro pěstování (kultivaci) mikroorganismů v laboratorních podmínkách je nutné přenést studovaný mikroorganismus do sterilního živného prostředí pomocí sterilních pomůcek, aby se zabránilo jeho kontaminaci organismy přítomnými v prostředí. **Sterilní podmínky** lze definovat jako podmínky bez přítomnosti živých organismů.

Sterilizace různých materiálů se provádí většinou **zvýšenou teplotou** (usmrcení organismů při vysoké teplotě) nebo **filtrací** (mechanické odstranění organismů). Většinu materiálu lze sterilizovat **vlhkým teplem v autoklávu** při teplotě 121°C a tlaku 0,1 MPa po dobu 15-30 minut. Autokláv je hermeticky uzavíratelná nádoba s dvojitým pláštěm, ve které se vyvíjí nasycená vodní pára při tlaku vyšším, než je tlak atmosférický. K dosažení požadované teploty je nutné, aby vzduch byl zcela vytlačen z komory autoklávu. Při autoklávování přichází nasycená pára do kontaktu s chladnějším objektem a kondenzuje na vodu. Při kondenzaci se uvolňuje velké množství tepla a rychle se tak zvyšuje teplota sterilizovaného objektu. Doba sterilizace je závislá na objemu sterilizovaného předmětu, např. půl litru kapaliny postačí autoklávovat asi 20 minut, 1 l vyžaduje 25 minut, 2 l 40 minut. Dobou sterilizace se míní doba od dosažení 121°C v komoře autoklávu. Během sterilizace autoklávováním je také potřeba zabránit zadržování vzduchu ve sterilizovaném předmětu, např. dlouhé předměty by neměly být umístěny v přímé pozici. Zvýšený tlak v komoře autoklávu zabraňuje varu kapaliny. Zvýšený tlak je proto potřeba udržet do doby, než klesne teplota pod bod varu při atmosférickém tlaku. Pokud je tlak uvolněn náhle před poklesem teploty, kapalina okamžitě vzkypí, což může vést až k explozi nádoby. To že byl daný objekt vystaven teple, je možné testovat pomocí chemického indikátoru, který mění teplem barvu (obvykle páska s proužky indikátoru). Změna barvy však nemusí nutně indikovat, že předmět nebo kapalina jsou sterilní, protože zahřátí nemusí být homogenní nebo mikroorganismy mohou vniknout do předmětu později. Ačkoli lze autoklávování použít pro většinu laboratorního materiálu, v případě plastových předmětů je potřeba ověřit, zda jsou z dostatečně odolného materiálu. Sklo je možno sterilizovat také **horkým vzduchem**, doba závisí na použité teplotě (2 h při 160°C, 3 h při 140 °C). Horkovzdušnou sterilizaci nelze použít pro živná média, sklo uzavřené vatovými a gumovými uzávěry a plastové předměty. Nádoby se chrání před

následnou kontaminací uzavřením zátkami nebo hliníkovou fólií, Petriho misky, hokejky a kovové nástroje balíme do hliníkové fólie, špičky sterilizujeme v uzavíratelných krabičkách. V případě šroubovacích zátek necháme zátky povolené, aby nedošlo k prasknutí nádoby následkem vysokého tlaku nebo k přisátí víčka podtlakem při chladnutí. Kovové předměty (očkovací klíčky, jehly, pinzety) se sterilizují těsně před použitím **ožehnutím v plameni**.

Materiál

Mikrobiologické zkumavky s víčkem (4)

Vatové tyčinky (3)

Destilovaná voda ve stříčce

Pracovní postup

Vatové tyčinky vložte do mikrobiologické zkumavky vatou dolů a uzavřete víčkem (celkem 3). Destilovanou vodu nalijte do zkumavky (přibližně $\frac{1}{4}$ objemu zkumavky) a uzavřete víčkem. Vyučující zajistí sterilizaci připravených pomůcek v autoklávu.

Úloha 2

Kultivace mikroorganismů přítomných v prostředí

Cíle

1. Připravit živná média pro následnou kultivaci (růst) mikroorganismů.
2. Demonstrovat všudypřítomnost mikroorganismů.
3. Demonstrovat využití univerzálního a selektivního média.
4. Popsat a porovnat růst mikroorganismů na tekutých a pevných půdách.
5. Popsat morfologii kolonií.

Teoretický úvod

Mikroorganismy jsou prakticky všudypřítomné; nacházejí se ve vodě, ve vzduchu, v půdě, v lidském organismu. Mikroorganismy se v laboratorních podmínkách kultivují na sterilních **živných médiích** (půdách), aby se zabránilo kontaminaci studovaného organismu organismy přítomnými v prostředí. Složení živných půd musí vyhovovat požadavkům daného organismu na výživu, pH, osmotické podmínky. Živná média musí obsahovat zdroj energie, makroprvky a růstové faktory (vitamíny, aminokyseliny).

Podle složení lze dělit živná prostředí na syntetická a komplexní. Chemické složení **syntetických prostředí** je přesně definováno, zdrojem uhlíku je obvykle glukosa, zdrojem dusíku amonné soli. **Komplexní média** nejsou chemicky přesně definována a obsahují jako zdroj uhlíku a dusíku proteiny a peptidy, které jsou dodávány ve formě extraktů a hydrolyzátů kaseinu, masa, kvasnic, sojových bobů, brambor a dalších přírodních materiálů, či částečně proteolyzovaných rostlinných a živočišných proteinů (peptony). Extrakty, hydrolyzáty a peptony jsou komerčně dostupné v práškové formě. Komplexní média se potom snadno připraví rozpuštěním jednotlivých složek v destilované vodě. Běžná kultivační média obsahující více složek jsou také komerčně dostupná. Většina chemoheterotrofních bakterií je rutinně kultivována na komplexních médiích.

Podle růstu mikroorganismů lze živná média dělit na univerzální, selektivní a selektivně diagnostická. **Univerzální média** vyhovují požadavkům na výživu širokého spektra organismů (např. masopeptonový bujón a agar), **selektivní médium** inhibuje růst určitého druhu nebo skupiny mikroorganismů (např. Sabouraudův agar; růst bakterií je potlačen nižším pH, je tak zvýhodněn růst kvasinek a plísní). Na **selektivně diagnostických médiích** roste jen velmi malá skupina organismů, jejichž růst se projevuje typickou biochemickou reakcí (např. Endův agar; potlačuje růst gram pozitivních bakterií, skupina gramnegativních bakterií fermentujících laktosu vytváří červenorůžové kolonie).

Živná média se sterilizují autoklávováním a to buď po rozdělení do vhodných nádob (zkumavky, baňky) nebo se sterilizují ve větším objemu a poté se plní za sterilních podmínek do předem sterilizovaných nádob. Roztoky, které není možné zahřívat na vyšší teploty z důvodu tepelné nestálosti (např. cukry, antibiotika) se sterilizují filtrací přes membránové filtry o velikosti pórů 0,2 µm (do sterilní nádoby) a přidávají se k médiu těsně před použitím. Některá média se složkami citlivými na teplo je možno autoklávovat při 115°C. Tato teplota je dostačující pro jejich sterilizaci, protože tepelně odolné bakteriální endospóry nejsou v kultivačních médiích obvykle přítomny. Jakmile jsou živná média sterilizována, mohou být inokulována (naočkována) a inkubována za podmínek podporujících mikrobiální růst.

Mikroorganismy lze kultivovat v **tekutých** živných půdách (tzv. bujóny) nebo na **pevných** živných půdách (tzv. agary). Pevnou půdu získáme přidávkem obvykle 1,5% až 2% agaru (extrakt z mořské řasy) k tekutému médiu před sterilizací. Agar se během sterilizace rozpustí a ještě kapalné médium se poté nalévá do sterilních skleněných nebo plastových Petriho misek, kde po ochlazení na teplotu okolo 40°C ztuhne. Jakmile agar jednou ztuhne, je možné ho inkubovat při teplotách až 100°C. Pevná média imobilizují buňky a ty rostou za tvorby viditelných, izolovaných kolonií. **Kolonie** je populace buněk, která vzniká z jedné buňky. Mnohé druhy bakterií rostou jako stejně vyhlížející kolonie. Různě vyhlížející kolonie jsou obvykle jiné druhy. Tvorba kolonií na pevném médiu umožňuje zhodnocení čistoty kultury, výskyt více než jednoho typu kolonie svědčí o kontaminaci kultury. V tekutých médiích se mikrobiální růst projeví zakalením.

Materiál

Erlenmayerova baňka k přípravě masopeptonového bujónu

Odměrný válec 100 ml

Masopeptonový bujón (nutrient broth), prášek

Agar

Destilovaná voda

Váhy

Hliníková fólie

Mikrobiologická zkumavka s víčkem (1)

Mikrobiologická zkumavka s masopeptonovým bujónem (1)

Erlenmayerova baňka (250 ml) se 100 ml masopeptonového agaru

Pipeta 1 ml

Špičky 1 ml (modré)

Sterilní Petriho misky (4)

Zkumavka se sterilní vatovou tyčinkou (3)

Zkumavka se sterilní vodou

Petriho miska se Sabouraudovým agarem (1)

Petriho misky s masopeptonovým agarem (2)

Mýdlo

Tekuté mýdlo

Desinfekční prostředek na ruce (Spitaderm, Spitagel)

Kahan

Pracovní postup

1. Příprava kultivačních médií

Do Erlenmayerovy baňky připravte 100 ml masopeptonového bujónu podle návodu na zásobní lahvi s práškovým médiem. Míchejte tak dlouho, až se prášek rozpustí. Napipetujte 2 ml masopeptonového bujónu do mikrobiologické zkumavky, uzavřete ji víčkem. Zkumavku popište „nesterilní“ a nechejte ji inkubovat při laboratorní teplotě do následujícího cvičení.

Ke zbývajícím 98 ml masopeptonového bujónu přidejte agar tak, aby jeho výsledná koncentrace byla 2% w/v. Jaké množství agaru (v gramech) je potřeba přidat? Uzavřete nádobu hliníkovou fólií, popište ji a připravte k autoklávování. Předějte nádobu vyučujícímu, který sterilizaci media zajistí.

2. Nalévání misek

Baňku s tekutým masopeptonovým agarem vyjměte z inkubátoru a nechejte zchladit přibližně na 45-50°C. Umístěte sterilní Petriho misky na laboratorní stůl, předem otřený desinfekčním prostředkem, víčkem nahoru. Zapalte si kahan. Z baňky s médiem odstraňte hliníkovou fólii, nakloňte ji a ožehněte hrdlo krátce v plameni. Nadzvedněte víčko první misky a nalijte rychle a úhledně asi 5 mm vysokou vrstvu masopeptonového agaru do spodní části misky (nemíchejte prudce agarem v baňce, vytvořily by se vzduchové bubliny). Držte baňku stále nakloněnou a přiklopte zpět víčko misky. Přejděte k další misce a postup opakujte tak dlouho, až budou všechny misky nality. Částečně odkryjte víčka jednotlivých misek a nechejte je otevřené asi 15 min, dokud agar neztuhne (snížení kondenzace vody na víčku).

3. Kultivace mikroorganismů z prostředí

Cílem je odebrat a testovat (kultivovat) vzorky z prostředí a vašeho těla.

A. Dvě Petriho misky s masopeptonovým agarem (MPA) a misku se Sabouraudovým agarem (SBA) použijte na vzorky z prostředí. Pro testování prostředí můžete použít např. laboratoř, umývárnu, skleník nebo fytotron.

- a. Jednu misku s MPA a jednu misku se SBA nechejte otevřené po dobu 30 min (obě na stejném místě).
- b. Druhou misku s MPA naočkujte stěrem např. z povrchu stolu, podlahy, vodovodní baterie nebo kliky. Stěr proveďte pomocí sterilní vatové tyčinky, tak že ji navlhčíte ve sterilní vodě, otřete ji o zkoumaný povrch a potom o povrch agarů.
- B. Na zbylé dvě misky s MPA naočkujte vzorky z vašeho těla. Pomocí vatové tyčinky proveďte např. stěr ze zubů nebo povrchu kůže.
- C. Inokulujte sterilní masopeptonový bujón pomocí vatové tyčinky, kterou jste použili na stěr z prostředí nebo vašeho těla: po otření o povrch agarů ponořte vatovou tyčinku do masopeptonového bujónu a ponechte ji tam během kultivace.
- D. Kultivujte mikroorganismy vzorkované z prostředí při teplotě blízké teplotě daného prostředí (25°C). Mikroorganismy odebrané z těla inkubujte při 37°C. Všechny misky inkubujte dnem vzhůru, aby voda nekondenzovala na povrchu agarů.

4. Účinnost mytí rukou

- A. Rozdělte misky na čtyři kvadranty tak, že na dno Petriho misky nakreslíte fixou kříž, a označte je 1-4. Jednu misku označte „voda“, druhý „mýdlo“.
- B. Nejprve začněte s agarem označeným „voda“. Dotkněte se prsty prvního sektoru prsty, umyjte si ruce bez mýdla, otřepete nadbytečnou vodu a vlhkými prsty se dotkněte sektoru 2. Opakujte po sektor 4.
- C. Umyjte si ruce běžným způsobem mýdlem (jeden student z dvojice obyčejným mýdlem, druhý tekutým), opláchněte, otřepete vodu a dotkněte se sektoru 1 agarů označeného „mýdlo“. Opakujte ještě dvakrát (ruce si mydlete 1 a poté 2 minuty). Naposledy si ruce pečlivě vydesinfikujte prostředkem k desinfekci rukou (Spitaderm, Spitagel) a dotkněte se sektoru 4.
- D. Inkubujte dnem vzhůru při 37°C.

Vyhodnocení výsledků (v následujícím cvičení)

1. Pozorujte a popište výsledný růst na agarových půdách. Zaznamenejte různě vyhlížející kolonie a popište jejich velikost, pigmentaci a morfologii (obrázek 1). Všímejte si celkového vzhledu, okrajů, profilu a povrchu (hladký, hrbolatý, lesklý, matný, průhledný).

Určete počet každého typu kolonií. Výsledky zaznamenejte v tabulkové formě:

Vzorek: _____. Kultivovaný při teplotě _____.

Průměr	Tvar	Okraje	Profil	Povrch	Pigmentace	Počet

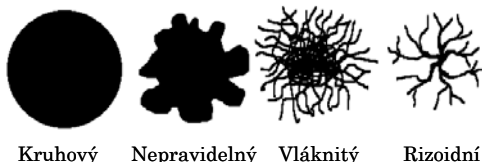
2. Porovnejte růst mikroorganismů na masopeptonovém a Sabouraudově agaru. Jak vysvětlíte případné rozdíly v počtu kolonií?

3. Popište vzhled masopeptonového bujónu označeného „nesterilní“ a bujónu, který jste naočkovali. Obě zkumavky pozorujte nejprve před roztřepáním, poté obsah roztřepte a znovu pozorujte. Výsledky zaznamenejte do tabulky:

	Nesterilní bujón		Inokulovaný bujón	
	Před roztřepáním	Po roztřepání	Vzorek: _____ Před roztřepáním	Po roztřepání
Zákal				
Vločky				
Sediment				
Blanka				
Zbarvení				

4. Na agarech, kterých jste se dotýkali prsty během mytí rukou, zaznamenejte přibližný počet kolonií, jejich barvu a velikost. Porovnejte účinnost jednotlivých způsobů mytí rukou (i s výsledky spolužáka). Získané výsledky kriticky zhodnoťte.

Tvar



Kruhový Nepravidelný Vlákenný Rizoidní

Okraje



Hladké Vlnité Vlákenné Zkroucené Laločnaté

Profil



Zvýšený Vypouklý Plochý Knoflíkovitý Kráterovitý

Obrázek 1. Popis kolonie.

Otázky

Jakou kultivační metodou byste zjistili, zda je zakalení bujónu způsobeno pouze jedním druhem mikroorganismu nebo směsí různých mikroorganismů? Stručně vysvětlete.

Úloha 3

Přenos mikroorganismů: aseptická technika

Cíle

1. Zvládnutí principu aseptické techniky.
2. Přenesení bakterie z jednoho živného prostředí do druhého.

Teoretický úvod

Bakterie i další mikroorganismy jsou kultivovány v laboratorních podmínkách za účelem jejich identifikace a studia jejich růstu a metabolismu. Prvním krokem kultivace mikroorganismů je jejich přenesení z odebraného vzorku nebo dříve vytvořené kultury do čerstvého živného prostředí. Tomuto přenosu říkáme **očkování** (inokulace). Očkování musí být provedeno tak, aby během přenosu nedošlo k zavedení nežádoucích mikroorganismů neboli **kontaminaci** ze vzduchu, rukou, dýchacích cest nebo pracovní plochy. Při očkování se užívá tzv. **aseptická technika**, což je sled kroků používaných k zabránění kontaminace sterilních předmětů nebo mikrobiálních kultur během manipulace.

Všechna média jsou před použitím sterilizována, obvykle autoklávováním (viz úloha 2). Nádoby obsahující kultivační média by neměly být otevřeny do doby, než s nimi pracujeme a i potom by neměly být ponechány otevřené. Pro kultivaci a uchování mikroorganismů se využívají různé typy živných médií:

- a. Živný bujon** – tekuté živné prostředí, obvykle v mikrobiologické zkumavce, případně Erlenmayerově baňce nebo jiné nádobě. Slouží k pomnožení mikroorganismů.
- b. Pevné médium na Petriho misce** (agar, plotna). Vhodné pro zhodnocení čistoty kultury, izolaci čistých kultur, počítání mikroorganismů atd.
- c. Šikmý agar** – pevné médium ve zkumavce, která byla ponechána v šikmé poloze při tuhnutí. Výhodou oproti pevným médiím na Petriho miskách je snadnější transport a skladování.
- d. Hluboký agar** – pevné médium ve zkumavce, které tuhne při svislé poloze zkumavky. Používá se pro růst mikroaerofilních bakterií vyžadujících méně kyslíku. Polotuhé hluboké agary obsahující 0,5-0,7% agaru a užívají se ke stanovení pohyblivosti bakterií (pohyblivé bakterie se pohybují směrem od místa inokulace a způsobují zakalení média).

Přenos a inokulace mikroorganismů se provádějí pomocí sterilní **bakteriologické kličky** nebo **očkovací jehly**. V případě přenosu z tekutých médií používáme také sterilní pipety. Aby se při přenosu mikroorganismů omezila možnost kontaminace vzorku ze vzduchu a pracovní plochy, je vhodné pracovat v tzv. **laminárním boxu**, jehož vnitřní prostor je před započetím práce sterilizován pomocí

ultrafialového záření (viz úloha 9 a příloha 2). Laminární box je vybaven čistícím vzduchotechnickým systémem, který svým přetlakovým nastavením zabraňuje vstupu nežádoucích částic do pracovního prostoru.

Materiál

Zkumavky obsahující masopeptonový bujón (2)

Zkumavky obsahující masopeptonový šikmý agar (1)

Zkumavky obsahující masopeptonový polotuhý hluboký agar s trifenyltetrazolium chloridem (1)

Petriho misky s masopeptonovým agarem (2)

Inokulační klička

Inokulační jehla

Stojánek na zkumavky

Kahan

Kultura bakterií v tekutém médiu (*Pseudomonas fluorescens*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis*)

Kultura bakterií na agarové misce (*Pseudomonas fluorescens*)

Pracovní postup

1. Očkování z tekutého média

A. Odběr kultury z tekutého média bakteriologickou kličkou

a. Očkovací kličku držte v jedné ruce a zkumavku s bakteriální kulturou v druhé ruce. Sterilizujte kličku důkladným vyžeháním v nesvítivé části plamene (klička se rozžhaví do ruda). Kličku nechejte vychladnout (asi 30 s).

b. Malíkem ruky, která drží kličku, sejměte se zkumavky víčko. (V případě použití zkumavek se šroubovacím víčkem je vhodné víčko předem mírně povolit). Víčko nepokládejte na podložku, ale stále ho držte.

c. Zkumavku držte mírně nakloněnou a ožehněte její hrdlo v plameni. Ponořte sterilní kličku do bakteriální kultury a do očka naberte bakteriální suspensi. Při práci ve dvojici každý student odebírá jiný mikroorganismus (*E.coli*, *S. epidermidis*).

d. Kličku vytáhněte ven, ožehněte hrdlo zkumavky a vraťte na ni víčko. Zkumavku umístěte do stojánku. Kličku stále držte v ruce.

B. Očkování do tekutého média

Vezměte do ruky zkumavku se sterilním masopeptonovým bujónem, odstraňte víčko a ožehněte hrdlo zkumavky. Ponořte kličku s odebranou kulturou do bujónu a potom ji ze zkumavky

vytáhněte. Ožehněte hrdlo zkumavky a vraťte víčko zpět. Zkumavku vraťte do stojánku. Vyžíhejte kličku.

C. Očkování na šikmý agar

Postupujte obdobně jako u očkování do bujónu, na šikmý agar očkujte jemným pohybem plochou očka kličky po povrchu agarů směrem ode dna nahoru, tak aby nedošlo k narušení agarů. Po naočkování zkumavku ožehněte, uzavřete víčkem a postavte do stojánku. Vyžíhejte kličku.

D. Očkování na agar v Petriho misce

Mírně odklopte víčko, vsuňte dovnitř kličku s odebranou kulturou a lehkým pohybem „kreslete“ po povrchu agarů (čáry nebo vlnovku) plochou očka kličky. Vytáhněte kličku, zavřete víčko a kličku vyžíhejte.

E. Očkování do hlubokého agarů očkovací jehlou

Kulturu odeberte očkovací jehlou stejně jako v bodě A. Vezměte do ruky zkumavku se sterilním masopeptonovým hlubokým agarem, odstraňte víčko a ožehněte hrdlo zkumavky. Očkujte hluboký agar zapíchnutím jehly do středu agarů. Jehlu opatrně vytáhněte, tak že jí pohybujete ve stejné dráze jako při vpichu. Ožehněte hrdlo zkumavky a vraťte víčko zpět. Zkumavku vraťte do stojánku. Vyžíhejte jehlu. Při práci ve dvojici každý student očkuje jiný mikroorganismus (*P. fluorescens*, *S. epidermidis*).

Z tekutého média často očkujeme přesný objem kultury pomocí pipety. Tento postup je popsán v úloze 5.

2. Očkování z tuhého média

A. Odběr kultury z agarů na Petriho misce

Vyžíhejte očkovací kličku a nechte ji vychladnout. Víčko misky lehce nadzvedněte a očkem kličky lehce seškrábněte povrch kolonie. Kličku vytáhněte, misku zavřete.

B. Odběr kultury ze šikmého agarů

Provedte obdobně jako odběr z bujónu v bodě 1A, pouze očkem kličky naberte kulturu rostoucí na povrchu agarů.

C. Očkování do tekutého média, na agarovou plotnu

Provedte obdobně jako při očkování z tekutého média.

3. Kultivace

Inkubujte všechny zkumavky a Petriho misky při 30°C (*P. fluorescens*) nebo 37°C (*E. coli*, *S. epidermidis*).

Vyhodnocení výsledků

Zaznamenejte vzhled jednotlivých kultur (viz úloha 2). U polotuhého agaru porovnejte vzhled média s nenačkovaným kontrolním médiem. Trifenyltetrazolium chlorid přítomný v médiu je metabolickou aktivitou živých organismů redukován na barevný formazán a usnadňuje tak identifikaci zóny růstu naočkovaného organismu. Byly některé bakterie rostoucí na polotuhém hlubokém agaru pohyblivé? Byl aseptický přenos úspěšný? Podle čeho tak usuzujete?

Úloha 4

Izolace mikroorganismů křížovým roztěrem

Cíle

Izolovat bakterie pomocí křížového roztěru.

Teoretický úvod

V přírodních podmínkách roste většina mikroorganismů pohromadě s ostatními organismy. Pro studium určitého organismu je nutné ho izolovat ze **směsné kultury** a získat tzv. **čistou kulturu** (kultura obsahující pouze jeden druh mikroorganismu). Pro izolaci mikroorganismů se používají nepřímé metody, neboť přímá separace je vzhledem k malé velikosti mikroorganismů možná jen s použitím důmyslných mikromanipulačních technik. Čistou kulturu je možno získat pomocí selektivních médií nebo zředovacími technikami. Mezi běžně používané zředovací techniky patří metoda křížového roztěru, metoda roztírání na plotně a metoda nalévání ploten. Princip **křížového roztěru** spočívá v postupném roztírání vzorku po povrchu agarů bakteriologickou kličkou, přičemž dochází k naředování původního vzorku tak, že na konci vyrůstají jednotlivé izolované kolonie. Je to nejběžnější izolační technika. Metody roztírání a nalévání jsou kvantitativní techniky, které umožňují stanovit počet bakterií ve vzorku. Přesným popisem těchto metod se zabývá úloha 5.

Materiál

Petriho misky s masopeptonovým agarem (2)

Bakteriologická klička

Kahan

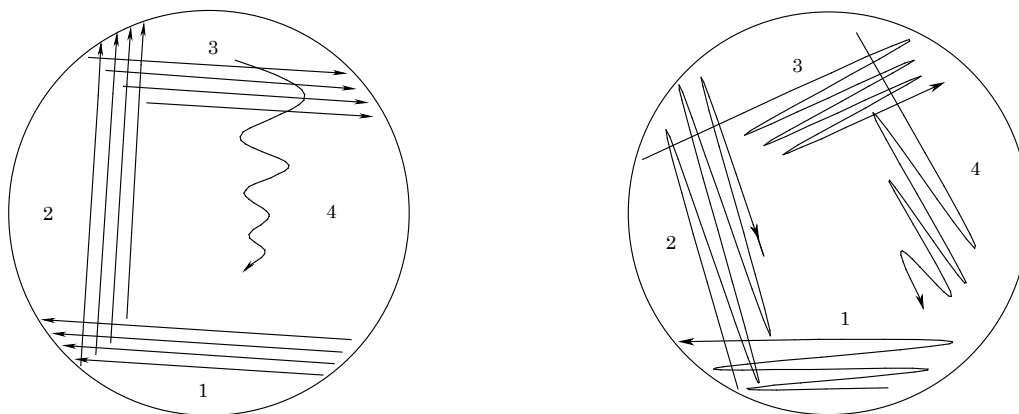
Směsná kultura bakterií

Zakalený masopeptonový bujón z minulého cvičení

Pracovní postup

Vyžehčte očkovací kličku, nechte ji vychladnout a asepticky odeberte kulturu. Nadzvedněte víčko Petriho misky a udělejte kličkou opatrně 3-4 vodorovné čáry po povrchu agarů (obrázek 2). Vyžehčte kličku a nechte ji zchladit. Pootočte misku a udělejte další 3-4 čáry procházející přes původní čáry. Vyžehčte kličku a nechte ji zchladit. Znovu pootočte misku a udělejte 3-4 čáry. Vyžehčte kličku, nechte ji zchladit a přes poslední čáry udělejte vlnovku. Vyžehčte kličku. Mezi jednotlivými kroky roztěru přiklopte víčko misky. *Mezi jednotlivými kroky nenamáchejte kličku znovu do kultury!* Křížový

roztěr provedte se směsnou kulturou a se zakaleným bujónem z minulého cvičení. Křížový roztěr může být také proveden tak, že místo vodorovných čar kreslíme vlnovky (obrázek 2). Cílem metody je získat izolované kolonie mikroorganismů. Po naočkování kultivujteisky dnem vzhůru při vhodné teplotě.



Obrázek 2. Křížový roztěr. Mezi jednotlivými kroky (1-4) je nutno vyžít kličku.

Vyhodnocení výsledků

Zakreslete vzhled křížového roztěru na obou miskách. Popište vzhled jednotlivých kolonií (dle návodu k úloze 2) a různě vyhlížející kolonie označte v nákresu. Zhodnoťte úspěšnost křížového roztěru.

Otázka

Budou vždy ve čtvrté části křížového roztěru přítomny izolované kolonie?

Úloha 5

Izolace a kvantifikace mikroorganismů ředícími technikami

Cíle

1. Izolovat bakterie roztírací a zalévací technikou.
2. Určit počet bakterií ve vzorku.

Teoretický úvod

Metody roztírání a zalévání jsou kvantitativní techniky, které umožňují stanovit počet životaschopných bakterií ve vzorku. Jedná se o **nepřímé techniky** stanovení počtu buněk. **Metoda roztírání na plotně** spočívá v nanesení malého množství (0,1 - 0,2 ml) předem naředěného vzorku (obvykle ve sterilní vodě nebo fyziologickém roztoku) na povrch agarů v Petriho misce a jeho rozetření ohnutou skleněnou tyčinkou, tzv. hokejkou. **Metoda nalévání ploten** spočívá v napipetování naředěného vzorku o objemu 1 - 2 ml na sterilní Petriho misku a jeho zalití sterilním agarem vytemperovaným na 45°C. Variace této metody spočívá ve zředování vzorku do sterilního tekutého agarů a jeho nalití do sterilní Petriho misky. Při nalévací metodě rostou kolonie v celém objemu agarů, nejen na jeho povrchu. Počítaný organismus musí krátkodobě snést zvýšenou teplotu. K určení počtu bakterií se zvolí misky s 30 až 300 koloniemi (použití misek s méně než 30 koloniemi je nepřesné, více než 300 kolonií se obtížně počítá). Metody vycházejí ze základního předpokladu, že z jedné životaschopné buňky vyrůstá jedna kolonie. Mikrobiální suspenzi je před očkovaním nutno zředit. Při ředění se používá obvykle desítkového ředění (obrázek 3). K určení optimálního ředění je potřeba odhadnout počet buněk ve vzorku ($0-10^3$ buněk/ml bez opalescence, 10^5 /ml lehce opaleskuje, 10^7-10^9 tvoří mléčný zákal). Počet bakterií v 1 ml původní kultury se spočítá následovně:

$$KTJ = (\text{počet kolonií/ředění ve tvaru } 10^{-x}) * (1/\text{objem vzorku v ml pipetovaného na misku})$$

Počet buněk se uvádí jako KTJ = kolonii tvořící jednotka (CFU, colony forming unit), neboť 1 kolonie ne vždy reprezentuje 1 buňku. Kolonie může vzniknout ze skupiny stejných buněk, které jsou spolu dočasně spojeny. Pro správné zhodnocení počtu mikroorganismů ve vzorku je potřeba každé ředění očkovat na tři misky a počet mikroorganismů vypočítat jako průměrnou hodnotu.

Materiál

Petriho misky s masopeptonovým agarem (4)

Baňka obsahující 50 ml vytemperovaného masopeptonového agaru

Sterilní zkumavky (7)

Sterilní Petriho misky (2)

Sterilní destilovaná voda

Pipeta 0,1-1 ml

Pipeta 20-200 µl

Sterilní špičky (žluté, modré)

Sterilní ohnuté skleněné tyčinky (hokejky)

Kahan

Tekutá kultura bakterií (*Pseudomonas fluorescens*)

Pracovní postup

1. Metoda roztírání na plotně

A. Ředění bakteriální kultury (obrázek 3)

Nachystejte si 7 sterilních zkumavek a do každé napipetujte pomocí automatické pipety se sterilní špičkou 1,8 ml (2 x 0,9 ml) sterilní destilované vody. Ze vzorku odeberte asepticky kulturu. Postupujte obdobně jako u přenosu kultury z tekutého média:

a. Na automatické pipetě nastavte požadovaný objem (200 µl). Vezměte pipetu, odklopte víčko krabičky se sterilními špičkami a nasadte špičku (nedotýkat se rukama, krabičku ihned zavřít). Zkumavku s bakteriální kulturou vezměte do druhé ruky.

b. Malíkem ruky, která drží pipetu, sejměte ze zkumavky víčko. Nepokládejte ho na stůl, ale stále ho držte.

c. Zkumavku držte mírně nakloněnou a ožehněte její hrdlo v plameni. Ponořte špičku do bakteriální kultury a pomalým pohybem nasajte bakteriální suspensi.

d. Pipetu vytáhněte ven, ožehněte hrdlo zkumavky a vraťte na ni víčko. Zkumavku umístěte do stojánku. Pipetu stále držíte v ruce.

Přeneste odebraný vzorek do první zkumavky s vodou:

a. Vezměte do ruky zkumavku se sterilní vodou, odstraňte víčko a ožehněte hrdlo zkumavky. Ponořte špičku s odebranou kulturou do vody, vypusťte do ní obsah špičky a pipetu ze zkumavky vytáhněte.

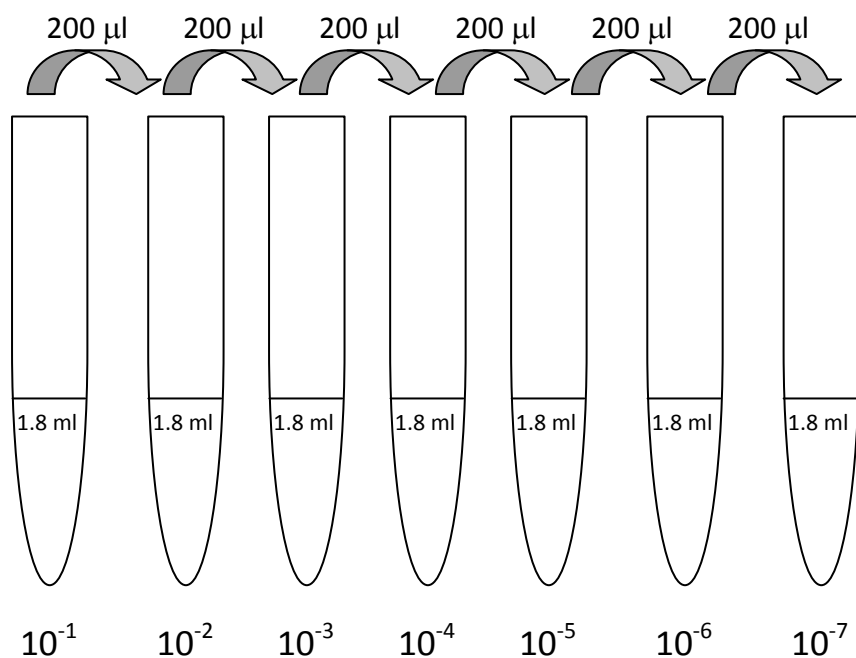
b. Ožehněte hrdlo zkumavky a vraťte víčko zpět. Zkumavku vraťte do stojánku. Špičku odhodte do odpadní nádoby.

c. Obsah první zkumavky protřepejte, asepticky z ní odeberte 200 µl roztoku a přeneste do další zkumavky se sterilní vodou. Postup opakujte, až dojdete k poslední zkumavce.

B. Očkování na agar v Petriho misce

Připravte si 4 Petriho misky s masopeptonovým agarem. Postupně očkujte na Petriho misky bakterie ze zkumavek se zředěním 10^{-4} až 10^{-7} :

- Pomocí automatické pipety se sterilní špičkou asepticky odeberte ze zkumavky 100 μl suspenze.
- Nadzvedněte víčko Petriho misky a do středu napipetujte suspenzi. Víčko přiklopte, odhodte špičku a odložte pipetu.
- Nadzvedněte znovu víčko a suspenzi rozetřete sterilní hokejkou po celé ploše agaru. Na hokejku netlačte. Po rozetření víčko přiklopte, hokejku ponořte do nádoby s desinfekcí.
- Postup opakujte s dalšími naředěnými vzorky. Na každé zředění použijte novou špičku a novou hokejku. (Pro potřeby cvičení bude přichystán dostatečný počet sterilních hokejek. V praxi se však obvykle používá opakovaně jedna hokejka, která se sterilizuje následovně: Hokejku vyjmeme z nádoby s etanolem, lehce ji oklepeme nad nádobkou a sterilizujeme ožehnutím v plameni. Přitom dojde ke vznícení a shoření etanolu na hokejce. Hokejku necháme vychládnout a použijeme. Potom ji ožehneme nad plamenem, počkáme, až se ochladí a ponoříme ji zpět do etanolu).



$$10^{-1} = 1:10^1 = \text{ředěno } 10\text{x}$$

$$10^{-6} = 1:10^6 = 1:1\,000\,000 = \text{ředěno } 1\,000\,000\text{x} (10^6\text{x})$$

Obrázek 3. Ředění mikrobiální kultury. V každém kroku je kultura zředěna 10x.

2. Metoda zalévání ploten

Připravte si 2 sterilní Petriho misky. Z naředěných kultur (zvolte ředění 10^{-6} a 10^{-7}) asepticky napipetujte do středu misky 1 ml suspenze. Vyndejte z inkubátoru (45°C) baňku s tekutým masopeptonovým agarem a asepticky nalijte na kulturu v misce vrstvu agaru (asi 0,5 cm). Přikrytou miskou mírně pohybujte, aby došlo k promíchání inokula s médiem. Nesmí dojít k potřísnění víčka. Nechejte ztuhnout.

3. Kultivace

Kultivujte dnem vzhůru při 30°C, 48-72h.

Vyhodnocení výsledků

Spočítejte kolonie na jednotlivých miskách a vypočítejte počet buněk (KTJ) v 1 ml bakteriální kultury. Spočítejte počet mikroorganismů jako průměrnou hodnotu z počtů kolonií na všech miskách, které lze hodnotit.

Otázka

Mohou některé bakterie narůst na roztírané plotně a přitom nenarůst na zalévané plotně? Vysvětlete.

Úloha 6

Přímé počítání mikroorganismů pod mikroskopem

Cíle

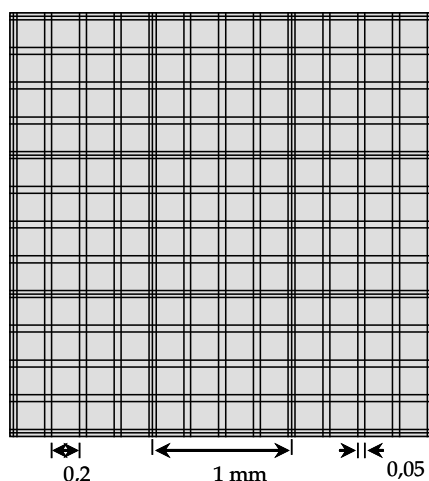
Určit počet mikroorganismů ve vzorku pomocí Bürkerovy počítací komůrky.

Teoretický úvod

Pro přímé počítání mikroorganismů pod mikroskopem se užívají různé typy **počítacích komůrek**. Počítací komůrku tvoří silné podložní sklo, v jehož střední části je vyryta mřížka čtvercových políček (počítací síť) o známé ploše a hloubce. Komůrka se překryje speciálním silnostěnným krycím sklem a tak vzniká prostor o přesně definovaném objemu. Mezi nejběžnější počítací komůrky patří komůrka Bürkerova, Thomova nebo Neubaerova.

Na Bürkerově komůrce je počítací síť tvořena devíti velkými čtverci, jejichž strana měří 1 mm (plocha 1 mm²). Každý z velkých čtverců je rozdělen dvojími čarami na skupinu 16 malých čtverců o ploše 0,04 mm² a v jejich rozích jsou malé čtverce s plochou 0,0025 mm² (obrázek 4). Přikrytím ploch s mřížkami krycím sklem vzniká prostor hluboký 0,1 mm.

K počítání mikroorganismů pod mikroskopem se používají suspenze o vhodné hustotě. Kulturu lze sledovat v nativním stavu nebo po barvení např. metylénovou modří.



Obrázek 4. Bürkerova počítací komůrka.

Materiál

Bürkerova komůrka

Silnostěnné krycí sklo pro počítací komůrku

Pipeta

Sterilní špičky

Sterilní zkumavka

Sterilní voda

Mikrobiální kultura (*Saccharomyces cerevisiae*)

Pracovní postup

1. Naředíte kulturu do sterilní vody, protřepete. (Při použití 24 h kultury *S. cerevisiae* je vhodné ředit 10-20x).
2. Prázdnou komůrku překryjte krycím sklem a do střední části komůrky napipetujte pod krycí sklo sterilní špičkou suspenzi.
3. Přeneste komůrku pod mikroskop a zaostřete na čtverečky.
4. Počítejte buňky v jednotlivých ploškách. Pokud se buňky nacházejí na čarách, počítejte vždy jen ty, které leží na levé a horní straně čtverečku. Spočítejte buňky v co největším počtu políček (alespoň 10). Počet buněk v 1 mm^3 (**x**) spočítáme následovně:

$$x = (\text{Celkový počet buněk/počet počítaných políček}) \times [1/(\text{plocha čtverečku} \times 0,1)] \times \text{ředění}$$

původní kultury ve tvaru 10^x

Poznámka: Postup podle bodů 1-3 bude demonstrován vyučujícím, počítání provedou studenti samostatně – každý student spočítá mikroorganismy v jednom políčku. K výpočtu potřebujete znát počet buněk v každém počítaném políčku! Pozor na vztah mm^3 a ml!

Vyhodnocení výsledků

Spočítejte počet buněk v 1 ml kultury a výsledek zaznamenejte do protokolu.

Úloha 7

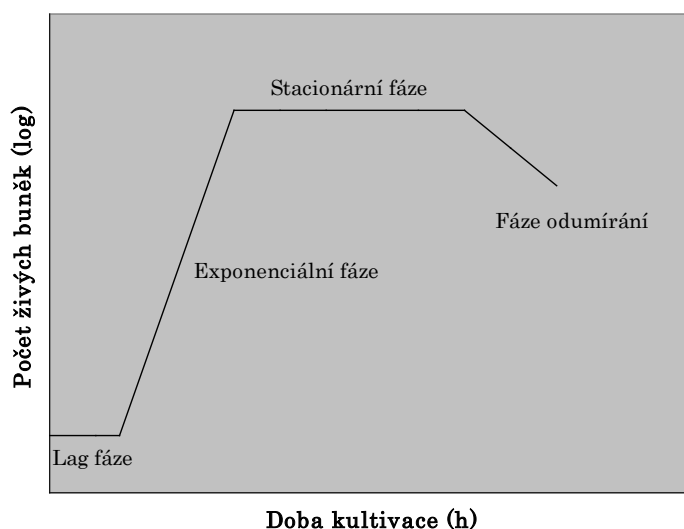
Vliv teploty na růst mikroorganismů: stanovení růstové křivky

Cíle

1. Identifikovat typické fáze růstové křivky.
2. Měřit turbidimetricky bakteriální růst.
3. Kultivovat bakterie v třepané kultuře.
4. Stanovit vliv teploty na růst bakterií.

Teoretický úvod

Růst populace mikroorganismů lze popsat **růstovou křivkou** (obrázek 5). Po inokulaci bakterií do čerstvého živného média se počet buněk téměř nemění, buňky se adaptují na nové prostředí (adaptační neboli lag fáze). Poté se buňky začínají exponenciálně množit (exponenciální neboli logaritmická fáze). Po vyčerpání živin nebo nahromadění toxických produktů buňky přestávají růst a jejich počet se nemění (stacionární fáze). Po určité době buňky začínají exponenciálně odumírat (fáze odumírání).



Obrázek 5. Typická růstová křivka mikrobiální populace.

Fáze růstu mikrobiální populace mohou být určeny měřením **turbidity** (zákalu) mikrobiální kultury. Změřením turbidity není možné přímo stanovit počet buněk ve vzorku, je však možno pozorovat mikrobiální růst na základě zvyšující se turbidity. Turbiditu vzorku měříme na spektrofotometru, jako absorbanci (optickou hustotu) při 600 nm (OD_{600}). Čím je vzorek hustší, tím

více absorbuje viditelné světlo, tj. absorbance se zvyšuje. Chceme-li korelovat turbiditu s počtem buněk, je nutno spočítat počet buněk odpovídající určité absorbanci jinou metodou. Získaná korelace je závislá na druhu organismu a podmínkách kultivace.

Většina bakterií roste v určitém teplotním rozmezí. **Minimální teplota růstu** je nejnižší teplota, při které mikroorganismus ještě roste. Jednotlivé druhy rostou nejlépe při **optimální teplotě růstu**. Nejvyšší teplota, při které organismus roste, se nazývá **maximální teplota růstu**.

Prokaryotické organismy jsou podle požadavku na teplotu klasifikovány do pěti skupin. **Psychrofilní bakterie** rostou při teplotách pod 20°C (až 0°C nebo méně), s optimem 15°C nebo méně. Také **psychrotrofní** bakterie rostou při velmi nízkých teplotách, avšak optimálně v rozmezí od 20 do 30°C. Optimální teplota pro **mezofilní** bakterie je mezi 25 a 40°C, pro **termofilní** mezi 45 a 65°C. **Hypertermofilní** bakterie rostou nejlépe při teplotách 80°C i vyšších. Rozsah preferovaných teplot je geneticky dán, souvisí se stabilitou enzymů a dalších biopolymerů buňky.

Materiál

Baňka obsahující 30 ml LB média

Jednorázové spektrofotometrické kyvety (2)

Sterilní špičky (modré)

Automatická pipeta (1 ml)

Spektrofotometr

Tekutá kultura *Escherichia coli*

Pracovní postup

1. Z LB média v baňce asepticky odeberte 1 ml a napipetujte ho do spektrofotometrické kyvety. Tento vzorek bude sloužit jako kontrola k vynulování spektrofotometru ($\lambda = 600 \text{ nm}$). Věnujte prosím pozornost správnému umístění kyvety v kyvetovém prostoru spektrofotometru!
2. Asepticky inokulujte do baňky 2 ml kultury *Escherichia coli*. Promíchejte.
3. Asepticky odeberte 1 ml a změřte absorbanci. Vzorek z kyvety vylejte do nádoby s desinfekčním prostředkem. Kyvetu si ponechejte pro další měření.
4. Baňku umístěte na třepačku v inkubátoru nastaveném na určitou teplotu (25, 30 nebo 37°C). Při práci ve dvojici umístěte každou baňku do jiného inkubátoru.
5. Zaznamenávejte absorbanci každých dvacet minut po dobu 2 hodin. Pro měření odeberte vždy 1 ml kultury.

Vyhodnocení výsledků

Získaná data (svá i partnera ve dvojici) vynesete do grafu. Zhodnoťte vliv teploty na růst *E. coli*. Zhodnoťte zaznamenané růstové křivky v porovnání s křivkou na obrázku 5.

Otázky

1. Proč při tomto experimentu nezaznamenáte fázi odumírání (a to ani po dlouhé době kultivace přesahující rámec cvičení)?
2. Jaká je optimální teplota růstu pro lidské patogeny?

Úloha 8

Vliv osmotického tlaku a pH na růst mikroorganismů

Cíle

1. Vysvětlit jak mikrobiální růst souvisí s osmotickým tlakem a pH.
2. Porovnat vliv osmotického tlaku a pH na růst bakterií a kvasinek.

Teoretický úvod

Osmotický tlak je tlak toku rozpouštědla pronikajícího přes semipermeabilní membránu z roztoku o nižší koncentraci rozpuštěných látek do roztoku o vyšší koncentraci rozpuštěných látek. Difuze rozpouštědla přes membránu (osmóza) je poháněna potenciální energií koncentračního gradientu, nevyžaduje tedy výdej energie vytvořené metabolicky buňkou. Látky rozpuštěné ve vodě (cukry, soli) tvoří s molekulami vody slabé vodíkové vazby. Molekuly nevázané (volné) vody jsou dostatečně malé, aby volně procházely přes cytoplasmatickou membránu, avšak molekuly vody vázané k rozpuštěné látce nikoli. Čím vyšší je tedy koncentrace rozpuštěných látek, tím nižší je koncentrace volných molekul vody schopných přenosu přes membránu.

Buňka se může z hlediska koncentrace rozpuštěných látek nacházet v isotonickém, hypotonickém nebo hypertonickém prostředí. V **isotonickém prostředí** je koncentrace vody i rozpuštěných látek stejná uvnitř i vně buňky a voda vstupuje do buňky a vystupuje z ní stejnou rychlostí. V **hypotonickém prostředí** je koncentrace vody vyšší vně buňky a koncentrace rozpuštěných látek uvnitř buňky. Voda vtéká do buňky. V **hypertonickém prostředí** je koncentrace vody vyšší uvnitř buňky, zatímco koncentrace rozpuštěných látek je vyšší vně buňky. Voda vytéká z buňky, cytoplasmatická membrána se smršťuje a dochází k plazmolýze.

Většina bakterií vyžaduje pro svůj optimální růst isotonické nebo hypotonické prostředí. Některé bakterie jsou osmotolerantní, tj. tolerují koncentrace soli až 10% (fakultativně halofilní bakterie). Některé archaebakterie jsou extrémně halofilní a vyžadují přítomnost až 30% soli.

Bakteriální růst je ovlivněn také **kyselostí (pH) prostředí**. Většina mikroorganismů roste v rozsahu 2-3 jednotek pH. Optimální pH pro růst většiny bakterií je mezi pH 6,5 a 7,5. Pouze několik druhů bakterií roste v kyselém prostředí s pH nižším než 4 nebo naopak v alkalickém prostředí nad pH 9. Mikroskopické houby jsou obecně více acidotolerantní než bakterie. Mikroorganismy při svém růstu často vytvářejí kyseliny, které inhibují jejich růst. Do živných médií se proto přidávají pufrы. V komplexních médiích působí jako pufrы peptony, do syntetických médií se obvykle přidávají fosfáty.

Materiál

Petriho misky s masopeptonovým agarem obsahujícím 2% cukru a 0, 5, 10 nebo 15 % NaCl

Petriho misky s masopeptonovým agarem obsahujícím 0, 10, 25 a 40% sacharosy

Zkumavky obsahující masopeptonový bujón o pH 3,0, 5,0, 7,0 a 9,0

Pipeta (100 µl)

Sterilní špičky (žluté)

Bakteriologická klička

Tekutá kultura *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis*, *Saccharomyces cerevisiae*

Pracovní postup

1. Vliv osmotického tlaku

- a. Nachystejte si sadu masopeptonových agarů obsahujících NaCl nebo sacharosu (při práci ve dvojici zpracuje každý student jednu sadu). Na dno každé misky nakreslete fixou tři čáry sbíhající se ve středu misky dělící agar na tři části.
- b. Pomocí sterilní bakteriologické kličky naočkujte ve formě vlnovky do jedné části každé misky *S. epidermidis*. Opakujte s kulturou *E. coli* a *S. cerevisiae* (kvasinka) ve zbývajících částech.
- c. Inkubujte dnem vzhůru při 30°C 24 až 48 hodin.

2. Vliv pH

- a. Do každé zkumavky naočkujte některý z organismů (20 µl pomocí pipety se sterilní špičkou). Při práci ve dvojici jeden student očkuje bakterii a druhý kvasinku.
- b. Inkubujte při 30°C 24 až 48 hodin.

Vyhodnocení výsledků

Zaznamenejte výsledky kultivace tabulkovou formou. Zhodnoťte relativní růst jednotlivých mikroorganismů za různých podmínek (++++ značí maximální růst). Který organismus toleruje nejlépe vysoké koncentrace NaCl? Který nejlépe toleruje vysoké koncentrace sacharosy? Jaká je tolerance k pH u testované bakterie a kvasinky?

Otázky

1. Který živný agar byste raději použili pro izolaci kvasinek: masopeptonový nebo Sabouraudův? Vysvětlete proč.
2. Kde ve svém nejbližším okolí byste hledali acidofilní a halofilní organismy? U každé skupiny uveďte alespoň dva příklady.

Úloha 9

Fyzikální metody kontroly mikrobiálního růstu: UV záření

Cíle

1. Sledovat vliv UV záření na růst mikroorganismů.
2. Seznámit se s prací v laminárním boxu.

Teoretický úvod

Ultrafialové (UV) záření je neionizační záření o vlnových délkách mezi 15 a 390 nm. Vlnové délky pod 200 nm jsou absorbovány vzduchem a neovlivňují živé organismy. Nejnebezpečnější je tzv. **UVC** záření (200-290 nm), jehož vlnové délky odpovídají optimálním absorpčním vlnovým délkám DNA. Také **UVB** záření (290-320 nm) může poškodit DNA. **UVA** záření (320-390 nm) není snadno absorbováno a proto živé organismy ovlivňuje méně.

UV záření indukuje **dimerizaci pyrimidinu** v nukleových kyselinách, což vede k následné mutaci. Pokud není poškození opraveno, vede mutace důležitých genů k buněčné smrti. Pokud jsou pyrimidinové dimery vystaveny viditelnému světlu, aktivují se enzymy fotolyasy, které tyto dimery štěpí. Tento proces se nazývá fotoreaktivace (oprava světlem). Druhý mechanismus opravy probíhá nezávisle na světle. Dimery jsou odstraněny endonukleasou, DNA polymerasa nahradí báze a DNA ligasa spojí řetězec.

Využití UV záření pro sterilizaci je limitováno, protože UV záření špatně prostupuje řadou materiálů. Využívá se hlavně pro sterilizaci povrchů, vzduchu a desinfekci vody.

Materiál

Petriho misky s masopeptonovým agarem (4)

Sterilní vatové tyčinky (1)

Papír

Alobal

UV lampa

Kultura *Pseudomonas fluorescens*

Pracovní postup

V laminárním boxu (viz příloha 2) velmi pečlivě rozetřete bakteriální kulturu pomocí vatové tyčinky po celém povrchu agarů (celkem čtyři misky). Rozdělte misku na dvě poloviny (fixou na dno misky).

Postupně umístěte tři misky pod UV lampu a odklopte víčko. Jeden student z dvojice přikryje polovinu každé misky sterilním alobalem, druhý student listem sterilního papíru. První misku ozařujte 10 s, druhou 20 s a třetí 60 s. Po ozaření vraťte víčko zpět, misky inkubujte dnem vzhůru při 30°C 24 h. Čtvrtá (neozářená) miska slouží jako kontrola růstu.

Vyhodnocení výsledků

Prohlédněte všechny agarové plotny, zaznamenejte počty bakterií. Zhodnoťte vliv UV záření na růst bakterie. Zhodnoťte i růst v zakryté části agarové plotny.

Otázky

1. Proč je při ozařování agaru na misce UV světlem nutno odstranit víčko?
2. Mnohé mikroorganismy nacházející se v prostředí jsou zbarvené. Jakou výhodu může pigment představovat pro organismus? Vysvětlete v souvislostech s tématem této úlohy.

Úloha 10

Chemické metody kontroly mikrobiálního růstu: desinfekční prostředky a antimikrobiální látky

Cíle

1. Zjistit účinnost různých chemických látek jako antimikrobiálních činidel.
2. Stanovit minimální inhibiční koncentraci ředícím testem.
3. Stanovit citlivost mikroorganismů k antibiotikům.
4. Porovnat citlivost různých bakterií k různým antibiotikům.

Teoretický úvod

Ke kontrole mikrobiálního růstu se užívá řada chemických sloučenin, nazývaných **antimikrobiální činidla**. **Desinfekční látky** jsou chemické sloučeniny používané ke snížení počtu mikroorganismů na povrchu neživých objektů, zatímco **antiseptika** jsou látky používané ke snížení počtu mikroorganismů na živých tkáních. V obou případech je cílem zamezit množení zejména patogenních mikroorganismů. Látky, jejichž použití vede ke smrti bakterií, se nazývají **baktericidní**, ty které způsobují přechodnou inhibici jejich růstu, jsou **bakteriostatické**.

Antimikrobiální činidla musejí být použita s ohledem na organismus a přírodní podmínky. Je potřeba brát ohled na pH, rozpustnost, toxicitu, přítomnost organického materiálu a cenu. Důležitými kritérii pro zhodnocení účinku antimikrobiálního činidla je účinná koncentrace, doba kontaktu a je-li pro mikroorganismus letální (-cidní) nebo inhibující (-statické).

Antimikrobiální látky, které se užívají k léčbě nemocí a aplikují se vnitřně, se nazývají **chemoterapeutická činidla**. Pokud jsou to látky přírodní, produkovány jinými mikroorganismy, nazývají se **antibiotika**. Prvním objeveným antibiotikem byl penicilin, látka produkováná vláknitou houbou *Penicillium chrysogenum*. Poté následoval streptomycin produkováný aktinomycetou rodu *Streptomyces*. Aktinomycety stále zůstávají důležitým zdrojem antibiotik. Látky zařazované mezi antibiotika jsou produkovány celou řadou mikroorganismů. Antibiotika se vzájemně liší chemickou strukturou, spektrem účinnosti a mechanismem účinku.

Z hlediska aplikace chemoterapeutické látky v humánní nebo veterinární medicíně je důležitá citlivost mikroorganismu k aplikované látce. Stanovení citlivosti se nejčastěji provádí pomocí kvalitativního **difusního testu** v agarovém médiu. Jeho princip spočívá v tom, že se testovaný organismus rovnoměrně rozetře po povrchu agarů a potom se na něj aplikují papírové disky napuštěné antimikrobiální látkou (komerčně dodávané, napuštěné definovaným množstvím látky). Během kultivace difunduje látka z disku do okolního agarů v koncentračním gradientu. Účinek látky

se projeví vytvořením 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. V klinických laboratořích se proto používá standardizovaný Kirby-Bauerův test. Správnost testu je kontrolována za pomoci standardních bakteriálních kmenů. Test využívá ke kultivaci Mueller-Hintonův agar, v němž látky volně difundují.

Druhou běžnou metodou určení citlivosti mikroorganismu k antimikrobiální látce je **metoda zředěvací** a to buď ve zkumavce nebo mikrotitrační destičce. Látka se obvykle ředí faktorem 2. Pomocí této kvantitativní metody lze stanovit tzv. **minimální inhibiční koncentraci (MIC)**, což je nejnižší koncentrace antimikrobiální látky, při které ještě nepozorujeme bakteriální růst.

Materiál

Petriho miska s masopeptonovým agarem

Sterilní mikrobiologické zkumavky (7)

Sterilní voda

Masopeptonový bujón (10 ml)

Petriho miska s Mueller-Hintonovým agarem

Sterilní vatová tyčinka

Antimikrobiální disky (bacitracin, kanamycin, penicilin G)

Sterilní pinzeta

Automatická pipeta

Sterilní špičky

Pravítko

Očkovací klička

Desinfekční činidla (Savo, Incidur)

Tekutá kultura *Staphylococcus epidermidis* (grampozitivní bakterie), *Escherichia coli* (gramnegativní bakterie)

Pracovní postup

1. Účinnost desinfekčních prostředků: vliv doby kontaktu

a. Do sterilní zkumavky naředíte desinfekční prostředek sterilní vodou na koncentraci doporučenou na obale výrobcem, tak aby celkový objem činil 5 ml. Při práci ve dvojici každý student použije jiné desinfekční činidlo. Misku s masopeptonovým agarem rozdělte na 5 sektorů. Označte je 0, 2,5, 5, 10 a 20.

b. Bakteriologickou kličkou naočkujte do sektoru 0 kulturu *S. epidermidis*.

c. Do zkumavky s desinfekčním prostředkem přidejte asepticky 0,5 ml kultury *S. epidermidis*. Protřepete.

d. Z této zkumavky po 2,5, 5, 10 a 20 minutách očkujte do odpovídajících sektorů na misce.

e. Inkubujte 24 h při 37°C.

2. Účinnost desinfekčních prostředků: vliv koncentrace. Stanovení minimální inhibiční koncentrace ředící metodou

a. Připravte si sadu sterilních zkumavek. Označte je pořadovým číslem (1-6). Do první zkumavky připravte 2% roztok Inciduru nebo 3% roztok Sava v masopeptonovém bujónu, tak aby celkový objem byl 2 ml.

b. Do dalších 5 zkumavek asepticky napipetujte po 1 ml masopeptonového bujónu.

c. Z první zkumavky odeberte 1 ml roztoku a napipetujte ho do druhé zkumavky, protřepete.

d. Postupujte obdobně k předposlední zkumavce (zkumavka 5). 1 ml kultury odebrané z této zkumavky vypustěte do odpadní nádoby. Poslední zkumavka (č. 6) tak nebude obsahovat žádný desinfekční prostředek a slouží jako kontrola růstu. Ostatní zkumavky teď obsahují 1 ml roztoku desinfekčního prostředku v masopeptonovém bujónu. Koncentrace prostředku v každé následující zkumavce je poloviční ve srovnání s předcházející zkumavkou.

e. Do každé zkumavky asepticky přeneste 50 µl kultury *S. epidermidis*.

f. Inkubujte 24 h při 37°C.

3. Citlivost bakterií k antibiotikům: difusní test

a. Asepticky a velmi pečlivě rozetřete kulturu (*S. epidermidis* nebo *E. coli*, každý student ve dvojici jiný organismus) po celém povrchu Mueller-Hintonova agaru. Pracujte v laminárním boxu.

b. Sterilní pinzetou vyjměte disk impregnovaný antibiotikem ze zásobní lahvičky a položte ho na povrch naočkovaného agaru. Jemně přitlačte, aby disk dobře přilnul k agaru. Položte tři různé disky, dostatečně daleko od sebe a od okraje misky. Počítejte s tím, že průměr zóny může být větší než tři centimetry. Inkubujte dnem vzhůru 24 h při 37°C.

Vyhodnocení výsledků

1. Pozorujte růst mikroorganismu v jednotlivých sektorech. Zaznamenejte i výsledky vašeho kolegy. Jaká doba kontaktu s desinfekčním prostředkem je dostačující k úplnému potlačení bakteriálního růstu? Byla nejdelší testovaná doba dostačující? Který prostředek byl účinnější? Myslíte si, že tento test byl objektivní a opravdu reprezentuje účinnost testovaných látek?

2. Určete minimální inhibiční koncentraci testovaného desinfekčního prostředku. Zaznamenejte i výsledky vašeho kolegy. Který prostředek je účinnější?

3. Pravítkem přesně změřte průměr inhibičních zón (kompletní inhibice) ve dvou na sebe kolmých směrech. Podle tabulky 1 určete míru citlivosti testovaného mikroorganismu (citlivý, střední, rezistentní). Zaznamenejte i výsledky spolužáka. Které antibiotikum bylo účinné pro grampozitivní bakterii a které pro gramnegativní?

Tabulka 1. Interpretace inhibičních zón

Symbol	Antimikrobiální látka	Obsah na disku	Průměr inhibiční zóny (mm)		
			Rezistentní	Střední	Citlivý
B	Bacitracin	10 jednotek	<8	9-12	>13
P	Penicilin G, <i>Staphylococcus</i>	10 jednotek	<28	-	>29
P	Penicilin G, <i>ostatní bakterie</i>	10 jednotek	<14	-	>15
K	Kanamycin	30 mcg	<13	14-17	>18

Otázky

1. Jaké jsou aktivní sloučeniny testovaných desinfekčních prostředků? Zjistěte jaký je jejich obecný mechanismus antimikrobiálního účinku (učebnice, internet).
2. Jak byste kultivačně ověřili, jestli je při zředovacím testu účinek testovaného desinfekčního prostředku baktericidní nebo bakteriostatický?
3. S využitím výsledků získaných během tohoto cvičení zhodnoťte, zda je účinek Inciduru a Sava baktericidní nebo bakteriostatický. Vysvětlete vaše závěry.
4. V případě Inciduru jste při zředovacím testu pravděpodobně zjistili, že bakterie narostla pouze v médiu bez desinfekčního prostředku. Je v tomto případě možné určit minimální inhibiční koncentraci? Jak byste postupovali, abyste ji mohli určit?
5. Stručně popište podstatu mechanismu účinku testovaných antibiotik. Na základě struktury buňky a chemických vlastností testovaných antibiotik vysvětlete rozdílnou citlivost grampozitivních a gramnegativních bakterií k testovaným antibiotikům. Zhodnoťte, zda pozorované výsledky odpovídají teoretickým předpokladům.

Úloha 11

Mikroskopické pozorování mikroorganismů

Cíle

1. Připravit mikroskopický preparát.
2. Použít mikroskop k pozorování mikroorganismů.
3. Zvládnout různé barvicí techniky.

Teoretický úvod

Vzhledem k tomu, že jednotlivé mikrobiální buňky nejsou pozorovatelné pouhým okem, lze morfologické znaky mikroorganismů sledovat pouze pod mikroskopem. K pozorování mikroorganismů nejčastěji používáme **světelný mikroskop**. Mikroskop obsahuje dvě sady čoček, okulár a objektiv. **Zvětšení mikroskopu** je násobkem zvětšení okuláru a objektivu. Okulár obvykle obsahuje čočku zvětšující 10x, běžné objektivy zvětšují 4x, 10x, 40x a 100x. K pozorování preparátu při 1000-násobném zvětšení je pro zaostření obrazu nutné použít imerzní olej, příslušný objektiv se nazývá imerzní. **Rozlišení mikroskopu** je definováno jako schopnost rozlišit dva body jako zřetelně odlišené. Je nepřímo úměrné vlnové délce světelného zdroje a přímo úměrné tzv. numerické apertuře, která vyjadřuje míru schopnosti objektivu sbírat světlo. Při použití běžného objektivu se světlo na rozhraní podložního skla a vzduchu láme a nevstupuje do objektivu. Při použití imerzního oleje k lomu nedochází.

Pro posouzení velikosti, skutečného tvaru a pohybu buňky pozorujeme buňky v tzv. **nativním preparátu**. Vývoj a růst mikroorganismů pozorujeme obvykle v tzv. vlhké komůrce, kde jsou mikroorganismy umístěny ve visuté kapce.

Použití světelného mikroskopu je omezeno nedostatečným kontrastem mezi bezbarvými mikroorganismy a okolním prostředím. Kontrast je možné zlepšit barvením preparátu. Barviva lze dělit z různých hledisek. Pokud se k barvení používá pouze jedno barvivo, potom se jedná o **jednoduché (monochromatické) barvení**. Mikroorganismy se obvykle barví tzv. **přímým barvením**, kdy jsou barviva aplikována přímo, bez použití mořidel. **Negativní barvení** využívá barvení pozadí, takže pozorujeme nezbarvené buňky na kontrastním pozadí. Barviva lze rozdělit také na kyselá (aniontová), bazická (kationtová) a neutrální. Kyselá barviva jsou záporně nabitými buňkami odpuzována a používají se k barvení pozadí, zatímco bazická barviva (kladně nabitá) se používají k barvení buněk.

Podíl živých a mrtvých buněk ve vzorku zjistíme pomocí tzv. **vitálního barvení**. Tato metoda využívá semipermeability cytoplasmatické membrány. K barvení se používá barvivo metylénová

modř, která barví mrtvé buňky modře (mají cytoplasmatickou membránu zcela propustnou) a živé buňky zůstávají nezbarveny (zabarvena je pouze buněčná stěna).

K odlišení různých druhů buněk a pozorování některých buněčných struktur je nutno použít speciálních barvicích technik. Tento typ barvení je označován jako **diferenční** (rozlišovací). Používá se obvykle více než jedno barvivo, proto je označováno jako barvení **polychromatické**.

Před samotným barvením se buňky musejí natřít na sklíčko a zafixovat. Účelem **fixace** je usmrcení buněk, neboť mrtvé buňky lépe přijímají barvivo. Také se denaturují enzymy, které by mohly rozložit části buňky a tak ji narušit. Fixace také zlepšuje přilnavost buněk k podložnímu sklu. Fixovat můžeme plamenem nebo 95% metanolem.

K mikroskopickému pozorování pouzder a slizů a měření velikosti buněk se používá **negativní barvení**. V tomto případě se preparát nefixuje, takže nedochází k deformaci buněk.

Prvním krokem při identifikaci bakterií je obvykle **barvení podle Grama**. Toto diferenciální barvení rozlišuje bakterie na grampozitivní a gramnegativní. Grampozitivní bakterie zadržují primární barvivo (krystalová violet), kdežto gramnegativní bakterie se snadno odbarvují a odbarvené bakterie jsou barveny sekundárním barvivem (safranin). Rozdílné barvení je dáno rozdíly v chemickém složení buněčné stěny. Princip spočívá v tom, že krystalová violet se nejprve váže na buňku a jód reaguje s krystalovou violetí za tvorby komplexu. U gramnegativních buněk odbarvovací činidlo rozpustí vnější lipopolysacharidovou vrstvu a komplex krystalové violeti s jódem se vymyje přes tenkou vrstvu peptidoglykanu. Gramova reakce je nejspolehlivější u mladé bakteriální kultury (méně než 24 h), zatímco starší kultury nemusejí zadržovat primární barvivo a výsledky nejsou přesné.

Strukturální barvení se používají k identifikaci a studiu struktury bakterií. V současné době se používají k barvení endospor, pouzder a bičíků (flagely). **Endospory** jsou klidové formy buněk, protože nemetabolizují a jsou rezistentní k teplu, chemikáliím a ostatním nepříznivým podmínkám. Vytvářejí se při nedostatku výživy a vody. Endospory jsou vytvářeny bakteriemi rodu *Bacillus* a *Clostridium*. Endospory jsou pro většinu barviv neprostupné, pro zlepšení barvení se obvykle používá zvýšená teplota. Obarvené endospory není možné snadno odbarvit. Vegetativní buňky se dobarvují jiným barvivem. Mnohé bakterie vylučují chemikálie, které přilnou k jejich povrchu a vytvářejí viskózní povlak. Je-li tato struktura okrouhlá nebo oválná, pak se nazývá **pouzdro**. Je-li nepravidelného tvaru a volně připojená k bakteriální stěně, pak se jedná o **slizovou vrstvu**. Schopnost vytvářet pouzdro je dána geneticky, ale velikost pouzdra je ovlivněna médiem, na kterém bakterie roste. Většina pouzder je tvořena polysacharidy, které jsou rozpustné ve vodě a nenabitě (neváží iontová barviva), jiná jsou složena z polypeptidů. Většina barvicích technik využívá barvení bakterií a pozadí, pouzdro zůstává bezbarvé. **Bičíky** (flagely) jsou proteinové struktury sloužící k pohybu bakterií. Bičíky jsou velmi křehké a nejsou viditelné pod světelným mikroskopem. Všechny techniky barvení bičíků používají mořidlo, které bičík pokryje a tím zesílí. Přítomnost a rozmístění bičíků jsou

důležité znaky pro identifikaci a klasifikaci bakterií. Podle rozmístění rozeznáváme bičíky peritrichální (všude kolem bakterie) a polární (na jedné nebo obou stranách buňky).

Materiál

Podložní a krycí skla

Stříčka s vodou

Filtrační papír

Očkovací klička

Pasteurovy pipety

Automatická pipeta

Sterilní špičky

Pinzeta

Sterilní voda

Vitální barvení: metylénová modř

Negativní barvení: nigrosin

Gramovo barvení: krystalová violet, jód, etanol (ve stříčce), safranin 1

Barvení endospor: malachitová zeleň, safranin 2

Barvení puzder: Kongo červen, 1% HCl, metylénová modř

Bakteriální kultury *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *Azotobacter vinelandii*, *Nostoc*

Pracovní postup

1. Použití mikroskopu

- a. Seznamte se s popisem mikroskopu v příloze 3.
- b. Rozsviďte žárovku mikroskopu a nastavte osvětlení.
- c. Podložní sklo s preparátem umístěte na stolek mikroskopu.
- d. Zařadte objektiv se zvětšením 40x.
- e. Zaostřete na preparát tak, že ho pomalu přiblížíte co nejbližší k objektivu pomocí kolečka makroposuvu (sledujte ze strany). Pozorujte preparát v okulárech a doostřete otáčením kolečka mikroposuvu směrem od sebe (stolek se posouvá směrem dolů).
- f. Nastavte polohu aperturní clony. Kroužek aperturní clony je opatřen stupnicí zvětšení objektivů. Otočte kroužkem aperturní clony tak aby na jeho přední straně bylo zvětšení odpovídající použitému objektivu. K dosažení dobrého kontrastu je nutná nízká intenzita osvětlení.

g. V případě použití imerzního objektivu, vyřadte z dráhy objektiv zvětšující 40x, do světelné dráhy naneste kapku imerzního oleje, zařadte imerzní objektiv (100x), doostřete na preparát a pozorujte. Před použitím imerzního objektivu je *vždy* nutné nejdříve zaostřit preparát při menším zvětšení! Před přidáním oleje musí být preparát dokonale suchý!

h. Po ukončení pozorování vyřadte imerzní objektiv (neotáčejte objektiv zvětšující 40x do imerzního oleje!) a odstraňte olej z čočky objektivu pomocí přichystaného papíru.

2. Příprava mikroskopického preparátu

A. Nativní preparát

a. Do středu čistého podložního sklíčka naneste kapku kultury v bujonu nebo do kapky sterilní vody ve středu podložního skla přeneste vyžíhanou kličkou malé množství kultury kultivované na agaru.

b. Důkladně rozmíchejte a překryjte krycím sklem tak, aby se nevytvořily bubliny (sklíčko držíme za hrany a opatrně pokládáme; použijte jednorázové rukavice!). Přebytečnou kapalinu odsajte filtračním papírem.

c. Pozorujte pod mikroskopem. Ve dvojici k pozorování použijte *Nostoc* a dvě další kultury (např. *E. coli*, *S. epidermidis*, *B. subtilis*). Každý student připraví alespoň jeden preparát.

d. Použitá podložní skla odložte do připraveného desinfekčního roztoku.

B. Fixovaný preparát (pro následné barvení)

a. Do středu čistého podložního sklíčka naneste kapku sterilní vody a vyžíhanou kličkou do ní přeneste malé množství kultury z agaru nebo přímo na sklo kapku kultury v bujonu.

b. Po důkladném rozmíchání suspenze zhotovte pomocí sterilní kličky nebo druhého podložního skla nátěr, který nesmí být příliš silný (měl by pouze slabě opaleskovat).

c. Nechejte volně na vzduchu úplně zaschnout.

d. Fixujte plamenem tak, že sklíčko se zaschlým nátěrem 2-3x protáhnete rychle přes modrou (nesvítivou) část plamene. Kultura je přitom na horní straně sklíčka.

e. Po vychladnutí barvěte.

3. Barvení

Při barvení pracujte v ochranných rukavicích! Barvení provádějte v digestoři. Dodržujte doporučené časy a preparáty nechejte důkladně zaschnout. Před odložením skla do desinfekčního roztoku otřete imerzní olej buničinou. Každý student připraví svůj vlastní preparát u všech barvicích technik.

A. Jednoduché barvení

a. Připravte fixovaný preparát. Použijte stejné mikroorganismy jako pro pozorování v nativním preparátu (mimo *Nostoc*).

b. Převrstvěte metylénovou modří na 30-60 s.

c. Důkladně opláchněte destilovanou vodou tak, abyste ji nestříkali přímo na nátěr a opatrně osušte mezi filtračními papíry.

d. Pozorujte imerzním objektivem. Ve dvojici k pozorování použijte dvě různé kultury.

B. Negativní barvení

a. Na okraji podložního skla suspendujte kulturu (ve dvojici např. *S. epidermidis* a *B. subtilis*) v kapce sterilní vody a přidejte kapku nigrosinu.

b. Rozmíchejte a rozetřete pomocí druhého podložního skla do tenké vrstvy.

c. Nechejte volně uschnout (nefixujte).

d. Pozorujte imerzním objektivem světlé buňky na šedém pozadí.

e. Použitá podložní skla odložte do připraveného desinfekčního roztoku.

C. Barvení dle Grama

a. Připravte nátěr kultury (*S. epidermidis*, *E. coli*), vysušte a fixujte v plameni.

b. Převrstvěte krystalovou violetí a nechejte působit 30 s.

c. Barvivo slejte, opláchněte destilovanou vodou ze stříčky tak, abyste ji nestříkali přímo na nátěr.

d. Převrstvěte roztokem jódu na 30 s.

e. Opláchněte destilovanou vodou.

f. Rychle odbarvěte etanolem (nechejte působit asi 10 s tak, že preparát opláchnete etanolem ze stříčky) a okamžitě opláchněte destilovanou vodou.

g. Přidejte na 30 s safranin.

h. Opláchněte destilovanou vodou a osušte mezi filtračními papíry.

i. Pozorujte imerzním objektivem.

D. Barvení endospor

a. Natřete a fixujte různě staré kultury *B. subtilis* (24 h, 48 h v bujonu, starou kulturu na agaru).

b. Nátěr zakryjte malým kouskem filtračního papíru (menší než podložní sklo).

c. Převrstvěte malachitovou zelení (pozor: velmi barví všechno kolem!!!) a umístěte nad páru po dobu 10 minut. Přidávejte barvivo podle potřeby. Udržujte vlhké.

d. Pinzetou odstraňte opatrně papír, důkladně opláchněte destilovanou vodou (nabarvené sklo není cílem metody).

e. Překryjte na 30 s vrstvou safraninu (roztok 2).

f. Opláchněte destilovanou vodou a osušte filtračním papírem.

g. Pozorujte pod mikroskopem imerzním objektivem. Spory jsou zbarveny zeleně, ostatní buněčný obsah červeně.

E. Barvení pouzder

a. Na sklíčko kápněte Kongo červeně a suspendujte v ní kulturu *A. vinelandii*.

b. Suspenzi rozetřete po povrchu sklíčka a nechejte dobře zaschnout. Preparát NEFIXUJTE!

- c. Převrstvěte na několik sekund kyselinou chlorovodíkovou (dojde ke změně zbarvení změnou pH), potom kyselinu opatrně slejte a nechejte volně uschnout.
- d. Převrstvěte na 3 minuty metylénovou modří, slejte a usušte volně na vzduchu.
- e. Pozorujte imerzním objektivem modré buňky, světlá pouzdra a tmavě modré pozadí.

Vyhodnocení výsledků

Zakreslete všechna mikroskopická pozorování do protokolu. Porovnejte vzhled mikroorganismů v nativním preparátu s preparátem barveným metylénovou modří. Porovnejte výsledky barvení metylénovou modří a nigrosinem. Která z testovaných bakterií je grampozitivní a která gramnegativní? Jak se liší vzhled různě starých kultur *Bacillus subtilis*? Jak vysvětlíte tyto změny?

Otázky

1. Jaké složení živného média pravděpodobně zvětší bakteriální pouzdro?
2. Jakou morfologii má většina bakterií mající bičík?

Úloha 12

Základy identifikace bakterií: katabolismus cukrů

Cíle

1. Seznámit se s principy identifikačních testů založených na metabolismu cukrů.
2. Testovat hydrolýzu škrobu mikroorganismy.
3. Testovat a interpretovat schopnost mikroorganismů fermentovat cukry.

Teoretický úvod

Chemické reakce probíhající v živém organismu se nazývají souhrnně **metabolismus**. Některé mikroorganismy využívají určité metabolické dráhy v přítomnosti kyslíku (aerobní) a některé v nepřítomnosti kyslíku (anaerobní).

Mnohé bakterie vytvářejí stejně vyhlížející kolonie a sdílejí i stejnou buněčnou morfologii. K jejich identifikaci se proto využívají další metody, z nichž mnohé vycházejí z rozdílných metabolických aktivit. Studium metabolismu mikroorganismů je také důležité pro pochopení jejich funkce v ekologii.

Značná část mikroorganismů získává energii rozkladem (katabolismem) cukrů. **Cukry** jsou organické molekuly obsahující uhlík, vodík a uhlík v poměru $(CH_2O)_n$. Podle velikosti jsou klasifikovány jako monosacharidy, oligosacharidy a polysacharidy. Monosacharidy jsou jednoduché cukry obsahující 3 až 7 atomů uhlíku. Oligosacharidy jsou složeny ze 2 až 9 monosacharidových molekul, nejběžnějšími oligosacharidy jsou disacharidy. Polysacharidy obsahují deset a více monosacharidových jednotek.

Větší molekuly jsou často rozkládány mimo buňku tzv. exoenzymy. Malé molekuly uvolněné touto reakcí jsou přeneseny zpět do buňky a dále rozkládány endoenzymy. V laboratorních podmínkách je přítomnost exoenzymu sledována pomocí změn substrátu okolo mikrobiální kolonie. **Amylasy** hydrolyzují polysacharid škrob, přičemž se uvolňuje monosacharid glukosa. **Glukosa** vstupuje do buňky a je dále katabolizována. Některé mikroorganismy katabolizují glukosu **oxidativně** za tvorby oxidu uhličitého a vody. Většina však katabolizuje glukosu **fermentativně** (zkvašováním) bez použití kyslíku (a to i v přítomnosti kyslíku). Mikroorganismy jsou schopny kromě glukosy fermentovat další monosacharidy (fruktosu), disacharidy (např. sacharosu, laktosu, maltosu) či polysacharidy (celulosu). Koncovými produkty fermentace jsou malé organické molekuly, obvykle organické kyseliny (např. kyselina mléčná). Některé mikroorganismy vytvářejí při fermentaci i plyny (vodík, oxid uhličitý). Zda je organismus oxidativní nebo fermentativní lze určit pomocí **Hugh-Leifsonova OF média**, které obsahuje vysokou koncentraci cukru a nízkou koncentraci peptonu. Pepton podporuje růst neoxidativních, nefermentujících bakterií. K testu se používají dvě zkumavky s polotuhým hlubokým

agarem, z nichž v jednom případě je agar vystaven přístupu kyslíku a v druhém je jeho přístupu zabráněno pomocí minerálního oleje na povrchu agaru. OF médium také obsahuje acidobazický indikátor, bromthymolovou modř, která se v přítomnosti kyseliny vznikající rozkladem cukru barví žlutě. V alkalickém prostředí vznikajícím rozkladem peptonu je zbarvení tmavě modré. Fermentující organismus rozkládá cukr za vzniku kyseliny v obou zkumavkách, zatímco oxidativní organismus vytváří kyselinu pouze ve zkumavce s přístupem kyslíku.

Tvorba kyseliny a plynu u fermentativních mikroorganismů se testuje pomocí tzv. **fermentační zkumavky**. Fermentační médium obsahuje pepton, acidobazický indikátor (fenolová červeň nebo bromthymolová modř), malou zkumavku otočenou dnem vzhůru k zachycení plynu (Durhamova zkumavka) a 0,5-1% cukru. V neutrálním prostředí je fenolová červeň červená, pod pH 6,8 se barví žlutě. Oranžové zbarvení je známkou tvorby velmi malého množství kyseliny (pH v rozmezí 6,8 a 7,4) a je považováno za negativní reakci. Fermentace nastává jak v nepřítomnosti, tak v přítomnosti kyslíku, avšak při delší kultivaci (více než 24 h) mohou mnohé bakterie růst po vyčerpání cukru oxidativně na peptonu a tím dojde k neutralizaci až alkalizaci (indikátor se zbarví růžovo červeně).

Fermentační proces může vést k tvorbě různých koncových produktů. V některých případech může být vytvářeno velké množství kyseliny, v jiných jsou vytvářeny produkty neutrální. K rozlišení organismů vytvářející kyselé produkty z glukosy od těch, které vytvářejí neutrální produkt acetoin se používá kombinovaný **metylčerveňový a Voges-Proskauerův test**. Metylčerveň je červená pod pH 4,4 (tj. červená barva indikuje tvorbu většího množství kyseliny), nad pH 6,0 je žlutá (vytváří se neutrální produkt). Tvorba acetoinu je detekována reakcí s hydroxidem draselným a α -naftolem. Při pozitivní reakci se médium zbarví červeně, při negativní světle hnědě. Tvorba acetoinu je závislá na době kultivace. Acetoin se tvoří až při delší kultivaci (glukosa je při glykolýze přeměněna na kyselinu pyrohroznovou a ta dále metabolizována buď na kyselinu mléčnou nebo na acetoin).

Material

Petriho miska s masopeptonovým agarem obsahujícím škrob (1 do dvojice)

Roztok jódu

Zkumavky se sterilním médiem (9 ml) pro fermentaci cukrů (fenolová červeň) (3)

Sterilní roztoky (10%) cukrů (glukosa, laktosa, sacharosa)

Bakteriální kultury: *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*

Pracovní postup

1. Hydrolýza škrobu

- a. Rozdělte škrobový agar na tři sektory.

- b.** Pomocí sterilní inokulační kličky do každého sektoru naneste kulturu *B. subtilis*, *E. coli* a *P. fluorescens* ve formě jedné krátké čáry.
- c.** Kultivujte dnem vzhůru při 30°C 24 h.
- d.** V příštím cvičení zaznamenejte růst bakterií a potom na agar napipetujte roztok jódu. Oblast hydrolýzy škrobu zůstane průhledná, škrob se zbarví jódem modře.

2. Fermentace cukrů

- a.** Vyučující před začátkem cvičení přidá do zkumavek s bujónem asepticky roztok cukru tak, aby koncová koncentrace cukru byla 1% (do každé zkumavky jiný cukr).
- b.** Pomocí pipety očkujte do jedné sady zkumavek 20 µl bakteriální kultury *E. coli* a do druhé *P. fluorescens* nebo *B. subtilis* (tj. každý student jinou kulturu, ale do všech 3 zkumavek stejnou!).
- c.** Inkubujte při 37°C 24 - 48 h.

Vyhodnocení výsledků

Zaznamenejte výsledky kultivace na škrobovém agaru. Který organismus dává pozitivní test na hydrolýzu škrobu? Zaznamenejte růst ve fermentačním médiu, tvorbu kyseliny a plynu. Které z testovaných mikroorganismů tvoří kyselinu, které tvoří plyn?

Otázky

- 1.** Vysvětlete, jak může organismus, který nehydrolyzuje škrob, růst na agarové plotně se škrobem.
- 2.** Co se může stát, spotřebuje-li organismus veškerý cukr ve fermentační zkumavce? Jak se to projeví?

Úloha 13

Základy identifikace bakterií: katabolismus proteinů

Cíle

1. Seznámit se s principy identifikačních testů založených na metabolismu proteinů.
2. Testovat hydrolýzu želatiny.
3. Testovat přítomnost ureasy.
4. Testovat deaminaci fenylalaninu.

Teoretický úvod

Proteiny jsou složeny z aminokyselin spojených do dlouhých řetězců pomocí peptidové vazby. Řada bakterií je schopna hydrolyzovat proteiny na peptidy a aminokyseliny. Hydrolýza proteinu se nazývá **proteolýza**. Bakterie využívají aminokyseliny jako zdroj energie a uhlíku pokud sacharidy nejsou k dispozici. Primárně jsou však aminokyseliny využívány v anabolických procesech.

Velké proteinové molekuly jako např. želatina, jsou hydrolyzovány pomocí exoenzymů a produkty hydrolýzy jsou transportovány zpět do buňky. **Hydrolýza želatiny** může být demonstrována kultivací bakterií na médiu s obsahem želatiny. Želatinové médium se rozpouští v teplé vodě (50°C), tuhne při ochlazení pod 25°C a opět se rozpouští při zahřátí nad 25°C. Pokud je želatina hydrolyzována, zkapalňuje, a netuhne ani při ochlazení pod 20°C.

Některé bakterie jsou schopny hydrolyzovat mléčný protein kasein, který dává mléku jeho bílý neprůhledný vzhled. **Hydrolýza kaseinu** se projeví projasněním média.

Ureasa je enzym, který rozkládá močovinu (odpadní produkt rozkladu proteinů u obratlovců) za vzniku amoniaku a oxidu uhličitého. Amoniak alkalizuje při reakci prostředí, což je detekováno změnou barvy acidobazického indikátoru (fenolová červeně) na tmavě růžovočervenou barvu.

Aminokyseliny, které vznikají rozkladem proteinů a peptidů vně buňky exoenzymy, jsou přeneseny do buňky, kde jsou metabolizovány pomocí endoenzymů. Dříve než mohou být aminokyseliny použity jako zdroj uhlíku a energie, musí být odstraněna aminoskupina **deaminací** (pomocí deaminas). Aminoskupina je přeměněna na amoniak, který je vyloučen z buňky. Druhým produktem je organická kyselina. Deaminací fenylalaninu vzniká kyselina fenylnpyrohroznová, která vytváří zelený komplex se železitými ionty. Deaminaci je možno sledovat také pomocí Nesslerova činidla, které detekuje amoniak (žluté zabarvení).

Aminokyseliny mohou být také **dekarboxylovány** (odstranění oxidu uhličitého pomocí dekarboxylas). Dekarboxylace aminokyselin vede k tvorbě odpovídajícího aminu, uvolnění oxidu

uhličitého a posunu pH do alkalické oblasti. Dekarboxylasová reakce je sledována pomocí acidobazického indikátoru.

Některé bakterie uvolňují **sirovodík** z aminokyselin obsahujících síru (cystin, cystein, methionin). Některé enterobakterie tvoří sirovodík redukcí kyslíkatých sirných sloučenin (např. thiosíranu). Produkce sirovodíku je detekována pomocí síranu železnatého (vytváří se černý, nerozpustný sulfid železnatý).

Některé bakterie jsou schopny přeměňovat tryptofan na **indol**. Indol je možno detekovat pomocí dimethylaminobenzaldehydu (Kováčsovo činidlo), se kterým vytváří jasně červené barvivo.

Materiál

Zkumavky s masopeptonovým bujónem obsahujícím želatinu (3 do dvojice)

Roztok močoviny

Roztok fenylalaninu

Roztok chloridu železitého

Zkumavky (6 do dvojice)

Očkovací klička a jehla

Automatická pipeta (1 ml)

Špičky (modré)

Bakteriální kultury *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus epidermidis*

Pracovní postup

1. Hydrolýza želatiny

- a. Pomocí očkovací jehly naočkujte jednu zkumavku s želatinovým médiem kulturou *B. subtilis*, druhou *E. coli* (při práci ve dvojici očkuje každý student jeden mikroorganismus). Třetí zkumavka slouží jako kontrola.
- b. Inkubujte při laboratorní teplotě do příštího cvičení.
- c. Pokud je želatina tekutá, umístěte zkumavku do nádoby s ledem. Je médium stále tekuté?

2. Důkaz tvorby ureasy

- a. Do 3 zkumavek napipetujte 0,3 ml roztoku močoviny a masivně naočkujte kličkou kulturu *S. epidermidis*, *E. coli* a *B. subtilis* (více kolonií z misky, až do hustého zákalu).
- b. Inkubujte 2-3 hodiny při 37°C.
- c. Hodnoťte zabarvení.

3. Důkaz deaminace fenylalaninu

- a. Do 3 zkumavek napipetujte 0,5 ml roztoku fenylalaninu a masivně naočkujte kličkou kulturu *S. epidermidis*, *E. coli* a *P. fluorescens*.
- b. Inkubujte při 30°C 2-3 hodiny v téměř vodorovné poloze (zkumavky položte do prázdné Petriho misky).
- c. Přidejte 2-3 kapky činidla (chlorid železitý) a ihned pozorujte.

Vyhodnocení výsledků

Zaznamenejte výsledky jednotlivých testů. K vyhodnocení testu na tvorbu ureasy a deaminaci fenylalaninu použijte i fotografie výsledků získaných pro bakterii *Proteus vulgaris*. Které organismy vykazují pozitivní testy?

Otázky

V souvislosti s výsledky této úlohy vysvětlete, proč se ke ztužování živných médií používá agar a ne želatina.

Úloha 14

Základy identifikace bakterií: respirace

Cíle

1. Seznámit se s principy identifikačních testů založených na detekci respiračních enzymů.
2. Testovat přítomnost oxidasy a katalasy.
3. Testovat schopnost redukovat dusičnany.

Teoretický úvod

Během metabolických procesů v buňce jsou uvolňovány elektrony, které jsou přijímány dalšími sloučeninami – akceptory elektronů. Přijetím elektronu jsou tyto sloučeniny redukovány. Při fermentativním metabolismu působí jako akceptory elektronů organické sloučeniny, při oxidativním metabolismu (respiraci) jsou to anorganické sloučeniny. Při **aerobní respiraci** je koncovým akceptorem elektronů kyslík.

Oxidasový test identifikuje organismy, které vytvářejí enzym cytochrom *c* oxidasu. Cytochrom *c* oxidasa se účastní přenosu elektronů v elektronovém transportním řetězci aerobních bakterií z cytochromu *c* na kyslík (oxidace cytochromu *c* kyslíkem, kyslík je redukován). Oxidasové činidlo obsahuje chromogenní oxidačně-redukční činidlo (tetrametyl-*p*-fenylendiamin dihydrochlorid), které oxidací mění barvu (tmavě modrofialové). Při oxidasovém testu nedochází k přímé oxidaci činidla cytochrom *c* oxidasou, ale cytochrom *c* oxidasa nejdříve oxiduje cytochrom *c*, který potom oxiduje činidlo.

Některé bakterie jsou schopny redukovat kyslík na peroxid vodíku. Ten je pro buňky toxický. Některé bakterie však mají obranný mechanismus snižující toto poškození. Rozklad peroxidu vodíku na vodu a kyslík je katalyzován enzymem **katalasou**. Přítomnost katalasy je možné testovat jednoduchým katalasovým testem, který spočívá v přidání peroxidu vodíku k bakteriální kultuře. Pozitivní test se projeví uvolňováním bublinek kyslíku.

Při **anaerobní respiraci** slouží jako akceptory elektronů různé oxidované anorganické sloučeniny. Během anaerobní respirace některé bakterie redukují dusičnany na dusitany, některé dále redukují dusitany na oxid dusný a dusík. **Redukce dusičnanů** na dusitany je detekována přidavkem kyseliny sulfanilové a dimetyl- α -naftylaminu ke kultuře kultivované v přítomnosti dusičnanu. Pozitivní reakce se projeví červeným zbarvením. Pokud je výsledek negativní (nepřítomnost dusitanu), je kultura dále testována na přítomnost dusičnanu přidavkem zinku. Pokud jsou přítomny dusičnany, nenastala

redukce. Zinek zredukuje dusičnany na dusitany a objeví se červené zbarvení. Jestliže je test negativní i po přidavku zinku, byly dusitany zredukovány na oxid dusný nebo dusík.

Materiál

Oxidasový test (disky)

Voda

Peroxid vodíku (3%)

Podložní skla nebo Petriho misky

Zkumavky se sterilním masopeptonovým bujónem obsahujícím KNO₃ (5 do dvojice)

Automatická pipeta (200 µl)

Špičky (žluté)

Sterilní voda

Roztok 1 (kyselina sulfanilová)

Roztok 2 (dimetyl- α -naftylamin)

Zinkový prach

Špachtle

Bakteriální kultury *Pseudomonas fluorescens*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Lactococcus lactis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus luteus*

Pracovní postup

1. Oxidasový test

Oxidasový disk umístěte do Petriho misky a zvlhčete ho vodou. Testovanou kulturu kultivovanou na pevném médiu (*P. fluorescens*, *E. coli*, *M. luteus*, *L. lactis*) přeneste sterilní kličkou a rozetřete po povrchu disku. Pozitivní reakce se projeví během 10-15 sekund jako tmavě modrofialové zbarvení. Opožděná reakce se projeví do 60 s. Pozdější nebo žádná změna barvy značí negativní výsledek.

2. Katalasový test

Rozetřete bakteriální kolonii (*L. lactis*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *B. subtilis*, *M. luteus*) v kapce 3% peroxidu vodíku na podložním sklíčku nebo Petriho misce a pozorujte.

3. Redukce dusičnanů

- a. Do 4 zkumavek s bujónem obsahujícím dusičnan draselný naočkujte 18-24 h bakteriální kulturu (*E. coli*, *L. lactis*, *P. fluorescens* a *B. subtilis*). Pátá zkumavka slouží jako kontrola.
- b. Kultivujte do příštího cvičení při 30°C.
- c. Přidejte několik kapek (3-5) činidla 1 a činidla 2 do každé zkumavky, protřepte a pozorujte.
- d. Do zkumavek s negativní reakcí přidejte nepatrné množství zinkového prachu a pozorujte.

Vyhodnocení výsledků

Zhodnoťte výsledky jednotlivých testů. Které bakteriální kultury byly pozitivní, které negativní?

Otázky

Jak odlišíte stafylokoky od streptokoků (pomocí biochemického identifikačního testu)?

Úloha 15

Eukaryotické mikroorganismy: kvasinky a mikroskopické houby

Cíle

1. Definovat rozdíly mezi bakteriemi, kvasinkami a mikroskopickými houbami.
2. Odlišit bakterie od kvasinek a mikroskopických hub.

Teoretický úvod

Kvasinky a **vláknité houby** jsou mikroskopické eukaryotické organismy patřící do říše *Fungi* (houby). Jsou to chemoheterotrofní organismy. Ve srovnání s bakteriemi rostou houby lépe v kyselejších prostředích, tolerují vyšší osmotický tlak a nižší vlhkost. Jsou větší než bakterie, k jejich charakterizaci a identifikaci se využívá především morfologických a buněčných znaků. Houby jsou strukturně komplexnější než bakterie, ale méně rozmanité metabolicky. Kvasinky ani vláknité houby netvoří samostatnou taxonomickou skupinu, jedná se pouze o různé morfologické typy hub.

Kvasinky jsou jednobuněčné houbové organismy, pro které je typický kulatý nebo oválný tvar. V přírodě jsou velmi rozšířené, především na ovoci a dalších substrátech obsahujících cukry. Kvasinky se množí nepohlavně i pohlavně. Nepohlavně se množí především **pučením**, některé se množí **přehrádečným dělením** (*Schizosaccharomyces pombe*). Během pučení se na mateřské buňce vytváří pupen, který se po dosažení dostatečné velikosti oddělí. V některých případech nemusí k oddělení pupenu dojít a vytváří se krátký řetězec buněk, který se nazývá **pseudohyfa**. Při pohlavním rozmnožování vznikají různé druhy pohlavních **spor**, podle kterých jsou kvasinky řazeny do podkmene *Ascomycota* (převážná část) nebo *Basidiomycota*. Kvasinky jsou fakultativně anaerobní organismy, jejichž metabolické aktivity jsou využívány v řadě průmyslových procesů, především v kvasném průmyslu (výroba piva, vína, lihu, droždí). Kvasinky jsou využívány také v mnoha biotechnologických aplikacích. Kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* a *Pichia pastoris* patří mezi nejvýznamnější modelové eukaryotní organismy. Některé kvasinky mohou být patogenní. V laboratorních podmínkách se k izolaci kvasinek využívá selektivní Sabouraudův agar. Jeho selektivita spočívá v obsahu jednoduchých živin (glukosa a pepton) a především v nízkém pH, které inhibuje růst většiny ostatních mikroorganismů. Na agarových plotnách kvasinky vytvářejí kolonie, které nejsou v mnoha případech vzhledově odlišitelné od kolonií bakteriálních. Většina technik používaných pro práci s bakteriemi je aplikovatelná pro práci s kvasinkami. Pro identifikaci kvasinek je třeba provést řadu testů, které zahrnují charakteristiky morfologické (tvar buněk, tvorba mycelia, specializovaných buněk), kultivační (vzhled kultury, tvorba pigmentů, tvorba pouzdrového polysacharidu), rozmnožovací (schopnost sporulace, tvar spor a věcek, typ spájení) a fyziologické (schopnost fermentace cukrů, asimilace

nitrátů, schopnost využívat různé uhlíkaté sloučeniny). Mezi běžné zástupce patří *Saccharomyces cerevisiae* (pekařské a pivovarnické kvasinky), *Candida albicans*, *Schizosaccharomyces pombe*.

Mikroskopické vláknité houby (obecně označované jako plísně) jsou aerobní mnohobuněčné organismy tvořené vlákny, která rostou na povrchu substrátů nebo je prorůstají. Tato vlákna se nazývají **hyfy**. Jednotlivé hyfy vytvářejí rozvětvené vláknité **mycelium**, které je považováno za jeden organismus a jehož jednotlivá vlákna obsahují stejnou DNA. Vlákno hyfy je složeno z jednotlivých buněk, obvykle oddělených přepážkou (septem). Některé houby septa neobsahují a jejich hyfy jsou tvořeny souvislou hmotou cytoplasmy s mnoha jádry (koenocytické hyfy). Konec vlákna nese buď spory či váčky (sporangia) se sporami. V laboratorních podmínkách se vláknité houby identifikují na základě vzhledu kolonie (tvar, barva), uspořádání hyf a struktury reprodukčních spor. Mikroskopické houby se množí převážně nepohlavně tvorbou sporangiospor nebo konidiospor. **Sporangiospory** jsou vytvářeny uvnitř sporangia, které je neseno vzdušnou hyfou (sporangioforou). **Konidiospory** jsou uspořádány v řetízku na konci vzdušné hyfy nazývané konidiofora. Pomocí sporangiofor se rozmnožuje např. *Rhizopus* a *Mucor*, pomocí konidiofor *Penicillium* a *Aspergillus*. Méně často se mikroskopické houby rozmnožují pohlavně tvorbou **zygospor** nebo **askospor**. Na základě nejmodernější klasifikace se dle způsobu pohlavního rozmnožování vláknité houby řadí do podkmene *Zygomycota* (např. *Rhizopus*, *Mucor*) a *Ascomycota* (různé druhy padlí, většina kvasinek). Někteří zástupci *Ascomycota* se však rozmnožují pouze nepohlavně, např. *Penicillium*, *Aspergillus*. Dříve se tyto nepohlavně rozmnožující houby řadily do podkmene *Deuteromycota*. Vláknité houby se obvykle vyživují **saprofytně**, tzn., že získávají výživu z mrtvého organického materiálu. Některé jsou však parazitické. Řada hub je využívána v potravinářském průmyslu např. k výrobě sýrů (rod *Penicillium*), saké, sojové omáčky (*Aspergillus oryzae*), kyseliny citronové (*Aspergillus niger*) nebo ve farmaceutickém průmyslu (antibiotika, *Penicillium chrysogenum*). Houby však způsobují i nemoci u člověka a to několika způsoby. Mohou být příčinou alergických reakcí (vdechování spor), některé vytvářejí toxiny, které mohou být pro člověka jedovaté nebo mají halucinogenní účinky. Toxiny některých vláknitých hub jsou karcinogenní (např. aflatoxiny produkované rodem *Aspergillus*). Některé houby se v lidském organismu množí a způsobují nemoci, obecně nazývané **mykózy**. Některé patogenní kvasinky a houby vykazují tzv. **dimorfismus** – tj. rostou ve formě kvasinky nebo vláknité houby podle podmínek prostředí (např. *Candida albicans*, *Coccidioides immitis*). Vláknité houby mohou také zničit zásoby potravin, což může vést k hladovění až smrti. Spory vláknitých hub ve vzduchu jsou nejčastějším zdrojem kontaminace v laboratoři.

Materiál

Petriho miska se Sabouraudovým agarem (2)

Baňka s YPG bujonem

Balónek

Sterilní vatová tyčinka

Zkumavka se sterilní vodou

Sterilní zkumavky (2)

Očkovací klička

Nůž

Bürkerova komůrka s krycím sklem

Podložní skla

Krycí skla

Metylénová modř

Roztok 20% glycerolu

Mikroskop

Kvasnice

Ovoce

Sýr Niva, Hermelín

Tekuté kultury *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Schizosaccharomyces pombe*

Pracovní postup

1. Pozorování kvasinek pod mikroskopem

a. Na podložní sklo přeneste kapku kultury v bujónu. Překryjte krycím sklem a pozorujte pod mikroskopem (viz úloha 11, nativní preparát). K pozorování použijte přichystané čisté kultury kvasinek. Pozorování zakreslete do protokolu.

2. Izolace kvasinek

a. Nakrájejte ovoce na malé kousky (každý student jiný druh) a vložte je do baňky s YPG (kvasničný extrakt-pepton-glukosa) bujonem. Promíchejte.

b. Misku se Sabouraudovým agarem rozdělte na dvě části. Pomocí vatové tyčinky proveďte stěr z jazyka a inokulujte polovinu agarů. Na druhou polovinu inokulujte pomocí sterilní kličky YPG bujon, který jste připravili v kroku a. Kultivujte při 30°C 2-3 dny.

c. Na hrdlo baňky nasadte balónek. Kultivujte při laboratorní teplotě do příštího cvičení.

d. V následujícím cvičení ze zakaleného bujónu připravte nativní preparát a pozorujte pod mikroskopem (viz bod 1 a úloha 11).

e. Po zhodnocení vzhledu kolonií na Sabouraudově agaru v následujícím cvičení připravte nativní preparát z různě vyhlížejících kolonií a pozorujte pod mikroskopem.

3. Barvení kvasinek – vitální test

- a. Kousek droždí rozpustíte ve sterilní vodě (ve zkumavce). Dobře roztřepete.
- b. Kapku vhodně zředěné suspenze přeneste do kapky metylénové modři v další zkumavce, promíchejte.
- c. Obarvenou kulturu přeneste do Bürkerovy komůrky (viz úloha 6) a počítejte v 10 políčkách mrtvé a živé buňky (viz úloha 11). V případě potřeby suspenzi dále naředíte. Obarvenou kulturu je nutné mikroskopovat ihned, neboť metylénová modř působí na buňky mírně toxicky.

4. Pozorování vláknitých hub rodu *Penicillium*

- a. Sabouraudův agar rozdělte na dvě poloviny. Jednu část inokulujte pomocí vyžíhané kličky kulturou z Nivy (zelený povlak na řezu), druhou část kulturou z Hermelínu (bílý povlak na povrchu). Každou kulturu inokulujte na dvě místa ve formě krátké čáry (1 cm). Po každé inokulaci nezapomeňte vyžít kličku. Kultivujte do příštího cvičení při 25°C.
- b. V následujícím cvičení odeberte vzorek mycelia vykultivovaného z Hermelínu nebo Nivy, přeneste ho do kapky glycerolu na podložním skle a opatrně překryjte krycím sklem. Kulturu neroztírejte a krycí sklo nepřítlačujte, aby nedošlo k poškození. Pozorujte pod mikroskopem nejprve pod nejmenším zvětšením, postupně pod větším.

Vyhodnocení výsledků

1. Zhodnoťte vzhled bujonu v baňce, a zda byl vytvořen plyn. Kapku bujonu mikroskopujte (úloha 2d), pozorování zakreslete do protokolu.
2. Zaznamenejte růst na obou Sabouraudových agarech, popište vzhled kolonií. U kolonií *Penicillia* si všimněte pigmentace vrchní a spodní strany kolonie, zbarvení konidiofor, přítomnosti exudátu (výpotku) a jeho zbarvení. Mikroskopujte různě vyhlížející kolonie (úloha 2e). Mikroskopická pozorování zakreslete do protokolu.
3. Zhodnoťte procento mrtvých buněk v suspenzi kvasnic.
4. Mikroskopické pozorování *Penicillia* zakreslete do protokolu.

Otázky

1. Jak vysvětlíte tvorbu plynu při kultivaci kvasinek?
2. Které mikroorganismy vykultivované na Sabouraudově agaru považujete za bakterie, kvasinky případně vláknité houby? Vysvětlete proč.
3. Jaké druhy rodu *Penicillium* se používají při výrobě Nivy a Hermelínu? (Specifikujte pro jednotlivé sýry).

Úloha 16

Mikroorganismy v půdě

Cíle

1. Prokázat přítomnost bakterií v půdě a určit jejich počet.
2. Prokázat výskyt celulolytických bakterií.
3. Izolovat lipolytické bakterie z půdy.
4. Prokázat přítomnost bakterií rodu *Azotobacter* v půdě.
5. Pozorovat symbiotické bakterie v kořenových hlízkách.

Teoretický úvod

Půda je jedním z přirozených stanovišť mikroorganismů. Mikroorganismy jsou rozhodujícím faktorem při vzniku půdy, ovlivňují půdní strukturu, účastní se rozkladu organické hmoty. Mikroorganismy hrají nezastupitelnou roli při přeměně a koloběhu biologicky důležitých prvků v přírodě. Produkují řadu látek prospěšných pro rostliny (vitamíny, růstové látky), některé fixují vzdušný dusík. Výskyt bakterií v půdě je dán množstvím živin a ostatními faktory prostředí (vlhkost, teplota, kyselost). Některé mikroorganismy se vyskytují v půdě přirozeně, jiné pouze v přítomnosti dostatečného množství živin. Mezi běžnou půdní mikroflóru náleží bakterie rodů *Pseudomonas*, *Serratia*, *Bacillus*, *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Streptomyces* a také řada vláknitých hub (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Fusarium*).

Podstatnou součástí buněčných stěn rostlinných buněk je **celulosa**. Je to velmi odolný, nerozpustný polysacharid. V rostlinném materiálu je obvykle doprovázena dalšími obtížně odbouratelnými látkami, např. hemicelulosami, pektiny, ligniny, tuky a pryskyřicemi. Na rozkladu celulosy se podílí řada mikroorganismů, které ji štěpí exoenzymem celulasou na celobiosu a poté na glukosu. Zastoupení aerobních celulolytických bakterií je ukazatelem úrodnosti půdy. V intenzivně obdělávaných půdách se vyskytují zástupci rodů *Cellvibrio*, *Cellfalcicula*, *Cytophaga*, *Sporocytophaga*, ve středně obdělávaných myxobakterie, ve slabě obdělávaných půdách a v kyselých půdách převládají mikroskopické houby. Celulosa může být rozkládána také za anaerobních podmínek.

Tuky jsou odbourávány na volné mastné kyseliny a glycerol hydrolytickými exoenzymy lipasami. Tuky jsou nejdříve štěpeny na glycerol a mastné kyseliny. Některé bakterie fermentují glycerol, jiné oxidují mastné kyseliny. Tuky jsou v půdě štěpeny především bakteriemi rodu *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, *Serratia* a *Corynebacterium*.

Půdní mikroorganismy se významnou měrou podílejí na **koloběhu dusíku** v přírodě. **Proteiny** jsou proteolyticky hydrolyzovány na aminokyseliny, ze kterých je deaminací uvolňován amoniak, který ve většině půd vytváří amonné ionty (proces **amonifikace**). Ty mohou být přímo využity rostlinami a

bakteriemi na syntézu aminokyselin. Některé půdní bakterie (*Nitrosomonas*, *Nitrobacter*) jsou schopny získávat energii oxidací amonných iontů na dusitany a dusičnany procesem zvaným **nitrifikace**. Dusičnany jsou potom důležitým zdrojem dusíku pro rostliny. **Denitrifikační** bakterie (např. *Pseudomonas*, *Bacillus*) dusičnany redukují na dusitany, oxid dusný a dusík a odstraňují je tak z půdy do ovzduší. Denitrifikace je procesem anaerobní respirace (viz úloha 14), při kterém dusičnany, dusitany a oxidy dusíku slouží jako akceptory elektronů. Atmosférický dusík je vracen do půdy procesem **fixace dusíku**. Dusík je redukován na amoniak enzymovým komplexem nitrogenasou za anaerobních podmínek. Mezi volně žijící bakterie schopné vázat vzdušný dusík patří rody *Azotobacter*, *Clostridium* a některé cyanobakterie (sinice). Mnohé bakterie fixující dusík žijí ve společenství kořenů rostlin (rizosféře). Symbioticky váže dusík např. rod *Rhizobium*. *Azotobacter* se vyskytuje pouze v dobře provzdušňovaných hnojených půdách s neutrální až alkalickou reakcí, má velké nároky na výživu, v kyselých půdách nefixuje dusík. Vytváří pouzdra. *Clostridium* je přísně anaerobní bakterie máselného kvašení. Je tolerantní ke kyselé i zásadité reakci půdy, dobře snáší vysoké nasycení půdy vodou a nižší teploty. Vytváří endospory. *Rhizobium* a příbuzné rody (hlízkové bakterie, rhizobia) se mohou množit v půdě samostatně nebo vytváří symbiotický vztah s kořeny bobovitých rostlin (sója, fazole, hrách, vojtěška, jetel). Jednotlivé druhy rodu *Rhizobium* vykazují vysokou specifitu vůči hostiteli, kterého infikují. Ani bakterie, ani rostlina nejsou za normálních podmínek schopny fixovat dusík. Při kontaktu bakterie s kořenovým vlášením se na rostlině vytvářejí hlízky, které poskytují anaerobní prostředí nutné pro fixaci dusíku. K fixaci dochází pomocí bakteriální nitrogenasy, avšak proces je zcela závislý na zdrojích energie vytvářených rostlinou. Fixace dusíku symbiotickými bakteriemi má značný zemědělský význam, neboť vede k významnému zvýšení vázaného dusíku v půdě a tím k vyšší úrodnosti půdy. K symbiotické fixaci dusíku dochází také u nebobovitých rostlin. Např. aktinomyceta *Frankia* tvoří hlízky na kořenech olše i dalších rostlin. Známá je také symbióza cyanobakterie rodu *Anabaena* s vodní kapradinou *Azolla*.

Materiál

Vzorky půdy proseté přes síto s oky o velikosti 2 mm

Sterilní voda

Sterilní plastová zkumavka (1)

Sterilní mikrobiologická zkumavka (1)

Sterilní mikrozkmavka (1)

Automatické pipety

Sterilní špičky

Sterilní hokejky (3)

Petriho miska s masopeptonovým agarem (2)
Proužky filtračního papíru
Sterilní Petriho misky (3)
Sterilní pinzeta
Stříčka s destilovanou vodou
Kádinky
Masopeptonový agar obsahující 1% tuku (tributylin)
20% roztok CuSO_4
Škrobová moučka
Skleněná tyčinka nebo větší špachtle
70% ethanol
Petriho miska s agarem obsahujícím manitol a kvasničný extrakt (1)
Očkovací klička
Mikroskop
Podložní skla
Imerzní olej
Krystalová violet
Bobovitá rostlina

Pracovní postup

1. Přítomnost a počet mikroorganismů v půdě

- a. 0,5 g zeminy suspendujte v 5 ml sterilní vody ve sterilní plastové zkumavce. Dobře protřepte (5 min) a nechte zeminu klesnout ke dnu (5-10 min).
- b. Přeneste asepticky 0,1 ml extraktu na povrch masopeptonového agaru a rozetřete hokejkou.
- c. Ve sterilní zkumavce nařed'te půdní extrakt (celkový objem alespoň 2 ml) a znovu naočkujte 0,1 ml na další masopeptonový agar.
- d. Kultivujte týden při 25°C.

2. Přítomnost celulolytických bakterií v půdě

- a. Zeminu naplňte do prázdné Petriho misky a mírně stlačte dnem kádinky.
- b. Zeminu rovnoměrně provlhčete vodou, tak aby se nevytvořilo bahno.
- c. Na povrch položte pinzetou proužky filtračního papíru, které jste provlhčili vodou. Pořádně je přitlačte tak, abyste je nepotřísnil zeminou.
- d. Misky kultivujte ve tmě při 25°C 3-7 dnů. Zemina přitom nesmí vyschnout.

3. Izolace lipolytických bakterií

- a. Na médium obsahující tuk (tributylin) očkujte 100 x ředěný půdní extrakt (0,1 ml).
- b. Kultivujte při 25°C do příštího cvičení.
- c. Po ukončení kultivace pozorujte okolí kolonií a potom do misky napipetujte 5 ml 20% CuSO₄, nechejte působit 15 minut a přebytečný roztok slijte.

4. Přítomnost bakterií rodu *Azotobacter* v půdě

- a. Zeminu smíchejte v kádince se stejným objemem škrobové moučky.
- b. Za stálého míchání přidávejte tolik vody, až vznikne velmi hustá pasta.
- c. Touto hmotou naplňte Petriho misku do poloviny výšky. Stlačte dnem kádinky a uhladte povrch vlhkým sklem.
- d. Inkubujte 48 h při 30°C nebo týden při pokojové teplotě.

5. Kultivace a pozorování hlízkových bakterií

- a. Odřízněte hlízku od kořene, pečlivě ji opláchněte vodou a umístěte ji na 1-2 minuty do mikrozkuřavky obsahující 70% ethanol.
- b. Sterilní pinzetou hlízku vyjměte a opláchněte ji sterilní destilovanou vodou. Přemístěte ji do kapky sterilní vody na sterilní Petriho misce a pomocí pinzety hlízku rozdrťte.
- c. Pomocí sterilní kličky naočkujte vytvořený výluh z hlízky křížovým roztěrem na agar s manitolem a kvasničným extraktem. Kultivujte při laboratorní teplotě do příštího cvičení.
- d. Pomocí sterilní kličky připravte z výluhu hlízky fixovaný preparát, který barvíte krystalovou violetí (postupujte stejně jako v případě barvení metylénovou modří, viz úloha 11). Pozorujte pod mikroskopem, pozorování zakreslete.

Vyhodnocení výsledků

Ve všech případech porovnejte výsledky získané s různými zeminami.

1. Stanovte počet kolonií vyrostlých na masopeptonovém agaru a vypočítejte počet mikroorganismů v 1g půdy. Posuďte morfologické vlastnosti jednotlivých kolonií a zaznamenejte. Zhodnoťte výskyt kolonií *Bacillus cereus* (charakteristický mykoidní vzhled, hyfy se obvykle stáčíjí ve směru hodinových ručiček). Jsou přítomny vláknité houby?
2. Pozorujte filtrační papír na zemině. Přítomnost celulolytických bakterií v půdě se projeví oranžovými, hnědými a zelenými skvrnami. Po delší době kultivace se skvrny zvětšují, papír zprůsvitňuje a může i zmizet.
3. Pozorujte růst na misce. V místech, kde byl tuk rozštěpen, dojde k projasnění média, případně je okolo kolonií viditelný precipitát. V přítomnosti CuSO₄ se kolem kolonií objeví zelené zabarvení (reakce Cu²⁺ s mastnými kyselinami).

4. Pozorujte růst na misce. Přítomnost bakterií rodu *Azotobacter* se projeví průhlednými, později světle hnědými slizovitými koloniemi. Na miskách mohou vyrůstat i jiné mikroorganismy, nejčastěji *Clostridium pasteurianum*. Jeho přítomnost se projeví charakteristickým žluklým zápachem.
5. Pozorujte růst na agaru s manitolem a kvasničným extraktem. Kolonie *Rhizobia* se jeví jako téměř bílé, mazlavé. Zhodnoťte případný výskyt jiných bakterií. Jak byste vysvětlili jejich původ? Z vybrané kolonie hlízkových bakterií připravte mikroskopický preparát barvený krystalovou violetí a pozorujte pod mikroskopem. Porovnejte s preparátem připraveným přímo z hlízky. Mikroskopická pozorování zakreslete do protokolu.

Otázky

1. Proč se k testování celulolytických bakterií v půdě používá filtrační papír?
2. Podle jakých strukturních znaků byste mikroskopicky rozlišili rod *Azotobacter* od rodu *Clostridium*?
3. Popište podstatu tvorby hlízek při symbiotickém vztahu rhizobií a rostlin a vysvětlete, proč bakterie izolované přímo z hlízky mají jiný vzhled než bakterie z hlízky kultivované.

Úloha 17

Mikroorganismy v potravinách

Cíle

1. Prokázat přítomnost bakterií v jogurtu.
2. Analyzovat množství bakterií v potravinách.

Teoretický úvod

Mikrobiální fermentace je využívána k výrobě širokého spektra potravin, zejména mléčných výrobků a alkoholických nápojů. Při výrobě mléčných výrobků se využívá přeměny laktosy na kyselinu mléčnou bez využití kyslíku bakteriemi mléčného kvašení. Při výrobě vína se využívá přeměny sacharosy na etanol a oxid uhličitý kvasinkami za anaerobních podmínek. V přítomnosti kyslíku rostou kvasinky aerobně a vytvářejí oxid uhličitý a vodu.

Mléko může být zpracováno fermentačně za přítomnosti různých mikroorganismů. Výsledný produkt je závislý na druhu mléka, podmínkách kultivace a použitém mikroorganismu. Kyseliny a antibiotika vytvářená během fermentace zabraňují růstu nežádoucích mikroorganismů. V současné době se z kravského mléka vyrábějí fermentací např. podmásli, jogurt a kefír. Při výrobě podmásli se využívá činnosti bakterií *Lactococcus lactis* (tvorba kyseliny mléčné) a *Leuconostoc* (tvorba neutrálních diacetylů). Jogurt je mléko, které je zkoncentrováno zahříváním a poté fermentováno za zvýšené teploty. *Streptococcus* vytváří kyselinu mléčnou a *Lactobacillus* chuť a aroma jogurtu. Kefír se vytváří činností bakterií rodu *Lactobacillus* a kvasinek *Saccharomyces*.

Mikrobiální růst v potravinách může vést ke zkažení potravin a může být příčinou různých nemocí. Během zpracování potravin může dojít ke kontaminaci půdními mikroorganismy, mikroorganismy z živočichů, pracovníků manipulujících s potravinami a z přístrojů. Potraviny jsou primárním zdrojem nemocí zažívacího traktu. Z tohoto důvodu je sledován výskyt koliformních bakterií (tyčinkovité nesporulující gramnegativní bakterie fermentující laktosu za tvorby kyseliny a plynu), které obvykle indikují přítomnost fekálního znečištění.

K rutinnímu sledování kvality potravin se používá technika počítání kolonií, kdy se stanoví celkové množství životaschopných bakterií ve vzorku potravin. Přítomnost příliš velkého množství mikroorganismů v potravinách je nežádoucí, protože se zvyšuje pravděpodobnost přítomnosti patogenů a zvyšuje se také možnost zkažení potravin. Nedostatek metody spočívá v tom, že jsou detekovány pouze bakterie schopné růstu v daném živném prostředí. K testování se používá médium, které podporuje růst většiny heterotrofních bakterií.

Materiál

Petriho miska s MRS agarem

Metylénová modř

Podložní skla

Imerzní olej

Mikroskop

Sterilní voda

Tekutý masopeptonový agar vytemperovaný na 45°C (150 ml)

Sterilní Petriho misky (6)

Sterilní plastová zkumavka (1)

Sterilní mikrobiologické zkumavky (2)

Sterilní odměrný válec (10 ml)

Automatické pipety

Sterilní špičky

Jogurt

Vzorek masa

Pracovní postup

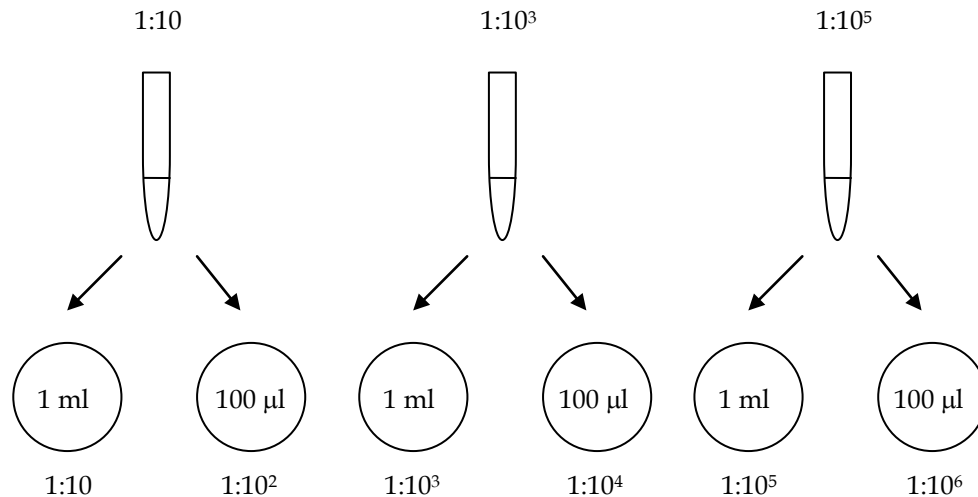
1. Bakteriální kultura v jogurtu.

- a. Sterilní kličkou odeberte vzorek z jogurtu a rozetřete ho křížovým roztěrem na povrch MRS agaru. Kultivujte dnem vzhůru při 30°C 24-48 hodin.
- b. Jogurt rozmíchejte v kapce sterilní vody na podložním skle, zhotovte fixovaný preparát (viz úloha 11). Preparát barvěte metylénovou modří (úloha 11) a pozorujte pod mikroskopem (úloha 11).

2. Základní bakteriologický rozbor mletého masa.

- a. Do sterilní plastové zkumavky navažte 1 g mletého masa (čerstvého nebo ponechaného 24 h v teple, případně několikrát rozmraženého a znovu zmraženého). Při práci ve dvojici zpracuje každý student jiný vzorek.
- b. Přidejte 9 ml sterilní vody a pořádně protřepte (ředění 1:10).
- c. Do sterilních zkumavek připravte vzorky zředěné v poměru 1:10³ a 1:10⁵.
- d. Označte dno 6 sterilních Petriho misek 1:10, 1:10², 1:10³, 1:10⁴, 1:10⁵ a 1:10⁶.
- e. Přeneste asepticky 0,1 ml z ředění 1:10⁵ na misku 1:10⁶ (0,1 ml ředění 1:10⁵ je ve výsledku ředění 1:10⁶ originálního vzorku) a 1 ml na misku 1:10⁵.
- f. Opakujte s ředěním 1:10 a 1:10³ (obrázek 6).

- g.** Vyjměte vytemperovaný agar z inkubátoru a nalijte ho asepticky do misek s napipetovanými vzorky (asi do 1/3). Misky zakryjte a mírně promíchejte krouživým pohybem.
- f.** Po ztuhnutí inkubujte dnem vzhůru při 37°C 24-48 hodin.



Obrázek 6. Ředění vzorku masa.

Vyhodnocení výsledků

1. Pozorujte růst na MRS agaru naočkovaném jogurtem (zaměřte se hlavně na čáry křížového roztěru). Popište vzhled kolonií. Porovnejte výsledky získané z obou jogurtů.
2. Zakreslete mikroskopické pozorování jogurtu do protokolu, popište vzhled pozorovaných mikroorganismů.
3. Vyhodnoťte růst bakterií na agarech s různě ředěnými vzorky masa. Počítejte bakterie na povrchu i uvnitř agaru. Spočítejte množství bakterií v 1 g masa a zhodnoťte, zda se maso hodí ke konzumaci. Přípustná hodnota v mase a masných výrobcích je 10^6 mikroorganismů na 1 g.

Otázky

1. Jak byste ověřili (na základě charakteristických metabolických a fyziologických vlastností), že na MRS agaru byly vykultivovány bakterie mléčného kvašení? Uveďte výsledky testů (+/-).
2. Pokud by se jogurt testoval pomocí Gramova barvení, jaký výsledek by indikoval kontaminaci? Vysvětlete proč.

Úloha 18

Mikroorganismy ve vodě

Cíle

1. Zvládnout techniku membránové filtrace.
2. Demonstrovat využití selektivních a diferenčních živných médií.
3. Seznámit se s principy metod stanovení koliformních bakterií a enterokoků.
4. Stanovit bakterie obecného znečištění vody.
5. Stanovit počet koliformních bakterií ve vzorku pitné vody.
6. Stanovit počet enterokoků ve vzorku pitné vody.

Teoretický úvod

Sladká voda je jedním z přirozených stanovišť bakterií. Jejich množství a druhové zastoupení je závislé na zdrojích výživy a na přítomnosti kyslíku. Ve vodě přítomné bakterie lze zařadit do tří základních skupin. **Autochtonní vodní bakterie** jsou typické vodní bakterie. Řadí se k nim rody *Chromobacterium*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Sphaerotilus*, *Leptothrix*, *Spirillum* a prostékáté bakterie. Obsahuje-li voda větší množství organické hmoty, jsou více zastoupeny také anaerobní a fakultativně anaerobní bakterie (*Clostridium*, *Desulfovibrio*). Splavováním půdy se do vody dostávají **půdní bakterie** (*Bacillus*, *Micrococcus*, *Streptomyces*, *Corynebacterium*, *Arthrobacterium*). Jedná se většinou o aerobní bakterie s mohutnou metabolickou aktivitou, nacházejí se proto ve svrchních vrstvách vody a jejich výskyt je omezen koncentrací živin. Ve vodě se také mohou nacházet **bakterie ze střev zvířat a člověka**, zejména čeleď *Enterobacteriaceae*, zástupci rodu *Streptococcus* a *Clostridium*. Přechodně se ve vodě mohou nacházet patogenní organismy (*Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae*).

Mikrobiologický rozbor vody je spolu s chemickým rozbohem základní složkou komplexního posouzení kvality vod. Při mikrobiologickém rozboru vody se sleduje přítomnost mikroorganismů, které jsou z hygienického hlediska závadné. Vzhledem k tomu, že není možné rutinně testovat přítomnost všech bakterií ve vodě a také není možné testovat výskyt všech patogenních bakterií (velmi malé množství, náročné identifikační techniky), využívají se ke zjištění znečištění vody tzv. **indikátorové skupiny bakterií**. Zjišťuje se přítomnost bakterií indikujících znečištění obecné a fekální.

Při **stanovení indikátorů obecného znečištění** se sledují psychrofilní a mezofilní bakterie. Přítomnost těchto mikroorganismů podává informaci o stavu vodního zdroje a jeho okolí. Přítomnost **psychrofilních bakterií** (optimální teplota růstu 15°C, viz úloha 8) indikuje přítomnost organických

látek rozložitelných bakteriemi při nízkých teplotách. **Mezofilní bakterie** (úloha 8) indikují znečištění mikroflorou teplokrevných živočichů a člověka.

Za **indikátory fekálního znečištění** se považují koliformní bakterie a enterokoky, tedy bakterie vyskytující se ve střevech a tím i ve fekáliích. **Koliformní bakterie** jsou nejdůležitějším faktorem fekálního znečištění vody. Jedná se o bakterie náležející do čeledi *Enterobacteriaceae* (gramnegativní tyčky netvořící spory), které běžně žijí v tlustém střevě. Nejčastějším zástupcem je *Escherichia coli*. Koliformní bakterie vykazují negativní oxidasový test a zkvašují laktosu (viz úlohy 12 a 14). Jejich přítomnost ve vodě je důkazem fekálního znečištění vody a ve vodě se potom mohou vyskytovat i patogenní enterobakterie (*Salmonella*, *Shigella*). V případě podezření na přítomnost těchto patogenů je potřeba potvrdit jejich výskyt speciální metodou stanovení. **Enterokoky** jsou grampozitivní streptokoky, které se vyskytují v zažívacím traktu člověka a živočichů. Oproti koliformním bakteriím jsou odolnější vůči teplotě a dalším fyzikálním a chemickým vlivům okolního prostředí. Jsou považovány za významný indikátor fekálního znečištění, obzvláště v pitných vodách upravovaných desinfekcí. K detekci koliformních bakterií a enterokoků je možno využít řadu selektivních médií.

V České republice jsou požadavky na rozbor pitné dány vyhláškou č. 252/2004 Sb., která byla novelizována vyhláškou č. 187/2005. Tyto vyhlášky mj. stanoví pro některé ukazatele metody rozboru, které jsou dány příslušnými normami. Také uvádí povolené hodnoty počtu bakterií z jednotlivých skupin. Vybrané metody stanovení koliformních bakterií a enterokoků jsou popsány v následujících odstavcích.

Koliformní bakterie v pitné vodě se stanoví membránovou filtrací a kultivací na **laktosovém TTC agaru s heptadecylsulfátem sodným** (Tergitol-7). Tergitol v živném médiu inhibuje růst grampozitivních mikroorganismů a sporulujících gramnegativních bakterií. Gramnegativní mikroorganismy schopné fermentovat laktosu vytvářejí žluté kolonie díky reakci s indikátorem bromthymolovou modří. Gramnegativní mikroorganismy nefermentující laktosu vytvářejí modré kolonie. TTC (trifenyltetrazolium chlorid) slouží jako rychlý indikátor bakteriálního růstu, redukuje se na nerozpustný formazán a vytváří červené až červenofialové kolonie. V přítomnosti laktosy i TTC vytvářejí fermentující mikroorganismy žluté kolonie se žlutými zónami, nefermentující červené s modrými zónami, které se jeví jako fialové. Pozitivní kolonie se z membránového filtru přeočkují na neselektivní agar a po kultivaci se provedou konfirmační testy na cytochrom c oxidasu (-) a tvorbu indolu (+).

Presumptivní fekální enterokoky se stanoví membránovou filtrací a kultivací na **Slanetz-Bartleyho agaru**. Enterokoky (ale i jiné bakterie) redukují tetrazolium chlorid přítomný v médiu na nerozpustný červený formazán, na membránovém filtru se vytvářejí červenohnědé kolonie. Kolonie z membránového filtru je nutné přeočkovat na **žluč-eskulin-azidový agar**, kde enterokoky hydrolyzují eskulin. Produkt reakce eskuletinu reaguje s železitým iontem a tvoří černohnědý komplex. Azid

přítomný v médiu inhibuje růst gramnegativních organismů a žluč inhibuje většinu ostatních grampozitivních organismů.

Přítomnost koliformních bakterií v nedesinfikovaných vodách se stanoví na **Endově agaru**. Ten obsahuje bazický fuchsin a laktosu. Bazický fuchsin potlačuje růst grampozitivních mikroorganismů. Koliformní bakterie fermentující laktosu vytvářejí červenorůžové kolonie, zatímco bakterie nefermentující laktosu jsou bezbarvé nebo slabě růžové.

Metoda membránové filtrace je kvantitativní metodou počítání mikroorganismů, při které se přes filtr s póry o velikosti 0.45 μm prosaje známé množství vzorku. Bakterie jsou zadrženy na povrchu filtru, který se potom umístí na povrch vhodného agarového média. Bakterie zachycené na filtru vytvoří po kultivaci na povrchu filtru kolonie, které je možné spočítat. Pokud se ke kultivaci použije selektivní nebo diferenční médium, je možno stanovit nebo podle vzhledu rozlišit určité skupiny mikroorganismů. Metoda umožňuje stanovení malého množství mikroorganismů ve velkém objemu vzorku.

Materiál

Sterilní odběrová láhev

Automatické pipety

Sterilní špičky (žluté, modré)

Sterilní filtrační zařízení s membránovým filtrem

Sterilní pinzeta

Membránová vývěva

Sterilní odměrný válec 100 ml

Petriho misky s masopeptonovým agarem (4)

Petriho miska se Slanetz-Bartley agarem

Petriho miska s Tergitol-7 agarem

Sterilní hokejky

Otáčecí podložka

Vzorek vody

Pracovní postup

1. Odběr vzorku vody

Odběr vody proveďte do sterilní láhve. Pro rozbor pitné vody (studna, povrchový zdroj, vodovod) odeberte 500 ml. Při odběru z vodovodního kohoutku nechejte vodu nejprve 5 min odtékat.

Odběrovou láhev naplňte asi 2 cm pod okraj. Vzorky zpracujte do 2h po odběru, v případě transportu a uchovávání v lednici maximálně do 24 h.

2. Stanovení počtu bakterií při 22 a 36°C

- a. Připravte si 4 maso-peptonové agary a popište je. Dva budou sloužit ke kultivaci bakterií při 22°C (psychrofilní) a dva pro kultivaci bakterií při 36°C (mezofilní).
- b. Na agary pro kultivaci psychrofilních bakterií asepticky napipetujte 0,1 a 1,0 ml vody přímo z láhve. Rozetřete sterilní hokejkou. Při roztěru otáčejte miskou na otáčecí podložce.
- c. Totéž opakujte s agary pro mezofilní bakterie.
- d. Misky, na které jste pipetovali 1 ml vody, *neobracejte* dnem vzhůru, voda po povrchu agarů stéká. Je nutné nechat vodu vsáknout nebo ji vysušit, proto misky umístěte do laminárního boxu, částečně je otevřete a vysušte.
- e. Inkubujte při výše uvedených teplotách 24 h.

3. Stanovení koliformních bakterií a *E. coli* na TTC agaru s Tergitolem

- a. Na sterilním filtračním zařízení dotáhněte středový kroužek a připojte ho k vypnuté vakuové pumpě.
- b. Odměřte ve sterilním válci 100 ml vody z odběrové láhve.
- c. Odšroubujte víko filtračního zařízení.
- d. Zapněte pumpu a prosajte odměřené množství přes filtr.
- e. Odpojte pumpu od filtračního zařízení, až poté pumpu vypněte.
- f. Opatrně pomocí sterilní pinzety odstraňte filtr z filtračního zařízení a přeneste ho do středu agarů s Tergitolem 7 tak, že ho opatrně pokládáte od okraje. Umístěte filtr na agar ve stejném směru, jako byl při filtraci! Filtr musí k agaru dobře přilnout.
- g. Kultivujte dnem vzhůru při 37°C 24 h.

4. Stanovení presumptivních fekálních enterokoků na Slanetz-Bartley agaru

- a. Postupem uvedeným v bodech 3a-e zfiltrujte 100 ml vody přes membránový filtr.
- b. Filtr přeneste sterilní pinzetou do středu Slanetz-Bartleyho agaru.
- c. Kultivujte dnem vzhůru při 37°C 40-48 h.

Vyhodnocení výsledků

1. Spočítejte množství kolonií na jednotlivých plotnách. Vypočítejte počet bakterií v 1 ml vzorku vody (bez ohledu na pravidlo minimálního počtu kolonií nutného k přesnému hodnocení, neboť zde nelze aplikovat).
2. Spočítejte počet kolonií na membránových filtrech. Věnujte pozornost barvě kolonií. Zhodnoťte množství koliformních bakterií a enterokoků ve 100 ml vody.

3. Na základě hodnot uvedených v tabulce 2 zhodnoťte, zda analyzovaný vzorek splňuje nároky na kvalitu pitné vody. K hodnocení vzorků vody ze zdrojů s malým odběrem (domácí studny) platí vyšší hodnoty.

Tabulka 2. Povolené limity pro jednotlivé skupiny bakterií v pitné vodě.

Parametr	Povolený limit
Počet kolonií při 36°C (mezofilní bakterie)	20 KTJ/ml 100 KTJ/ml u zdrojů s výkonem do 5 m ³ za den
Počet kolonií při 22°C (psychofilní bakterie)	200 KTJ/ml 500 KTJ/ml u zdrojů s výkonem do 5 m ³ za den
Koliformní bakterie, <i>E. coli</i> , enterokoky	0 KTJ/100 ml

Otázky

1. Jsou provedené kultivační testy dostačující k důkazu koliformních bakterií a enterokoků ve vodě? Jak byste ověřili, že na membránových filtrech narostly koliformní bakterie a enterokoky?
2. Bylo by možné využít techniku membránové filtrace (pomocí zařízení použitého v tomto cvičení) k získání sterilního živného bujónu? Pokud ano, jak byste postupovali?
3. Pro analýzu vzorku máte k dispozici Petriho misku s médiem, které obsahuje laktosu, žluč a indikátor pH. Která skupina mikroorganismů bude selektivně obohacena na tomto živném médiu? Které mikroorganismy je možné diferencovat na tomto médiu? Vždy vysvětlete důvod. K zodpovězení otázky využijte informací uvedených v teoretickém úvodu úlohy.

Literatura

1. Johnson T.R., Case C.L. Laboratory Experiments in Microbiology, Seventh Edition. Pearson Education, Inc., San Francisco, USA, 2004.
2. Němec M., Mazal P. Cvičení z mikrobiologie. Rektorát UJEP, Brno, Česká republika, 1989.
3. Jandová B., Kotoučková L. Praktikum z mikrobiologie. Vydavatelství MU, Brno, Česká republika, 1996.
4. Madigan M.T., Martinko J.M. Brock Biology of Microorganisms, Eleventh Edition. Pearson Education, Inc., Upper Saddle River, USA, 2006.
5. Vyhláška č. 187/2005 Sb., kterou se mění vyhláška č. 252/2004 Sb., kterou se stanoví hygienické požadavky na pitnou a teplou vodu a četnost a rozsah kontroly pitné vody.
6. Vyhláška č. 132/2004 Sb., o mikrobiologických požadavcích na potraviny, způsobu jejich kontroly a hodnocení.

Příloha 1

Vzor protokolu

Číslo stránky

Cvičení z mikrobiologie

Tématický okruh 6: Kontrola bakteriálního růstu

Jméno: Jan Novák

Skupina: Biochemie, den dle rozvrhu (např. středa dopoledne)

Datum: datum započetí úlohy

Úloha 10 Fyzikální metody kontroly mikrobiálního růstu: UV záření

Účel: Sledovat vliv ultrafialového záření na růst mikroorganismů

Pracovní postup: Není nutné podrobně vypisovat, je však nutné uvést použitou kulturu, dobu ozáření, materiál použitý k zakrytí misky.

Výsledky: např.

Doba ozáření (s)	Růst na volné polovině	Růst na zakryté polovině
0	Počet kolonií	
10		
20		
60		

Závěr: Zhodnotit vliv UV záření na růst sledovaného mikroorganismu. Nezapomenout porovnat výsledky s kolegou ve dvojici. V tomto případě, jak hodnotíte propustnost různých materiálů pro UV záření.

Odpověď na otázky: Odpovědět na všechny položené otázky. Formulaci otázky do protokolu opsat.

Úloha 11 Chemické metody kontroly mikrobiálního růstu: desinfekční prostředky a antimikrobiální látky

Účel: 1. Zjistit účinnost různých chemických látek jako antimikrobiálních činidel.

2. Stanovit minimální inhibiční koncentraci zředovacím testem.

3. Stanovit citlivost mikroorganismů k antibiotikům.

4. Porovnat citlivost různých bakterií k různým antibiotikům.

Pracovní postup: Zejména nezapomenout popsat přesné postupy ředění, použité bakteriální kultury a sloučeniny.

Výsledky: Zpracovat tabulkovou formou.

Závěr: Zhodnotit účinnost jednotlivých chemických látek dle požadavků ve „Vyhodnocení výsledků“.

Odpověď na otázky: Odpovědět na všechny položené otázky. Formulaci otázky do protokolu opsat.

Příloha 2

Použití laminárního boxu

Laminární box se používá k zajištění vysoké čistoty na pracovní ploše a celém vnitřním prostoru boxu. Obsahuje čistící vzduchotechnický systém, který svým přetlakovým nastavením zabraňuje vstupu nežádoucích částic do pracovního prostoru.

Obsluha:

1. Před započetím práce sterilizujte prostor boxu ultrafialovým zářením (asi 15 minut) zapnutím ultrafialové lampy do zásuvky.
2. Zapněte box do pohotovostního režimu otočením klíčku do polohy I.
3. Za pomoci vyučujícího odstraňte ultrafialovou lampu.
4. Zapněte cirkulaci vzduchu (tlačítko σ) a osvětlení (symbol žárovky). Cirkulaci vzduchu je možné snížit stisknutím tlačítka $\sigma/2$.
5. Po ukončení práce vypněte cirkulaci vzduchu tlačítkem σ (osvětlení se vypne automaticky).
6. Vypněte box otočením klíčku do polohy 0.
7. Vyučující nasadí ultrafialovou lampu. Prostor sterilizujte.
8. Pokud v boxu po kratší dobu nepracujete, nevypínejte cirkulaci vzduchu. Pokud vypnete cirkulaci a nenasadíte UV lampu, může do prostoru vnikat prach a mikroorganismy přítomné ve vzduchu.

Příloha 3

Popis mikroskopu Olympus CX21

(Školní mikroskop Olympus CX21 - Návod k obsluze. Elsyst Engineering, Vyškov, 2003).

