

Mendelova univerzita v Brně
Agronomická fakulta

POTRAVINÁŘSKÁ MIKROBIOLOGIE

návody do cvičení

Ing. Libor Kalhotka, Ph.D.
Ing. Lenka Dostálová
Ing. Lenka Detvanová

**Mendelova univerzita v Brně
Agronomická fakulta**

POTRAVINÁŘSKÁ MIKROBIOLOGIE

návody do cvičení

**Ing. Libor Kalhotka, Ph.D.
Ing. Lenka Dostálová
Ing. Lenka Detvanová**

Brno, 2015



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



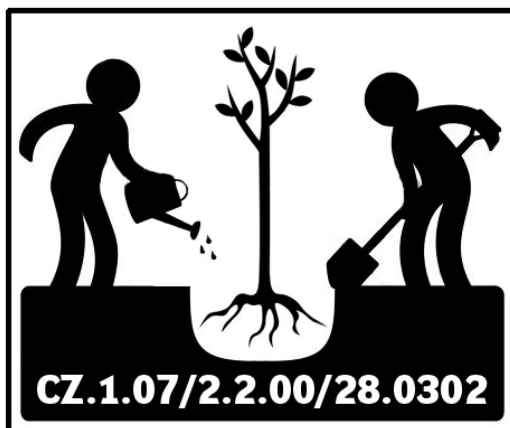
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ



Tato publikace je spolufinancována z Evropského sociálního fondu a státního rozpočtu České republiky.

Byla vydána za podpory projektu OP VK CZ.1.07/2.2.00/28.0302 Inovace studijních programů AF a ZF MENDELU směřující k vytvoření mezioborové integrace.

© Ing. Libor Kalhotka, Ph.D., Ing. Lenka Dostálová, Ing. Lenka Detvanová
2015

ISBN 978-80-7509-259-5

Obsah

1 MIKROSKOP - ZÁKLADNÍ CHARAKTERISTIKY	4
2 MIKROSKOPOVÁNÍ TRVALÝCH PREPARÁTŮ	9
3 MĚŘENÍ MIKROORGANISMŮ	10
4 Příprava a barvení preparátů	13
4.1 Příprava nativního preparátu	13
4.2 Barvení bakterií	13
4.2.1 Pozitivní barvení	13
4.2.2 Negativní barvení	14
4.2.3 Gramovo barvení	15
4.2.4 Barvení dle Möllera	16
5 MORFOLOGIE VLÁKNITÝCH MIKROMYCET - PLÍSNÍ	17
6 STANOVENÍ GENERAČNÍ DOBY	24
7 METABOLISMUS KVASINEK.....	27
8 TVAROVÁ VYROVNANOST KVASINEK	30
9 BARVENÍ KVASINEK	33
10 BARVENÍ BAKTERIÍ MLÉČNÉHO KVAŠENÍ.....	33
11 BOJ PROTI MIKROORGANISMŮM (TEPLOTA, UV ZÁŘENÍ, ANTIBIOTIKA).....	34
12 VLIV VNĚJŠÍCH PODMÍNEK NA AKTIVITU MIKROORGANISMŮ (TEPLOTA, PH, OSMOTICKÝ TLAK).....	37
13 PŮSOBENÍ TĚŽKÝCH KOVŮ, BARVIV A KONZERVANTŮ.....	40
14 VLIV ČIŠTĚNÍ NÁDOB RŮZNÝMI ZPŮSOBY NA MIKROFLÓRU.....	43
15 POVRCHOVÉ STĚRY.....	44
16 MÁSELNÉ KVAŠENÍ	44
17 ANTIMIKROBIÁLNÍ AKTIVITA ÚČINNÝCH LÁTEK Z ROSTLIN.....	45
18 MIKROBIOLOGICKÝ ROZBOR VZORKŮ POTRAVIN.....	46
18.1. Mikrobiologický rozbor koření	51
18.2 Rozbor potravin s nízkou vlhkostí a šťávy z mrkve	54
18.3 Rozbor mléčných výrobků	55
19 MIKROBIOLOGICKÝ ROZBOR VODY	56
20 PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION)	58
21 POUŽITÁ A DOPORUČENÁ LITERATURA.....	61

1 MIKROSKOP - ZÁKLADNÍ CHARAKTERISTIKY

Název mikroskop pochází z řeckého slova mikros - malý a skopein - pozorovat. První použitelný mikroskop byl vynalezen kolem roku 1590 Holanďany Hansem a Zachariásem Jansenovými. Tento mikroskop využíval vyduté i vypouklé čočky a zvětšoval asi 60x. **Anthony van Leeuwenhoek** (1632 - 1723) zkonstruoval jednočočkový mikroskop zvětšující asi 270x. Tímto mikroskopem zkoumal nejrůznější vzorky např. květy, listy, kůži, vlasy, sperma i lidskou krev. Jako první viděl a popsal krevní buňky. Do vývoje mikroskopů zasáhli v 17. století i Galileo Galilei, Christian Huygens a britský geolog Robert Hook, který nejenom že popsal mikroskop, ale doložil svou práci řadou vyobrazení získaných při pozorování pomocí mikroskopu. Tím dokázal, že možnosti mikroskopu jsou s výhodou využitelné ve vědeckém výzkumu i v praxi. Mezi nejvýznamnější vynálezce a vědce v oblasti optiky 19. století patří **Ernst Abbe** (teoretická studie optických principů), **Otto Schott** (výzkum optického skla), **August Köhler** (osvětlení mikroskopů) a **Carl Zeiss**. Poslední jmenovaný stál i u zahájení výroby mikroskopů v roce 1847.

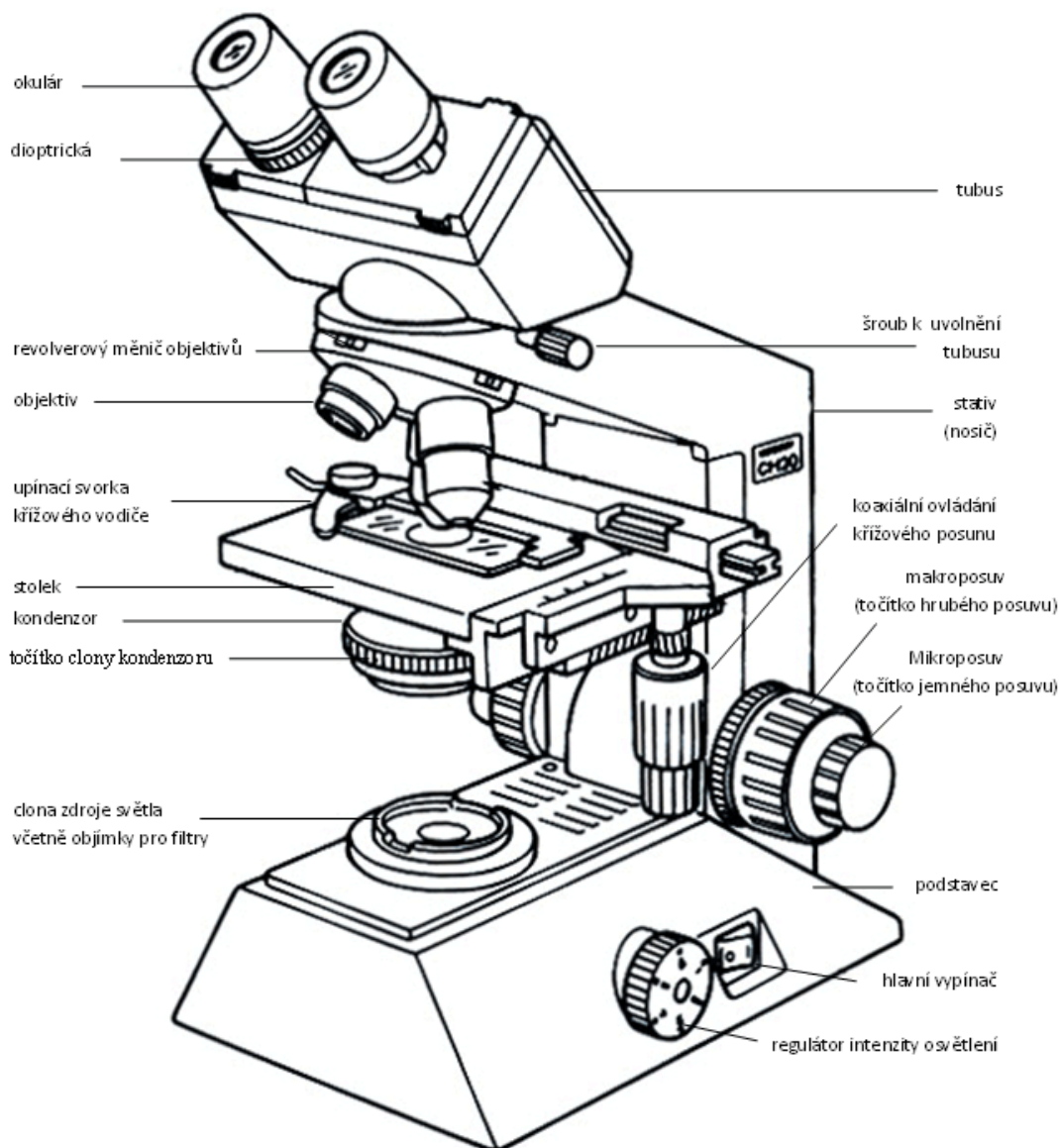
Jednotlivé části (viz Obr. 1) mikroskopu můžeme rozdělit do dvou skupin, na **mechanické části** tvořené stativem s podstavcem, který v podstatě tvoří kostru mikroskopu a nese všechny důležité části, stolkem se svorkami na upnutí preparátu, mikrometrickým a makrometrickým šroubem a **části optické** tvořené okuláry, binokulární hlavicí, objektivy a kondenzorem.

Makrometrický šroub (makrošroub) slouží k hrubému zaostření tak, že přibližujeme nebo vzdalujeme stolek pro uložení preparátu od objektivů.

Mikrometrický šroub (mikrošroub) slouží k jemnému doostření.

Okuláry jsou základním optickým prvkem. Slouží ke zvětšení pozorovaného předmětu, obvykle mají zvětšení 10x. V našem případě jde o **Huygensovy okuláry**. V okuláru je umístěna **kruhová clonka** udávající zornému poli kruhový tvar a částečně eliminuje sférickou vadu a **okulárový mikrometr** pro proměřování preparátů.

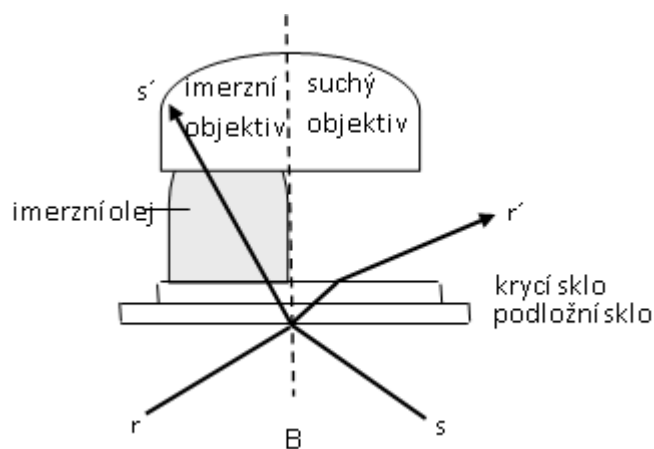
Binokulární hlavice slouží k rozvodu světelných paprsků do okulárů, které jsou na ní umístěny.



Obr 1: Stavba mikroskopu

(http://mmp.vfu.cz/opvk2014/?title=teorie-svetelne_mikroskopy&lang=cz&goonpage=)

Objektivy poskytují skutečný, zvětšený, ale převrácený obraz pozorovaného předmětu. Jsou umístěny na **revolverové hlavici**, jež umožňuje jejich plynulou výměnu. Jsou to optické soustavy složené z několika čoček. Rozlišujeme objektivy tzv. **suché**, kde prostředí mezi preparátem a čočkou tvoří vzduch. Jsou to obvykle objektivy zvětšující 5, 10, 20 a 40x. **Imerzní objektivy** jsou takové, kde prostředí mezi čočkou objektivu a preparátem tvoří imerzní olej, který má téměř stejný lom světla jako sklo. Díky tomu do malé čočky objektivu dopadá více světelných paprsků, které by se jinak při průchodu různým prostředím lámaly (viz Obr. 2). V našem případě jde o objektiv zvětšující 100x.



Obr. 2: Lom světelných paprsků

(http://mmp.vfu.cz/opvk2014/?title=teorie-svetelne_mikroskopy&lang=cz&goonpage=)

Kondenzor je umístěn pod stolem pro upnutí preparátu. Je složen z několika spojných čoček uložených v pouzdru, které soustřeďují paprsky v podobě kužele na preparát. Kondenzor je opatřen **irisovou clonou**, která reguluje množství světla přicházejícího ze zdroje do kondenzoru.

Celkové zvětšení mikroskopu (CZM)

Je to zvětšení, jehož jsme schopni dosáhnout při dané sestavě optiky mikroskopu. Lze jej vypočítat pro každý objektiv.

Vypočítáme ho podle vzorce:

$$\text{CZM} = \text{zvětšení okuláru} \times \text{zvětšení binokulární hlavice} \times \text{zvětšení objektivu}$$

objektiv	okulár	binok. hlavice	celkové zvětšení

Maximální užitečné zvětšení (MUZ)

Je to ideální zvětšení pro pozorování objektů v mikroskopu pro daný objektiv. Může se lišit od celkového zvětšení.

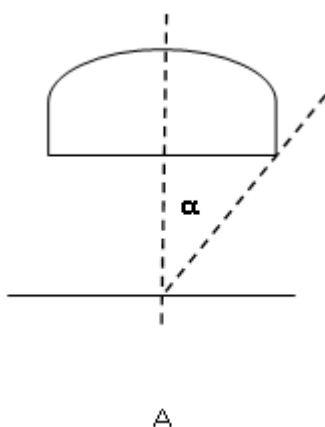
Vypočteme podle vzorce: $MUZ = 1000 \times A$

kde A je numerická apertura.

Numerická apertura (A) (apertura = otvor) je dána vzorcem:

$$A = n \times \sin \frac{\alpha}{2}$$

kde n = index lomu prostředí mezi objektivem a preparátem, α (alfa) = úhel svíraný optickou osou mikroskopu a pláštěm kužele, v němž se nacházejí paprsky, které z daného místa preparátu mohou vstoupit do objektivu a podílet se na zobrazení (Obr. 3). Na numerické apertuře je závislá světelnost a rozlišovací schopnost objektivu. Čím více zvětšující objektiv, tím větší je i A . Numerická apertura je jedna ze základních charakteristik objektivu a její hodnota je na objektivu uvedena.



Obr. 3: Polovina otvorového úhlu

(http://mmp.vfu.cz/opvk2014/?title=teorie-svetelne_mikroskopy&lang=cz&goonpage=)

objektiv	numerická apertura A	maximální užitečné zvětšení

Nejmenší rozlišitelná struktura

Jde o vlastnost objektivů rozlišit dva od sebe nepatrně vzdálené body ještě jako dva samostatné body.

Vypočte se podle vzorce: $R = \frac{\lambda}{A}$ [μm]

kde A = numerická apertura, λ (lambda) = vlnová délka použitého světla.

Čím větší je numerická apertura a čím kratší je vlnová délka, tím je lepší rozlišení (tj. menší minimální vzdálenost mezi dvěma body).

objektiv	numerická apertura A	$\lambda = 0,75 \mu\text{m}$ červené	$\lambda = 0,55 \mu\text{m}$ žlutozelené	$\lambda = 0,45 \mu\text{m}$ modrozelené

Úkoly:

1. Vypočtete základní charakteristiky mikroskopu: celkové zvětšení, maximální užitečné zvětšení a nejmenší rozlišitelnost struktur.
2. Navrhněte úpravu mikroskopu tak, abyste u celkového zvětšení pro objektiv zvětšující 100x dosáhli ideálního maximálního užitečného zvětšení.
3. Při které vlnové délce dosáhneme pro objektiv zvětšující 100x nejlepší rozlišitelnosti struktur.

2 MIKROSKOPOVÁNÍ TRVALÝCH PREPARÁTŮ

Trvalé preparáty jsou připraveny ze zafixovaných kultur bakterií, které jsou obarveny gentianovou violetí a překryty pryskyřicí (kanadským balzámem), do kterého je vtlačeno krycí sklíčko. Takové preparáty při šetrném zacházení vydrží mnoho let.

Postup:

Stolkem pro upnutí preparátu sjedeme pomocí makrošroubu co nejnižše. Do svorek upneme preparát a při pohledu z boku se pomocí makrošroubu přiblížíme co nejbližše k čočce objektivu (pokud to jde tak až na dotyk). Potom se již můžeme podívat do okulárů a vzdalováním se od objektivu pomocí makrošroubu nahrubo zaostříme. Jemné doostření provedeme pomocí mikrošroubu. Při pozorování objektivem zvětšujícím 100x je nutno na krycí sklíčko nanést kapku imerzního oleje a vytvořit spojitě prostředí mezi preparátem a čočkou objektivu tak, že do oleje objektiv zanoříme. Při tomto zvětšení provedeme zakreslení preparátu a to buď jako celé zorné pole nebo kruhovou výseč. Uvedeme název mikroorganismu a zvětšení.

Úkoly:

Zmikroskopujte a zakreslete předložené trvalé preparáty.

3 MĚŘENÍ MIKROORGANISMŮ

Buňky měříme **okulárovým mikrometrem**. Jeho stupnice se musí proměřit pro každé zvětšení **objektivovým mikrometrem**, aby se stanovila relativní hodnota dílku okulárového mikrometru.

Objektivový mikrometr je podložní sklíčko se stupnicí uprostřed vodícího obrazce (kruh nebo čtverec). Stupnice je rozdělena na dílky, z nichž každý má hodnotu 10 μm .

Hodnota dílku okulárového mikrometru

Při zjišťování hodnoty dílku okulárového mikrometru postupuje se tak, že se stupnice obou mikrometrů seřídí v zorném poli rovnoběžně vedle sebe a počátky se ztotožní, aby se mohlo zjistit, kolik dílků objektivového mikrometru odpovídá dílkům okulárového mikrometru. Odpovídající dílky se musí přesně krýt. Vybereme kryjící se dílky (lépe některé další než první případ) a odečteme jejich počet. Hodnotu dílku okulárového mikrometru vypočteme podle vzorce:

$$H = \frac{\text{dílky objektivové}}{\text{dílky okulárové}} \times 10 \quad [\mu\text{m}]$$

objektiv	dílek okulárového mikrometru [μm]

Výpočet plochy zorného pole

Pro některé výpočty potřebujeme znát plochu zorného pole. V tomto případě použijeme objektivový mikrometr. Po zaostření stupnice nastavíme počáteční dílek na levý okraj zorného pole a odečteme, kolik dílků činí průměr zorného pole. Hodnotu v dílcích vynásobíme hodnotou dílku (10 μm). Z průměru vypočteme poloměr a dosadíme do vzorce: $\pi \times r^2$ pro výpočet plochy kruhu. Plochu je potřeba vypočítat pro jednotlivé objektivy.

objektiv	prumer zorného pole [μm]	plocha zorného pole [μm^2]

Měření bakterií

Vlastní měření provádíme již pouze okulárovým mikrometrem, jímž lze spolu s okulárem otáčet. Zjištěné hodnoty (délky a šířky) v počtech dílků pak vynásobíme zjištěnou hodnotou dílku pro příslušný objektiv.

č.	tyčinka		kok
	počet dílků okulárového mikrometru		
	délka	šířka	šířka
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
průměr			
velikost v μm			

Některé orientační hodnoty

1. Objem jedné průměrné buňky v μm^3

kok (koule):

tyčinka (válec):

2. Povrch jedné průměrné buňky v μm^2

kok (koule):

tyčinka (válec):

3. Počet buněk v cm^3 (30 % meziprostory)

kok (koule):

tyčinka (válec):

4. Povrch buněk bakterií v objemu 1 ml (v cm^3)

kok (koule): = hodnota počtu buněk v cm^3 x hodnota povrchu jedné průměrné buňky

tyčinka (válec): = hodnota počtu buněk v cm^3 x hodnota povrchu jedné průměrné buňky

5. Počet buněk bakterií, které se vejdou na plochu 1 cm^2 (30 % meziprostory)

kok (koule):

tyčinka (válec):

Úkoly:

1. Zjistěte hodnotu velikosti dílku okulárového mikrometru pro jednotlivá zvětšení.
2. Vypočtěte plochu zorného pole.
3. Proveďte proměření velikosti mikroorganismů při maximálním zvětšení.
4. Na základě zjištěných hodnot uveďte, jaký tvar je pro mikroorganismus vhodnější z hlediska příjmu živin a osídlení prostředí.

4 Příprava a barvení preparátů

Pro pozorování mikroorganismů zhotovujeme různé preparáty, jejichž příprava a použití jsou dány sledovaným cílem pozorování. Životní projevy mikroorganismů sledujeme v **nativních preparátech**, morfologii sledujeme v preparátech, ve kterých jsou mikroorganismy usmrceny a vhodně obarveny.

4.1 Příprava nativního preparátu

Bakterie i jiné mikroorganismy pozorujeme v jejich přirozeném tekutém prostředí (kapka vody, tekuté živné půdy). K demonstraci je vhodný senný nálev připravený 48 – 72 h inkubací sena ve vodě při laboratorní teplotě.

Postup:

Kapku roztoku přeneseme na čisté podložní sklíčko a překryjeme krycím sklíčkem. Pozorujeme objektivem zvětšujícím 40x. Lze pozorovat různé formy pohybu a jiné životní projevy mikroorganismů.

4.2 Barvení bakterií

K barvení bakterií lze použít různé postupy, z nichž některé slouží pouze k lepší pozorovatelnosti buněk pod mikroskopem a jinými je zjišťována morfologická stavba bakteriální buňky. Do první skupiny patří **pozitivní a negativní barvení**, do druhé například barvení **Gramovo a Möllerovo**.

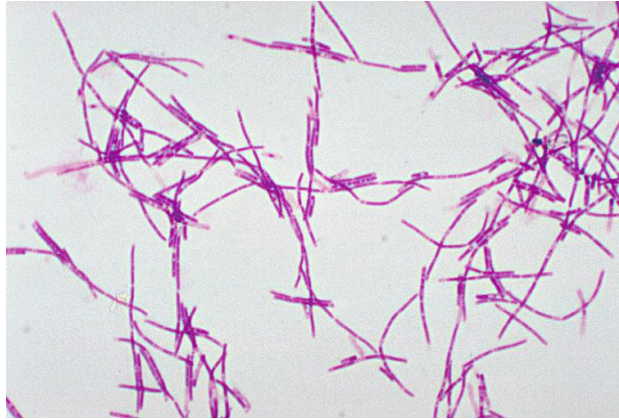
4.2.1 Pozitivní barvení

Při pozitivním barvení dochází k obarvení bakteriálních buněk genciánovou violetí, prostředí zůstává nezbarveno.

Postup:

Nejprve vysterilizujeme podložní sklíčko – otřeme je ethanolem a opálíme v plameni. Na sterilní podložní sklíčko kápneme kapku destilované vody, do které přeneseme mikroorganismus vyžihanou a vychladlou bakteriologickou kličkou. Pomocí bakteriologické kličky suspenzi rozetřeme po co největším povrchu sklíčka a necháme přirozeně zaschnout.

Preparát po zaschnutí zafixujeme (2x – 3x sklíčko s preparátem protáhneme nesvítivým plamenem). Na zafixovaný preparát nanese se genciánovou violet' a necháme ji působit po dobu 30 sekund. Violet' smyjeme pod mírným proudem vody, preparát necháme oschnout a pozorujeme jej objektivem zvětšujícím 100x pod imerzním olejem. Pozitivní barvení je znázorněno na Obr. 4.



Obr. 4: Pozitivní barvení (<http://textbookofbacteriology.net>)

4.2.2 Negativní barvení

Při negativním barvení dochází k obarvení prostředí nigrosinem, buňky zůstávají nezbarveny.

Postup:

Na sterilní podložní sklíčko kápneme kapku destilované vody, do které přeneseme vyžíhanou a vychladlou bakteriologickou kličkou mikroorganismus. Do této suspenze kápneme malou kapku nigrosinu a směs roztáhneme po povrchu sklíčka druhým podložním sklem. Necháme přirozeně zaschnout a pozorujeme objektivem zvětšujícím 100x pod imerzním olejem. Negativní preparát je znázorněn na Obr. 5.



Obr. 5: Negativní barvení (<https://homepages.wmich.edu/>)

4.2.3 Gramovo barvení

Pomocí Gramova barvení rozlišujeme dvě skupiny bakterií – grampozitivní (G^+) a gramnegativní (G^-). Toto rozdělení je založeno na rozdílné stavbě buněčné stěny bakterií.

Postup:

Na sterilní podložní sklíčko kápne kapku destilované vody. Vyžíhanou a vychladlou bakteriologickou kličkou přeneseme do vody mikroorganismus (G^+), kličku znovu vyžeháme a přeneseme druhého mikroba (G^-). Suspenzi kličkou promícháme, rozetřeme po co největší ploše sklíčka a necháme přirozeně zaschnout. Po zaschnutí zafixujeme. Fixovaný preparát obarvíme krystalovou violetí – dochází k obarvení peptidoglykanu G^+ bakterií a lipopolysacharidu G^- bakterií, po 30 sekundách ji necháme stéct (neoplachujeme), místa obarvená violetí překryjeme Lugolovým roztokem, necháme ho působit 30 sekund a smyjeme ethanolem. V tomto kroku dochází k vymytí lipopolysacharidové membrány G^- bakterií společně s navázaným barvivem. Nyní preparát obarvíme safraninem (30 s) – dojde k obarvení peptidoglykanu G^- bakterií, opláchneme mírným proudem vody a necháme přirozeně uschnout. Pozorujeme objektivem zvětšujícím 100x pod imerzním olejem. Grampozitivní bakterie jsou zbarveny do fialova, gramnegativní do růžova až červena. Gramovo barvení je zobrazeno na Obr. 6.



Obr. 6: Gramovo barvení (<http://dc396.4shared.com/>)

4.2.4 Barvení dle Möllera

Toto barvení slouží k diferenciaci spor rodů *Bacillus* a *Clostridium*. Vegetativní buňky jsou zbarveny modře, spory červeně.

Postup:

Fixovaný preparát ponoříme na 2 minuty do chloroformu – dochází k odstranění tukových látek. Preparát osušíme, kápneme na něj kyselinu chromovou, která uvolňuje stěnu spory a ta se tak stává propustnější pro barvivo. Po 2 minutách kyselinu opláchneme mírným proudem vody a preparát osušíme. Překryjeme karbolfuchsinem a zahříváme 2-3 minuty do výstupu par. Na preparát nanese 5% kyselinu sírovou a necháme ji působit několik vteřin. Opláchneme, nanese methylenovou modř, po 4 - 6 minutách ji opláchneme, preparát osušíme a pozorujeme objektivem zvětšujícím 100x pod imerzním olejem. Preparát obarvený dle Möllera je na Obr. 7.



Obr. 7: Möllerovo barvení (www.flickr.com)

Úkoly:

1. Připravte nativní preparát a pozorujte v něm pohyb bakterií. Zakreslete obrázek nativního preparátu.
2. Připravte, pozorujte a zakreslete barvené preparáty.

5 MORFOLOGIE VLÁKNITÝCH MIKROMYCET - PLÍSNÍ

Vláknité mikromycety (plísňe) jsou mikroorganismy s eukaryotickou buňkou patřící mezi houby. Jejich základní stavební jednotkou je **vlákno – hyfa**, jejichž soubor se označuje jako **mycelium**. Hyfy můžeme rozdělit na jednobuněčné (přehrádkované, septované) a vícebuněčné (nepřehrádkované, neseptované), mycelium pak na povrchové (vzdušné) a substrátové.

Na substrátu dojde k uchycení spory a k jejímu vyklíčení. Nejprve dochází k růstu substrátového mycelia, později se vytváří vzdušné mycelium – hyfy s fruktifikačními útvary, které nesou spory, pomocí nichž se plíseň rozmnožuje. Plíseň se rozmnožují pohlavně nebo nepohlavně. **Pohlavní rozmnožování** je méně časté, dochází ke splynutí dvou pohlavních buněk a vznikají pohlavní spory – askospory či zygospor. Častěji se plíseň rozmnožují **nepohlavně**, a to buď fragmenty mycelia, kdy dochází k odlomení části mycelia, které dál roste, nebo pomocí nepohlavních spor.

Nepohlavní spory můžeme rozdělit na endo- a exospory. **Endospory** vznikají ve fruktifikačním útvaru – ve sporangiu a nazývají se sporangiospory. Sporangium je umístěno na sporangioforu. **Exospory** nevznikají uvnitř fruktifikačního útvaru. Vznikají odškrcováním = konidie, rozpadem = oidie, pučením = blastospory z koncových částí speciálních vláken vzdušného mycelia.

Obecně plíseň rozlišujeme dle významu na žádoucí a nežádoucí. Kulturní plíseň se využívají pro produkci organických kyselin, antibiotik, nebo enzymů. Některé druhy se používají při výrobě potravin – sýrů (s plísní v těstě – niva, roquefort; s plísní na povrchu - camembert) nebo salámů (uherský salám). V Japonsku se některé druhy rodu *Rhizopus* používají k výrobě fermentovaných alkoholických nápojů. Negativně působí plíseň při kažení potravin, některé druhy produkují mykotoxiny. Mykotoxiny jsou sekundární metabolity plísní, které mohou poškodit lidské zdraví. Mohou být karcinogenní, mutagenní, teratogenní, neurotoxické, hepatotoxické, nefrotoxické, genotoxické, imunotoxické. Jejich toxicita může být akutní nebo chronická. Nejvíce toxické jsou ochratoxin A, aflatoxiny, dalšími příklady jsou patulin, fumonisin, zearalenon, nivalenol, deoxynivalenol a mnoho dalších.

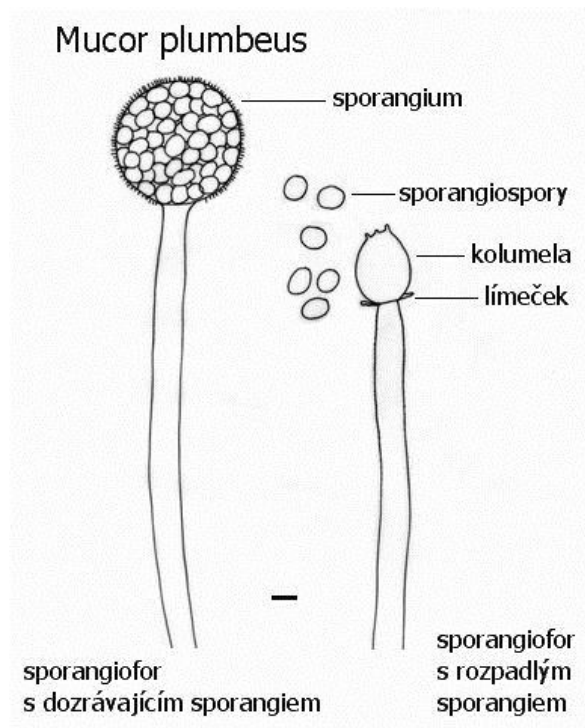
Technicky významné plíseň můžeme zařadit do tří skupin: třída *Ascomycetes* (houby vřeckaté), třída *Zygomycetes* (houby spájivé), a *Deuteromycetes* (houby nedokonalé)

Třída Zygomycetes

Rozmnožují se pohlavně zygosporami, nepohlavně endosporami. Vytváří jednobuněčné mycelium, jsou to jednodušší plísně, které mají velký význam v potravinářství. Nejrozsáhlejším rodem je *Mucor*.

Rod *Mucor*

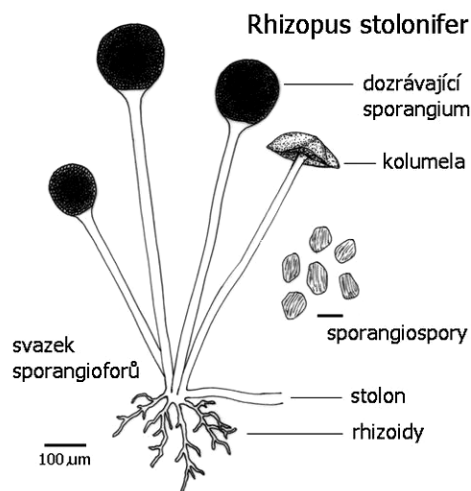
Tvoří na různých potravinách, jako je chleba, zelenina, maso, máslo nebo ovoce, většinou bělavý porost. Některé druhy mají proteolytické enzymy – výskyt v mléčných výrobcích. Některé druhy produkují mykotoxiny, některé jsou patogenní. Vlákna – sporangiofory jsou ukončena kolumelou, na které je plodnička (sporangium) se sporangiosporami. Zástupci: *Mucor plumbeus* (Obr. 8), *M. javanicus*, *M. rouxii*



Obr. 8: *Mucor plumbeus* – náčrt sporangioforu (Kubátová-Miniatlas mikroorganismů)

Rod *Rhizopus*

Působí kažení ovoce i jiných potravin. Některé druhy tvoří mykotoxiny, některé jsou také patogenní. Tvoří dlouhá vlákna, až 1 cm, sporangiofory vyrůstají po 2 až 3 ze stolonu v místech, kde vznikají rhizoidy (= nepravé kořínky). Konec sporangioforu je ukončen kolumelou, na níž je plodnička (sporangium) nesoucí sporangiospory. Zástupci: *Rhizopus nigricans* (Obr. 9), *R. delemar*, *R. japonicus*



Obr. 9: Stavba *Rhizopus stolonifer* (Kubátová-Miniatlas mikroorganismů)

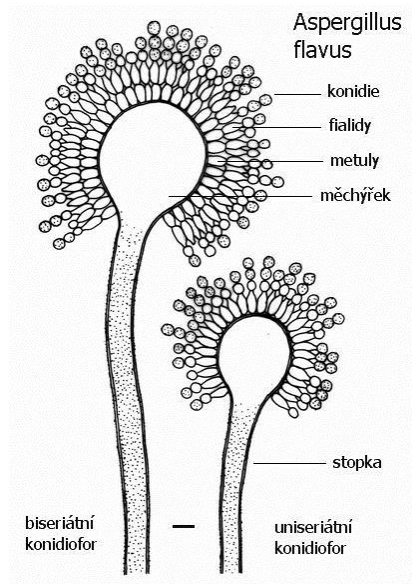
Třída *Ascomycetes*

Rozmnožují se pohlavně askosporami, nepohlavně konidiemi. Zástupci této třídy jsou rody např. *Aspergillus* a *Penicillium*.

Rod *Aspergillus*

Jde o rod vyskytující se na nejrůznějším materiálu, neboť je velmi bohatě vybaven enzymy (amylolytickými, proteolytickými a pektolytickými). Některé druhy jsou vhodné pro průmyslovou přípravu enzymů nebo organických kyselin. Mycelium rodu *Aspergillus* je vícebuněčné, z lůžka (měchýřku) na konci konidioforu vyrůstají metuly (větve), které se větví ve fialidy – v případě biseriálního konidioforu. V případě uniseriálního konidioforu vyrůstají fialidy přímo z lůžka. Z fialid se odškrucují konidie, které mohou být kulaté, oválné, různě

zbarvené. Mycelium je většinou bezbarvé. Zástupci: *Aspergillus flavus* (Obr. 10), *A. niger*, *A. clavatus*



Obr. 10: *Aspergillus flavus* – nákres konidioforu (Kubátová-Miniatlas mikroorganismů)

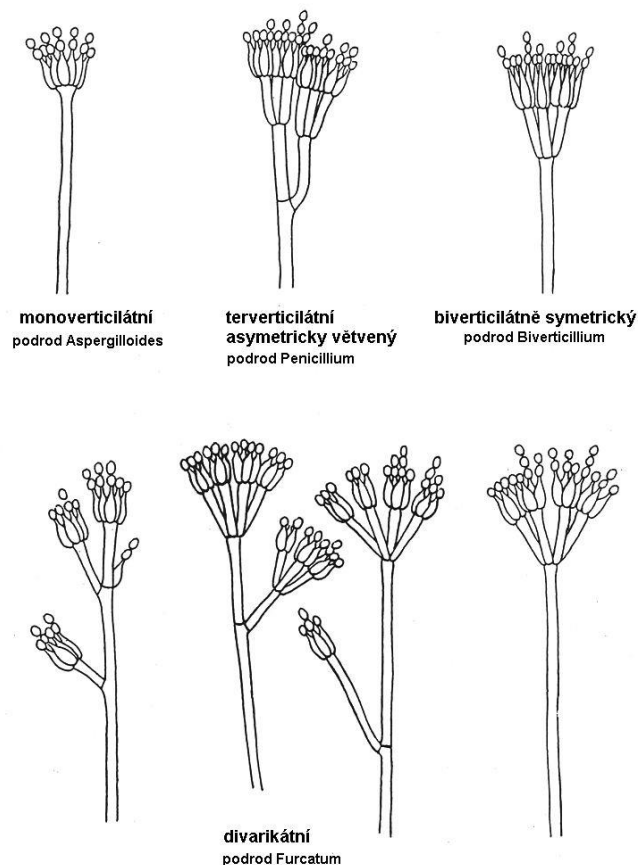
Rod *Penicillium*

Je nejrozšířenějším a nejrozsáhlejším rodem, obsahuje asi 250 druhů. Jeho druhy tvoří kolonie s velkým množstvím žlutozelených až modrozelených konidií, které jsou na různých potravinách i jiném materiálu patrné jako zelené, sametové až moučné povlaky. Okraje kolonií, na nichž nejsou spory, jsou bílé. Kází ovoce a zeleninu, produkuje mykotoxiny (kyselina cyklopiazonová, ochratoxin A, patulin), organické kyseliny (glukonová, citronová), antibiotika (penicilin)

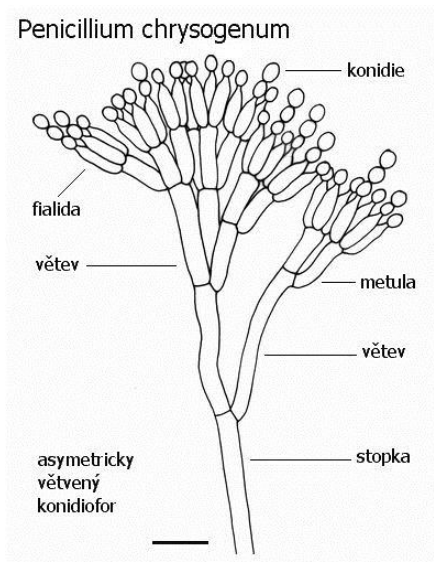
Podle uspořádání štětečkovitých konidioforů se rozdělují následujících skupin (starší dělení): **I. Monoverticillata** – konidiofor je ukončen jedním svazkem fialid, jsou málo rozšířené (*P. frequentans*). **II. Biverticillata** – mezi konidiofor a fialidy se vmezeřují metuly. **B. symetrica** – konidiofor je symetricky ukončen uspořádaným svazkem metul, z každé vyrůstá svazek fialid, z nich se odškrcují konidie (*P. waksmanii*). **III. Asymetrica** – štětičky jsou nesymetricky uspořádané (metuly vyrůstají z různých míst konidioforu (*P. chrysogenum*)). **IV. Polyverticillata** – konidiofor je ukončen bohatým, opakovaně větveným symetricky uspořádaným štětečkem.

Základní taxonomické schema rodu *Penicillium* je následující: říše - *Fungi*, oddělení – *Ascomycota*, řád – *Eurotiales*, čeleď – *Trichocomaceae*, anamorfní rod – *Penicillium*, 4 podrody – *Aspergilloides*, *Biverticillium*, *Furcatum* a *Penicillium*.

Každý podrod má specifickou stavbu konidioforů (Obr. 11). Podrod *Aspergilloides* má **monovertilátní konidiofor** Příkladem je *P. glabratum* nebo *P. spinulosum*. Podrod *Biverticillium* má **biverticilátně** větvený symetrický konidiofor. Příkladem jsou např. *P. purpurogenum* a *P. islandicum*. Podrod *Furcatum* vytváří 2 typy biverticilátních konidioforů. *P. citrinum*, *P. canescens* aj. Podrod *Penicillium* zahrnuje asymetricky větvené terverticilátní druhy. Řadíme sem druhy často se vyskytující v potravinách a krmivech a významné producenty mykotoxinů, např. *P. expansum*, *P. aurantiogriseum*, *P. italicum*, *P. digitatum*, *P. camemberti*, *P. roqueforti* (Obr. 12), *P. verrucosum*.



Obr. 11: Typy konidioforů u rodu *Penicillium* (Kubátová, 2006)



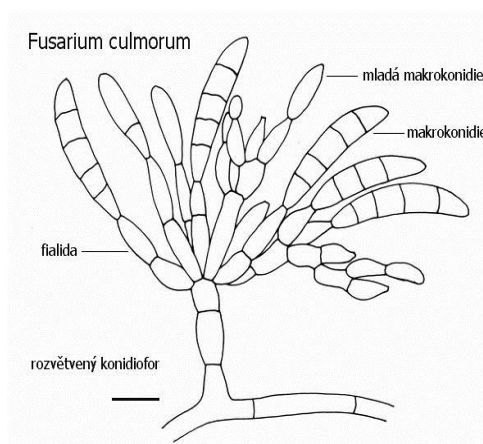
Obr. 12: *Penicillium chrysogenum* – nákras konidioforu (Kubátová-Miniatlas mikroorganismů)

Deuteromycetes

Pohlavní rozmnožování není známo, nepohlavně se rozmnožují exosporami. Tvoří vícebuněčné mycelium. Exospory mohou být jednobuněčné (mikrokonidie) nebo vícebuněčné (makrokonidie). Nejdůležitějšími zástupci jsou rody *Fusarium* a *Alternaria*.

Rod *Fusarium*

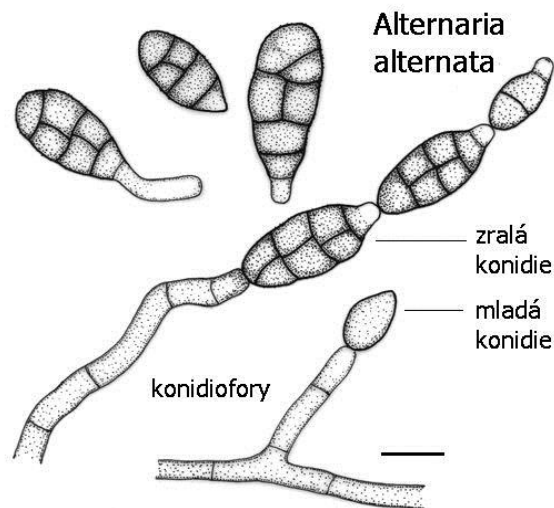
Způsobuje kažení jablek, rajčat, brambor, některé druhy způsobují onemocnění rostlin. Rozmnožuje se pomocí mikro- i makrokonidií, které jsou srpkovitého tvaru. Zástupci: *Fusarium culmorum* (Obr. 13), *F. moniliforme*, *F. solani*



Obr. 13: Stavba *Fusarium culmorum* – nákras konidioforu (Kubátová-Miniatlas mikroorganismů)

Rod *Alternaria*

Vyskytuje se na rostlinách, jako vzdušná kontaminace v mlékárnách, sklepích a na stěnách pivovarských místností. Způsobuje skvrnitost košťálovin a černou hnilobu mrkve. Tmavá pigmentace ji chrání před slunečním zářením. Makrospory mají příčné i podélné přepážky a tvoří se v řetízcích. Zástupci: *Alternaria alternata* (Obr. 14), *A. brassicicola*, *A. japonica*



Obr. 14: *Alternaria alternata* – nákres konidioforu (Kubátová-Miniatlas mikroorganismů)

Mikroskopování mikromycet

Postup:

Na sterilní sklíčko kápneme kapku laktofenolu (hydrofóbní vlákna mikromycet jsou špatně smáčivá ve vodě) a do ní přeneseme preparačními jehlami otřenými ethanolem část mycelia z Petriho misky. Pozor – snadno může dojít k poškození mycelia, může být odebráno příliš velké množství mycelia, což vede k tmavé, špatně pozorovatelné změti vláken pod mikroskopem, může dojít také k odebrání agaru, preparát je pak nepozorovatelný. Překryjeme krycím sklíčkem a pozorujeme objektivem zvětšujícím 10 – 20x (celkový pohled) a 20 – 40x (detail).

Úkol:

Připravte preparáty z předložených kultur plísní. Při obou zvětšeních preparát zakreslete, při pozorování detailu změřte šířku hyfy a šířku spory (případně makrokonidie).

6 STANOVENÍ GENERAČNÍ DOBY

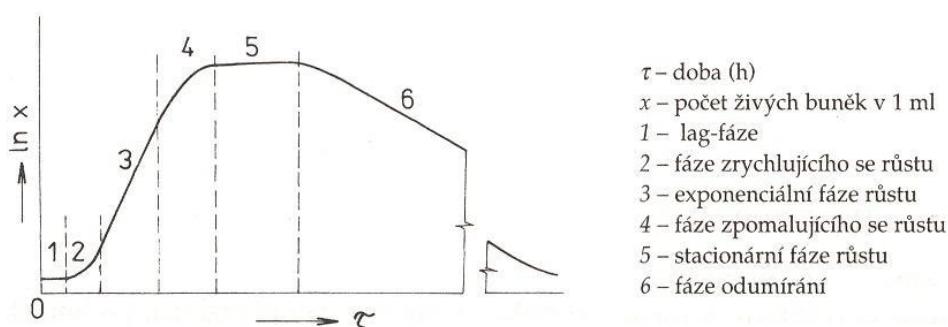
Kvasinky jsou většinou jednobuněčné eukaryotické mikroorganismy patřící mezi houby. Některé druhy mohou tvořit tzv. pseudomycelium, některé tvoří pravé mycelium. Kvasinky jsou fakultativně anaerobní, na prostředí, ve kterém se nachází, závisí pak jejich tvar. Buňky kvasinek rostoucích v anaerobních podmínkách, tedy bez přístupu vzduchu, jsou kulovité, v aerobních podmínkách, za přístupu vzduchu, je jejich tvar spíše protáhlý. Rozmnožování kvasinek probíhá buď pohlavně, nebo nepohlavně. Pohlavní rozmnožování je méně časté, děje se tak pomocí askospor nebo exospor, častěji se kvasinky množí nepohlavně – pučením, nebo dělením. Svůj název získaly díky své schopnosti zkvašovat mono- a některé disacharidy za tvorby ethanolu a CO₂.

Nejvýznamnější kvasinkou v potravinářském průmyslu je rod *Saccharomyces*. Druhy této kvasinky jsou schopny zkvašovat několik cukrů najednou, nezakvašují však laktosu. Tvoří většinou krátce elipsoidní, vejčité nebo protáhlé buňky. Nejdůležitější je druh *S. cerevisiae* – uplatňuje se jako pekařská, lihovarská, vinařská a svrchní pivovarská kvasinka. Zkvašuje glukosu, sacharosu, maltosu, galaktosu a částečně nebo úplně trisacharid rafinosu. U kmenů, které se používají v pekařském a pivovarnickém průmyslu, se vyžaduje vyrovnanost tvaru a velikosti buněk a stálost jejich technologických vlastností.

Mezi nežádoucí kvasinky, které kontaminují potraviny a potravinové suroviny patří například rod *Candida*, *Pichia* nebo *Hansenula*. Rody *Pichia* a *Hansenula* jsou označovány jako křísotvorné, kontaminují pivo nebo víno, na jehož povrchu tvoří kříš. Jejich působením dochází také k nežádoucím senzorickým změnám. Některé druhy rodu *Candida* mohou být pro člověka patogenní, například *C. albicans*, která způsobuje kandidózy. Nepatogenní druhy rodu *Candida* se mohou vyskytovat jako kontaminace pekařského droždí.

Stanovení generační doby kvasinek

Generační doba je časový úsek, za který se zdvojnásobí počet kvasinek v kultuře – vytvoří se nová generace. Délka generační doby je závislá na tom, v jaké růstové fázi se kvasinky nachází. Růst mikroorganismů v uzavřeném prostředí lze charakterizovat **růstovou křivkou** (Obr. 15), která má několik fází.



Obr. 15: Růstová křivka mikroorganismů (Šilhánková, 2002)

Z obrázku je patrné, že v exponenciální fázi je růst mikroorganismů nejrychlejší, to znamená, že generační doba je nejkratší. V optimálních podmínkách se pohybuje okolo 30 minut. Výpočet pro její stanovení je následující:

$$T[\text{min}] = \frac{t \cdot \log 2}{\log x - \log x_0} \quad , \text{ kde:}$$

- T – generační doba v minutách
- t – úsek mezi 1. a 2. počítáním
- x_0 – počet buněk při 1. počítání
- x – počet buněk při 2. Počítání

Z hodnoty generační doby můžeme stanovit počet generací za dobu t:

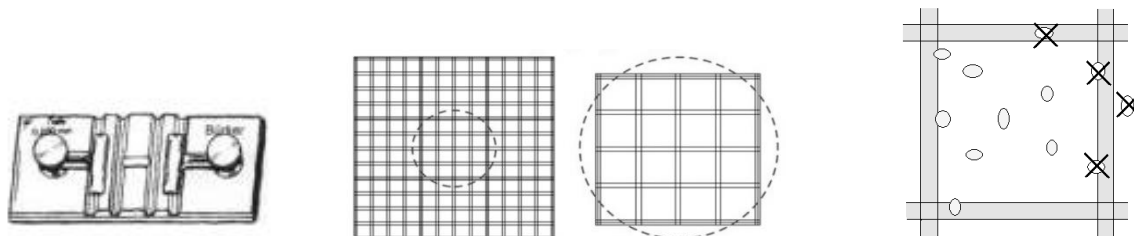
$$n = \frac{t}{T} \quad , \text{ kde:}$$

- n – počet generací
- t – úsek mezi 1. a 2. Počítáním
- T – generační doba v minutách

Postup:

Nejprve si připravíme suspenzi, ve které budeme počet buněk zjišťovat. Do prázdné zkumavky napipetujeme 1 ml kultury kvasinek ve sladinkovém médiu (200 ml)

z Erlenmayerovy baňky, přidáme 1 ml destilované vody a důkladně promícháme. Pro počítání buněk použijeme Bürkerovu komůrku (Obr. 16) – silnější podložní sklíčko s vyrytými dvěma mřížkami vybavené dvěma svorkami pro uchycení krycího sklíčka.



Obr. 16: Bürkerova komůrka

(<http://www.dispolab.sk/>, <http://www.e-mikroskopy.pl/>)

Na Bürkerově komůrce jsou vyryty dvě počítací mřížky. Každá z nich je rozdělena třemi čarami na devět velkých čtvercových polí, jejichž strana měří 1 mm. Tato pole jsou tvořena středními čtverci o ploše $1/25 \text{ mm}^2$ a v jejich rozích jsou malé čtverce s plochou $1/400 \text{ mm}^2$. Po stranách středních čtverců jsou obdélníky, jejichž plocha se rovná čtyřem malým čtvercům, tedy $1/100 \text{ mm}^2$. Přikrytím ploch s mřížkami krycím sklem vzniká prostor na počítání buněk vysoký 0,1 mm.

Při práci s Bürkerovou komůrkou využíváme tzv. Bürkerovo pravidlo:

- Zvolíme dvě sousední strany obdélníku (čtverce) např. horní a pravou. Spočteme všechny buňky, které na těchto stranách leží, nebo se jich dotýkají zevnitř i zveně.
- Buňky, které se dotýkají nebo leží na dolní a levé straně se nepočítají.
- Buňka, která leží na pravé a současně na dolní čáře a ta, která leží na horní a současně levé čáře se nepočítá

Pravidlo lze snadno zdůvodnit představou o sousedních čtvercích a požadavkem, aby se žádná buňka nepočítala dvakrát.

Nejprve tedy uchytíme do svorek krycí sklíčko, k němu přiložíme z vrchní a ze spodní strany pipetu s připravenou suspenzí, která se tak pod krycí sklíčko nasaje. Zaznamenáme čas prvního počítání. Bürkerovu komůrku umístíme na stolek mikroskopu jako preparát a použijeme objektiv o zvětšení 20x.

Ve čtverci počítáme všechny buňky, které jsou zcela uvnitř a nedotýkají se obvodu pole, a buňky, které se dotýkají zvolených dvou stran obvodu. Ty, které se dotýkají zbývajících dvou stran obvodu pole, nepočítáme, byť by byla větší část buňky uvnitř. Kvasinka pučící je počítána jako jedna, pokud je dceřiná buňka menší než mateřská, jako dvě pokud jsou stejně

velké. Spočítáme počet buněk v různých deseti čtvercích, z nichž vypočítáme průměr a získáme tak počet buněk v jednom průměrném čtverci. Získáme tak hodnotu x_0 . Po 30 minutách od začátku prvního počítání si připravíme novou suspenzi kvasinek do prázdné zkumavky a opět spočítáme počet kvasinek v 10 čtvercích. Získáme hodnotu x . Při výpočtu generační doby je nutno zohlednit zředění suspenze před počítáním. Zředovací faktor při smísení 1 ml původní suspenze a 1 ml destilované vody je 2. (Při větším zředění se faktor zvyšuje – 1 ml suspenze + 2 ml vody → faktor zředění = 3, atd.).

Úkol:

Vypočítejte průměrnou generační dobu kvasinek.

7 METABOLISMUS KVASINEK

A. Stanovení produkce ethanolu

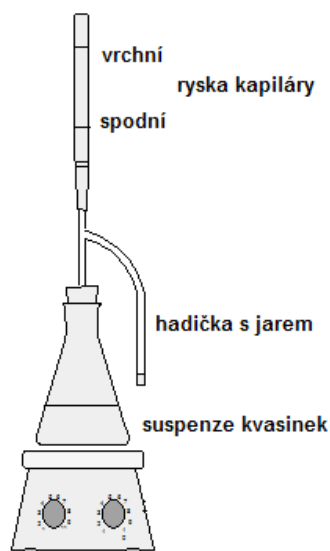
Kvasinky zkvašují sacharidy za produkce ethanolu a oxidu uhličitého:



Rozkladem glukosy tedy vzniká po dvou molekulách ethanolu, oxidu uhličitého a energie ve formě ATP. Díky stejnému množství vyprodukovaného ethanolu a CO_2 lze objem CO_2 převést na objem ethanolu, který kvasinky vyprodukovaly.

Postup:

Pro stanovení produkce CO_2 použijeme kapiláru a mýdlovou bublinku (Obr. 17). Erlenmayerovu baňku s kvasničnou suspenzí utěsníme gumovou zátkou, kterou prochází hadička do kapiláry. Opakovaně mačkáme hadičku s jarem, až získáme bublinku, která doputuje ke kapiláře. Uvolňovaný CO_2 nese bublinku vzhůru kapilárou. Měříme čas, za který se bublinka dostane od spodní k vrchní rysce kapiláry. Tento čas změříme 5x a zprůměrujeme. Na kapiláře je uveden objem úseku mezi dvěma ryskami (v ml), který bublinka překoná za změřený čas.



Obr. 17: Sestava pro měření objemu vyprodukovaného CO₂

Čas průtoku CO₂ kapilárou v sekundách

Měření	1	2	3	4	5	Průměr
čas						

Objem kapiláry = _____ ml

a1. Po jedné minutě bylo vyprodukováno _____ ml CO₂

a2. Objem CO₂ přepočítaný pomocí konstanty zohledňující tlak a teplotu = $a_1 \cdot K$
 _____ ml CO₂

a3. Produkce CO₂ za 60 minut _____ ml CO₂

a4. 1 mmol CO₂ = 22,41 ml CO₂

x mmol CO₂ = a₃ ml CO₂

Za 60 min bylo vytvořeno _____ mmol CO₂.

a5. a₄ mmol CO₂ = a₄ mmol EtOH

(Z rovnice vyplývá, že molární množství CO₂ se rovná molárnímu množství EtOH)

a₆. Objem 1 mmol EtOH = 58,2 μl

a₄. mmol EtOH = x μl EtOH

Za 60 minut bylo vytvořeno _____ μl EtOH.

B. Stanovení počtu kvasinek, které zjištěné množství ethanolu vyprodukovaly

b₁. Průměrný počet buněk v jednom čtverci (hodnota x₀) = _____

b₂. Počet buněk v 1 ml = b₁ · 250 · 1000 = _____

b₃. Počet buněk v celém objemu kultivační tekutiny = b₂ · objem kultivační tekutiny (200 ml) · zředění (pokud nebylo zohledněno již dříve) = _____

b₄. Za 60 minut b₃ kvasinek vyprodukovalo a₆ μl EtOH
10⁹ kvasinek vyprodukovalo x μl EtOH

Za 60 minut vyprodukovalo 10⁹ kvasinek _____ μl ethanolu.

C. Množství zkvašené glukosy a energie získané kvasinkami

c₁. 1 mol glukosy = 2 mol EtOH
x mmol glukosy = a₄ mmol EtOH

Na tvorbu a₄ mmol ethanolu bylo spotřebováno _____ mmol glukosy.

c₂. 1 mmol glukosy = 180 mg
c₁ mmol glukosy = x mg

Za 60 minut bylo zkvašeno celkem _____ mg glukosy.

c₃. a₄ mmol EtOH = a₄ mmol ATP (zkvašením glukosy vzniká ekvimolární množství EtOH a ATP)

c4. $1 \text{ mmol ATP} = 0,0309 \text{ J / mmol}$

$c_3 \text{ mmol ATP} = x \text{ J / mmol}$

Populace kvasinek získala _____ J chemicky vázané energie.

D. Získaná energie a syntéza mikrobiální biomasy

$1 \text{ mmol ATP} = 10,5 \text{ mg sušiny buněk}$

$c_3 \text{ mmol ATP} = x \text{ mg sušiny buněk}$

(Počet gramů sušiny buněk vytvořených na 1 mol ATP se rovná 10,5 g – tzv. výnosový koeficient Y_{ATP} .)

Energie získaná při kvašení za daných podmínek a při přepočtu na 60 minut umožnila syntetizovat _____ mg sušiny nové živé hmoty kvasinek.

Úkol:

Vypočítejte průměrnou generační dobu a produkci ethanolu u kvasinek.

Kvasinka	Generační doba	μl ethanolu vyprodukovaného 10^9 kvasinek
průměr		

8 TVAROVÁ VYROVNANOST KVASINEK

Jak již bylo zmíněno, pro technologické využití kvasinek je velmi důležitá vyrovnanost tvaru a velikosti buněk, aby bylo dosaženo optimálního výsledku výrobního procesu. Tvarová vyrovnanost se zjišťuje měřením buněk a následným statistickým vyhodnocením.

Postup:

Z kultury kvasinek ve sladinkovém médiu odpipetujeme 1 ml do prázdné zkumavky. Přidáme 1 ml 0,01% methylenové modře, obsah zkumavky důkladně promícháme a necháme chvíli působit. Přídavkem methylenové modře rozlišíme mrtvé a živé buňky – buněčná stěna mrtvých buněk je pro barvivo propustná, zbarví se tedy do modra, buněčná stěna živých buněk barvivo nepropouští a tyto tedy zůstávají bezbarvé. Můžeme tak stanovit procento živých a mrtvých buněk v kultuře. Připravenou suspenzi kvasinek kápneme na vysterilizované podložní sklo, přikryjeme krycím sklíčkem a pozorujeme objektivem se zvětšením 20x nebo 40x. Změříme délku a šířku dvaceti živých buněk a hodnoty zaznamenáme do tabulky a dále s nimi pracujeme podle následujících výpočtů.

Vyrovnanost buněk se posuzuje korelačním koeficientem mezi naměřenými délkami a šířkami buněk. K výpočtu korelačního koeficientu je třeba stanovit součet hodnot veličiny x (délky), jejich kvadrátů, součet hodnot veličiny y (šířky) a jejich kvadrátů a nakonec součet součinů x a y. Pomocí takto zjištěných hodnot vypočteme hodnotu výběrového korelačního koeficientu. Významnost zjištěné hodnoty korelačního koeficientu se testuje pro n-2 stupňů volnosti.

Buňka	Délka		Šířka		$x_i \cdot y_i$
	x_i	x_i^2	y_i	y_i^2	
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					
12					
13					
14					
15					
16					
17					
18					
19					
20					
	Σx_i	Σx_i^2	Σy_i	Σy_i^2	$\Sigma x_i y_i$

$$1. \quad Sx_i'^2 = Sx_i - \frac{(Sx_i)^2}{n}$$

$$2. \quad Sy_i'^2 = Sy_i - \frac{(Sy_i)^2}{n}$$

$$3. \quad Sx_i'y_i' = Sx_i y_i - \frac{Sx_i \cdot Sy_i}{n}$$

$$4. \quad \sqrt{Sx_i'^2 \cdot Sy_i'^2}$$

$$5. \quad r = \frac{Sx_i'y_i'}{\sqrt{Sx_i'^2 \cdot Sy_i'^2}}$$

Hodnoty korelačních koeficientů se pohybují v rozmezí 0 až ±1. Čím je vyrovnanost buněk větší, tím se vypočtená hodnota r více přibližuje +1. Nevyrovnanost buněk vzniká jako následek nepříznivých faktorů, degenerace kultury, kontaminace a podobně. Hladiny významnosti se vyhledají v tabulce pro p 0,01 a p 0,05 a n-2 stupňů volnosti.

Hodnoty významnosti p 0,01 a p 0,05		
n - 2	Pravděpodobnost p	
	0,05	0,01
8	0,6319	0,7646
13	0,5139	0,6411
18	0,4438	0,5614
23	0,3809	0,4869
28	0,3494	0,4487
38	0,3044	0,3932
48	0,2732	0,3541

Úkol:

Zjistěte tvarovou vyrovnanost kvasinek.

9 BARVENÍ KVASINEK

Vitální barvení

Ze suspenze kvasinek odpipetujeme 1 ml do prázdné zkumavky, přidáme 1 ml 0,01% methylenové modře, promícháme a chvíli necháme působit. Mrtvé buňky se barví modře.

Barvení vakuol

K suspenzi kvasinek přidáme kapku neutrální červeně. Přikryjeme krycím sklíčkem a pozorujeme. Neutrální červeně je internalizována vakuolami a ty se barví červeně.

Důkaz glykogenu v buňkách

Hustou suspenzi rozetřeme po podložním skle, necháme mírně zaschnout a přelijeme kapkou Lugolova roztoku. Přikryjeme krycím sklíčkem. Části buňky obsahující glykogen se barví hnědě, bílkoviny žlutě.

Úkol:

Proveďte barvení kvasinek a zakreslete pozorování.

10 BARVENÍ BAKTERIÍ MLÉČNÉHO KVAŠENÍ

Bakterie mléčného kvašení (BMK) používáme ve formě čistých mlékařských kultur pro výrobu fermentovaných mléčných výrobků – jogurtu, keфіru, sýrů a podobně. Používají se také jako startovací kultury při výrobě fermentovaných salámů a při výrobě kysaného zelí. Pro obarvení BMK v mléčných výrobcích použijeme karbolfuchsin, ve šťávě z kysaného zelí gentianovou violet.

Postup:

BMK v mléčných výrobcích – na vysterilizované podložní sklíčko kápeme kapku destilované vody, vyžítanou a vychladlou bakteriologickou kličkou do ní přeneseme malé množství mléčného výrobku, rozmícháme a rozetřeme po co největší ploše sklíčka. Necháme přirozeně zaschnout a zafixujeme.

Barvení methylenovou modří: Fixovaný preparát obarvíme 0,1% methylenovou modří a necháme působit nejlépe 5 minut. Smyjeme pod proudem vody, necháme oschnout, pozorujeme objektivem zvětšujícím 100x pod imerzním olejem.

Barvení karbolfuchsinem: Fixovaný preparát ponoříme na 1 až 2 minuty do směsi ethanol:ether (1:1) – dojde k odmaštění. Po oschnutí přebarvíme karbolfuchsinem, který necháme působit 3 až 5 minut. Smyjeme pod proudem vody, necháme oschnout, pozorujeme objektivem zvětšujícím 100x pod imerzním olejem.

Barvení gentianovou violetí: BMK ve šťávě z kysaného zelí – na vysterilizované sklíčko kápneme kapku šťávy z kysaného zelí, rozetřeme po co největším povrchu skla a necháme přirozeně zaschnout. Poté nanese gentianovou violet, kterou necháme několik sekund působit. Omyjeme pod proudem vody a pozorujeme objektivem zvětšujícím 100x pod imerzním olejem.

Úkol:

Proved'te přípravu barevných preparátů. Pozorování zakreslete.

11 BOJ PROTI MIKROORGANISMŮM (TEPLOTA, UV ZÁŘENÍ, ANTIBIOTIKA)

V boji proti mikroorganismům lze využívat různých metod fyzikálních, chemických, fyzikálně-chemických, biologických. Experimentálně bude ověřeno působení teploty, ultrafialového záření a antibiotik na vybrané druhy mikroorganismů.

Smrtící účinek teploty

Pět zkumavek označíme jako T_5 , T_{10} , T_{15} , T_{20} a T_{25} . Do každé zkumavky odpipetujeme sterilní pipetou 2 ml fyziologického roztoku s mikroorganismem. Zkumavku zakryjme alobalem a označíme. Všechny zkumavky vložíme do vodní lázně vytemperované na 85 °C. Zkumavku s číslem T_5 budeme zahřívat 5 minut, T_{10} deset minut atd. Popíšeme 6 Petriho misek s nalitým sterilním agarem značkou t_0 , t_5 , t_{10} , t_{15} , t_{20} , t_{25} . Do Petriho misky t_5 napipetujeme 0,1 ml ze zkumavky T_5 , do Petriho misky t_{10} napipetujeme 0,1 ml ze zkumavky T_{10} , atd. Při pipetování ale postupujeme opačně od zkumavky T_{25} , tedy z místa, kde

předpokládáme nejmenší koncentraci mikroorganismů směrem ke kontrole, kde je mikroorganismů nejméně. Tak budeme pro očkování potřebovat jen jednu sterilní pipetu.

Inokulum rozetřeme po povrchu Petriho misky vyžíhanou skleněnou hokejkou. Miska s označením t_0 bude sloužit jako kontrola a pipetujeme do ní 0,1 ml původního fyziologického roztoku s mikroorganismem (který **NEBYL V LÁZNI**).

Smrtící účinek UV záření

Vezmeme si 5 Petriho misek a označíme Z_0 , Z_8 , Z_{16} , Z_{32} , Z_{64} . 10 ml fyziologického roztoku s mikroorganismem napipetujeme do Petriho misky o průměru 15 cm. Potom velkou Petriho misku s 10 ml vezmeme a ozáříme UV prvních 8 sekund. Po ozáření z misky odpipetujeme 0,1 ml fyziologického roztoku na misku označenou Z_8 a rozetřeme po povrchu agaru vyžíhanou skleněnou hokejkou. Následně budeme velkou Petriho misku ozařovat dalších 8 s, po ozáření opět odebereme 0,1 ml roztoku do misky Z_{16} (dohromady je doba ozáření 16 s). Pak budeme velkou Petriho misku s roztokem ozařovat 16 sekund a na konec 32 s (aby součet časů ozáření byl 64 s). Na pipetování použijeme vždy novou sterilní pipetu a na roztírání vždy ožíhanou skleněnou hokejku.

Testování citlivosti na antibiotika

Petriho misku s nalitým MPA agarem otočíme dnem vzhůru a na dno fixkou napíšeme čísla 1 až 6 (čísla 1 až 5 po obvodu asi 1,5 cm od okraje misky a číslo 6 doprostřed misky) a k číslu si vytvoříte legendu pro příslušná antibiotika. Na misku napipetujeme sterilní pipetou 0,5 ml **bujónové** (tmavé) **kultury**, kterou rozetřeme po povrchu živné půdy sterilní skleněnou hokejkou a necháme vsáknout. Na příslušná čísla podle legendy klademe terčky napuštěné antibiotiky.

Petriho misky se založenými experimenty budeme inkubovat při laboratorní teplotě do příštího cvičení.

Vyhodnocení:

Na Petriho miskách odečteme narostlé kolonie bakterií a přepočteme je na %. Zjištěné hodnoty vepíšeme do příslušných tabulek. U testování antibiotik změříme průměr vytvořených inhibičních zón. Následně odpovíme na zadané otázky.

Teplota

Doba pasterace [min.]	0	5	10	15	20	25
počet kolonií						
% přežití	100					
ostatní druhy bakterií						

UV záření

Doba expozice [s]	0	6	18	32	64
počet kolonií					
% přežití	100				
ostatní druhy bakterií					

Antibiotika

Antibiotika	Název bakterie							
	Název		Název		Název		Název	
	Průměr zóny (mm)	účinek	Průměr zóny (mm)	účinek	Průměr zóny (mm)	účinek	Průměr zóny (mm)	účinek

Legenda hodnocení citlivosti na antibiotika:

++ silný účinek - velmi citlivý MO k ATB (průměr inhibiční zóny nad 12 mm),

+ slabý účinek - průměr zóny 9 -12 mm,

- neúčinkuje.

Otázky pro závěrečné hodnocení:

1. Jsou za daných podmínek rozdíly v přežití mezi sporulujícími a nesporeujícími druhy?
2. Jaký je pro všechny nesporeující druhy minimální čas smrtící teploty?
3. Čím je způsobeno přežití sporulujících druhů?
4. Který ze zkoušených druhů je za daných podmínek nejcitlivější a který nejméně k UV?
5. Při jaké délce expozice UV za daných podmínek jsou všechny vyšetřované druhy usmrceny?
6. Které z použitých antibiotik má s ohledem na zkoušené druhy nejširší spektrum účinku?
7. Který druh bakterií je na zkoušený soubor antibiotik nejméně citlivý, který je nejcitlivější?
8. Které antibiotikum, resp. jaká nejjednodušší kombinace by umožnila úplnou inhibici všech zkoušených druhů bakterií?

12 VLIV VNĚJŠÍCH PODMÍNEK NA AKTIVITU MIKROORGANISMŮ (TEPLOTA, PH, OSMOTICKÝ TLAK)

Na mikroorganismy působí nejrůznější faktory prostředí. Jde o faktory fyzikální jako je teplota, tlak, aktivita vody. Faktory chemické jako pH. Faktory biologické tedy vzájemné vztahy mezi mikroorganismy a mezi mikroorganismy a makroorganismy. V následujících experimentech bude zkoumán vliv pH, koncentrace soli a teploty kultivace na vybrané mikroorganismy.

Na každém stole jsou stojánky s 13 zkumavkami obsahujícími sterilní peptonovou vodu, ke které přidáme různé chemikálie dle návodu a příslušný testovaný mikroorganismus.

Vliv pH

Prvních pět zkumavek si označíme jako A – E. V tabulce jsou uvedena množství chemikálií, jejichž přidáním do peptonové vody vytvoříme v příslušné zkumavce odpovídající pH.

Příklad: Na vytvoření pH 4,0 do zkumavky A přidáme 1,92 ml 0,2M Na₂HPO₄ a 3,08 ml 0,1M kyseliny citronové a kapku mikroba. Obsah ve zkumavce dobře promícháme.

0,2M Na ₂ HPO ₄ [ml]	0,1M kys. citronová [ml]	pH	označení zkumavky
1,92	3,08	4,0	A
2,34	2,66	4,6	B
2,58	2,42	5,0	C
3,16	1,84	6,0	D
4,12	0,88	7,0	E

Vliv teploty kultivace

Tři zkumavky označíme T₂₃, T₃₀ a T₄₀ a upravíme podmínky tak, aby pH prostředí bylo 7,0 (3 x zkumavka E z předešlého úkolu). Obsah ve zkumavce dobře promícháme.

Vliv koncentrace soli (NaCl)

Posledních pět zkumavek označíme jako čísla 1 - 5. Budeme v nich vytvářet prostředí s různou koncentrací soli a to tak, že do příslušné zkumavky napipetujeme určité množství sterilní destilované vody a roztoku NaCl. Postupujeme podobně jako v prvním případě. Na vytvoření 11 % koncentrace NaCl ve zkumavce číslo 1 přidáme 5,0 ml NaCl a 0 ml vody. Obsah ve zkumavce dobře promícháme.

NaCl [ml]	H ₂ O [ml]	% NaCl	označení zkumavky
5,0	0,0	11	1
4,1	0,9	9	2
2,7	2,3	6	3
1,3	3,7	3	4
0,45	4,55	1	5

Do takto připravených 13 zkumavek s různým prostředím sterilní pipetou vpravíme 1 kapku bujónové kultury testovaného mikroorganismu a obsah ve zkumavce dobře promícháme. Zkumavky pro testování vlivu teploty umístíme do příslušných termostátů s nastavenou teplotou a zkumavky pro testování vlivu pH a koncentrace soli budeme inkubovat při laboratorní teplotě.

Vyhodnocení:

Mikroorganismy ve zkumavkách rozkládají pepton a využívají ho jako zdroj živin. Při tom se uvolňuje amoniak. Množství uvolněného amoniaku je úměrné pomnožení mikroorganismu a jeho aktivitě.

Zkumavky zkontrolujeme, jestli nebyly kontaminovány plísněmi. Kontaminované zkumavky vyloučíme z hodnocení. Obsah zkumavek důkladně promícháme. Do čisté zkumavky odpipetujeme 1 ml vzorku, přidáme 8,7 ml destilované vody a 0,3 ml Nesslerova činidla. Obsah zkumavek důkladně promícháme. Nesslerovo činidlo reakcí s amoniakem, který vznikl rozkladem peptonu, poskytuje žlutohnědé zbarvení. Po cca 5 minutách, kdy probíhá barevná reakce, porovnáme zkumavky s barevnými standardy. Ke zkumavce ve které proběhla barevná reakce, vyhledáme standard s nejbližší nižší intenzitou zbarvení. Obě zkumavky umístíme nad bílý podklad a z pokusné zkumavky odebíráme tekutinu tak dlouho, až se při pohledu zhora na hladinu tekutiny srovná její zbarvení se zbarvením standardu. Pak změříme výšku sloupce tekutiny ve standardu a v pokusné zkumavce v mm. Obsah amoniaku v μg se vypočte podle vzorce:

$$K_2 = \frac{d_1}{d_2} \times K_1$$

Kde: K_2 – obsah amoniaku v pokusné zkumavce,

K_1 – obsah amoniaku v pokusné zkumavce,

d_1 – výška sloupce standardního roztoku,

d_2 – výška sloupce pokusného roztoku.

Vypočtené hodnoty vepíšeme do tabulky a porovnáme s hodnotami pro ostatní mikroorganismy. Dále vytvoříme grafy pro jednotlivé testované faktory (pro pH, teplotu, NaCl), do nichž zaneseme hodnoty pro všechny testované mikroorganismy. V závěru odpovíme na položené otázky.

	Množství N-NH ₄ v 1 ml kultivačního média [μg]												
	vliv pH					vliv koncentrace NaCl [%]					vliv teploty [$^{\circ}\text{C}$]		
Druh bakterie	4,0	4,6	5,0	6,0	7,0	1	3	6	8	11	22	30	40

Otázky pro závěrečné hodnocení:

1. Vliv pH prostředí

- Je stupeň kyselosti prostředí, který zcela potlačuje růst, pro všechny zkoumané bakterie stejný?
- Který druh a při jakém pH vykazuje relativně největší aktivitu?
- Jaké nejnižší pH umožňuje již všem zkoušeným bakteriím zřetelný růst?
- Který druh je na změnu pH v rozmezí 5,0 – 7,0 nejcitlivější?

2. Vliv NaCl

- Která koncentrace NaCl v prostředí zcela inhibuje růst všech zkoušených druhů bakterií?
- Který druh je na přítomnost NaCl v prostředí relativně nejcitlivější?
- Při které koncentraci NaCl v prostředí mohou již růst všechny druhy bakterií?

3. Vliv teploty

- Který druh bakterií relativně nejlépe roste při 22, 30, 40 °C?
- Který druh bakterií nejvýrazněji reaguje na změnu teploty z 22 na 30 °C a který z 30 na 40 °C (jak v pozitivním, tak negativním smyslu)?
- Působí u většiny zkoušených bakterií větší intenzitu metabolismu zvýšení kultivační teploty z 22 na 30 °C nebo z 30 na 40 °C?

13 PŮSOBENÍ TĚŽKÝCH KOVŮ, BARVIV A KONZERVANTŮ

Některé látky působí na mikroorganismy inhibičně, zpomalují či zastavují jejich růst, nebo je usmrcují. Mezi tyto látky patří těžké kovy, některá barviva a konzervanty. Z těžkých kovů posoudíme působení stříbra ve formě sargenu (prostředek používaný pro jednorázovou desinfekci pitné vody) a mědi ve formě měděného plíšku. U konzervantů budeme zkoumat účinky kyseliny sorbové, kyseliny mravenčí a benzoanu sodného, u barviv je to krystalová violet.

Působení těžkých kovů

Postup:

Budeme potřebovat 4 Petriho misky. 1. Petriho misku připravíme jako kontrolu, na kterou naočkujeme 0,5 ml mikroba a zalijeme masopeptonovým agarem (MPA).

Druhá miska bude pro testování účinku mědi – na Petriho misku naočkujeme 0,5 ml mikrobiální kultury, zalijeme MPA a před zatuhnutím vložíme měděný plíšek očištěný v 10% HNO_3 .

Pro testování působení sagenu budeme potřebovat dvě Petriho misky (testujeme 2 různé koncentrace). Do dvou prázdných zkumavek napipetujeme po 1 ml sagenu (1 ml - 0,01 g/l, 1 ml - 0,02 g/l) a po 1 ml mikrobiální kultury. Necháme působit 60 minut, po uplynutí doby působení napipetujeme 1 ml na Petriho misky označené koncentrací sagenu a zalijeme MPA. Petriho misky budeme inkubovat při laboratorní teplotě.

Působení konzervantů

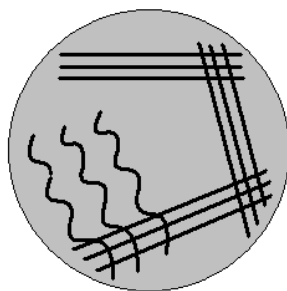
Postup:

Použijeme 7 Petriho misek. Do Petriho misky napipetujeme vždy příslušný konzervant a 10 ml MPA, necháme ztuhnout a na povrch rozetřeme hokejkou 0,1 ml mikrobiální kultury. 1. Petriho misku použijeme jako kontrolu bez přídavku konzervantu. K testování použijeme roztok kyseliny benzoové, sorbanu sodného a kyselinu mravenčí 0,25 % a 0,08 %. Do příštího týdne necháme kultivovat při laboratorní teplotě.

Působení barviv - krystalové violeti

Postup:

Použijeme 5 Petriho misek. Připravíme si desetinné ředění krystalové violeti tak, že do zkumavky s 9 ml destilované vody napipetujeme 1 ml krystalové violeti, důkladně promícháme, připravíme tak ředění 10^{-1} , pokračujeme až do zředění 10^{-3} . Do Petriho misek napipetujeme po 1 ml neředěné krystalové violeti a všech tří ředění. Zalijeme 10 ml MPA, důkladně promícháme a po zatuhnutí naočkujeme mikrobiální kulturu křížovým roztěrem (viz Obr. 18).



Obr. 18 – Schéma křížového roztěru

Vyžíhanou a vychladlou kličkou nabereme mikrobiální kulturu a naneseeme ji třemi rovnoběžnými tahy na zatumlý agar. Kličku opět vyžíháme, misku pootočíme a vedeme tři rovnoběžné tahy z konce prvních tahů. Vyžíháme kličku, pootočíme misku a opět uděláme tři rovnoběžné tahy, dále kličku nežiháme, opět otočíme misku a z konců posledních rovných tahů uděláme tři vlnovky, které se nesmí dotýkat prvních tahů.

Jako kontrolu použijeme Petriho misku s agarem bez krystalové violeti s mikrobiální kulturou naočkovanou křížovým roztěrem. Do příštího týdne necháme kultivovat při laboratorní teplotě.

Vyhodnocení:

Působení Cu:

Zde vyhodnotíme přítomnost, případně velikost inhibiční zóny (projasněná zóna kolem měděného plíšku), ve které je potlačen mikrobiální růst. V případě přítomnosti inhibiční zóny změříme její průměr. Účinnost zaznamenáme následovně:

- bez účinku = inhibiční zóna se nevytvořila,
- + slabý účinek = průměr inhibiční zóny do 6 mm,
- ++ střední účinek = průměr zóny do 12 mm,
- +++ silný účinek = průměr zóny nad 12 mm.

Působení sagenu, konzervantů, barviv:

Vyhodnotíme intenzitu růstu mikroorganismů oproti kontrole. Účinek zaznamenáme následovně:

- bez účinku,
- + slabý účinek,

- ++ střední účinek,
- +++ silný účinek.

Vytvoříme souhrnnou tabulku pro všechny experimenty a všechny testované mikroorganismy a provedeme závěrečné zhodnocení.

14 VLIV ČIŠTĚNÍ NÁDOB RŮZNÝMI ZPŮSOBY NA MIKROFLÓRU

V tomto experimentu budeme provádět simulaci různých způsobů čištění.

Jsou připraveny zkumavky, ve kterých je zaschlý fermentovaný mléčný výrobek. Těchto zkumavek budeme potřebovat 5 a vyčistíme je různými způsoby. Stejně tak budeme potřebovat 5 Petriho misek, které označíme symboly pro způsob čištění zkumavky a značkou stolu.

- 1. Kontrola** – do zkumavky nalijeme 10 ml destilované vody, uzavřeme gumovou zátkou otřenou ethanolem, obsah zkumavky protřepeme a napipetujeme 1 ml na Petriho misku označenou jako „kontrola“
- 2. Zkumavku** umyjeme studenou vodou, poté napipetujeme 10 ml destilované vody, protřepeme a napipetujeme 1 ml na Petriho misku.
- 3. Zkumavku** umyjeme teplou vodou za použití štětky, opět napipetujeme 10 ml destilované vody, protřepeme a napipetujeme 1 ml na Petriho misku.
- 4. Zkumavku** umyjeme teplou vodou a jarem, po umytí napipetujeme 10 ml destilované vody, protřepeme a na Petriho misku napipetujeme 1 ml.
- 5. Zkumavku** umyjeme teplou vodou a fixinelou, protřepeme, po umytí napipetujeme 10 ml destilované vody, protřepeme a na Petriho misku napipetujeme 1 ml.

Po naočkování všech Petriho misek zalijeme inokulum živnou půdou (MPA) a necháme kultivovat do dalšího cvičení při laboratorní teplotě.

Vyhodnocení:

Spočítáme narostlé kolonie, jejich počet na „kontrolě“ vyjádříme jako 100 %, k těmto 100 % vztahujeme počty kolonií na ostatních miskách a procenty vyjádříme přeživší mikroby a tím i nepřímou účinnost jednotlivých způsobů čištění. Vytvoříme souhrnnou tabulku s výsledky od celé skupiny a po zprůměrování provedeme závěrečné hodnocení.

15 POVRCHOVÉ STĚRY

Jednou z metod jak zjistit kontaminaci povrchu různých předmětů je **stěrová metoda**. Pro povrchové stěry budeme potřebovat sterilní vatový tamponěk, zkumavku s 10 ml fyziologického roztoku a sterilní šablonu z alobalu s otvorem o rozměru 5 x 5 cm. Na plochu, ze které chceme udělat stěr, přiložíme sterilní šablonu, tampon namočíme do fyziologického roztoku, a setřeme jí plochu okénka. Stíráme vodorovně a svisle otáčivým pohybem tamponku. Po setření celé plochy vložíme tampon do zkumavky, zalomíme a třepeme (vortexujeme), až se uvolní vlákna vaty. Na Petriho misku napipetujeme 1 ml ze zkumavky a zalijeme živnou půdou (MPA). Necháme do příštího cvičení kultivovat při laboratorní teplotě.

Vyhodnocení:

Spočítáme kolonie narostlé na Petriho misce, vypočteme KTJ v 10 ml (celý objem fyziologického roztoku) a porovnáme znečištění jednotlivých stíraných ploch.

16 MÁSELNÉ KVAŠENÍ

Máselné kvašení je anaerobní proces, při kterém vzniká kyselina máselná, oxid uhličitý a vodík. Mezi mikroorganismy, pro které je máselné kvašení typické, patří klostridia. Působením enzymů produkovaných klostridiiemi vzniká kyselina máselná a CO₂ například v sýrech, kde způsobují jejich duření. Klostridia se nachází v půdě. Otestujeme tedy, zda jsou přítomné společně s hlínou na povrchu brambor.

Postup:

Brambory nakrájíme na drobné kostičky, naplníme jimi asi do jedné třetiny zkumavku, přidáme 1 g CaCO₃ a do dvou třetin zkumavky doplníme vodou z vodovodu. Zkumavku vložíme do vodní lázně o teplotě 85 °C a pasterujeme 10 minut. Směs ve zkumavce lehce uzavřeme zátkou a necháme kultivovat 72 h při 35 °C. Klostridia přítomná v půdě budou zkvašovat bramborový škrob na kyselinu máselnou.

Vyhodnocení:

Po uplynutí doby kultivace napipetujeme do prázdné zkumavky 5 ml ze zkumavky s bramborami, přidáme 0,5 ml 96% ethanolu, 2 ml koncentrované kyseliny sírové a opatrně

zahříváme nad plamenem. V případě přítomnosti kyseliny máselné (a tedy klostridií) dochází ke vzniku ethylmáselného esteru ananasové vůně. Druhým způsobem vyhodnocení je přidavek 2 ml 5% roztoku FeCl_3 . Záhřevem dochází ke vzniku máselnanu železitého skořicově hnědého zbarvení (v přítomnosti kyseliny máselné).

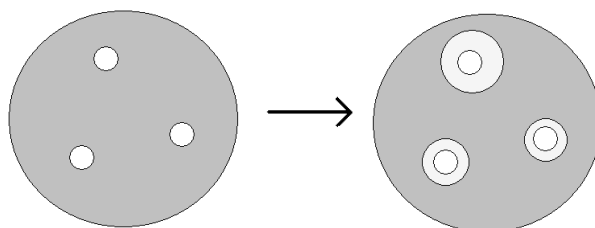
Mikroskopické vyšetření: Fixovaný preparát barvíme Lugolovým roztokem. Přítomná granulosa v protoplazmě bakterií se zbarví modře. Spory, jsou-li přítomny, deformují buňku.

17 ANTIMIKROBIÁLNÍ AKTIVITA ÚČINNÝCH LÁTEK Z ROSTLIN

Rostliny obsahují některé látky, které negativně ovlivňují růst a množení mikroorganismů. K tomu dochází mnoha různými způsoby, například poškozením enzymatického systému, metabolických drah, poškozením struktury a funkce buněčné stěny a podobně. Tyto účinné látky jsou obsaženy například v levanduli, tymiánu, meduňce, pažitce, ale také v ananasu nebo čaji. Jejich účinnost se stanovuje například **diskovou difúzní metodou**.

Postup:

Na Petriho misku s živnou půdou naočkujeme 0,1 ml testovaného mikroba. Vysterilizovanou skleněnou hokejkou jej rozetřeme po celém povrchu agar. Na sterilní disky z filtračního papíru (o průměru 9 mm) napipetujeme 30 μl zkoumaného roztoku. Pinzetou přeneseme vždy tři napuštěné disky na naočkovanou Petriho misku. Provádí se dvě opakování, tzn. dvě Petriho misky pro jednu účinnou látku a mikroba. Disky jemně přitiskneme, aby nedošlo k jejich odlepení při kultivaci. Disky musí být umístěny tak, aby bylo možné odečtení inhibičních zón po kultivaci. Jejich rozmístění je následovné:



Obr. 19 – Rozmístění disků a inhibiční zóny vzniklé po kultivaci

Vyhodnocení:

Po kultivaci (podle druhu testovaného mikroorganismu) vyhodnotíme tvorbu inhibičních zón a změříme jejich průměr (tedy včetně disku). Do tabulky zaznamenáme šest hodnot a jejich aritmetický průměr. Následovně můžeme porovnat účinnost jednotlivých látek, či citlivost jednotlivých testovaných mikroorganismů.

18 MIKROBIOLOGICKÝ ROZBOR VZORKŮ POTRAVIN

Mikrobiologickou analýzu potravin a potravinových surovin pro jejich výrobu provádíme především:

- pro kontrolu a zabezpečení zdravotní nezávadnosti,
- při posuzování úrovně hygieny a sanitace při jejich výrobě,
- při vzniku onemocnění – při podezření, že krmivo obsahovalo patogenní mikroorganismus,
- pro posouzení technologických postupů, posouzení mikrobiálních kultur využívaných při výrobě některých krmiv,
- při experimentální činnosti v oblasti výroby a využití krmiv.

Z patogenních mikroorganismů se v potravinách mohou vyskytnout například *Salmonella sp*, *Campylobacter*, *E. coli*, *Bacillus anthracis*, *B. cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus* a koagulázapozitivní stafylokoky, *Shigella*, *Vibrio*, *Yersinia enterocolitica*. Kromě těchto bakterií se v potravinách a potravinových surovinách stanovují i mikroorganismy další, jako jsou koliformní bakterie, bakterie čeledi *Enterobacteriaceae*, sulfitredukující klostridia, enterokoky (především *E. faecalis* a *E. faecium*), stanovuje se také celkový počet mikroorganismů, počet kvasinek a plísní. Mikroorganismy, které nejsou patogenní, jsou technologicky důležité, neboť se mohou významně podílet na kažení potravin či mohou produkovat toxické metabolity (biogenní aminy, mykotoxiny), nebo jsou součástí mikroflóry důležité při výrobě některých potravin (bakterie mléčného kvašení, probiotické mikroorganismy).

Pro mikrobiologickou kontrolu potravin a potravinových surovin můžeme využít celou řadu metod. Mikrobiologická kontrola krmiv a krmivářských surovin je v mnohém podobná.

Odběr vzorku, přeprava a uchovávání

Vzorek potravin nebo suroviny pro mikrobiologickou analýzu musí být reprezentativní a nesmí být během přepravy do laboratoře ani během úchovy pozměněn nebo poškozen. Vzorky odebíráme sterilními nástroji do vhodných sterilních obalů (skleněné nebo plastové vzorkovnice, zkumavky, PE sáčky apod.). Odebraný vzorek musí být řádně označen, aby nedošlo k jeho záměně. Do laboratoře pak musí být dopraven tak, aby nedošlo ke změně v počtu mikroorganismů přítomných ve vzorku. Především musí být zachována vhodná teplota. Stabilní vzorky lze dopravovat při teplotě rovnající se teplotě okolí, vzorky u nichž by hrozila nežádoucí změna pak v rozmezí teplot 0 až 4 °C (rychle se kazící vzorky 0 až 2 °C), vzorky zmrazeného materiálu při teplotě pod -18 °C, nebo při teplotě zaručující, že nerozmrznou. Vzorky by měly být co nejrychleji dopraveny do laboratoře a co nejrychleji pokud možno do 24 h popř. do 48 h od odběru zpracovány. Před zpracováním musí být uchovávány tak, aby nedošlo ke změně v počtech přítomných mikroorganismů.

Výběr metody pro detekci mikroorganismů závisí především na typu vzorku stanovovaném mikroorganismu nebo skupině mikroorganismů, charakteristice specifického média, cíli analýzy, času, vybavení laboratoře apod.

Kultivační vyšetření

Jedná se o klasické základní stanovení používané k důkazu či počtu významných skupin mikroorganismů nebo jednotlivých rodů a druhů, umožňující případnou další manipulaci s kultivovanými mikroorganismy (izolace, identifikace, testování). Jde o naočkování vzorku (inokula) do živného média a jeho inkubaci při dané teplotě a době.

Při tomto vyšetření vyžíváme **tuhých a tekutých živných půd neselektivních** (obecné základní půdy umožňující růst velkému počtu mikroorganismů), **půd selektivních** (umožňující růst určitým mikroorganismům, přičemž ostatní jsou potlačeny inhibičními látkami), **půd diagnostických** (využívají se k důkazu přítomnosti určitých mikroorganismů a obsahují různé indikátory reagující např. s produkty metabolismu apod.), **půd selektivně diagnostických** (potlačují nežádoucí mikroorganismy a reagují s daným mikrobem či produktem jeho metabolismu za vzniku určité barevné reakce). Dále máme k dispozici půdy transportní, konzervační, resuscitační, pomnožovací atd.

Vzorek pro kultivační vyšetření je nutno vhodně upravit s ohledem na vlastnosti vzorku a účel a druh stanovení. Vzorek je nutno vhodně homogenizovat (promíchání, promíchání s ředícím roztokem, použití homogenizátorů – stomacher - homogenizace obvykle 60 až 120 s). Mikroorganismy patogenní stanovujeme zpravidla s předpomnožením jako

kvantitativní stanovení. Ostatní mikroorganismy pak v příslušné měrné jednotce jako kolonie tvořící jednotky – KTJ (Colony Forming Units – CFU) v jednom gramu nebo mililitru, nebo na jednotku plochy - cm². Zhomogenizovaný vzorek dále ředíme (desítkové ředění) z důvodu předpokladu vyššího množství stanovovaných mikroorganismů. K ředění lze využít různých ředících roztoků (fyziologický roztok, příslušná pomnožovací půda apod.). Takto upravený vzorek očkujeme do sterilních Petriho misek. Využít můžeme metodu přímého výsevu (zalití inokula živnou půdou) či výsevem na povrch kultivačního média (roztěr na povrch ztuhlé živné půdy). Můžeme také očkovat inokulum do tekutého živného média pro důkaz přítomnosti některých mikroorganismů nebo jejich skupin nebo pro jejich případnou resuscitaci. Kultivační podmínky volíme podle požadavků stanovení.

Základní charakteristika a optimální kultivační podmínky pro nejběžnější skupiny mikroorganismů jsou následující:

Celkový počet mikroorganismů (CPM)

Jsou to aerobní a fakultativně anaerobní mikroorganismy (bakterie, kvasinky a plísně). Tato skupina mikroorganismů nás informuje o míře kontaminace daného substrátu (potravin, surovin). Z výsledků lze usuzovat na úroveň hygieny při výrobě a manipulaci s potravinami a surovinami. V případě potravin, při jejichž výrobě se uplatňují mikroorganismy (sýry apod.) toto tvrzení neplatí, protože do CPM se výrazně promítají právě počty těchto důležitých mikroorganismů především pak bakterií mléčného kysání. U CPM však lze stanovit jen určité procento mikroorganismů ze skutečného množství, proto se volí pro kultivaci neoptimálnější podmínky. Optimální teplota kultivace je 30 °C a čas 72 h. Jako živné médium využíváme obvykle PCA (Plate Count Agar).

Bakterie č. *Enterobacteriaceae*

Tato čeleď zahrnuje 44 rodů gramnegativních, peritrichních nebo nepohyblivých, nesporulujících tyčinek. Jsou to fakultativně anaerobní, chemoorganotrofní bakterie s respiratorním i fermentatorním metabolismem. Pro většinu druhů je teplotní optimum 37 °C, některé druhy ale rostou dobře i při nižších teplotách. Většinou jsou oxidasa negativní a katalasa pozitivní. Vyskytují se v půdě, ve vodě na rostlinných a živočišných materiálech. Řada druhů jsou patogeny rostlin a živočichů včetně člověka. Nejvýznamnějšími rody jsou *Escherichia*, *Enterobacter*, *Salmonella*, *Shigella* a *Yersinia*. Bývají často stanovovány jako hygienický indikátor, jejich indikátorové posouzení musí být v souvislosti s charakterem posuzovaného materiálu. Obvykle se stanovují na VRBG agaru (Violet Red Bile Glucose

Agar = agar s krystalovou violetí, neutrální červení, žlučí a glukosou = VČŽG) PŘI 37 °C za 24 h. Charakteristické jsou růžová až červené nebo fialové kolonie.

Koliformní bakterie

Bakterie laktasa pozitivní, oxidasa negativní, které se v použitých půdách chovají podobně jako *E. coli* a jeho biotypy, dále *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella*, *Citrobacter*. Jsou indikátorem spolehlivosti pasterace a termizace, sanitace, jakosti pitné vody. Mají indexový význam – v pitné vodě indikují možnou přítomnost patogenních bakterií. Produkují biogenní aminy. Obvyklá kultivace probíhá na VRBL agaru (Violet Red Bile Lactose Agar = agar s krystalovou violetí, neutrální červení, žlučí a laktosou = VČŽL) při 37 resp. 30 °C, 24 resp. 72 h. Typické kolonie jsou velké 0,5 mm nebo větší fialově červené, někdy jsou obklopené červenou zónou precipitované žluči.

Enterokoky (*E. faecalis* a *E. faecium*)

Jde o grampozitivní koky schopné tvořit kyselinu mléčnou (homofermentativní). Jsou odolné vůči nepříznivým vlivům prostředí (6,5% NaCl, pH 9,6, rostou při 10 i 45 °C, přežívají 60 °C 30 min). Přirozená součást fermentovaných potravin. V nefermentovaných potravinách a surovinách mohou indikovat nedostatečné tepelné ošetření či kontaminaci z nedostatečně dekontaminovaných ploch. Jsou rovněž indikátory fekální kontaminace pitné vody – ve vodě přežívají kratší dobu než *E. coli*. Základní stanovení spočívá v kultivaci při 37 °C 72 h na živné půdě Slantz-Bartley agar. Vyrostlé kolonie mají v průměru 2 mm a mají růžovohnědé až červenohnědé zbarvení. Pro stanovení lze využít i chromogenní půdy např. COMPASS *Enterococcus* Agar, kde se enterokoky po kultivaci při 44 °C za 24 h projeví jako modře zbarvené kolonie.

Bakterie mléčného kvašení (BMK)

Jsou to grampozitivní (G+), homo- a heterofermentativní tyčinky a koky, především příslušníci rodů *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*. Jejich význam tkví především ve schopnosti zkvašovat jednoduché cukry na kyselinu mléčnou případně další produkty, čehož se využívá při výrobě různých fermentovaných potravin, produkují sensoricky aktivní látky, bakteriociny, některé druhy působí jako probiotika. V určitých případech se ale mohou podílet svou činností i na kažení některých potravin. Jde o pestrou skupinu s různými nároky na kultivaci. Obvykle se stanovují mezofilní aerobní BMK za kultivačních podmínek 30 °C, 72 h. Jako živné médium se používá MRS (de Man, Rogosa,

Sharp) agar o pH 5,7. Úpravou podmínek kultivace (teplota, aerobní nebo anaerobní prostředí, čas, pH, živné médium) můžeme podpořit v růstu jednotlivé skupiny nebo rody a druhy BMK. Například pro stanovení laktobacilů lze použít MRS agar a kultivovat v anaerobních podmínkách při 37 °C 48 h.

Psychrotrofní mikroorganismy

Jde o mezofilní mikroorganismy mající schopnost růst i při podstatně nižších teplotách (1 – 7 °C) než je jejich růstové optimum. Patří sem celá řada bakterií, některé kvasinky a plísně. Tyto mikroorganismy se vyznačují silnou proteolytickou a lipolytickou aktivitou. Jejich počet informuje o stupni mikrobiální kontaminace či rekontaminace surovin a potravin nebo prostředí. Kultivační teplota je 6,5 °C po dobu 10 dnů, u zrychleného stanovení je možno využít teploty 22 °C po dobu 48 h. Jako živné médium lze využít PCA.

Termorezistentní aerobní nebo anaerobní mikroorganismy

Jsou to bakterie, které přežívající termizační a pasterační teploty a časy a nerozmnožují se při nich (60 °C 30 min, 71,5-85 °C 40 - 5 min). Omezeně i sporující bakterie – jejich spory jsou termorezistentní. Patří sem příslušníci rodů *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Clostridium*. Zdrojem kontaminace je půda, prach, znečištěná nástroje. Problémem bývají bakterie současně psychrotrofní a termorezistentní (č. *Bacillaceae*). Před vlastním stanovením je nutno vzorek nebo jeho ředění vystavit působení pasterační teploty např. 85 °C 10 min. Kultivace se provádí podle potřeby v aerobních nebo anaerobních podmínkách. Anaerobní podmínky vytvoříme tak, že Petriho misky umístíme do speciálních nádob s vyvíječem atmosféry nebo do speciálních termostátů. Kultivujeme při 30 resp. 37 °C 48 h na PCA. Čas a teplotu kultivace lze upravit podle potřeby stanovení určitých skupin těchto mikroorganismů. Pro stanovení termofilních mikroorganismů volíme teploty vyšší např. 55 °C.

Mikromycety (kvasinky a plísně)

Pro stanovení mikromycet lze odebírat vzorek, o potřebné velikosti, hmotnosti (10 – 40 g u potravin při homogenizaci na Stomacheru) či objemu, stěry z povrchů, seškraby apod., v závislosti na druhu testovaného materiálu, metodě stanovení a samozřejmě na sledovaném mikroorganismu. V rámci plotnových metod lze stanovovat i specifické skupiny vláknitých mikromycet (toxinogenní, xerofilní, termorezistentní,...) U kultivačních metod je potřeba zvolit vhodné živné médium (agar s dichloranem, bengálskou červení a chloramfenikolem –

DRBC, Czapek-Dox agar, sladinový agar, agar s kvasničným extraktem, glukosou a chloramfenikolem, Sabouradův agar, aj.), způsob inokulace (zalití do půdy, roztěr inokula na povrch ztuhlého média – 0,1 až 0,3 ml, položení pevného vzorku na ztuhlé médium) inkubační teplotu (obvykle 25 °C, optimum pro většinu mikromycet je mezi 20 – 30 °C, pro psychrotrofní mikromycety je vhodná teplota kolem 6,5 °C eventuelně 10 °C, pro termofilní 40 °C) a čas inkubace (obvykle 72 – 120 h, ale podle potřeby i déle - 14 dní až 4 týdny).

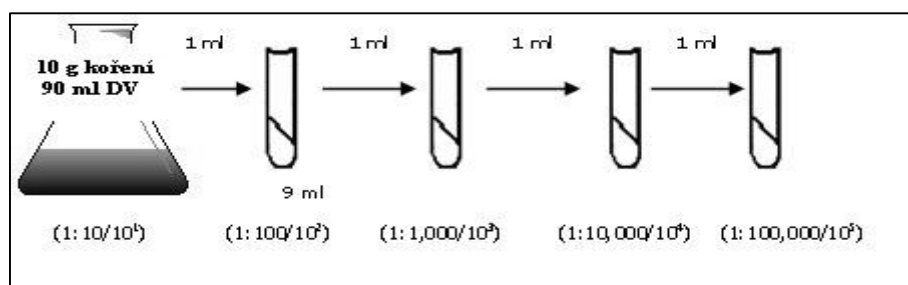
18.1. Mikrobiologický rozbor koření

Ve vzorcích koření budeme stanovovat tyto skupiny mikroorganismů: celkový počet mikroorganismů (CPM), sporulující a termorezistentní bakterie (SP), počet kvasinek a plísní a koliformní bakterie.

Mnohé vzorky pro mikrobiologická stanovení není možné očkovat do tekutých či na ztužená živná média přímo, ale je zapotřebí je ředit, aby na Petriho miskách narostlo počitatelné množství kolonií a bylo možno výsledky vyhodnotit. Ředění se provádí u vzorků s vysokým obsahem mikroorganismů, jako jsou půdy, odpadní vody, kaly, sedimenty, některé potraviny apod. Tekuté vzorky se ředí většinou bez úprav, vzorky pevné se buď homogenizují se sterilním fyziologickým roztokem, nebo se do něj vytřepávají, či se v něm rozpouštějí. Fyziologický roztok je roztokem solí o stejném osmotickém tlaku jako je vnitrobuněčné prostředí mikroorganismů (obvykle se používá NaCl o koncentraci 8,5 g/l). Místo fyziologického roztoku se někdy používá peptonová voda nebo fyziologický roztok s peptonem (1 g/l). Vlastní ředění se provádí desetinnou řadou, to znamená, že původní vzorek se ředí postupně o řády - tj. 10x, 100x, 1000x atd. Tato ředění se většinou označují zápornými exponenty: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} a dále. Do ředění je nutno vždy zahrnout i úpravu či rozpouštění pevných vzorků.

Příprava vzorku: Na sterilní váženice odvážíme vzorek koření. Navážku koření (10 g) převedeme do Erlenmayerovy baňky se sterilním fyziologickým roztokem (90 ml) a 10 minut budeme třepat na třepačce. Dojde tak k opláchnutí mikroorganismů z povrchu koření. Po vytřepání připravíme řadu desetinného ředění.

Postup desetinného ředění: Původní, nezředěný vzorek označujeme 10^0 (0x krát zředěno). 1 ml vzorku se asepticky přenese do zkumavky s 9 ml sterilního fyziologického roztoku a důkladně promícháme na vortexu. Tímto způsobem vznikne ředění 10^{-1} (10x zředěno). Poté se odebere 1ml ze zkumavky a přenese do následující zkumavky opět s 9 ml sterilního fyziologického roztoku, tak získáme ředění 10^{-2} (100 x zředěno). Tento postup se opakuje podle předpokládaného obsahu mikroorganismů ve vzorku tolikrát, aby se dosáhlo potřebného zředění vzhledem k charakteru kultivace. Z příslušných zkumavek se potom naočkuje 1 ml roztoku na Petriho misku. Pro stanovení počtu sporulujících mikroorganismů je potřeba napřed příslušnou zkumavku zahřát ve vodní lázni vytemperované na $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 10 min., aby došlo k devitalizaci vegetativních forem mikroorganismů.



Obr. 20: příprava desetinného ředění

(<http://www.fao.org/docrep/010/ai407e/AI407E24.htm>)

Živné půdy a ředění používané pro zalévání Petriho misek: Do sterilních a řádně označených Petriho misek (stanovovaný mikroorganismus, použité ředění, značka pracovní skupiny pro rozlišení) inokulujeme sterilní pipetou 1 ml roztoku z příslušného ředění. Inokulum následně zalejeme rozehřátou a na cca $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ zchlazenou živnou půdou a po zatuhnutí umístíme dnem vzhůru do příslušného termostatu.

CPM - 10^{-4} , 10^{-5} - masopeptonový agar (MPA), kultivace 72 h při $30\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Sporulující bakterie (SP) - 10^{-1} , 10^{-2} - masopeptonový agar (MPA), po záhřevu $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 min., kultivace 48 h při $30\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Kvasinky a plísňe - 10^{-1} , 10^{-2} - agar s kvasničným extraktem, glukosou a chloramfenikolem, kultivace 72 – 120 h při $25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Koliformní bakterie (Koli) - 10^{-1} , 10^{-2} -VRBL agar, kultivace 24 h při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Vyhodnocení

K vyhodnocování výsledků se vždy vybírají jen Petriho misky z těch ředění, kde je množství kolonií dobře počítatelné - kde nejsou kolonie vzájemně přerostlé, slité či jinak nepřehledné. Za nejvhodnější misky k počítání se považují obvykle takové, kde je počet kolonií mezi 30 a 300. Zjištěný počet kolonií se po odečtu průměruje u paralelních misek a výsledek se přepočítává na 1 ml nebo 1 g původního vzorku s tím, že se zohlední použité ředění. Při vyjadřování počtu mikroorganismů ve vzorcích se obvykle používá výrazu KTJ/g (pevné vzorky) či KTJ/ml (tekuté vzorky). Spočítáme množství typických kolonií na Petriho miskách a dosadíme do vzorce pro výpočet N (KTJ/g nebo ml).

$$N = \frac{\Sigma C}{V \cdot d \cdot (n_1 + 0,1 \cdot n_2)}, \text{ kde:}$$

N = počet kolonií tvořících jednotek v 1 g (ml) vzorku (KTJ/g nebo ml),

ΣC = suma kolonií ze všech Petriho misek od příslušné skupiny mikroorganismů,

V = objem inokula,

d = první použité ředění,

n_1 (n_2) = počet misek z prvního (druhého) ředění.

Na základě vypočítaných hodnot provedeme zhodnocení.

Stanovované skupiny mikroorganismů	Počty stanovovaných skupin mikroorganismů
celkové počty mikroorganismů	
sporulující bakterie	
kvasinky/plísň	
koliformní bakterie	

18.2 Rozbor potravin s nízkou vlhkostí a šťávy z mrkve

Počty mikroorganismů v potravinách s nízkou vlhkostí (např. ovesné vločky, rýže, sušené ovoce) lze stanovit oplachem. 10 g vzorku navážíme na sterilní váženku sterilní lžičkou. Navážku přesypeme do Erlenmayerovy baňky s 90 ml fyziologického roztoku, čímž získáme vzorek zředěný na 10^{-1} . Vzorek necháme 10 minut oplachovat na třepače. Připravíme si sterilní Petriho misky. Nadepíšeme je skupinou stanovovaných mikroorganismů, příslušným ředěním a značkou stolu. Pro každé ředění se použijí paralelně dvě Petriho misky. V suchých potravinách díky nízké aktivitě vody neočekáváme vysoké počty mikroorganismů, na misky tedy pipetujeme přímo obsah Erlenmayerovy baňky – 10^{-1} . Pro stanovení sporulujících mikroorganismů vložíme část vzorku ve sterilní zkumavce do vodní lázně o teplotě 85 °C na 10 minut. Působením vysoké teploty dojde ke zničení vegetativních forem mikroorganismů, přežijí pouze spory, které při vhodných kultivačních podmínkách vyklíčí. Na Petriho misky pipetujeme 1 ml příslušného ředění, zaléváme je vychlazenými rozehřátými živnými půdami. Po zatuhnutí Petriho misky umístíme do termostatu dnem vzhůru a kultivujeme po určenou dobu, viz tabulka níže.

Dále budeme zjišťovat, jestli je rozdíl v počtech mikroorganismů ve šťávě z mrkve připravené z mrkve pouze omyté a mrkve omyté a oškrábané. Uvnitř je mrkev v podstatě sterilní (pokud nehnije). Mrkev tedy buď omyjeme, nebo omyjeme a oškrábeme, odšťavníme a šťáva představuje nezředěný vzorek – 10^0 . Ve šťávě z oškrábané a omyté mrkve neočekáváme vysoký výskyt mikroorganismů, použijeme ředění 10^{-1} (viz princip desetinného ředění). Více mikroorganismů předpokládáme ve šťávě z mrkve pouze omyté, ředění tedy zvýšíme na 10^{-2} . 1 ml příslušného ředění pipetujeme na Petriho misky, zalijeme živnou půdou a necháme kultivovat. Stanovované skupiny mikroorganismů, doporučené ředění a podmínky kultivace jsou uvedeny v následujících tabulkách.

Skupina MO	Ředění		
	Suché potraviny	Mrkev omytá	Mrkev oškrábaná
CPM	10^{-1}	10^{-2}	10^{-1}
Sporulující MO	10^{-1}	-	-
Kvasinky a plísňe	10^{-1}	10^{-2}	10^{-1}

Skupina MO	Živná půda	Podmínky kultivace
CPM	PCA (Plate Count Agar)	30 °C / 72 h
Sporulující MO	PCA (Plate Count Agar)	30 °C / 48 h
Kvasinky a plísňe	Agar s chloramfenikolem	25 °C / 120 h

Vyhodnocení:

Spočítáme množství typických kolonií na Petriho miskách a dosadíme do vzorce pro výpočet N (KTJ/g nebo ml).

$$N = \frac{\Sigma C}{V \cdot d \cdot (n_1 + 0,1 \cdot n_2)}, \text{ kde:}$$

N = počet kolonií tvořících jednotek v 1 g (ml) vzorku (KTJ/g nebo ml),

ΣC = suma kolonií ze všech Petriho misek od příslušné skupiny mikroorganismů,

V = objem inokula,

d = první použité ředění,

n_1 (n_2) = počet misek z prvního (druhého) ředění.

18.3 Rozbor mléčných výrobků

Při rozboru tekutých mléčných výrobků, jako je například kefír, acidofilní mléko apod., je vzorek pouze ředěn desetinným ředěním, pokud je analyzován sýr, je třeba vzorek homogenizovat. Navážíme 10 g sýru a vložíme do homogenizačního sáčku. Přilijeme 90 ml fyziologického roztoku a homogenizujeme ve stomacheru 1 min. Po homogenizaci získáme vzorek zředěný na 10^{-1} . Připravíme si Petriho misky s popisem stanovované skupiny mikroorganismů, stupněm ředění vzorku a značkou stolu. Do Petriho misek napipetujeme 1 ml příslušného ředění vzorku, zalijeme živnou půdou, necháme ztuhnout a kultivujeme za daných podmínek, jak je uvedeno v následující tabulce.

Skupina mikroorganismů	Živná půda	Podmínky kultivace
CPM (celkový počet mikroorganismů)	PCA (Plate Count Agar)	30 °C / 72 hodin
Koliformní bakterie	VRBL	37 °C / 24 hodin
Kvasinky / plísně	Agar s chloramfenikolem	25 °C / 120 hodin
BMK (bakterie mléčného kysání)	MRS	30 °C / 72 hodin

Vyhodnocení:

Spočítáme kolonie narostlé na Petriho miskách, podle vzorce vypočítáme N (KTJ/g nebo ml), zaznamenáme do tabulky a provedeme zhodnocení.

19 MIKROBIOLOGICKÝ ROZBOR VODY

Voda je jedním z přirozených prostředí výskytu mikroorganismů, z nichž bakterie jsou považovány za nejvýznamnější a nejpočetnější skupinu. V mikrobiologii vody se běžně využívá rozdělení bakterií podle následujících hledisek: **způsobu získávání živin** (autotrofní, heterotrofní) a **energie** (chemotrofní, fototrofní), **vztahu ke kyslíku** (aerobní, fakultativně anaerobní, anaerobní, mikroaerofilní), **původu v prostředí** (autochtonní, alochtonní), jejich **hygienického významu** (patogenní, potenciálně patogenní, nepatogenní), **indikačních schopností** (indikátory fekálního znečištění, indikátory organického znečištění), **schopnosti degradovat a transformovat chemické sloučeniny** (bakterie degradující a transformující sloučeniny uhlíku, dusíku, síry apod. – fyziologické skupiny) či **genetické a fylogenetické příbuznosti** (fylogenetické skupiny).

Při rutinním mikrobiologickém rozboru vod není možné stanovovat všechny potenciálně přítomné patogeny, proto byla zavedena koncepce indikátorových organismů, jejichž výskyt ve vodách je odrazem mikrobiologické kvality vod. Existují 2 skupiny běžně stanovovaných indikátorů: **indikátory organického znečištění** (mikroorganismy kultivovatelné při 22 a 36 °C, např. *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Flavobacterium* a zástupci enterobakterií a vibrií) a **indikátory fekálního znečištění** (koliformní bakterie, termotolerantní koliformní bakterie, *Escherichia coli*, intestinální enterokoky, *Clostridium perfringens*).

Při mikrobiologickém vyšetření vody se ve vodě stanovují počty vybraných bakterií (především tzv. fekálního znečištění) a zjišťuje se, zda jejich počet odpovídá požadavkům vyhlášky. V následující tabulce je uveden přehled vybraných mikroorganismů, které se stanovují ve vodě (s ohledem k vodě pitné) i s kultivačními nároky.

Postup:

Do sterilní řádně označené vzorkovnice odebereme vzorek vody. Vzorkovnici s vodou udržujeme až do doby analýzy v chladu (v chladničce). V laboratoři provedeme analýzu. Stanovovat budeme počty: mikroorganismů kultivovatelných při 22 a 36 °C vyočkováním 1 ml vody nebo příslušného ředění na Petriho misky, počty koliformních bakterií filtrací

100 ml vody nebo příslušného ředění přes membránový filtr pomocí vývěvy. Filtr pak položíme na Petriho misku s nalitým Endo agarem. Dále orientačně stanovíme indikátorovým papírkem množství dusičnanů.

mikroorganismus	kultivační medium	kultivační teplota [°C]	doba kultivace [h]
Mikroorganismy kultivovatelné při 36 °C	PCA agar	36	48
mikroorganismy kultivovatelné při 22 °C	PCA agar	22	72
termotolerantní koliformy	m-FC agar	45	24
<i>Escherichia coli</i>	Rapid E.coli agar	37	24
intestinální enterokoky	Slanetz-Bartley agar	37	72
koliformní bakterie	Endo agar	37	72
<i>Pseudomonas</i>	Rapid Pseudomonas agar	37	48
<i>Legionella</i>	GVPC agar	37	240
<i>Salmonella</i>	tlumivá peptonová voda	37 45	24 24
	Rappaport- Vassiliadis agar	37	48
	Rapid Salmonella agar		

Vyhodnocení:

Po uplynutí doby kultivace odsečeme na Petriho miskách narostlé typické kolonie a provedeme zhodnocení analýzy vzorků vody.

20 PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION)

Pro molekulárně genetické vyšetření je často potřebné získat poměrně velké množství určitého úseku DNA. Až do roku 1983 existoval jediný způsob, jak úsek DNA namnožit, pokud nebylo možné jej v dostatečném množství přímo izolovat z odebraného materiálu: vnést jej do bakteriálního plasmidu a klonovat. V roce 1983 objevil Kary Mullis PCR (Polymerase chain reaction = polymerázová řetězová reakce). O deset let později za svůj objev získal Nobelovu cenu.

PCR je běžně využívanou metodou molekulární biologie. Je to technika, která umožňuje namnožit DNA bez pomoci buněk – simulací replikace. Za několik hodin je tato metoda schopna vyprodukovat kolem miliardy kopií DNA.

Základním principem PCR je opakovaná řízená denaturace dvouřetězcové DNA a následná renaturace osamocených řetězců se specifickými oligonukleotidy, které jsou v reakční směsi v nadbytku. Tyto oligonukleotidy slouží následně jako primery pro syntézu nového řetězce DNA. Amplifikace DNA probíhá v opakujících se cyklech, které mají tři kroky – **denaturace** (denaturation), **nasednutí primerů** (annealing), **elongace** (extension) viz Obr. 21. Reakce probíhá v termocykleru, který mění teplotu v požadovaných intervalech.

Komponenty PCR

Templátová DNA (izolát ze vzorku).

Taq polymeráza – vzhledem k vysoké teplotě v denaturační fázi, při níž by došlo k denaturaci běžného enzymu, by bylo nutné polymerasu přidávat v každém cyklu. Proto se pro PCR používají termostabilní DNA polymerasy, původně izolované z bakterií žijících v horkých pramenech. Nejvýznamnějším zástupcem je tzv. Taq polymerasa z bakterie *Thermus aquaticus*.

Primery – jako primery se zpravidla používají oligonukleotidy o délce 17 až 28 nukleotidů. Aby reakce dobře probíhala, měly by splňovat několik požadavků:

- Musí být specifické pro amplifikovanou sekvenci a měly by být pokud možno zcela komplementární k úseku, na který mají dosedat.
- Neměly by spolu být vzájemně komplementární, jinak se samy začnou chovat jako templáty a během PCR se budou tvořit jejich dimery (to platí zvláště o jejich 3'-koncích).

- Primer by neměl obsahovat vnitřně komplementární sekvence, aby nedocházelo k vnitřní hybridizaci (tvorbě „smyček“), rozložení AT a CG párů by mělo být pokud možno rovnoměrné, zejména 3'-konec by neměl být příliš bohatý na CG.
- Teploty, při kterých dosedají oba použité primery, by se neměly výrazně lišit.

Nukleotidy (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

MgCl₂ - působí jako kofaktor polymerasy. Příliš nízká koncentrace Mg²⁺ může mít za následek nízký výtěžek reakce, naopak příliš vysoká koncentrace může vést k tvorbě nespecifických produktů.

Průběh PCR

Denaturace

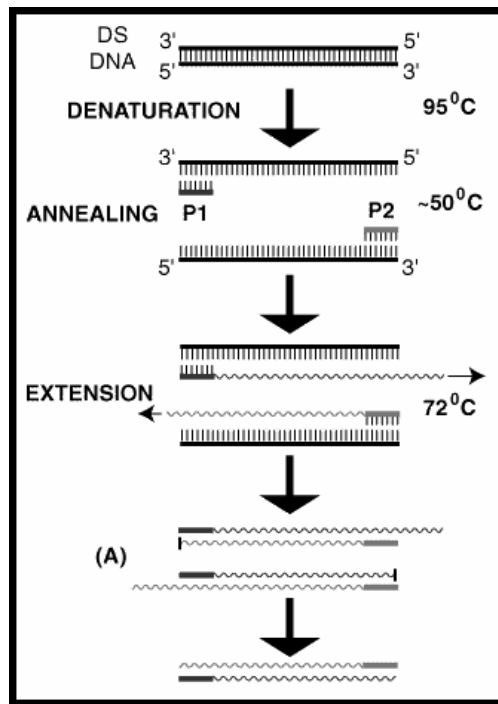
Zahřátím DNA na teplotu 94 °C dochází k rozpadu vodíkových můstků mezi vlákny DNA, čímž dojde k rozpletení dvouvláknové dsDNA na jednovláknovou ssDNA.

Nasednutí primerů

V této fázi dochází k nasednutí primerů na cílovou sekvenci DNA vodíkovými můstky podle pravidel komplementarity. Probíhá při teplotě mezi 50 a 60 °C. Při příliš nízké teplotě mohou primery nasedat i na sekvence, které jsou komplementární jen z části, a vytvoří se tak nespecifický produkt. Při příliš vysoké teplotě primery hybridizují (nasedají) málo a produktu se tak nevytvoří dostatečné množství.

Elongace

Syntéza nových řetězců probíhá při teplotě 65 – 75 °C. Oligonukleotidy, které dosedly na jednořetězcovou DNA (templát) v předchozím kroku, slouží v tomto kroku jako primery pro DNA polymerasu. Od jejich 3'-konce začíná syntéza nového řetězce komplementárního s templátem.



Obr. 21 – Průběh polymerázové řetězové reakce

(<http://www.flmnh.ufl.edu/cowries/xPCR.gif.pagespeed.ic.pAb1CJxOVT.png>)

Po prvním cyklu PCR se počet řetězců DNA ve směsi zdvojnásobí. V dalším cyklu mohou jako templát pro polymerasu sloužit i nově vytvořené řetězce, takže se nasyntetizuje dvojnásobné množství produktu. Při opakování cyklů množství vytvořených řetězců stoupá exponenciálně.

21 POUŽITÁ A DOPORUČENÁ LITERATURA

AMBROŽ, Z. (1982): Mikrobiologie. Návody do cvičení. Vysoká škola zemědělská v Brně. 60 s.

Bacillus ssp. Flickr [online]. 2014 [cit. 2014-11-14]. Dostupné z: <https://www.flickr.com/photos/36128932@N03/3338080341/>

CLARK, David P. *Molecular biology*. 1. vyd. Boston: Elsevier Academic Press, c2005, p. ISBN 01-217-5551-7.

Culture and Identification of Infectious Agens. 4shared [online]. 2014 [cit. 2014-11-14]. Dostupné z: <http://dc396.4shared.com/doc/vRHM8PiE/preview.html>

DEMNEROVÁ, K., PAZLAROVÁ, J., RUML, T., MACKOVÁ, M., SAVICKÁ, D., HOFMAN, F. (1986): Biologie pro 3. ročník SPŠ potravinářské technologie obor výroba krmiv a mlynářství. SNTL, Praha, 184 s.

JANDEROVÁ, B., BENDO VÁ, O. (1999): Úvod do biologie kvasinek. Karolinum, Praha, ISBN: 80-7184-990-1, 108 s.

JESENSKÁ, Z. (1987): Mikroskopické huby v poživatinách a v krmivách. Alfa, Bratislava, 320 s.

KUBÁTOVÁ, A., Vlák nité houby. In: Chumchalová, J., Němec, M., Kotoučková L., Páčová, Z., Savická, D., Kubátová, A., Patáková, P. Mini atlas mikroorganismů. Dostupný na: <http://www.vscht.cz/main/soucasti/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/index-b.htm>

KUBÁTOVÁ, A. (2006): Atlas mikroskopických saprotrofních hub (Ascomycota) (2006). Dostupný na: <https://botany.natur.cuni.cz/cs/atlas-mikroskopickyh-saprotrofnich-hub-ascomycota-2006>

MAKOVÁ, J., TANČINOVÁ, D., MEDO, J.(2013): Metódy mikrobiologického skúšania potravín. SPU v Nitre, 134s. ISBN 978-80-552-0984-5

MALÍŘ, F., OSTRÝ, V., BÁRTA, I., BUCHTA, V., DVOŘÁČKOVÁ, I., PAŘÍKOVÁ, J., SEVERA, J., ŠKARKOVÁ, J. (2003): Vlák nité mikromycety (plísně), mykotoxiny a zdraví člověka. NCO NZO, Brno, ISBN: 80-7013-395-3, , 349 s.

Negative Stain Results. Wmich.edu [online]. 2014 [cit. 2014-11-14]. Dostupné z: <http://dc396.4shared.com/doc/vRHM8PiE/preview.html>

ŠILHÁNKOVÁ, L. (2001): Laboratorní cvičení z mikrobiologie. VŠCHT Praha, ISBN: 80-7080-415-7, 179 s.

SEDLÁČEK, I. (2007): Taxonomie prokaryot. Masarykova univerzita, Brno, 270 s. ISBN 80-210-4207-9

ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 1. vyd. Praha: VICTORIA PUBLISHING, 1995, 361 s. ISBN 80-856-0571-6.

ŠMARDA, Jan. *Metody molekulární biologie*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2005, 188 s. ISBN 80-210-3841-1.

TANČINOVÁ, D., MAŠKOVÁ, Z., FELŠŐCIOVÁ, S., DOVIČIČOVÁ, M., BARBORÁKOVÁ, Z. (2012): Úvod do potravinárskej mykológie. Kľúč na identifikáciu potravinársky významných vláknitých mikroskopických húb. SPU, Nitra, ISBN: 978-80-552-0753-7, 286 s.

The Genus *Bacillus*. *Online Textbook of Bacteriology* [online]. 2014 [cit. 2014-11-14]. Dostupné z: http://textbookofbacteriology.net/Bacillus_5.html

ZEMAN, L a kol. : Výživa a krmení hospodářských zvířat

http://mmp.vfu.cz/opvk2014/?title=teorie-svetelne_mikroskopy&lang=cz&goonpage

http://mmp.vfu.cz/opvk2014/?title=teorie-svetelne_mikroskopy&lang=cz&goonpage

http://mmp.vfu.cz/opvk2014/?title=teorie-svetelne_mikroskopy&lang=cz&goonpage

<http://textbookofbacteriology.net>

<https://homepages.wmich.edu/>

<http://dc396.4shared.com>

www.flickr.com

<http://www.dispolab.sk/>, <http://www.e-mikroskopy.pl>

<http://www.fao.org/docrep/010/ai407e/AI407E24.htm>

<http://www.flmnh.ufl.edu/cowries/xPCR.gif.pagespeed.ic.pAblCJxOVT.png>

Autor	Ing. Libor Kalhotka, Ph.D. Ing. Lenka Dostálová Ing. Lenka Detvanová
Název titulu	POTRAVINÁŘSKÁ MIKROBIOLOGIE návody do cvičení
Vydavatel	Mendelova univerzita v Brně Zemědělská 1, 613 00 Brno
Vydání	První, 2015
Náklad	200 ks
Počet stran	63
Tisk	ASTRON studio CZ, a.s.; Veselská 699, 199 00 Praha 9 Neprošlo jazykovou úpravou.
ISBN	978-80-7509-259-5

Tato publikace je spolufinancována z Evropského sociálního fondu a státního rozpočtu České republiky.

Byla vydána za podpory projektu OP VK CZ.1.07/2.2.00/28.0302 Inovace studijních programů AF a ZF MENDELU směřující k vytvoření mezioborové integrace.



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ