

# Obsah

1	Úvod.....	6
2	Organizace laboratorních cvičení.....	7
2.1	Poznámky a protokoly.....	7
2.2	Bezpečnost a hygiena práce v mikrobiologické laboratoři.....	8
2.3	Zásady bezpečné práce v mikrobiologické laboratoři.....	9
2.4	První pomoc při mimořádnostech a úrazech.....	10
2.5	Další zásady práce v mikrobiologické laboratoři.....	10
3	Principy sterilního prostředí a aseptické práce.....	11
3.1	Sterilizační metody.....	11
3.1.1	Sterilizace povrchů.....	12
3.1.2	Sterilizace médií a laboratorního nádobí.....	12
4	Kultivační techniky.....	14
4.1	Média.....	14
4.2	Kultivace mikroorganismů.....	15
4.3	Příprava misek s pevným agarovým médiem.....	16
4.4	Techniky a způsoby očkování.....	17
4.4.1	Očkování na pevné půdy kličkou.....	17
4.4.2	Očkování na pevné půdy roztěrem.....	18
4.4.3	Přímý výsev do půdy.....	19
4.4.4	Kultivace mikroorganismů zachycených na membránových filtrech.....	19
4.4.5	Kontrola jakosti živných půd – práce s referenčními kmeny bakterií.....	20
4.5	Odběr, úprava a ředění vzorků vody.....	21
5	Vybrané mikroskopické techniky.....	23
5.1	Mikroskop – popis a zásady práce.....	23
5.1.1	Optický mikroskop a jeho základní součásti.....	23
5.1.2	Obecné zásady při práci s mikroskopem.....	26
5.2	Měření rozměrů objektů v mikroskopu.....	29
5.3	Práce s počítačí komůrkou.....	30
5.3.1	Práce s počítačí komůrkou typu Bürker.....	31
5.3.2	Práce s počítačí komůrkou typu Cyrus I.....	32
5.4	Stanovení mikroskopického obrazu (biosestonu a abiosestonu).....	34
	Počet org. v 1 ml.....	38
5.5	Stanovení objemové biomasy.....	41
5.6	Stanovení saprobního indexu.....	43
6	Barvicí metody.....	46
6.1	Barvení dle Grama.....	46
6.1.1	Provedení barvení dle Grama.....	47
6.2	Barvení mikromycet.....	48
6.3	Neisserovo barvení.....	49
7	Vliv vnějších faktorů na mikroorganismy.....	50
7.1	Stanovení citlivosti mikroorganismů k antibiotikům.....	50

7.2	Vliv ultrafialového záření na růst mikroorganismů.....	52
8	Mikrobiologické rozборы vod.....	54
8.1	Stanovení kultivovatelných mikroorganismů při 22 °C a 36 °C .....	54
8.2	Stanovení psychrofilních a mezofilních bakterií .....	56
8.3	Stanovení koliformních bakterií .....	58
8.4	Stanovení termotolerantních koliformních bakterií a <i>Escherichia coli</i> .....	61
8.5	Stanovení intestinálních enterokoků.....	63
9	Vybrané metody půdní mikrobiologie .....	66
9.1	Stanovení fosfolipidových mastných kyselin v půdě .....	66
9.2	Stanovení respirace půdy.....	71
9.3	Stanovení enzymových aktivit v půdě.....	73
9.3.1	Vyjadřování enzymových aktivit .....	73
9.3.2	Stanovení enzymových aktivit v půdě pomocí substrátů uvolňujících p-nitrofenol .....	74
9.3.3	Stanovení aktivity dehydrogenáz v půdě .....	76
10	Stanovení mikroorganismů přítomných ve vzduchu.....	78
10.1	Stanovení mikroorganismů ve vzduchu spadem.....	78
11	Bakteriální růstový test toxicity .....	79
12	Biochemické metody.....	86
12.1	Mikrobiální identifikace pomocí MikroLA-testu .....	86
12.1.1	Stanovení enterobakterií pomocí ENTEROtestu 16 .....	86
12.2	Stanovení koncentrace chlorofylu-a .....	90
13	Výpočty a vyhodnocování výsledků .....	92
13.1	Kultivační stanovení - výpočty .....	92
13.2	Mikroskopická stanovení - výpočty.....	94
13.3	Výpočty z růstových křivek .....	98
13.1	Vyhodnocení bakteriálního růstového testu toxicity - výpočet hodnoty IC50 .....	99
14	Přehled médií a roztoků.....	102
14.1	Kultivační média.....	102
14.1.1	LB (Luria Broth) .....	102
14.1.2	Plate Count Agar (PCA).....	102
14.1.3	Malt extract .....	102
14.1.4	Škrobový agar .....	102
14.1.5	Müller-Hintonův agar.....	103
14.1.6	Selektivní médium na stanovení mikromycet .....	103
14.1.7	Sabouraudův glukózový agar .....	103
14.1.8	Agar s kvasničným extraktem .....	104
14.1.9	Masopeptonový agar .....	104
14.1.10	Endo agar.....	104
14.1.11	m-FC agar .....	105
14.1.12	Médium dle Slanetz – Bartley (m-enterokokový agar) .....	105
14.1.13	Žluč-aeskulin-azidový agar .....	105
14.1.14	Médium pro kultivaci sladkovodních řas .....	106
14.2	Roztoky .....	107

---

14.2.1	Fyziologický roztok.....	107
14.2.2	Fosfátový pufr 0,066 M pH 7.....	107
14.2.3	Ringerův roztok.....	107
14.2.4	Roztok bazického fuchsinu .....	108
14.2.5	Roztok pro cytochromoxidázový test.....	108
14.2.6	Alkalický roztok kyseliny rosolové.....	108
14.3	Barviva.....	109
14.3.1	Krystalová violet'.....	109
14.3.2	Safranin .....	109
14.3.3	Methylenová modř .....	109
14.3.4	Lugolův roztok .....	109
14.3.5	Roztok 0,5 % TTC .....	109
14.3.6	Neisserovo činidlo.....	109
14.3.7	Laktofenol dle Amanna.....	110
15	Seznam literatury.....	111
15.1	Použité literární zdroje.....	111
15.2	Přehled použitých norem .....	111

# 1 Úvod

Předložená skripta jsou určena zejména studentům bakalářských programů Fakulty životního prostředí Univerzity Jana Evangelisty Purkyně v Ústí nad Labem jako pomůcka pro praktická laboratorní cvičení k mikrobiologicky zaměřeným předmětům, konkrétně 1MIKR-Mikrobiologie, 1MIHY-Mikrobiologie a hydrobiologie a 1LAHY-Laboratoře z hydrobiologie. Texty jsou určeny pro začátečníky v oboru mikrobiologie, proto se věnují základním technikám a návykům souvisejícím s dodržováním zásad aseptické práce. Popsány jsou nejprve základní mikrobiologické techniky (kultivace, mikroskopování apod.) a jednoduché základní úlohy, na kterých se tyto techniky procvičují. Mikrobiologické úlohy jsou věnovány posuzování environmentálních charakteristik prostředí, proto jsou detailně rozebírány vybrané jednoduché i pokročilejší metody pro analýzu mikroorganismů v základních složkách životního prostředí (voda, sedimenty, půda, vzduch). Kromě povinných laboratorních cvičení najdou tyto metody využití např. při přípravě závěrečných prací (bakalářského i magisterského programu), nebo i v rámci studentské vědecké činnosti. Návodů se zcela záměrně vyhýbají genetickým metodám, pro které existuje řada jiných specializovaných publikací. Na závěr jsou studentům k dispozici teoretické výpočetní úlohy k procvičování včetně řešených příkladů. K návodům doporučujeme ještě určovací klíč vodních organismů zaměřený na vodní ekosystémy Ústeckého kraje a Podkrušnohorské pánve, který byl z praktických důvodů vydán samostatně.

Jako autoři jsme se snažili, aby kromě cílových studentů předmětu Mikrobiologie našel text širší využití i u studentů z jiných fakult UJEP, popř. jiných vysokých škol a v neposlední řadě i u širší odborné veřejnosti.

V Ústí nad Labem únor 2014

Autoři.



## 2 Organizace laboratorních cvičení

### 2.1 Poznámky a protokoly

Ke každé činnosti v laboratoři je nutné přistupovat zodpovědně už od samého začátku. Nezbytnou pomůckou, která Vás doprovází při cvičeních, je záznamový blok (popř. sofistikovanější notebook), do kterého se doporučuje provádět veškeré záznamy, které slouží k pozdějšímu vyhodnocení dat a přípravě protokolu (umožní se identifikovat odchylky od postupu nebo eventuální chyby). Ideální je vést si laboratorní deník. Zapisovat by se měly jednotlivé práce, jejich nastavení (počáteční podmínky, původ a označení vzorků, způsob zpracování, kultivační teplota, doba kultivace, typ použitého média, ředící řada, doba experimentu apod.). Dále by se měly zapisovat primární výsledky, ze kterých se později vypočítají potřebné výstupní hodnoty. A v neposlední řadě je třeba zaznamenat abnormality, poruchy, chyby apod. **Poznámky dělejte pečlivě a čitelně** tak, aby byly jasné, stručné a hlavně srozumitelné i s delším časovým odstupem (např. pro další osoby, kolegy z pracovní skupiny, pedagogický dozor apod.).

Experimentální práce je pak završena přípravou pracovního protokolu. Smyslem protokolu je zdokumentovat provedenou práci tak, aby bylo možné ji později reprodukovat, odhalit případné experimentální chyby či identifikovat faktor, který způsobuje neočekávané výsledky. Protokol by měl být stručný a výstižný a měl by obsahovat všechny důležité údaje (navážky, inkubační dobu, primární i přepočítané výsledky apod.). Zejména je třeba zdůraznit a zdůvodnit případné odchylky od standardního postupu. Pokud zpracováváte nějaká statistická data (např. máte průměr z deseti měření), je třeba je doplnit alespoň základní statistickou charakteristikou (průměr  $\pm$  směrodatná odchylka apod.).

**Protokol by měl obsahovat tyto prvky:**

- Jména studentů, identifikaci skupiny, datum práce.
- Stručný princip práce (několik vět).
- Stručnou metodiku (není třeba opisovat postup z návodu, stačí se na něj odkázat, je ale třeba vypsát všechny odlišnosti a údaje potřebné pro další vyhodnocování, např. navážky, objemy či teploty).
- Primární nezpracované výsledky v podobě tabulek či grafů (např. počty mikroorganismů v jednotlivých polích počítací komůrky, počty narostlých kolonií apod.).
- Výsledky kultivačních stanovení se uvádějí v jednotkách KTJ, tj. kolonie tvořící jednotky (anglický ekvivalent CFU, Colony Forming Units). Tato jednotka vyjadřuje počty živých mikroorganismů schopných se na/v daném médiu rozmnožit. Výsledky se ještě vztahují na jednotku objemu vzorku (např. KTJ/100 ml nebo KTJ/ml).
- Přepočty primárních výsledků na porovnatelné rozumné veličiny (např. roztěry ze vzorku vody v počtech KTJ/ml apod.). Je nutné nepsat jen vzorce, ale i číselné dosazení, pak je možné lépe odhalit chybu.

- Stručný slovní závěr (např. „V testované vodě jsme zjistili  $XX \pm YY$  KTJ/ml“, „Neznámý mikroorganismus byl určen jako gramnegativní“ apod.).

*Vzorový protokol je uveden v příloze.*

Dále platí následující pravidla:

- Protokoly odevzdávejte **v písemné podobě**. Zpracovány by měly být na počítači, vytištěny ideálně oboustranně, v případě více stránek svázaný (nebo alespoň vloženy do desek) a s očíslovanými stránkami.
- V případě malých nedostatků bude protokol uznán na základě konzultace s vedoucím cvičení. V případě závažných nedostatků bude protokol vrácen k přepracování.
- Některé práce budou probíhat v menších skupinách 2 - 4 studentů, v takovém případě odevzdávejte pouze **jeden protokol za celou skupinu**. Stejně jako skupinová práce je dílem všech, je i protokol dílem všech a všichni by se měli podílet na jeho sepsání. Udělá-li protokol jen jeden člen skupiny, měli by si ho ostatní alespoň přečíst.

Při sepisování protokolů se snažte používat zdravý selský rozum. Občas se v protokolech objeví zjevně zcela nesmyslné výsledky, např. "v jednom ml vody jsme zjistili  $1,3 \times 10^9$  gramů mikroorganismů" (tj. 1 300 tun = dlouhý nákladní vlak plně naložený bakteriemi).

## 2.2 Bezpečnost a hygiena práce v mikrobiologické laboratoři

Každá laboratorní práce představuje potenciální riziko. Nesprávným postupem práce je možné ohrozit vlastní bezpečnost, bezpečnost ostatních, stejně jako způsobit materiální škody. Proto je bezpodmínečně nutné se seznámit se zásadami bezpečné laboratorní práce a tyto dodržovat. Na začátku cvičení stvrdí studenti svým podpisem, že byli se zásadami bezpečné práce seznámeni a že se zavazují je dodržovat.

Kromě běžných laboratorních rizik s sebou nese mikrobiologická práce i zvýšené zdravotní riziko vyplývající z práce se živými mikroorganismy, které mohou být potenciálně patogenní. I když v rámci výuky nebudou studenti pracovat přímo se známými patogeny, některé práce zahrnují kultivace nedefinované kultury (např. ze vzorků vody). Ačkoliv je zde riziko infekce malé, není nulové. Ke každému vzorku je nutné přistupovat s předpokladem, že je patogenní mikroorganismus přítomen.

## 2.3 Zásady bezpečné práce v mikrobiologické laboratoři

1. V laboratoři je dovoleno pracovat jen pod dohledem pedagogického pracovníka, provádět jen ty úkony, které povolí, a je nutné dodržovat jeho pokyny a nařízení.
2. Při práci je třeba se chránit přiměřenými ochrannými pomůckami. Každý musí mít oblečen ochranný plášť, v případě těsnějšího kontaktu s potenciálně nebezpečným materiálem (např. barvení preparátů) je třeba používat gumové rukavice.
3. V laboratoři je zakázáno jíst, pít a kouřit.
4. Je třeba dbát zvýšené hygieny. Při každém odchodu z laboratoře je třeba si důkladně umýt ruce mýdlem, v případě potřeby i dezinfekčním činidlem.
5. Dojde-li ke kontaminaci předmětu (např. oděvu, tašky apod.) mikrobiální kulturou, je třeba vždy provést dezinfekci, např. otřením dezinfekčním roztokem.
6. V laboratoři nesmí pracovat osoby, které by tím byly vystaveny výrazně zvýšenému zdravotnímu riziku. Jedná se např. o alergiky na některý mikroorganismus či látku, se kterou se pracuje, osoby s oslabeným imunitním systémem a těhotné ženy. Studenti stvrdí svým podpisem začátkem cvičení, že jim jejich zdravotní stav absolvování cvičení umožňuje.
7. Každý úraz, byť i jen oděrku, je třeba hlásit pedagogickému pracovníkovi, kvůli zvýšenému riziku infekce rány. V laboratoři je k dispozici lékárnička pro základní ošetření úrazů a dezinfekci ran.
8. Rozbité laboratorní sklo je třeba odkládat do zvláštní k tomu určené nádoby. Je-li kontaminováno mikrobiologickou kulturou, musí se před vyhozením dezinfikovat. **Rozbité sklo se nesmí sbírat rukou, ale vždy jen zametat.**
9. Každý laboratorní postup je třeba si promyslet, aby nedocházelo k závažným chybám a ohrožení zdraví či majetku.
10. Potenciálně nebezpečné operace je třeba dělat vždy jen předepsaným způsobem na určeném místě a s ohledem na bezpečnost svou i ostatních.
11. Při práci v blízkosti kahanu dbejte zvýšené opatrnosti, aby nedošlo k zahoření např. oděvu či vlasů.
12. Ke každé mikrobiální kultuře je třeba chovat se tak, jako by byla patogenní. Ke každé chemikálii je třeba se chovat tak, jako by byla prudce jedovatá.
13. Suspenze mikroorganismů je zakázáno pipetovat ústy, vždy je potřeba použít balónek, pipetovací nástavec nebo automatickou pipetu.

## 2.4 První pomoc při mimořádnostech a úrazech

Stane-li se Vám úraz či jiná mimořádnost, zanechte práce (vyjma odvrácení bezprostředního ohrožení dalších osob) a zavolejte pedagogický dozor, který poskytne první pomoc.

1. Dostane-li se mikrobiální kultura do úst, je třeba ústa vypláchnout a vykloktat dezinfekčním roztokem, např. 1%  $\text{KMnO}_4$  či zředěným Lugolovým roztokem.
2. Kontaminovanou pokožku je třeba otřít dezinfekčním činidlem, např. 0,1% ajatinem.
3. Při zasažení oka mikrobiologickým materiálem je třeba vypláchnout oko borovou vodou. V případě zasažení chemikálií, je třeba oko důkladně vypláchnout proudem vody a až poté borovou vodou.
4. Každou otevřenou ránu je třeba vydezinfikovat jodovou tinkturou nebo 3% peroxidem vodíku.

## 2.5 Další zásady práce v mikrobiologické laboratoři

1. V laboratoři je nutné udržovat pořádek. Úspěšnost většiny prací závisí na čistotě prostředí.
2. Po každé práci je třeba uklidit po sobě, zejména uvolnit své pracovní místo, umýt použité nádoby, očistit objektiv mikroskopu apod.
3. Použité mikrobiální kultury se musí po ukončení práce likvidovat, např. autoklávováním či roztokem dezinfekčního činidla.
4. Snažte se pracovat tiše, aby i ostatní měli klid na vlastní práci.



### 3 Principy sterilního prostředí a aseptické práce

Zásady dodržování sterilního prostředí a aseptické práce je alfou a omegou každého mikrobiologa. Sterilní prostředí a aseptická práce jsou základem úspěšné mikrobiologické práce. Při práci v mikrobiologické laboratoři je nutné si uvědomit, že mikroorganismy jsou všude okolo nás, jsou ve vzduchu, na kůži, ve vodě, apod., a pro úspěch experimentu (laboratorní práce, cvičení) je třeba je usmrtit nebo alespoň silně omezit.

#### Dodržujte tyto pokyny:

- Pracujte v čistém prostředí, kde se nepráší, nevíří prach apod. S tím souvisí např. i potřeba mít v laboratoři zavřená okna (dveře).
- Pracovní plochu si vždy vysterilujte, např. ajatinem nebo ethanolem.
- Pokud není k dispozici laminární box, pracujte v blízkém okolí zapáleného kahanu.
- Ruce si před prací umyjte řádně mýdlem, popř. i dezinfekčním činidlem.
- Pracujte systematicky, plynule, bezpečně a přesně. V žádném případě nepracujte zbrkle a zbytečně nespěchejte.
- Nikdy se nedotýkejte sterilních částí (tj. obvykle těch vnitřních) misek, baněk, zkumavek apod. nesterilními nástroji (to platí i pro holé ruce).
- Používejte pouze sterilní pomůcky. Ty pomůcky, které už přišly do styku s mikrobiální kulturou, znovu nepoužívejte.
- Nepokládejte sterilní pomůcky (pinzety, kličky, zátky apod.) přímo na pracovní plochu, i když byla před tím vysterilovaná. Neodnášejte je z laminárního boxu nebo z dosahu plamene kahanu.
- Otevíráte-li sterilní nádobu, dělejte to vždy co nejbližší u kahanu a jen po nezbytně nutnou dobu. Je-li to možné, sterilujte zátku i hrdlo baňky lehkým ožehnutím v plameni (pozor na zahoření!). Pokud potřebujete víčko položit, pokládejte ho vždy nesterilní (vnější) částí dopředu.
- Pokud pipetujete automatickou pipetou, zmačkněte ji do sací polohy ještě před ponořením do sterilní kapaliny, v opačném případě zabubláte do kapaliny málo sterilní vzduch s rizikem potenciální kontaminace vzorku.

#### 3.1 Sterilizační metody

V laboratoři se používají nejčastěji tyto sterilizační (sterilační) metody:

- **Vlhké teplo** je účinnější než suché a ještě vyšší účinnosti se dosahuje za vyššího tlaku. Zařízení pro sterilaci vlhkým teplem pod tlakem se nazývá **autokláv**. V autoklávu je možné sterilovat vše, co není citlivé na teplo, vlhko a tlak, např. média, nástroje, nádobí atd. (při znalosti snášenlivosti materiálu vůči provozované teplotě, např. skleněné láhve typu Duran mají na plastových víčkách vyznačenou i teplotu, které je plast schopný odolat, 145 °C, 160 °C apod.).

**Pozor! Autokláv je vysokotlaké zařízení, které smí obsluhovat jen řádně proškolená osoba, což student obvykle není.**

- **Suché teplo** nemá takovou sterilizační účinnost, a proto musí působit delší dobu (nejčastěji 2 h, ale často se nádoby nechává v sušárně přes noc). Používá se hlavně pro sterilizaci čistého nádobí, které je potřeba mít suché.
- Další způsob sterilizace, který lze použít v případě tekutin (tj. kapalin a plynů) citlivých na teplo, je **filtrace**, která probíhá přes filtr s menšími póry než je velikost bakteriálních buněk. Zařízení, ve kterém je možné pracovat sterilně v proudu filtrovaného vzduchu, se nazývá **laminární box** nebo též **flow-box**.
- **Chemické látky** se používají ke sterilizaci tam, kde není možné použít předchozí techniky a kde aplikace chemikálií nevedí. Příkladem je sterilizace povrchů ethanolem nebo ajatinem, dezinfekce vody chlorem apod. Chemikálie mohou být jak **mikrobicidní** (mikroorganismy zabíjejí), tak pouze **mikrobistatické** (brání rozmnožování mikroorganismů). Spektrum mikrobicidních látek je velké, např. oxidační činidla (peroxid vodíku, chlor apod.), kationaktivní detergenty (ajatin), alkoholy (ethanol) apod. Z mikrobistatických látek se nejčastěji používají antibiotika.
- **Záření** s dostatečnou energií (UV, gama) se nejčastěji používá pro sterilizaci nepravidelných povrchů, vzduchu a pro speciální aplikace. Tzv. **germicidní lampa** emituje UV záření o vlnové délce 260 až 290 nm, které má nejvyšší mikrobicidní účinky. Ozařování gama zářením se někdy používá pro speciální sterilizace, např. půdy.
- **Plamen** je velice účinný sterilizační prostředek, ale dost nebezpečný. Používá se pro sterilizaci kovových nástrojů (kličky, pinzety), skleněných pomůcek (Drigalskiho tyčinka, pipety) a též pro sterilizaci okolního vzduchu, není-li k dispozici laminární-box.

### 3.1.1 Sterilizace povrchů

Ke sterilizaci povrchů (pracovního stolu apod.) používáme v našich laboratořích buď 50 % roztok ethanolu nebo 0,1 % roztok ajatinu. Oba roztoky jsou k dispozici u výlevky ve stříčkách. Stříkněte přiměřenou dávku na sterilovaný povrch a rozetřete utěrkou (buničina, papír).

Podlahu je v případě potřeby možné dezinfikovat standardními mikrobicidními úklidovými prostředky typu SAVO.

Jinou možností je použití germicidní lampy; tyto operace ale provádí vyučující obvykle mezi cvičeními, např. přes noc.

### 3.1.2 Sterilizace médií a laboratorního nádobí

Všechna média používaná v rámci cvičení z mikrobiologie se sterilizují prostřednictvím autoklávu (nejčastěji při 121 °C, 0,1 MPa, 15 min). Podobně je možné sterilizovat většinu skleněného, porcelánového i kovového nádobí a též plastové výrobky, které tyto podmínky

vydrží (např. polypropylenové kádinky, plastové špičky k automatickým pipetám i s krabičkami, víčka od láhví typu „Pyrex“ apod.). Většina standardního mikrobiologického vybavení se vyrábí sterilizovatelná autoklávováním při těchto podmínkách, nicméně sterilizaci je vhodné nejprve vyzkoušet. Z nejčastěji používaného laboratorního materiálu nevydrží výše uvedené podmínky plastové polystyrenové misky; ty se dodávají už sterilní popř. aseptické z výroby a médium se na ně nalévá až při výrazně nižších teplotách (viz kapitola 4.3).

Čisté laboratorní sklo (zkumavky, Erlenmayerovy baňky, kádinky apod.) se obvykle sterilizuje v sušárně (160 °C, 2 h a déle). Sterilizaci tak lze účelně spojit s předchozím mytím.

Další metody sterilizace konkrétního vybavení jsou detailněji popsány u jednotlivých postupů v dalších kapitolách.

## 4 Kultivační techniky

Kultivace (pomnožení, pěstování) mikroorganismů představuje jeden ze základních pilířů mikrobiologické práce. Mikrobiologická práce má svá specifika, která je třeba respektovat. Mezi ty nejzákladnější patří následující:

- Mikroorganismy jsou obvykle rychle rostoucí objekty, a protože jsou prakticky všudypřítomné, je třeba při práci dbát na sterilitu prostředí, nástrojů, kultivačních médií a pečlivost aseptické práce.
- Různé mikroorganismy mají rozdílné nároky na svou výživu i podmínky kultivace. Proto je třeba vždy pečlivě zvážit složení kultivačního média, teplotu kultivace, dobu kultivace, aerobní/anaerobní podmínky, případnou aeraci a další specifické faktory.
- Kultivace trvá v závislosti na organismu řádově hodiny (přes noc) až několik týdnů (pomalu rostoucí mikroorganismy na hůře rozložitelných substrátech).

### 4.1 Média

Správná volba kultivačního média je základem úspěšné kultivace. Používaná média je možné rozdělit podle několika hledisek, a to:

- Podle původu lze rozdělit média na **přírozená** (mléko, krev, listí apod.), **syntetická** (jejichž složení je přesně definováno a jsou připravena z čistých chemikálií) a **polosyntetická** (obsahující některé živiny přesně definované a jiné směsné přírodního původu).
- Podle skupenství dělíme média na **kapalná** a **ztužená** (do formy gelu).
- Podle obsahu živin dělíme média na **bohatá** (všechny živiny jsou v nadbytku) a **limitovaná** (jedna živina nebo několik živin je záměrně v nedostatku).
- Podle selektivity dělíme média na **obecná** (roste na nich mnoho skupin mikroorganismů) a **selektivní** (roste na nich jen několik skupin mikroorganismů, ideálně jen jeden rod či druh).

Složení kultivačních médií je samozřejmě různé, nicméně každé médium má následující obecné složení:

- **Zdroj uhlíku.** Nejčastěji se používají sacharidy (glukóza), aminokyseliny, peptidy, lipidy, ale lze použít např. i uhlovodíky a jejich deriváty. Autotrofní mikroorganismy vyžadují jako zdroj uhlíku  $\text{CO}_2$ , pak je obvykle třeba dobrá aerace popř. přídavek uhličitanu nebo hydrogenuhličitanu. Při přípravě bohatých médií jsou populární hydrolyzáty bílkovin (pepton, trypton, dříve používané bujóny apod.), které představují současně zdroj uhlíku i dusíku.
- **Zdroj dusíku.** Dusík je základem většiny nezbytných biochemických látek (bílkoviny, nukleové kyseliny atd.). Nejobecnější jsou organické zdroje dusíku (např. aminokyseliny), ale většina mikroorganismů je schopná využít i amonné ionty, dusičnany a dusitany. Některé skupiny mikroorganismů jsou schopné fixovat i vzdušný dusík, pak je třeba dbát na dobré provzdušnění.

- **Zdroje dalších minerálních látek.** Zejména se jedná o zdroj fosforu (nejčastěji fosforečnany), síry (nejčastěji sírany), biogenních kovů (železa, mědi, zinku atd., obvykle v podobě iontů) a solí (zejména chlorid sodný a draselný).
- **Selektivní činidla,** způsobující omezení růstu některých skupin mikroorganismů. Jedná se např. o antibiotika.
- **Speciální látky pro auxotrofy.** Některé mikroorganismy (tzv. auxotrofní<sup>1</sup>) nemají schopnost syntetizovat si všechny své organické látky a některé je jim třeba přidávat do prostředí. Nejčastěji se jedná o některé aminokyseliny, vitamíny nebo lipidy.
- **Voda.** Bez vody život není a i pevná (ztužená) média mají obsah vody okolo 98 %.
- **Látky upravující pH,** např. pufrů.
- **Sole zvyšující salinitu** pro kultivaci halofilních (slanomilných) mikroorganismů.
- **Ztužovadlo** u ztužených médií (agar, který je rostlinného původu a želatina, která je živočišného původu).

**Ztužování** médií se provádí nejčastěji **agarem**. Agar je polysacharid (polygalaktóza) izolovaný z mořských řas. Většina mikroorganismů ho neumí rozkládat a využívat jako živinu. Agar taje při 96 °C a tuhne při 40 °C, čehož se využívá při ztužování médií, které je možné po sterilizaci za tepla rozlít a která po vychladnutí následně tuhnou.

**Selektivita** médií je možné dosáhnout v zásadě dvěma způsoby. **Negativní** selektivita se dosahuje přidáním mikrobistatických látek, které selektivně inhibují růst jen některých skupin mikroorganismů (tj. jsou pro ně toxické), zatímco jiné mikroorganismy neovlivňují. Nejčastěji se používají např. antibiotika nebo vhodná barviva (např. bengálská červeň pro inhibici růstu bakterií při kultivaci hub). **Pozitivní** selektivita se dosahuje použitím některé méně obvyklé živiny, kterou umí využít jen omezená skupina mikroorganismů. Např. mikroorganismy schopné odbourávat aromatické uhlovodíky, je možné odlišit od ostatních kultivací na toluenu jako jediném zdroji uhlíku a energie; bakterie schopné fixovat vzdušný dusík je možné izolovat na médiu bez zdroje dusíku apod.

## 4.2 Kultivace mikroorganismů

Mikroorganismy rostou obvykle za daných podmínek několik dní, vyžadují určitou teplotu vhodnou pro jejich růst, živiny a samozřejmě i aerobní/anaerobní podmínky (většina organismů, které se kultivují při rozbořech, běžně vyžadují přístup vzduchu; naproti tomu např. klostridia jsou obligátně anaerobní mikroorganismy, které kyslík zabíjí, navíc s fermentačním metabolismem, tj. nepotřebují externí oxidační činidlo).

**Ztužená média** se obvykle kultivují v termostatu s výměnou vzduchu. Misky se kultivují v tzv. **zavěšené poloze**, tj. dnem misky nahoru. Důvodem je kondenzace vody při kultivaci,

<sup>1</sup> Z řeckého *auxein* = zvýšený a *trofi* = výživa, jídlo. U vyšších organismů se tento termín používá málo, nicméně vyšší organotrofní organismy jsou obvykle auxotrofní ve vztahu k řadě organických látek, které pak nazýváme **esenciální**. Např. pro člověka je esenciálních 8 aminokyselin, řada mastných kyselin a další látky, obvykle nazývané vitamíny. U organotrofních mikroorganismů je ale auxotrofie málo obvyklá a proto se zdůrazňuje.

kteřá takto kape pouze na víčko, zatímco v opačném případě by kapala na agar a rozmývala rostoucí kulturu.

**Kapalná média** se obvykle kultivují v termostatané třepačce (vodní nebo vzduchové). Kapalně médium se nejčastěji umisťuje do kónické Erlenmayerovy baňky, popř. do kultivační láhve. Třepání zajišťuje dostatečnou aeraci kultury. Je ale třeba dát pozor na průchodnost zátky. Zátka nesmí být přikryta alobalem (kterým se kryje proti zvlhnutí v průběhu sterilace v autoklávu) a nesmí být ani mokrá, protože přes kapalinu prochází vzduch podstatně pomaleji. Přestupu vzduchu naopak pomáhají vhodné detergenty, musí být ale netoxické a v nízké koncentraci (např. polysorbát – TWEEN).

### 4.3 Příprava misek s pevným agarovým médiem

Média se nejčastěji ztužují agarem, obvykle v 1 – 2% koncentraci. Agarem ztužené médium se nejčastěji připravuje do zkumavek (tzv. šikmý agar) a na misky. Médium se rozlévá do sterilních misek po autoklávování za přiměřené teploty (cca 50 – 70 °C) ve sterilním prostředí (v okolí kahanu nebo v laminárním boxu, ideální je spuštění UV lampy při dodržování zásad bezpečné práce v laboratoři). Plastové misky jsou dodávány už od výrobce sterilní popř. aseptické (připravené v prostředí bez mikroorganismů, dezinfekce je většinou provedena kyselinou peroctovou), skleněné misky je třeba před tím vysterilovat v autoklávu nebo sušárně. Po zatuhnutí před prvním použitím se misky nechají kultivovat, aby se odhalily případné kontaminace (tj. pokud na čerstvě nalité misce naroste mikrobiální kultura, je třeba jí nepoužívat a zlikvidovat). Připravené misky se zatuhlým médiem by se měly stručně označit (použité médium, datum nalití) a to na spodní straně (nikoliv na víčko)<sup>2</sup>.

**Pomůcky:** Sterilní misky (plastové nebo skleněné), sterilizační láhve („pyrexky“), izolační rukavice (např. kuchyňské chňapky), kahan.

#### Postup:

1. Dle návodu na přípravu připravte požadované kapalně kultivační médium a nalijte ho do sterilizační láhve („pyrexky“).
2. Přidejte cca 1 - 2 % agaru (např. 15 g na 1 000 ml). Agar se při nízké teplotě nerozpustí ani při intenzivním míchání, nechte ho nejprve nabobtnat po dobu 15 min.
3. Sterilizujte médium v autoklávu.
4. Po skončení sterilizace nechte médium zchladnout na teplotu cca 70 °C.
5. Sterilujte pracovní stůl (ajatinem, ethanolem apod.) a zapalte kahan.
6. Připravte si na pracovní stůl sterilní misky. **Neotvírejte je a při vybalování dávejte pozor, aby se neotevřely.**
7. Sterilizační láhev držte v pravé ruce (vzhledem k vysoké teplotě použijte izolační rukavici), levou rukou lehce odklopte víčko misky a nalijte do misky přiměřenou dávku média tak, aby vznikla vrstva cca 0,5 cm tlustá (cca 15 ml média, které

<sup>2</sup> Popisování misek zespu a ne na víčko má dvojí význam. Popis misky je neoddelitelně spojený s vlastním médiem a kulturou a nemůže dojít k omylu např. záměnou víček. Dále to má i praktické využití např. při zběžné kontrole stavu nasazených misek (kultivace se provádí v zavěšené poloze, označení vzorku je na dně misky a tudíž přímo na očích).

rovnoměrně pokryje dno, ale nedosahuje horního okraje nalévané misky). Misku poté ihned přiklopte. Při nalévání média zásadně nedávejte víčko nalévané misky stranou, nepokládejte na pracovní stůl, ale stále víčko držte v levé ruce (pozice obou misek svírá ostrý úhel: připomíná písmeno „V“).

8. Po skončení rozlévání lehce ožehněte hrdlo lahve i zátku v plameni (opravdu jen lehce, aby plastové části nechytily nebo se nedeformovaly) a zavřete.
9. Počkejte, dokud agar v miskách nezatuhne. Po zatuhnutí se misky použijí pro naočkování mikroorganismů, a nebo se uloží do lednice pro potřeby další analýzy.

**Pozor! Při nalévání horkého média dbejte zvýšené opatrnosti; snadno může dojít k úrazu opařením** (vznikají nepříjemné popáleniny až druhého stupně, které se mohou hojit i několik týdnů)!

## 4.4 Techniky a způsoby očkování

Mikrobiologické metody jsou založeny na různém způsobu a technikách očkování, které jsou určeny charakterem očkovaného média a účelem stanovení. Ve zkumavkách se provádí očkování v tekutých kultivačních médiích (k tomuto očkování lze použít kličku či pipetu). V případě použití kličky se čistá kultura přenáší ze šikmého agarů do tekutého média; z tekutého média do tekutého média; z povrchu agarů na Petriho misce do tekutého média. Očkování pevných kultivačních médií lze provádět kličkou či pipetou a provádí se častěji, než očkování tekutých kultivačních médií. Ve zkumavkách lze provádět očkování kličkou na povrch šikmých agarů, očkování vpichem, přeočkování kultury z tekutého média na povrch pevného média. V případě očkování agarových ploten bakteriálních suspenzí za pomoci pipety se technika očkování vzorků provádí několika způsoby; jedná se o přímý výsev do kultivační pudy a nebo přímý výsev na povrch pudy.

### 4.4.1 Očkování na pevné pudy kličkou

K přeočkování mikroorganismu z kapalného nebo pevného média na ztužené médium se obvykle používá klička sterilovaná plamenem. Principem je zachycení malého množství čisté kultury mikroorganismů na očkovací kličce a její následné rozetření po ztuženém médiu. Pracujte ve sterilním prostředí laminárního boxu nebo v okolí kahanu.

**Pomůcky:** Kahan, očkovací klička, parafilm

#### Postup přeočkování z pevného média:

1. Sterilujte pracovní stůl (ajatinem, ethanolem apod.) a zapalte kahan.
2. Připravte si na stůl misky s již zatuhlým agarovým médiem a misky s přeočkovávaným mikroorganismem.
3. Sterilujte očkovací kličku v oxidační části plamene (tj. nad oranžovou redukční částí, cca uprostřed plamene). Klička by se měla viditelně rozpálit.
4. Otevřete původní misku a ochlaďte kličku buď o vnitřní stěnu či víčko (u skleněných misek) nebo o agar vpichem v oblasti, kde není viditelný nárůst mikroorganismů.

5. Naberte **malé** množství kultury na kličku.
6. Zavřete původní misku a otevřete novou.
7. Několika tahy rozetřete mikroorganismus po agarovém médiu.
8. Zavřete misku a vysterilujte znovu kličku.
9. Nechte novou misku inkubovat v inkubátoru v zavěšené poloze.
10. Na závěr se miska ještě obvykle obalí parafilmovou páskou.

Pro lepší manipulaci s miskami se doporučuje misky položit na pracovní stůl tak, aby byly umístěné dnem vzhůru. Při přeočkovávání následně v pravé ruce držíme kličku, kterou sterilizujeme v plameni a do levé ruky si bereme misku (dnem dolů) s koloniemi mikroorganismů, které chceme přeočkovat. Před nabráním zvolené kolonie kličkou, je důležité kličku po sterilizaci plamenem ochladit na volném prostoru média misky (vpichem), a teprve pak kulturu nabrat z misky, misku vrátit zpět a přeočkovat na čistou misku.

#### **Postup přeočkování z kapalného média:**

1. Sterilujte pracovní stůl (ajatinem, ethanolem apod.) a zapalte kahan.
2. Připravte si na stůl misky s připraveným ztuženým médiem a původní kapalnou kulturu.
3. Sterilujte očkovací kličku v oxidační části plamene (tj. nad oranžovou redukční částí, cca uprostřed plamene). Klička by se měla viditelně rozpálit.
4. Levou rukou otevřete baňku s kapalnou kulturou, zátku nepokládejte, ale držte ji stále v ruce (v dlani svírejte malíčkem proti palci).
5. Namočte kličku do kultury, aby se ochladila (měla by slyšitelně zasyčet).
6. Po zchladnutí lehce zamíchejte kličkou v médiu a vytáhněte ji z baňky.
7. Otevřete misku a několika tahy rozetřete mikroorganismus po agaru.
8. Zavřete misku.
9. Zátku i hrdlo baňky lehce ožehněte plamenem (pozor, aby zátka nechytila!) a zavřete.
10. Nechte novou misku inkubovat v inkubátoru v zavěšené poloze.
11. Na závěr se miska ještě obvykle obalí parafilmovou páskou.

Každá zaočkovaná miska se musí označit údaji o zaočkované kultuře, datem očkování popř. i jménem pracovníka a dalšími užitečnými údaji. Označení se provádí vždy na dno misky, nikoliv na víčko (viz poznámka pod čarou<sup>2</sup> na straně 16).

#### **4.4.2 Očkování na pevné půdy roztěrem**

Na povrch ztuhlého agarového média je možné napipetovat maximálně objem 1 ml vzorku (pro misky o průměru 90 mm; u menších misek se doporučuje maximální objem aplikovaného vzorku 0,5 ml). Naaplikovaný objem se rozetře po povrchu agarového média tak, aby rovnoměrně pokryl povrch. K rozetření lze použít sterilní Drigalskiho tyčinku („hokejku“).

Agarové médium by mělo být předsušené a zbavené nadbytečné vlhkosti. Pokud tomu tak není, je zasakování vzorku do agarového média zdlouhavější.



**Postup očkování na pevné půdy roztěrem:**

1. Sterilujte pracovní stůl (ajatinem, ethanolem apod.) a zapalte kahan.
2. Připravte si na stůl misky s připraveným ztuženým médiem a popište je na spodní stranu.
3. Připravte si roztíraný vzorek (obvykle jeho ředící řadu).
4. Levou rukou lehce odklopte víčko misky a kápněte potřebné množství vzorku (obvykle 0,1-1 ml) na misku.
5. Drigalskiho tyčinku namočte do ethanolu, zapalte plamenem kahanu a ethanol nechte shořet už mimo plamen. Tím se tyčinka sterilizuje.
6. Odklopte víčko a položte ho vedle vnitřní stranou vzhůru.
7. Tyčinkou rozetřete kapku po celé ploše misky dokud se nevsákne; levou rukou si můžete miskou pootáčet.
8. Misku opět přiklopte.
9. Před kultivací se miska obvykle ještě obalí parafilmovou páskou.

**4.4.3 Přímý výsev do půdy**

Stejným způsobem, který je popsán v kap. 4.3, můžete rozlévat i roztopené médium na dno Petriho misky s napipetovaným vzorkem (např. vody) či očkovaným mikroorganismem (viz metody stanovení kultivovatelných mikroorganismů při 22 °C a 36 °C). V tomto případě je zajištěn homogenní nárůst v celém objemu média. Je ale třeba dbát na to, aby agar byl vytemperovaný na přijatelnou teplotu (obvykle lehce přes 40 °C, při nižších teplotách už agar tuhne, vyšší teploty naopak bývají inhibující pro životaschopnost mikroorganismů).

**4.4.4 Kultivace mikroorganismů zachycených na membránových filtrech**

Pro stanovení mikroorganismů ve větších objemech slouží metoda membránové filtrace pomocí membránových filtrů a filtračního aparátu.

Principem metody je kvantitativní zachycení mikroorganismů na povrchu membránového filtru, který se přenáší na povrch selektivního kultivačního média a postupem popsáným v normách je kultivován předepsanou dobu při předepsané teplotě. Filtrační aparatura pro membránovou filtraci (s vývěvou) je složena většinou z jednoho, tří či pěti filtračních míst s uchycenými komínky. Uvnitř těchto trychtýřovitých komínek jsou rysky označující objem 50 ml a 100 ml, což usnadňuje aplikaci vzorku, kdy nemusíme používat odměrné nádoby. Na jednotlivé kovové plošky filtrační aparatury se umísťují membránové filtry Milipor s průměrem pórů nejčastěji 0,45 μm (ale lze použít i filtry o velikosti pórů menší, např. 0,22 μm pro klostridia apod.) a přichycují se trychtýřovitými komínky. Do takto vzniklého prostoru se pak aplikuje požadovaný objem sledovaného vzorku, spuštěním vývěvy se vzorek přefiltruje a kvantitativně se zachytí na povrchu filtru. K přenášení membránových filtrů na povrch médií se používá pinzeta. Při malém objemu filtrovaného vzorku (1 ml a méně) se kvůli lepšímu rozmístění případných mikroorganismů na filtru nejprve na filtr naleje cca 10 ml fyziologického roztoku a teprve poté vzorek. Pinzeta, trychtýřovité komínky a kovové

plošky filtrační aparatury se po filtraci vzorku důkladně sterilizují plamenem plynové pistole. Tuto sterilizaci není nutné provádět mezi filtrací stejného vzorku, jestliže se filtruje od menšího ředění/objemu k většímu.

#### 4.4.5 Kontrola jakosti živných půd – práce s referenčními kmeny bakterií

V mikrobiologické laboratoři se provádí mikrobiologická stanovení, využívající základní, specifická, selektivní a konfirmační média, u kterých je nutné provádět kontroly jakosti a správnost přípravy. V tomto návodu je uveden postup ožívování referenčních kmenů bakterií (např. psychofilní, mezofilní, kultivovatelné při 22 °C a 36 °C, koliformní, enterokoky a termotolerantní bakterie). Pro potřeby kontroly je vhodné používat referenční kmeny bakterií (viz Tabulka 1). Kmeny CCM (*Czech Collection of Microorganisms*) jsou dodávány v želatinových discích (20 disků v 1 lahvičce).

##### Postup ožívování kmenů:

- Před ožívováním kmenů je nutné si připravit do zkumavek šikmý agar (půda Nutrient agar, lze použít i PCA). Zkumavka s čerstvě nalitým agarem se přenesse do ledničky, aby došlo k rychlému zchlazení a vytvoření kondenzní vody na šikmém agaru. Agar se nechá ztuhnout.
- Lahvička s disky bakterií se vyndá z ledničky a ponechá se 10 min při pokojové teplotě z důvodu zamezení kondenzace vody v lahvičce. Podle tabulky 1 se zvolí CCM kmen podle typu půdy, kterou je potřeba testovat.
- Vyžíhanou a lehce teplou kličkou (očkovací jehlou) se lehce dotkne želatinového disku tak, aby se přilepil na jehlu a bylo ho možné přenést do kondenzní vody na šikmém agaru. V případě, kdy se nevytvoří kondenzní voda, přidá se pár kapek bujónu.
- Zkumavka s přeneseným želatinovým diskem se nechá inkubovat cca 6 h při optimální teplotě (pro dané stanovení).
- Poté se zkumavka nakloní tak, aby došlo k přelití plochy šikmého agaru suspenzí bakterií, a znovu se zkumavka vloží do termostatu.
- Doba inkubace při optimální teplotě trvá 24 – 48 h.
- Takto připravené a oživené kmeny je možné uchovávat v chladicím boxu do doby stanovení.

##### Postup pro zjištění jakosti živné půdy:

- Po oživení kmenů ze želatinových disků se použijí CCM kmeny pro zjištění a otestování jakosti připravené živné půdy.
- Připraví se misky s nalitou ztuhlou živnou půdou pro jednotlivá mikrobiologická stanovení.
- Z termostatu, popř. z chladicího boxu se vyndá zkumavka se šikmým agarem s bakteriemi.
- Nad kahanem se vyžihá očkovací jehla, zchladí se o agar a bakteriální suspenze se přenesse na testovanou misku se živnou půdou. Mezi jednotlivými očkovacími tahy se jehla vyžihá.

- Po naočkování se miska inkubuje při optimální teplotě 24 - 48 h.

### Příprava kmenů pro laboratorní testování:

- Pro potřeby testování např. inhibičních účinků látek a materiálů a pro potřeby ověřování metod je možné aplikovat disk přímo do fyziologického roztoku v ředící lahvičce a temperovat 24 h při teplotě 36 °C v termostatu. Oživené mikroorganismy z disku lze pak v objemu přímo aplikovat dále na misky.

**Tabulka 1. Použití kmenů pro otestování jakosti připravovaných půd**

Médium (stanovení)	Kontrolní kmen	Kontrola vitality	
		Růst	Barva kolonie
Nutrient Agar (mezofilní a psychofilní) Agar s kvasničným extraktem PCA	<i>E. coli</i> CCM 3954	+	
Endo agar (koliformní)	<i>E. coli</i> CCM 3954	+	Červená, kovový lesk
Slanetz-Bartley Médium (enterokoky)	<i>E. faecalis</i> CCM 4224	+	Červenohnědá
Žluč-aeskulin-azidový agar (enterokoky)	<i>E. faecalis</i> CCM 4224	+	Hydrolyza esculinu
m-FC Agar (+FD058) (termotolerantní)	<i>E. coli</i> CCM 3954	+ (44,5 °C)	Modrá
	<i>E. faecalis</i> CCM 4224	-	

## 4.5 Odběr, úprava a ředění vzorků vody

Správnost provedení odběru vzorku je nezbytným předpokladem věrohodnosti a použitelnosti dosažených výsledků. Důležitá je i volba vhodného profilu odběrového místa. Odběr se provádí do sterilních skleněných lahví se zabroušenou zátkou o objemu 200 až 500 ml (překryté hliníkovou fólií). Při odběru z vodovodního kohoutku se voda nechá odtékat po dobu nejméně 5 minut; u hlubokých vrtů se používají odběrné nádoby. Z údolních nádrží a vodárenských objektů se vzorek odebírá vždy 15 až 20 cm pod hladinou (nikdy z hladiny). Vzorkovnice se plní do 4/5 objemu. Nutné je dodržovat zásady při transportu vzorku. Uchovávání vzorku se provádí v chladničce při teplotě 4 °C. V laboratoři se vzorky skladují v chladu a temnu v lednici a zpracovávají se maximálně do 24 h od doby odběru.

Před analýzou se vzorky nechají temperovat na laboratorní teplotu, před očkovaním se vzorek protřepe, za aseptických podmínek se dále pipetuje či odměruje potřebný objem k analýze. Vzorky pitné vody popř. katarobní vody se nezředí, pro stanovení psychofilních a mezofilních bakterií se pipetuje objem 1 ml, pro stanovení koliformních bakterií se zpracovává 10 ml, popř. 100 ml vzorku (filtrace přes membránový filtr).

Vzorky znečištěných vod je nutné před vlastní analýzou **zředit**. Zředování se provádí v reagenčních lahvičkách se zabroušenou zátkou o objemu 50 ml (eventuálně lze použít i zkumavky o menších objemech, pak se následně dopočítá potřebný objem média a vzorku).

**Pozor! Při ředění se zachovává následující řada ředění 1:10.** Je-li potřeba ředit na 0,001 (tj.  $10^{-3}$ ) použijí se 3 lahvičky, každá s 9 ml sterilního zředovacího roztoku (fyziologický roztok), do nichž se pipetuje vždy 1 ml z předchozího ředění. Vždy se použije nová pipeta či špička. Jako zředovacího roztoku se vylučuje používání destilované a vodovodní vody; bezpečně lze použít Ringerův roztok ve čtvrtinové koncentraci.

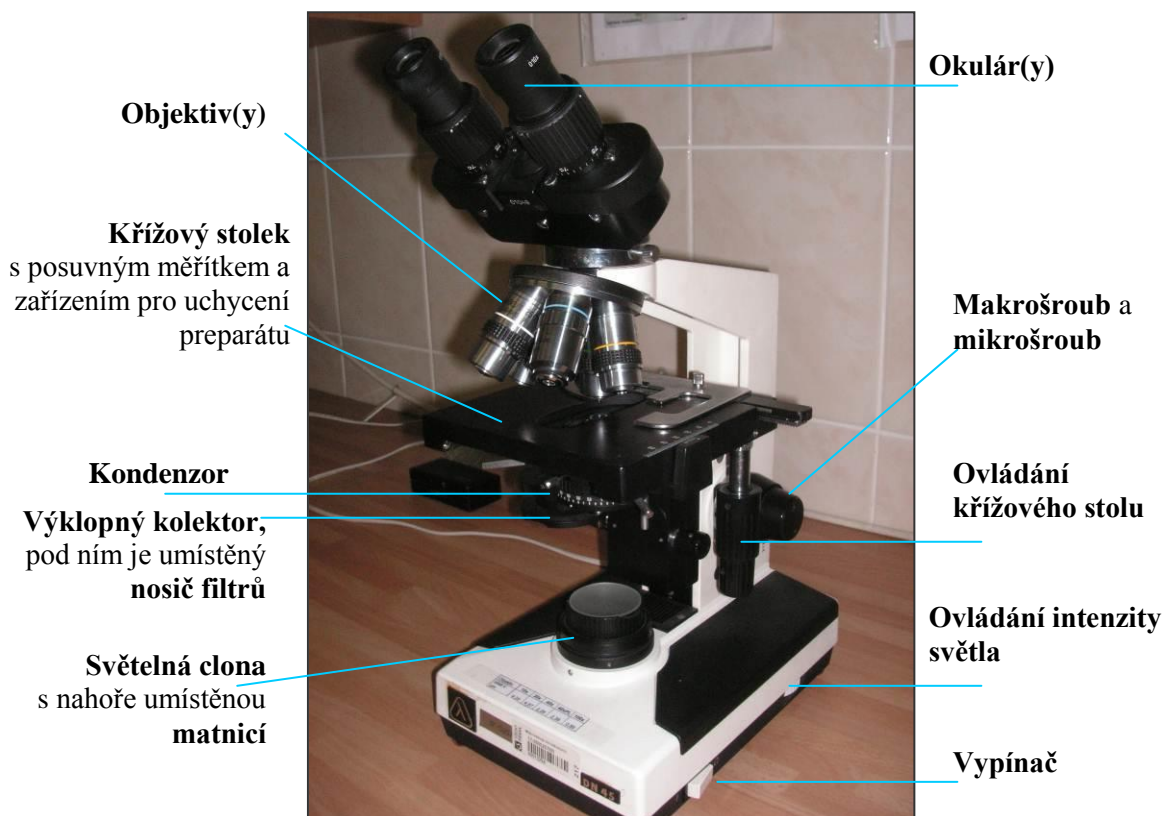
**Poznámka:** V případě odběru vzorků, které jsou určeny pro stanovení mikroskopického obrazu, saprobního indexu, objemové biomasy, chlorofylu-a apod., se k odběru používají skleněné nebo PE předem vymyté lahve o objemu 100 ml až 300 ml. Druh odběru, místo a bod se řídí účelem rozboru a místními podmínkami. Odebraný vzorek musí reprezentovat jakost vody v místě odběru. Při odběru vzorku povrchové vody se řídí postup odběru dle možnosti a dostupnosti vzorkovacího místa. Pro odběr specifických společenstev se používají speciální odběrové pomůcky. Vzorek pro stanovení se odebere do lahvičky, která se vypláchne odebíranou vodou a poté se naplní vzorkem do 4/5 objemu.

## 5 Vybrané mikroskopické techniky

### 5.1 Mikroskop – popis a zásady práce

#### 5.1.1 Optický mikroskop a jeho základní součásti

Mikroskop je optický přístroj, který umožňuje pozorování drobných objektů, které jsou menší, než je rozlišovací schopnost lidského oka. Principem fungování je optické propojení dvou čoček (**objektivu** a **okuláru**), jejichž zvětšení se ve výsledku násobí. V laboratoři mikrobiologie pracoviště FŽP UJEP se používá mikroskop typu Lambda DN45, který je přesný a biologicko-laboratorní optický přístroj (viz Obr. 1). Podle potřeby je možné mikroskop doplňovat dalšími doplňkovými přístroji a pomůckami, které rozšiřují jeho konečné použití. K mikroskopu je možné doplnit např. fluorescenční nástavec, který umožňuje při vhodné volbě filtračních optických kvyet pozorovat fluorescenčně barvené preparáty či objekty s autofluorescencí (v praxi se nejčastěji využívá autofluorescence chlorofylu-a u fotosynteticky aktivních organismů pro potvrzení jejich vitality (Obr. 2).



Obr. 1. Binokulární světelný mikroskop

**Mechanickou část** mikroskopu představuje **stativ**, což je pevné rameno s revolverovou hlavicí pro umístění objektivů a objímkou pro okuláry a nástavce. Dále má dva zaostřovací posuvy. Základnu tvoří obdélníková noha s vestavěným osvětlením s regulací intenzity světla a **clonou**, pomocí které se regulují světelné paprsky přicházející do mikroskopu (je doplněna rozptylovým filtrem, tj. **matnicí**). Stůl s křížovým vodičem preparátu, tzv. **křížový stolek**, s úchytným zařízením pro připravený preparát, je konstruovaný tak, že umožňuje posun preparátu ve dvou směrech na sebe kolmých, a je navíc doplněn Vernierovým měřítkem (**nónius**). Uprostřed stolku je otvor, kterým prochází světelné paprsky vedené z osvětlovací části mikroskopu.

Pod stolkem, často po stranách nohy mikroskopu, je **makrometrický** a **mikrometrický šroub**. Makrometrický šroub se používá pro posun křížového stolku s preparátem směrem od a k objektivu. Slouží po zaostření objektu, tzn. že se pomocí makrometrického šroubu dostaneme na určitou *pracovní vzdálenost*. Mikrometrický šroub slouží již jen k doostření struktury pozorovaného objektu, tzn., že pomocí mikrometrického šroubu jsme na určité *hloubce ostrosti*.

Podstatnou částí mikroskopu je **část optická**, která se skládá ze dvou základních soustav čoček, kterými jsou **okulár**<sup>3</sup> (blíže k oku) a **objektiv** (blíže k pozorovanému objektu), které jsou od sebe odděleny tubusem a fungují jako spojky. Okuláry a objektivy mají své speciální zvětšení a rozlišovací schopnost a jsou snadno vyměnitelné (tahem, vyšroubováním).

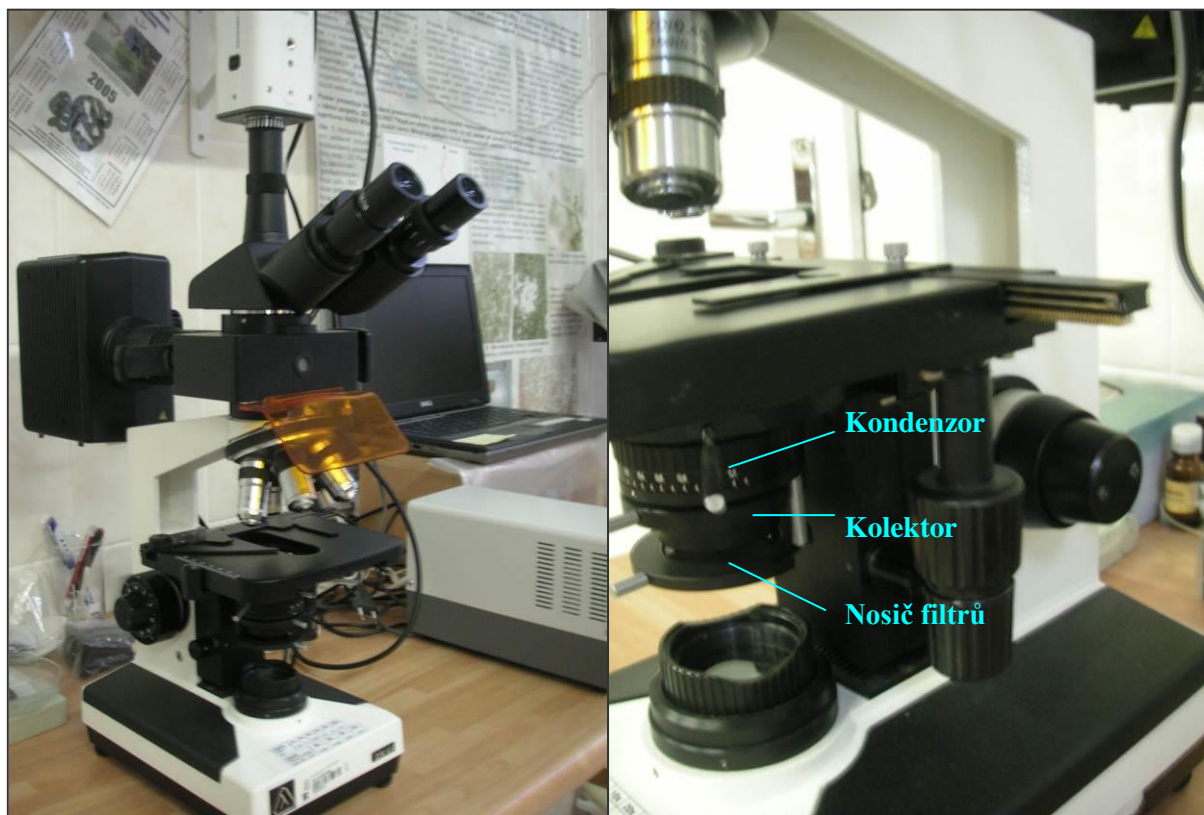
Optickou součástí mikroskopu, neméně důležitou, je soustava čoček kondenzoru umístěná v tělese pod stolkem mikroskopu. **Kondenzor** soustřeďuje světelné paprsky do roviny pozorovaného objektu. Součástí kondenzoru bývá často výklopný pomocný kolektor, který upravuje velikost osvětleného pole v předmětové rovině, pod ním jsou nosiče filtrů. Při použití žlutozeleného filtru se potlačí sekundární spektrum (barevné orámování obrazu), vložením světla modrého nebo modrého filtru se ztlumí světlo a zlepší rozlišení objektů.

**Okulár** zvětšuje obraz, který je vytvořený objektivem. Zvětšení okuláru je uvedeno na jeho plášti. Nejčastěji používaný typ okulárového zvětšení je O10×, popř. O15×. V mikroskopické praxi existují i další typy okulárů, nejen různých zvětšení, ale také jeho konečného využití, např. měřicí okulár (měřicí stupnice, mřížka, kříž, apod.) nebo okulár s ukazovátkem. *Měřicí okulár* O10×M10 (popř. O15×M10), který se používá pro proměřování objektů, má speciálně vloženou stupnici s 0,1 mm intervalem. *Ukazovací okulár* s uvnitř umístěnou šipkou umožňuje názorné označení vybraného objektu v pozorovaném preparátu, slouží pro prezentaci hodnoceného preparátu a např. pro didaktické účely.

**Objektiv** zvětšuje pozorovaný objekt. Pro pozorování detailů je důležité zvětšení objektivu. Běžně dodávanou sadou zvětšení objektivů u mikroskopu jsou objektivy se zvětšením 4× (červený pruh na plášti), 10× (žlutý pruh na plášti), 20× (zelený pruh na plášti), 40× (světle modrý pruh na plášti) a 100× (dva černé pruhy či bílé pruhy na plášti, tzv. imerzní objektiv).

<sup>3</sup> Z latinského oculus = oko

Při detailním pozorování objektivu lze na jeho plášti spatřit vyrytá čísla, která udávají mechanickou tubusovou vzdálenost/tloušťku krycího skla a zvětšení objektivu/numerickou aperturu. Rozlišující barevné pruhy jsou v souladu s platnými normami (viz Obr. 3).



Obr. 2. Mikroskop LAMBDA typu DN45 s fluorescenčním nástavcem a trinokulární hlavicí vyvedenou prostřednictvím videokamery do počítače. Detail kondenzoru s výklopným kolektorem a nónius.

100 udává **zvětšení objektivu** / 1,25 udává **numerickou aperturu**

160 udává **mechanickou tubusovou vzdálenost** / 0,17 udává **tloušťku krycího skla**



Obr. 3. Vlevo imerzní objektiv (100×), vpravo suchý objektiv (40×).

Numerická apertura, tj. rozlišovací schopnost čočky rozlišit určitý rozměr struktury, se při pozorování objektivem daného zvětšení nastavuje na kondenzoru, čímž se získá nejlepší pozorovací schopnost objektivu. S numerickou aperturou souvisí index lomu světla a další optické vlastnosti. Optické vlastnosti objektivu jsou velmi zásadní, protože čočky mají určité vady, které znemožňují nerušené pozorování objektů včetně jejich detailů (barevné neboli chromatické aberace, kulové neboli sférické aberace). Při mikroskopování je velmi důležitý index lomu světla, který v závislosti na prostředí, daném typem preparátu, znemožňuje snadnost pozorování a rozlišování objektů. Suché objektivy nevyžadují díky nízké apertuře zvláštní prostředí mezi krycím sklíčkem a čočkou objektivu (viz text výše, zvětšení 4×, 10×, 20×, 40×). V případě, kdy je potřeba zvýšit aperturu zvýšením indexu lomu prostředí, které je mezi krycím sklíčkem a objektivem, se používají imerzní objektivy (zvětšení 100×). Ke zvýšení indexu lomu prostředí se používají imerzní tekutiny, např. cedrový olej, glycerin, vodní imerze apod., které se aplikují pomocí kapátka na povrch pozorovaného preparátu. Přesnost aplikace imerzní tekutiny je zásadní pro pozorování, imerzní kapka zachytí podstatně širší kužel paprsků. **Suché objektivy se nikdy nepoužívají jako imerzní!**

Podle použité sestavy okuláru a objektivu je možné vypočítat celkové zvětšení mikroskopu vynásobením zvětšení objektivu zvětšením okuláru, tj. 10× zvětšení objektivu a 40× zvětšení okuláru udává obraz celkově zvětšený 400×.

Mikroskopy mohou mít různým způsobem konstruovanou okulárovou optickou část, podle toho se rozlišují mikroskopy s jedním okulárem, jako tzv. **monokulární**, dva okuláry mají **binokulární** (nejčastější v běžných laboratořích). Hlavici s okuláry lze kdykoliv jednoduše odpojit a nasadit jiný tubus např. speciálně upravený pro fotoaparát nebo kameru. V ideálním případě je k dispozici varianta binokulárního mikroskopu s vlastním uchycením kamery umožňujícím současné pozorování objektu examínátorem i kamerou, v tomto případě se jedná o tzv. **trinokulární** mikroskop (třetí optická cesta vyvedená přes kameru na televizní obrazovku nebo do počítače).

### 5.1.2 Obecné zásady při práci s mikroskopem

1. Pro pozorování mikroskopem je vhodné zvolit místo, které je méně osvětlené (vyjma fluorescenční mikroskopie není ale pozorování v úplně zatemnělé místnosti vhodné).
2. Při instalaci objektivů do revolverových hlavic je vhodné osadit jednotlivé závity objektivů od nejnižší po nejvyšší zvětšení. Důvodem je usnadněná manipulace při pozorování objektu s narůstajícím zvětšením (po přesném zaostření objektu objektivem je obraz zhruba zaostřen pro další objektivy, tj. při změně objektivu o větším zvětšení postačuje jemné doladění mikrošroubem).
3. Podstatné je **seřízení mikroskopu**. Stolek mikroskopu posuneme směrem dolů pomocí posuvu, umístíme preparát tak, aby ležel ve středu průhledového otvoru clony. Do funkce zařadíme objektiv se zvětšením 4×, kondenzor posuneme na horní doraz, seřídíme numerickou aperturu pro daný typ objektivu, do funkce zařadíme výklopný



evropský  
sociální  
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost

UNIVERZITA J. E. PURKYNĚ V ÚSTÍ NAD LABEM



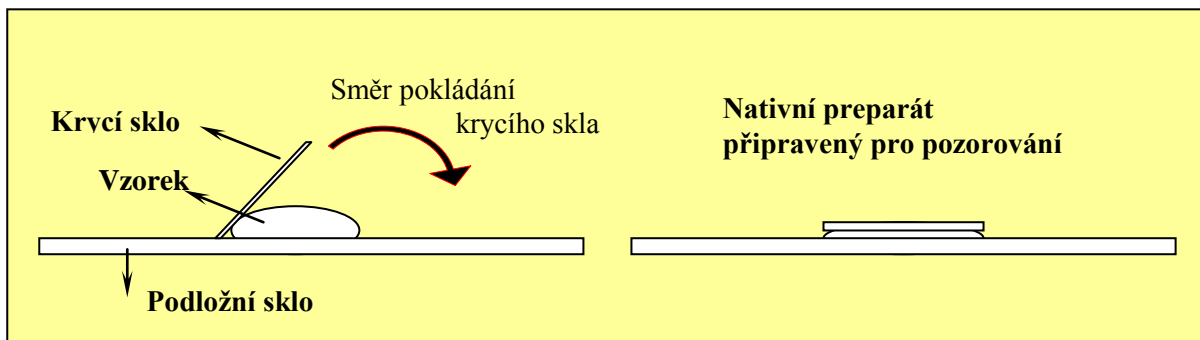
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ  
CZ.1.07/2.2.00/28.0205 - ENVIMOD



kolektor. Prsteneček, který ovládá posuv lampového kolektoru (v obdélníkovém podstavci mikroskopu), seřídíme tak, aby jeho bílá (stříbrná) značka ležela proti indexu. Úplně otevřeme clonu, do prstence lze vložit matnici. Zapneme osvětlení mikroskopu a přiblížíme stolek s preparátem do blízkosti objektivu, pozorujeme a doostřujeme. Optimální intenzity docílíme pomocí točítka, umístěného z boku obdélníkového podstavce mikroskopu. Dále je důležité na binokulární hlavici nastavit správný oční rozestup tak, abychom viděli pouze jeden obraz pozorovaného objektu. Při pohybu rozestupu okulárů se mění hodnota na stupnici. Číselný údaj, který odečteme na stupnici očního rozestupu, bychom měli nastavit i na hlavičce okulárového tubusu (rozdíl hodnot odečtených na obou hlavičkách okulárových tubusů udává dioptrický rozdíl očí).

4. Součástí seřízení mikroskopu je provedení základního **nastavení osvětlovací soustavy dle Köhlera**. Na mikroskopu dáme do funkce objektiv 10×, na kondenzoru nastavíme požadovanou numerickou aperturu, z funkce vyřadíme výklopný kolektor. Umístíme preparát do křížového úponu stolku, zaostříme obraz. Vyjmeme matnici z polní clony, upravíme intenzitu osvětlení a clonu téměř uzavřeme. Pomocí vertikálního posuvu nosiče s kondenzorem (oboustranně je ovládaný točítka) zaostříme obraz clony do předmětové roviny objektu (preparátu). Obraz clony vystředíme pomocí středících šroubů, otevřeme polní clonu tak, aby její obraz zmizel těsně za okraj zorného pole. Tímto postupem je mikroskop seřízený, můžeme již mikroskopovat a pracovat bez další speciální úpravy a seřizování při dalších použitých zvětšeních objektivů.
5. Před **pozorováním imerzním objektivem 100×** je vhodné preparát nejprve pozorovat suchým objektivem silného zvětšení, připravit si pozorovaný objekt do správné pozice, vystředit a připravit příznivé osvětlení. Snížíme kondenzor a na jeho čelní čočku nanese tenkou vrstvu imerzního oleje (bez bublinek a prachu!). Kondenzor opět zvýšíme tak, aby se kapka oleje spojila se spodní stranou podložního skla. Tímto postupem se připraví tzv. *kondenzorová imerze*, bez které není možné dosáhnout plné numerické apertury kondenzoru. (V běžné praxi se většinou tento postup zanedbává a rutinně nepoužívá. Běžnější je spíše postup, který následuje po nastavení kondenzorové imerze, v textu je popsán dále.). Preparát oddálíme od objektivu. Na místo, které budeme pozorovat, opatrně nanese kapku imerzního oleje. Do pozice zařadíme imerzní objektiv. Makrošroubem posouváme preparát směrem k čočce objektivu, přitom z boku pozorujeme moment, kdy se kapka spojí s čelní čočkou objektivu. Dalším pomalým posuvem čočku nepatrně ponoříme do oleje. Nastavíme potřebnou numerickou aperturu (zde 1,25). Po skončení práce s preparátem je nutné čočky důkladně vyčistit!
6. Parametry vztahující se na mikroskopování jsou **hloubka ostrosti** a **pracovní vzdálenost**. Hloubka ostrosti udává, že mikroskop zobrazí ostře jen ty struktury, které jsou v určité vzdálenosti od čočky objektivu. Pracovní vzdálenost představuje prostor mezi čelní čočkou objektivu a krycím sklíčkem preparátu.

7. Důležitým parametrem je **numerická apertura**, která má vliv na rozlišovací schopnost objektivu (tzn., že u objektivů není rozhodující zvětšení), vhodně použitá se správně nastaveným světlem.
8. **Zvětšování** celkového zvětšení mikroskopu nemá význam při překročení pětistého až tisícího násobku numerické apertury použitého objektivu. Při překročení tohoto parametru dochází k tzv. prázdnému zvětšení, kdy obraz pozorovaného objektu je sice větší, ale nejsou u něho rozlišeny další podrobnosti<sup>4</sup>.
9. Důležitá je **správná příprava preparátu**. K přípravě preparátu je potřeba vzorek, mikropipetka (Pasteurova pipeta, kapátko apod.), podložní sklo a krycí sklo. Mikropipetkou se odebere vzorek a přibližně kapka se přenese na střed podložního skla. Krycí sklíčko se hranou položí na okraj kapky pod úhlem méně než 90° a pomalu se pokládá ve směru kapky do doby, než se povrch kapky neslije s povrchem krycího sklíčka (viz Obr. 4). Tento postup položení krycího sklíčka zamezí vytvoření bublinek v preparátu.



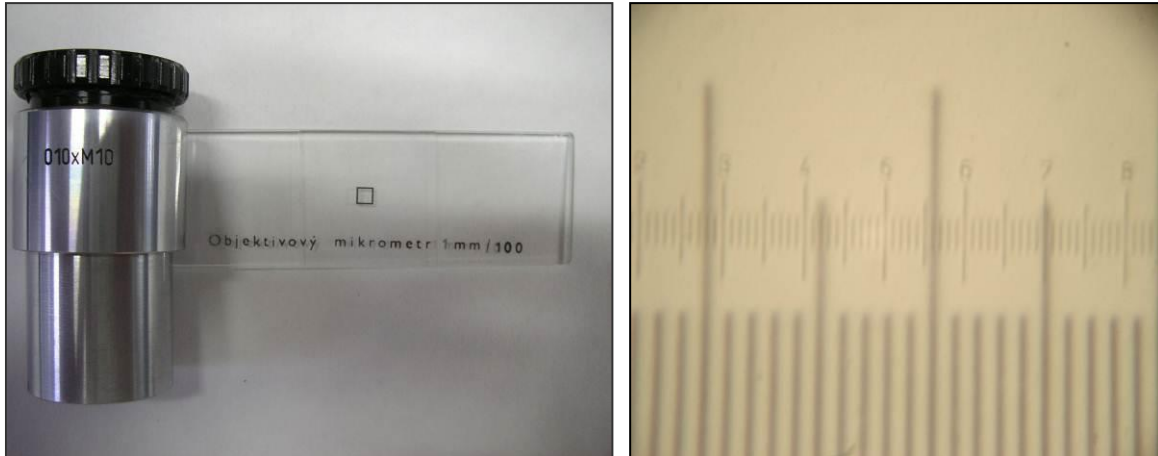
Obr. 4. Příprava nativního preparátu určeného pro přímé mikroskopické pozorování.

10. Při **pozorování neznámého objektu** (prvotní práce) je doporučeno začít pozorovat při nejnižší sestavě objektivů a okulárů.

<sup>4</sup> Limitujícím faktorem pro optické pozorování je vlnová délka použitého záření. Z fyzikální podstaty světla není možné i při sebevětším zvětšení odlišit body, které jsou blíže než je vlnová délka záření. U viditelné části elektromagnetického spektra jsou to řádově stovky nanometrů. Uvážíme-li, že typická bakterie je tyčinkovitá o délce 2 000 - 4 000 nm a průměru cca 500 nm, můžeme ve viditelném světle pozorovat maximálně její tvar, subcelulární částice (bičíky, fimbrie apod.) už jsou pod rozlišovací schopností a pro jejich vizualizaci je třeba použít mikroskop elektronový.

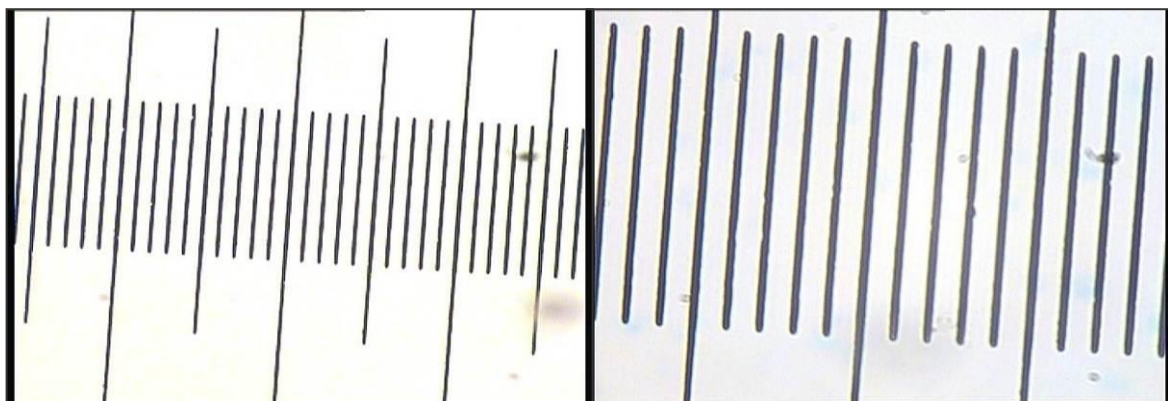
## 5.2 Měření rozměrů objektů v mikroskopu

Při pozorování objektů pod mikroskopem je vhodné znát i jejich velikost, což je důležité pro další taxonomii či pro posuzování např. separačních technologií. Pro zjištění velikosti pozorovaného objektu slouží tzv. **měřicí okulár** s uvnitř umístěným měřítkem se stupnicí o intervalu 0,1 mm (viz Obr. 5).



Obr. 5. Vlevo – Měřicí okulár a objektivový mikrometr. Vpravo – Způsob překrytí měřítka měřicího okuláru (menší stupnice označená čísly) a objektivového mikrometru (větší stupnice umístěné na fotografii vespuďu).

Aby bylo možné měřítko měřicího okuláru použít pro zjišťování velikosti, je nutné provést proměření mikroskopu pro všechny používané objektivy. Důvodem je fakt, že měřítko okulárové je pouze pomocné a slouží ke stanovení počtu dílků obsažených v měřené délce objektu (tento počet se bude lišit v závislosti na použitém objektivu, viz Obr. 6). Proměření se týká daného mikroskopu a je nepřenosné a nepoužitelné pro jiný druh a typ mikroskopu.



Obr. 6. Vlevo – Pohled na objektivový mikrometr při 10× zvětšení objektivu. Vpravo - Pohled na objektivový mikrometr při 20× zvětšení objektivu.

Proměření mikroskopu je založeno na stanovení pomocného měřítka, ke kterému potřebujeme **měřicí okulár**, obsahující okulárový mikrometr, a dále pak **objektivový mikrometr**, což je v podstatě podložní sklíčko s uprostřed vyrytým čtverečkem, kde 1 mm je dělený na 100 dílků (tzn., že 1 dílek odpovídá 0,01 mm).

Na křížový stolek mikroskopu se umístí objektivový mikrometr, jeho měřítko se zaostří a namísto jednoho okuláru se umístí měřicí okulár. Současně jsou viditelná dvě měřítka vedle sebe, tj. okulárové a objektivové (viz Obr. 5). Měřítka se dále upraví tak, aby měla stejnou orientaci a aby se překrývala. Libovolná ryska okulárového měřítka se přesně nastaví na jednu z rysek objektivového měřítka a hledá se, které další dvě rysky se překrývají, neboli se shodují. V úseku vymezeném shodujícími se ryskami se spočítá počet dílků na okulárovém ( $y$ ) a počet dílků na objektivovém měřítku ( $y'$ ), zjistí se velikost jednoho dílku okulárového měřítka odpovídající určitému (použitému) objektivovému zvětšení (viz rovnice).

$$1 \text{ dílek} = \left( \frac{y'}{y} \right) \times 0,01 \text{ mm}$$

Takto zjištěná hodnota velikosti jednoho dílku při určitém zvětšení objektivu se používá pro zjištění velikosti pozorovaného objektu (počet dílků obsažených v měřené délce objektu se násobí zjištěnou hodnotou velikosti jednoho dílku). Postup proměřování se opakuje u všech typů objektivů z příslušenství mikroskopu.

**Poznámka:** Velikost pozorovaných objektů větších rozměrů, jako jsou např. mikromycety, vláknité bakterie, řasy, sinice, apod., ne detaily (!), lze zjistit přibližně za použití počítačích komůrek, např. typu CYRUS I, která se v praxi používá velmi často. Počítací mřížka této komůrky je rozdělená na čtverečky ( $250 \times 250 \mu\text{m}$ ,  $125 \times 125 \mu\text{m}$ ) a obdélníčky ( $125 \times 250 \mu\text{m}$ ), velikost dělek je při používání různých objektivů konstantní. Znalost těchto parametrů je vhodná při zjišťování velikostních kategorií vložek, dále organismů menších než  $100 \mu\text{m}$ . Použití počítačích komůrek je popsáno v kapitole 5.3.

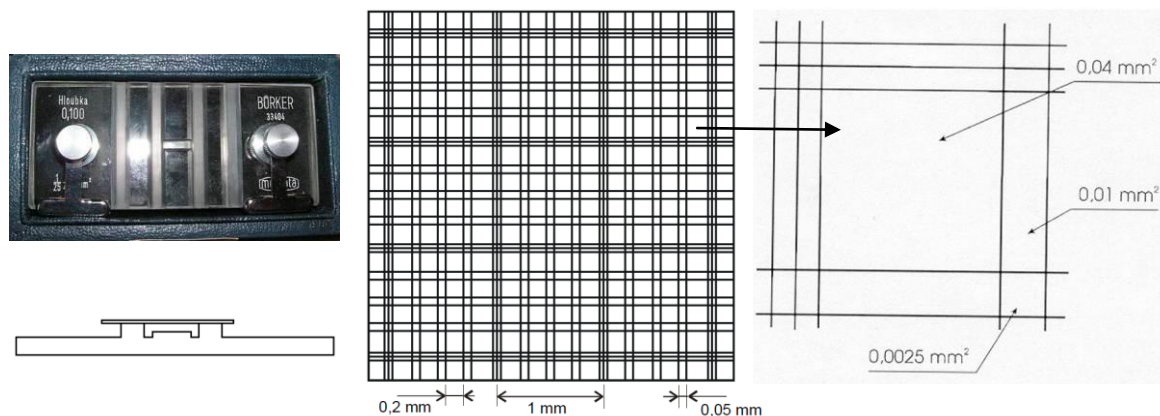
### 5.3 Práce s počítačí komůrkou

Počítací komůrka je neocenitelný nástroj pro mikroskopické stanovení koncentrace mikroorganismů v suspenzi. Jedná se o speciální mikroskopické podložní sklo, ve kterém je většinou uprostřed na horní ploše zbroušena komůrka do určité definované hloubky. Na dně zábrusu je následně počítačí mřížka definovaných rozměrů. Díky důmyslnému uspořádání mřížky, je možné na zvolené ploše kvantitativně vyhodnotit mikroskopicky posuzovaný vzorek.

Existuje několik typů počítačích komůrek, mezi nejrozšířenější patří Bürker komůrka, dále pak Cyrus I a Cyrus II.

### 5.3.1 Práce s počítací komůrkou typu Bürker

Počítací komůrka typu Bürker má hloubku 0,1 mm, na dně jsou vybroušeny velké čtverce o ploše  $0,04 \text{ mm}^2$ , malé čtverce o ploše  $0,0025 \text{ mm}^2$  a obdélníkové pásy, viz obrázky vzhledu komůrky a rastru (perokresba znázorňuje boční pohled komůrky, následně jsou připojeny obrázky zobrazující komůrku a její počítací síť (Obr. 7) a příklad postupu prošetřování komůrky a zaznamenávání počtu buněk (Obr. 8).



Obr. 7. Vlevo – Pohled na počítací komůrku shora a z boku. Uprostřed – rastr počítací komůrky. Vpravo – detail základního čtverce a přesné rozměry.

**Pomůcky:** Mikroskop, počítací komůrka, krycí sklíčko, Pasteurova pipeta (kapátko).

#### Postup:

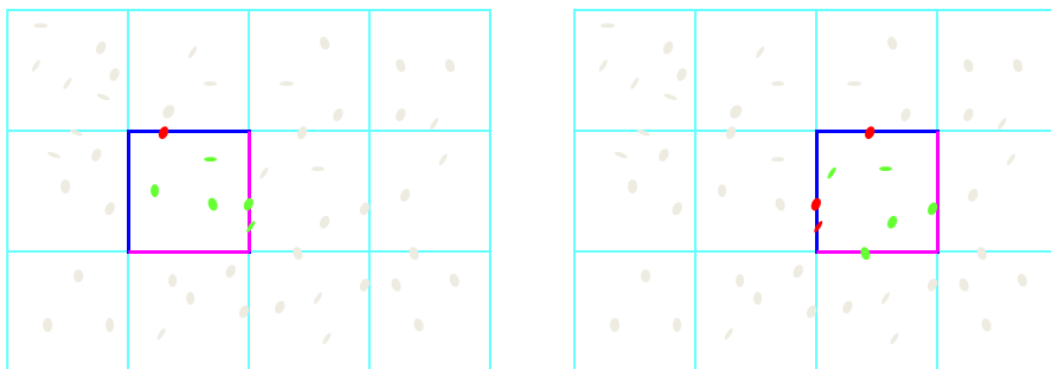
1. Opatrně povolte šrouby na počítací komůrce a odsuňte držáky sklíčka stranou.
2. Do vyryté komůrky kápněte **malé** množství buněčné suspenze.
3. Přikryjte krycím sklíčkem tak, aby nevznikly bubliny a přebytečná kapalina otekla do přilehlých drážek.
4. Přisuňte držáky sklíčka a opatrně ale pevně je utáhněte.
5. Pozorujte pod mikroskopem při zvětšení  $100\times$ ,  $200\times$  nebo  $400\times$ .

#### Vyhodnocení:

Spočítejte počet buněk nejméně v 10 čtvercích (pokud je koncentrace nízká, je vhodnější počítat množství ve více čtvercích, pro minimalizaci chyby se doporučuje dopočítat se celkem nejméně 300 organismů). Buňky, které přesahují z jednoho čtverce do druhého, počítejte vždy jen na dvou sousedních stranách čtverce (Obr. 8). Na volbě stran nezáleží, ale musí být dodržena v celém počítání. Z výsledků 10 čtverců vypočítejte aritmetický průměr a směrodatnou odchylku (nejlépe za pomoci počítače) a výsledek přepočítejte na skutečnou koncentraci buněk v suspenzi.

**Poznámky a komentáře:**

1. Počítací komůrka bývá hluboká „jen“ 0,1 mm, nicméně při 400× zvětšení se jedná o značnou hloubku. Aby bylo možné zaostřit jak na buňky, tak na rastr (mřížku) na dně komůrky, je nutné nastavit vysokou clonu světla. Intenzitu osvětlení lze ještě ovlivnit regulačním potenciometrem, který je na mikroskopu vpravo dole.
2. Počítání v počítací komůrce je vhodné spíše pro buňky kvasinek nebo řas, než přímo pro bakterie. Pro bakterie se příliš nehodí, neboť většina bakterií je při zvětšení 400× bez obarvení obtížně pozorovatelná. Vzhledem k tloušťce komůrky není možné použít zvětšení 1 000×.
3. V kultuře kvasinek či řas je i příměs bakterií, které se nepočítají. Rozpoznat malé bakteriální a velké kvasinkové buňky by neměl být problém.
4. Je-li počet buněk ve čtverci natolik velký, že je prakticky nemožné je přesně spočítat, je nutné kulturu příslušně zředit vodou nebo fyziologickým roztokem. V takovém případě ale dejte pozor na správný přepoččet ředění na výslednou koncentraci.



**Obr. 8.** Schématické znázornění práce s počítací komůrkou – čtverce a rozptýlené buňky (např. kvasinek), barevně ohraničený čtverec je čtvercem, ve kterém probíhá kvantifikace, zelené body jsou buňky počítané na čtverci, červené body jsou buňky už nezahrnuté do kvantifikace.

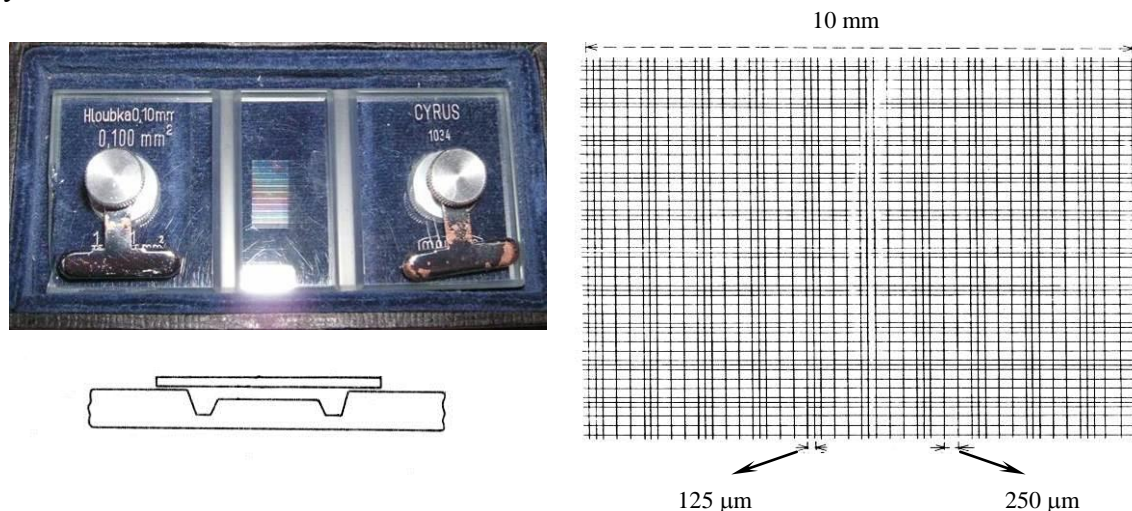
### 5.3.2 Práce s počítací komůrkou typu Cyrus I

Počítací komůrka typu Cyrus I je na horní ploše uprostřed zbroušena do hloubky 0,1 mm, na dně tohoto zábrusu je na ploše 100 mm<sup>2</sup> mřížka (počítací síťka) definovaných rozměrů. Ve svislém i vodorovném směru je mřížka tvořena liniemi vzdálenými od sebe 0,25 mm, které tvoří primární čtverce o ploše 0,0625 mm<sup>2</sup> (další linie jsou ve vzdálenosti 0,125 mm). Po stranách plošného zábrusu, rovnoběžně s kratší stranou komůrky, jsou vybroušeny dvě hluboké rýhy o profilu písmene „V“, kterými je odváděna přebytečná kapalina při plnění komůrky. Parametry počítací komůrky jsou: hloubka 0,1 mm, šířka 10 mm, plocha 100 mm<sup>2</sup> a objem 10 mm<sup>3</sup>, viz Obr. 9.

Podle technologie výroby mřížky lze komůrky rozdělit do dvou skupin, na leptané (ryté) přímo do skla komůrky (linie mřížky jsou průsvitné) a na leptané do chromové vrstvy nanesené na skle komůrky (linie mřížky jsou neprůhledné). Komůrky s neprůhlednými a

černými liniemi jsou nevhodné pro pozorování drobnějších objektů a mikroorganismů, protože často dochází k jejich překrytí, čímž je znemožněno nejen určování organismů, ale také jejich správná kvantifikace. Černý rastr může také negativně ovlivnit případné semikvantitativní vyhodnocení pole pokrývnosti abiosestonem za použití metody analýzy obrazu (viz ČSN 75 7713).

**Poznámka:** Alternativně lze použít počítací komůrku Cyrus II, která se od komůrky Cyrus I liší především menší hloubkou. Mřížka je přehlednější než u jiných typů komůrek. Menší hloubka umožňuje počítání drobnějších organismů (bezbarví bičíkovci apod.), dále je vhodná pro vzorky s vysokou koncentrací biosestonu, pro odpadní vody a vzorky aktivovaného kalu. Počítací komůrka Cyrus II není vhodná pro počítání vzorků pitné a podzemní vody a běžně oživených vzorků povrchové vody. Malý objem komůrky (0,005 ml) zvyšuje variabilitu výsledků.



Obr. 9. Pohled na počítací komůrku Cyrus I. Vlevo – Pohled shora a z boku. Vpravo – Pohled na rastr a základní rozměry polí.

### Postup:

1. Opatrně povolte šrouby na počítací komůrce a odsuňte držáky sklíčka stranou.
2. Do vyryté komůrky kápněte **malé** množství zahuštěného vzorku (zahuštění centrifugací).
3. Přikryjte krycím sklíčkem tak, aby nevznikly bubliny a přebytečná kapalina otekla do přilehlých drážek.
4. Přisuňte držáky sklíčka a opatrně ale pevně je utáhněte.
5. Pozorujte pod mikroskopem při zvětšení 100×, 200× nebo 400×.
6. Vyberte si určitý počet polí (pásů), které budete vyšetřovat. V lepším případě, pokud je zastoupeno málo organismů, vyhodnoťte celou komůrku.
7. Údaj o počtu vyhodnocených polí (pásů) si pečlivě zaznamenejte. K tomuto počtu polí se bude pak vztahovat množství spočítaných organismů (objektů).

### Vyhodnocení:

Zjištěný počet organismů, při znalosti počítané plochy, hloubky komůrky a ředění, lze pak

jednoduše převést na celkový počet organismů v objemu, který odpovídá 1  $\mu\text{l}$  (viz vzorec).

$$N_{org. \text{ v } 1 \mu\text{l}} = N_{org.} / (\text{počítaná plocha v } \text{mm}^2 \times \text{hloubka komůrky v } \text{mm} \times \text{ředění})$$

**Poznámka:** Při práci s komůrkou typu Cyrus I se v praxi používají častěji pro vyhodnocení počtu jedinců v 1 ml vzorku vody přepočítávací koeficienty ( $f$ ) podle toho, kolik pásů komůrky se vyšetří a na jaký objem se vzorek odstředil (viz vzorec). Blíže o tomto způsobu výpočtu je uvedeno u metody zaměřené na stanovení mikroskopického obrazu (stanovení biosestonu a abiosestonu).

## 5.4 Stanovení mikroskopického obrazu (biosestonu a abiosestonu)

Metoda se používá pro stanovení mikroskopického obrazu biosestonu a abiosestonu ve vodě. Zkouška se používá ke zjištění jakosti povrchové (podzemní) vody, pitné vody, v průběhu úpravy a po úpravě při akumulaci a distribuci. Stanovení mikroskopického obrazu ruší větší množství suspendovaných nerozpuštěných látek. Stanovení abiosestonu (pokryvnosti) ruší vyšší obsah živých organismů.

**Podstata metody:** Metoda stanovení mikroskopického obrazu je založena na taxonomickém určení druhů, popř. vyšších taxonomických skupin, a počtů těchto mikroorganismů ve vzorku zahuštěném centrifugací pod mikroskopem s fluorescenční lampou. Metoda stanovení abiosestonu je založena na stanovení pokryvnosti zorného pole mikroskopu částicemi zahuštěnými odstředěním vzorku vody.

**Chemikálie:** Během rozboru se používá demineralizovaná voda pro případné ředění vzorků a pro čištění komůrek. Pro promytí centrifugačních zkušavek se používá čistý ethanol, pro případné nejasnosti při taxonomickém určování Lugolův roztok.

### Přístroje a pomůcky:

- Binokulární mikroskop s přídatným fluorescenčním zařízením.
- Laboratorní odstředivka s výkyvným rotorem.
- Centrifugační zkušavky kónicky zúžené s ostrou špičkou o objemu 10 ml (s kalibrací na 0,2 ml, 0,5 ml, 1 ml a 10 ml).
- Počítací komůrka typu Cyrus I (alternativně počítací komůrka typu Cyrus II).
- Pasteurovy pipety (mikropipetky).
- Kádinka s destilovanou vodou.
- Preparační jehla.
- Jednorázové ubrousky.

### Postup zkoušky:

Celá zkouška zahrnuje tři fáze, a to zahuštění vzorku centrifugací, stanovení biosestonu (přítomné organismy, živé a mrtvé) a stanovení abiosestonu (doprovodné částice).



**1. Fáze - zahuštění vzorku:**

1. Do centrifugační zkumavky se odměří 10 ml promíchaného vzorku a po dobu 5 min se odstředí v centrifuze, o průměr rotoru 0,08 m, při otáčkách  $2\,000\text{ ot.min}^{-1}$  (při použití jiného typu odstředivky se musí velikost otáček přepočítat).
2. Po odstředění se vzorek slije tak, aby sediment zůstal ve zkumavce. Vodu ulpěnou na stěnách zkumavky spojíme se zbytkem tak, že provedeme opakovanou centrifugaci vzorku, která může být kratší (obvykle stačí 1 minuta). Poté už vzorek nesléváme.
3. Vzorek se opatrně promíchá opakovaným nasáváním a vypouštěním mikropipetkou a poté se kapka přenesse do počítací komůrky.

**2. Fáze - stanovení biosestonu:**

1. Pod mikroskopem se určí druhy nebo taxonomické skupiny a vyjádří se jejich počet.
2. Počet se zjišťuje na ploše celé komůrky nebo na určitém počtu pruhů.
3. Při práci s komůrkou typu Cyrus I se pro vyhodnocení počtu jedinců v 1 ml vzorku vody používají přepočítávací koeficienty ( $f$ ) podle toho, kolik pásů komůrky se vyšetří a na jaký objem se vzorek odstředil.

$$f = \frac{K}{n} \cdot v \cdot 10$$

kde:  $K$  je 1600 (počet čtverců na rastru počítací komůrky Cyrus I),  $n$  je vyšetřený počet polí (čtverců),  $v$  je odstředěný zbytek.

4. Při práci s komůrkou typu Cyrus II se pro vyhodnocení počtu jedinců v 1 ml vzorku vody používají přepočítávací koeficienty ( $f$ ) podle toho, kolik pásů komůrky se vyšetří a na jaký objem se vzorek odstředil.

$$f = \frac{K}{n} \cdot v \cdot 200$$

kde:  $K$  je 2500 (počet čtverců na rastru počítací komůrky Cyrus II),  $n$  je vyšetřený počet polí (čtverců),  $v$  je odstředěný zbytek.

5. Při rozborech se používá fluorescenční lampa ke zjištění životaschopnosti mikroorganismů. Podstatou vitality je autofluorescence asimilačních pigmentů v buňce, kdy živé buňky září pod fluorescencí červeně.

**Poznámky a komentáře:**

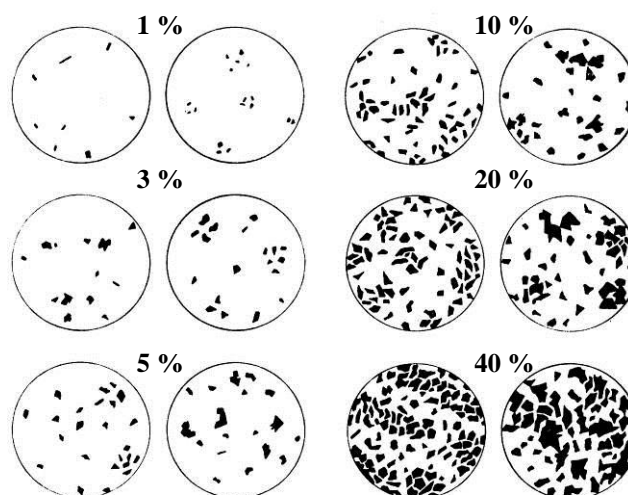
1. Zjišťuje se počet jedinců či individuí přítomných ve vzorku a výsledkem je počet organismů v 1 ml vzorku vody. U zahuštěných vzorků, kde není možné kvalifikovaně stanovit počet organismů v 1 ml, lze použít i semikvantitativní údaj o míře abundance jednotlivých zástupců taxonomických skupin.
2. Pro kvantifikaci organismů je důležité vymezení pojmu “jedinec”, kterým se rozumí v souvislosti s normou ČSN 75 7712 pro biologický rozbor samostatně žijící

vícebuněčný či jednobuněčný organismus či individuum, buňka, kolonie či cenobium o velikosti v průměru do 100  $\mu\text{m}$ , vlákno do 100  $\mu\text{m}$ . Při překročení uvedených velikostních mezí se zaznamenávají násobky.

3. Výběr způsobu kvantifikace, tj. zda počítat buňky či jedince, se odvíjí od účelu hydrobiologického rozboru. Pro vodárenské účely a hodnocení separační účinnosti jsou vhodné údaje o počtu buněk.
4. V případě masivního vodního květu se volí např. procento pokryvnosti, u kokálních sinic vyhovuje stanovení počtu buněk v koloniích a odhad na ploše 100  $\mu\text{m}$   $\times$  100  $\mu\text{m}$  (menší kolonie než 100  $\mu\text{m}$  se počítají bez ohledu na počet buněk jako jeden jedinec).
5. U vláknitých sinic se používá velikostní mez 100  $\mu\text{m}$  a překročení této délky se vyjadřuje jako její násobek. U zástupců rozsivek rodů *Synedra*, *Asterionella*, *Meridion*, *Fragilaria* a zlatých řas rodů *Dinobryon*, *Synura*, *Uroglena* se udává počet v koloniích, u cenobiálních zelených řas rodů *Pandorina*, *Eudorina* se používá údaj o velikosti plochy. Větší zástupci konzumentů, např. nálevníci, vířníci či korýši jsou individui.

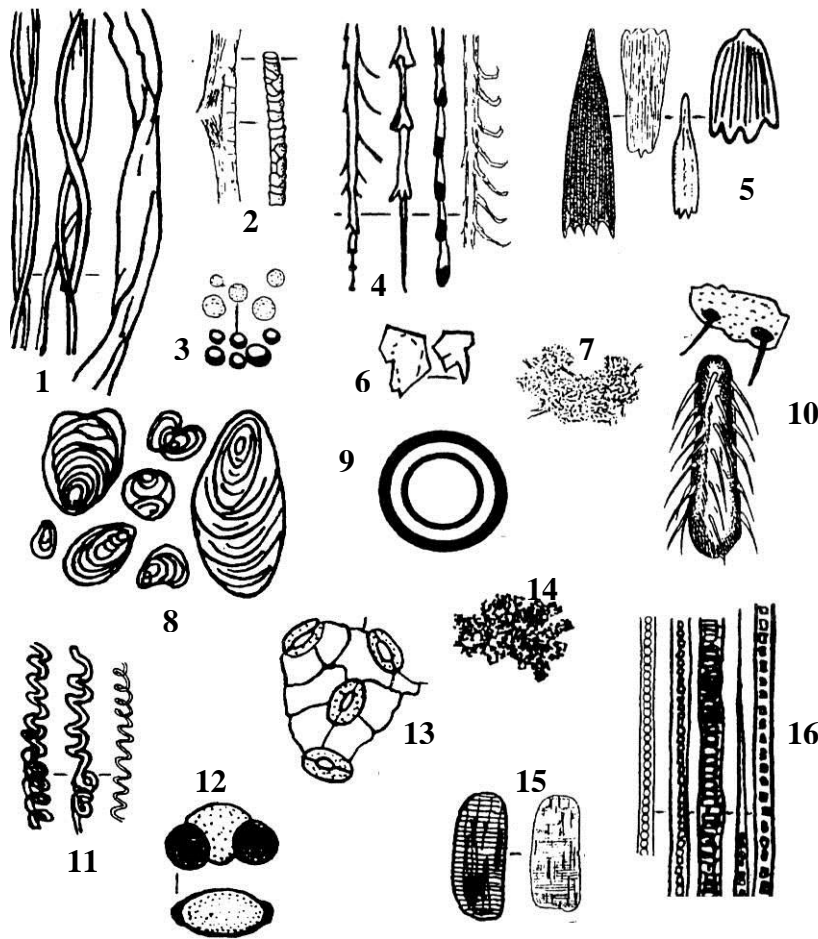
#### 4. Fáze – Stanovení abiosestonu:

1. V případě stanovení abiosestonu se při 200 $\times$  násobném celkovém zvětšení mikroskopu porovná pokrytí zorného pole s odhadovou stupnicí (viz Obr. 10). Tímto způsobem se zjistí celková abundance abiosestonu.
2. Pro potřeby detailnější analýzy je potřeba zjistit typ alochtonních či autochtonních částic abiosestonu (např. Obr. 11).
3. U jednotlivých typů částic je vhodné uvést i jejich abundanci (hojnost). Hojnost částic lze uvádět slovně či číselně. Stupně hojnosti: 1 (ojediněle, pod 1 %), 2 (roztroušeně, 1 % - 3 %), 3 (řídce, 3 % - 10 %), 5 (hojně, 10 % - 20 %), 7 (velmi hojně, 20 % - 40 %) a 9 (hromadně, nad 40 %).



Obr. 10. Způsob stanovení pokryvnosti abiosestonu na základě odhadové stupnice. Pozorování při celkovém 200 $\times$  zvětšení.

4. Pokryvnost pole v mikroskopu se vyjádří v % pokryvnosti, vyjádří se slovně podíl detritu a anorganických částic.



Obr. 11. Nejběžnější částice abiosestonu: (1) vlákna bavlny, (2) vlákna vlny, (3) olejové krůpěje, (4) ptačí peří, (5) motýlí šupiny, (6) štěpiny křemičité horniny, (7) detritus, tj. neidentifikovatelné organické zbytky, (8) škrobová zrna brambor, (9) vzduchová bublina, (10) zbytky chitinu hmyzu, (11) vlákna rostlinného pletiva, (12) pylové zrno, zde borovice, (13) list s průduchy, (14) sraženina železa, (15) saze, (16) krysí chlupy.

#### Poznámky a komentáře:

1. Pro určení typu autochtonních a allochtonních částic se používá obrazová tabule z ČSN 75 7713.
2. Abioseston u vody určené pro pitné účely by neměl přesáhnout 10 % pokryvnosti zorného pole.
3. Metoda stanovení mikroskopického obrazu často předchází metodám stanovení objemové biomasy (vhodné výsledky se zaznamenávají počty buněk) a saprobního indexu (vhodné výsledky s počty jedinců).

*Vzorové protokoly, viz text dále.*

## Vzor protokolu se záznamem zjištěných výsledků při rozboru vzorku povrchové vody

<b>Lokalita a místo odběru:</b> Nádrž	<b>Datum odběru:</b>
<b>Typ vzorku:</b> volná voda	<b>Datum rozboru:</b>
<b>Úprava a vyhodnocení vzorku:</b> centrifugace 10 ml promíchaného vzorku, stanovení mikroskopického obrazu dle ČSN 75 7712 a 13	
<b>Taxon/skupina</b>	<b>Počet org. v 1 ml</b>
<b>Sinice</b> ( <i>Pseudanabaena limnetica</i> , <i>Synechococcus</i> sp., <i>Leptolyngbya</i> sp.)	105
<b>Skrytěnky</b> ( <i>Cryptomonas ovata</i> , <i>Cryptomonas obovata</i> , <i>Cryptomonas</i> sp.)	20
<b>Zlativky</b> ( <i>Chrysococcus rufescens</i> )	24
<b>Rozsivky</b> ( <i>Achnanthes minutissima</i> , <i>Cyclotella comta</i> , <i>Cocconeis pediculus</i> , <i>Gomphonema</i> sp., <i>Fragilaria crotonensis</i> , <i>Cymbella ventricosa</i> , <i>Navicula</i> sp., <i>Navicula cryptocephala</i> , <i>Navicula nana</i> , <i>Nitzschia acicularis</i> , <i>Nitzschia actinastroides</i> , <i>Nitzschia paleacea</i> , <i>Nitzschia parvula</i> , <i>Synedra ulna</i> , <i>Synedra acus</i> )	60
<b>Zelené řasy</b> ( <i>Ankyra ancora</i> , <i>Chlamydomonas</i> sp., <i>Cosmarium punctatum</i> , <i>Monoraphidium contortum</i> , <i>Monoraphidium minutum</i> , <i>Scenedesmus obliquus</i> , <i>Scenedesmus communis</i> , <i>Scenedesmus opoliensis</i> )	35
<b>Krásnoočka</b> ( <i>Euglena</i> sp., <i>Phacus</i> sp.)	10
<b>Nálevníci</b> ( <i>Coleps hirtus</i> , <i>Litonotus</i> sp., <i>Vorticella</i> sp.)	18
<b>Měňavky</b> ( <i>Limax amoeba</i> , <i>Amoeba radiosa</i> )	20
<b>Počet organismů celkem:</b> 292 org./ml	
<b>Poznámky k rozboru:</b> Ve vzorku přítomen abioseston – pylová zrna, škrobová zrna, rostlinné a živočišné zbytky, schránky koryšů, schránky rozsivek, zbytky peří, detritus. Celková abundance abiosestonu 7 %.	

## Vzor protokolu se záznamem zjištěných výsledků při rozboru vzorku vody z akumulace

<b>Lokalita, VDJ:</b> Zemní vodojem	<b>Datum odběru:</b>		
<b>Specifikace vzorku:</b> voda z komory akumulace			
<b>Postup odběru vzorku:</b> vzorkovnicí odběr vody z příhladinové vrstvy do hloubky 15-20 cm			
<b>HYDROBIOLOGICKÝ ROZBOR</b>			
<b>Použitá metoda:</b> stanovení mikroskopického obrazu dle ČSN 75 7712 a ČSN 75 7713			
<b>Úprava vzorku:</b> centrifugace 10 ml vzorku a vyhodnocení dle ČSN 75 7712 a 13			
<b>Bioseston</b>			
<b>Taxon/typ biosestonu</b>	<b>Počet org. · ml<sup>-1</sup></b>		
Rozsivky (rod <i>Nitzschia</i> )	6		
<b>celkový počet organismů:</b> 6 org · ml <sup>-1</sup>	<b>počet živých organismů:</b> 0 org · ml <sup>-1</sup>		
<b>počet mrtvých organismů:</b> 6 org · ml <sup>-1</sup>			
<b>Do počtu biosestonu nezahrnuto:</b>	<b>Abundance</b>		
Železité bakterie (rod <i>Gallionella</i> )	2		
<b>Abioseston</b>			
<b>Typ abiosestonu</b>	<b>Abundance</b>	<b>Typ abiosestonu</b>	<b>Abundance</b>
Korozní produkty, sraženiny železa	3	Škrobová zrna	2
Písek	1	Schránky rozsivek	1
Rostlinné zbytky	2	Pylová zrna	2
Detritus	1		
<b>celková abundance vzorku:</b> 10 %			



evropský  
sociální  
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost

UNIVERZITA J. E. PURKYNĚ V ÚSTÍ NAD LABEM



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ  
CZ.1.07/2.2.00/28.0205 - ENVIMOD

## Vzor protokolu pro záznam mikroskopického rozboru vzorku vody

Protokol o provedení mikroskopického rozboru vzorku vody		1/2		
<b>Identifikace a specifikace odebraného vzorku</b>				
Vzorek, láhev č.:	Datum odběru:			
Odběrové místo:	Datum rozboru:			
Typ vzorku:				
<b>Použitá metoda:</b> stanovení mikroskopického obrazu dle ČSN 75 7712 a ČSN 75 7713				
<b>Úprava vzorku:</b> centrifugace 10 ml vzorku a vyhodnocení dle ČSN 75 7712 a 13				
<b>Zbytek (podíl) po odstředění ve zkumavce:</b> v = ml	<b>Počet vyšetřených polí počítací komůrky:</b> n =			
Přepočítávací koeficient $f$ použitý pro zjištění počtu taxonu v 1 ml $f = (1600/n) \cdot v \cdot 10 =$				
<b>Stanovení biosestonu</b>				
Taxonomická skupina	Vitalita	Záznam o výskytu taxonu	Suma	Počet v 1 ml
Sinice kokální, kolonie	Živé			
	Mrtvé			
Sinice vláknité	Živé			
	Mrtvé			
Rozsivky centrické	Živé			
	Mrtvé			
Rozsivky penátní	Živé			
	Mrtvé			
Skrytěnky	Živé			
	Mrtvé			
Obrněnky	Živé			
	Mrtvé			
Zlativky	Živé			
	Mrtvé			
Krásnoočka	Živé			
	Mrtvé			
Chlorokokální řasy	Živé			
	Mrtvé			
Vláknité zelené řasy	Živé			
	Mrtvé			
Bezbarví bičíkovci	Živí			
	Mrtví			
Nálevníci	Živí			
	Mrtví			
Měňavky	Živé			
	Mrtvé			
Vířníci	Živí			
	Mrtví			
	Živí			
	Mrtví			



evropský  
sociální  
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost



UNIVERZITA J. E. PURKYNĚ V ÚSTÍ NAD LABEM

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ  
CZ.1.07/2.2.00/28.0205 - ENVIMOD

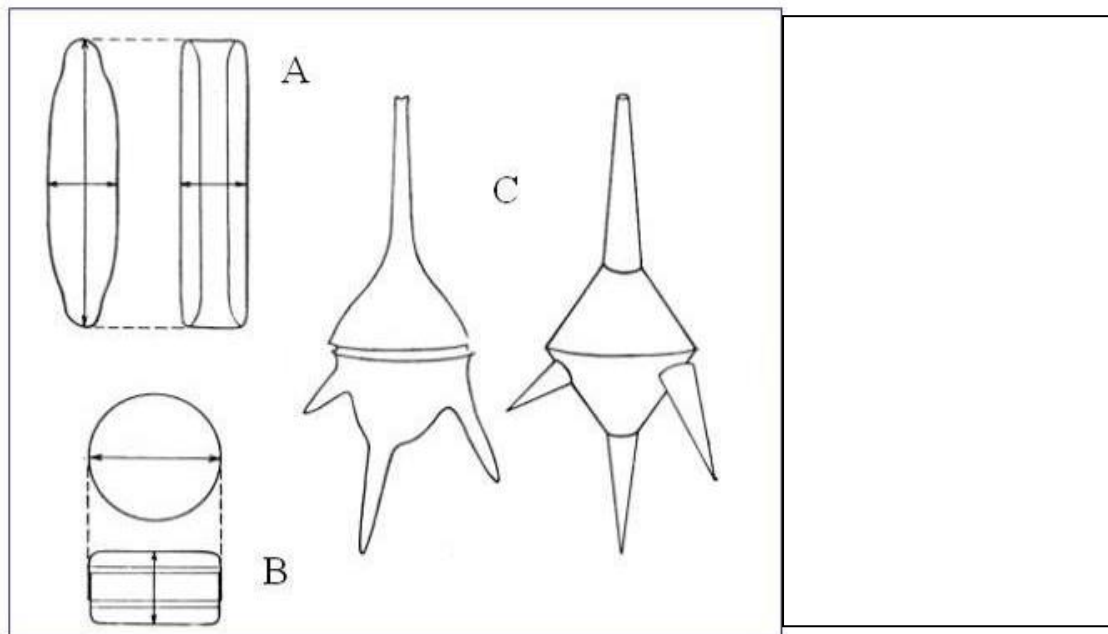
## Vzor protokolu pro záznam mikroskopického rozboru vzorku vody - pokračování

<b>Protokol o provedení mikroskopického rozboru vzorku vody</b>			<b>2/2</b>
<b>Poznámky k taxonomickému zastoupení:</b>			
<b>Celkový počet organismů:</b> org·ml <sup>-1</sup>	<b>Počet živých organismů:</b> org·ml <sup>-1</sup>	<b>Počet mrtvých organismů:</b> org·ml <sup>-1</sup>	
<b>Do počtu biosestonu nezahrnuto</b>			
<b>Typ biosestonu</b>	<b>Abundance</b>	<b>Typ biosestonu</b>	<b>Abundance</b>
Železité bakterie		Hyfy mikromycet	
Sírné bakterie		Konidie mikromycet	
Vlákná bakterií			
Tyčky a koky bakterií			
<b>Stanovení abiosestonu</b>			
<b>Typ abiosestonu</b>	<b>Hojnost (abundance)</b>	<b>Typ abiosestonu</b>	<b>Hojnost (abundance)</b>
Korozní produkty		Pylová zrna	
Sraženiny železa		Škrobová zrna	
Sraženiny manganu		Živočišné zbytky	
Písek		Motýlí šupiny	
Vločky koagulantu		Ptačí peří	
Detritus		Štětiny máloštětinatců	
Rostlinné zbytky			
Schránky rozsivek			
<b>Poznámky a komentáře:</b>			
<b>Celková abundance vzorku (při 200× celkovém zvětšení):</b> %			
<b>Shrnutí biologického rozboru</b>			
Mikroskopický obraz – živé organismy celkem	org·ml <sup>-1</sup>		
Mikroskopický obraz – organismy celkem	org·ml <sup>-1</sup>		
Mikroskopický obraz – abioseston	%		

## 5.5 Stanovení objemové biomasy

Mikroskopický rozbor vzorku vody udává informace o druhové struktuře a kvantitě společenstev přítomných organismů. Je-li zaměřen na autotrofní složku biocenózy (fytoplankton), pak je možné množství organismů uvádět buď vyjádřením počtu buněk nebo jedinců (abundance), a nebo jako objemovou biomasu. Metodu stanovení objemové biomasy lze použít pro povrchovou vodu, nárosty a sedimenty.

**Podstata metody:** Objemová biomasa fytoplanktonu je objem a nebo živá hmotnost přítomných sinic a řas v určité jednotce objemu vzorku vody. Stanovuje se přímo, a to mikroskopicky. Aby bylo možné objemovou biomasu stanovit, jsou nezbytné následující výchozí údaje: *počet buněk zástupců a jejich buněčný objem*. Objemová biomasa buněk jednotlivých druhů řas a sinic se stanoví proměřením organismů pomocí okulárového měřítka (viz práce s mikroskopem), většinou ve dvou rozměrech (šířka a délka), viz Obr. 12 (taxon A, taxon B).



Obr. 12. Příklady proměřování taxonů a aproximace geometrických těles.

### Postup zkoušky:

Pro výpočet objemu buněk je nutné zjistit lineární rozměry u co nejvíce zástupců téhož taxonu, a to nejméně 20 - 25 buněk. Čím větší počet buněk je změřen, tím je údaj o průměrném objemu přesnější. Měření lineárních rozměrů, vzhledem k variabilitě druhů během ontogenetického vývoje a sezónním změnám, je nutné na zkoumané lokalitě opakovat. Nedoporučuje se bez ověření použít údaj o objemu buněk určitého druhu z jedné lokality pro jinou lokalitu, stejně tak i údaje z literatury. Rozdíly mohou být i několikanásobné.

Tvar buňky (organismu) se aproximuje s tvarem geometrického tělesa odpovídajícím tvaru měřené buňky. Údaje o šířce a délce se dosadí do patřičného matematického vzorce pro

výpočet objemu odpovídající geometrického tělesa. Příklady základních tvarů geometrických těles pro výpočet objemu buněk nejčastějších zástupců fytoplanktonu jsou uvedeny v textu dále, viz Tabulka 2. (V mnoha případech, u organismů se složitějším tvarem buňky a prostorovým tvarem, je potřeba použít kombinace vzorců pro více geometrických těles.)

**Tabulka 2. Vzorce pro výpočet objemů buněk řas a příklady**

Geometrické tvar těleso	Vzorec pro výpočet objemu	Příklady použití - zástupci rodů
koule	$0,5236 d^3$	Sinice: <i>Coelosphaerium</i> , <i>Merismopedia</i> , <i>Microcystis</i> Řasy: <i>Pseudokephyrion</i> , <i>Chromulina</i> , <i>Chrysococcus</i> , <i>Chlamydomonas</i> , <i>Pyramimonas</i> , <i>Carteria</i> , <i>Eudorina</i> <i>Acantosphaera</i> , <i>Chlorella</i> , <i>Coenococcus</i> , <i>Coelastrum</i> , <i>Golenkinia</i> <i>Dictyosphaerium</i> , <i>Planktosphaeria</i> , <i>Treubaria</i> , <i>Tetrastrum</i> <i>Trachelomonas</i>
válec	$0,7854 a^2 \cdot b$	Sinice: <i>Aphanizomenon</i> , <i>Phormidium</i> , <i>Pseudanabaena</i> , <i>Planktothrix</i> Řasy: <i>Actinocyclus</i> , <i>Aulacoseira</i> , <i>Cyclotella</i> , <i>Stephanodiscus</i> , <i>Pinnularia</i> obecně vláknité řasy
hranol	$a^2 \cdot b$	<i>Asterionella</i>
elipsoid	$0,5236 a^2 \cdot b$	Sinice: <i>Gomphosphaeria</i> , <i>Anabaena</i> , Řasy: <i>Dinobryon</i> , <i>Mallomonas</i> , <i>Cryptomonas</i> <i>Didymocystis</i> , <i>Lagerheimia</i> , <i>Oocystis</i> , <i>Nephrocytium</i> , <i>Elakatothrix</i> , <i>Monoraphidium</i> <i>Scenedesmus</i> , <i>Spirotaenia</i> , <i>Trachelomonas</i>

**Vysvětlivky:** Zlomky  $\pi$  byly přepočteny na použití průměru a celkových délek, kde  $a$  je šířka (kratší osa),  $b$  je délka (podélná rotační osa),  $d$  je průměr.

### Výpočet a výsledky:

Průměrná hodnota z proměřeného množství buněk se použije pro výpočet celkové biomasy tvořené daným taxonem (buňkou, jedincem) na zkoumané lokalitě. Objemová biomasa se zjistí vynásobením počtu přítomných buněk (organismů, jedinců) daného taxonu a průměrnou hodnotou objemu. Objemovou biomasu je možné převést na živou hmotnost, za předpokladu specifické hmotnosti řas rovné 1,0. Potom  $10^6 \mu\text{m}^3$  odpovídá 1  $\mu\text{g}$ .

**Poznámka:** Objemová biomasa koreluje s obsahem chlorofylu, který se stanoví spektrofotricky při vlnové délce 663 nm (chlorofyl-*a*), 645 nm (chlorofyl-*b*), 630 nm (chlorofyl-*c*).



## 5.6 Stanovení saprobního indexu

Stanovení slouží pro biologické posuzování jakosti povrchových (popř. podzemních) a odpadních vod, dále pak sedimentů stěrů, biofilmů a nárostů a popř. samotných společenstev planktonu, bentosu, sestonu apod.

Stanoveným ukazatelem je saprobní index společenstva, představovaný reprezentativním vzorkem či vzorky, odebranými z posuzované lokality. Saprobní index ( $S$ ) se používá pro charakteristiku celého společenstva a představuje v podstatě vrchol pomyslné Gaussovy křivky normálního rozdělení, zachycující výskyt organismů ve vodním prostředí. Z křivky lze odvodit minima, maxima a optima výskytu sledovaného organismu a dále pak i jeho indikační váhu ( $w$ ,  $D$ ). Pro indikační váhu druhu platí hodnota 5 a 4 u nejlepších indikátorů, 3 u středních, 2 a 1 u nejhorších.

**Podstata metody:** Metoda je založena na hodnocení saprobity podle ekologických nároků organismů, které jsou vyjádřené individuálními saprobními indexy. Saprobity je charakterizována obsahem organických látek schopných biochemického rozkladu, jejichž různé hladiny ovlivňují výskyt organismů a vznik biocenóz (společenstev) ve vodním prostředí. Pro indikaci saprobity, a s ní spojenou postupující eutrofizací či znečišťováním, se používají organismy, označované jako biologické indikátory. V případě znalosti nároků a požadavků organismů na obsah organických látek ve vodním prostředí, na charakteru fyzikálních a chemických abiotických faktorů, lze usuzovat na jakost vody. (Indikační hodnotu má i nepřítomnost organismu v prostředí, kde se za běžných podmínek jinak vyskytuje). Předpokladem je správné určení nalezených druhů. K hodnocení je možné použít výsledky stanovení sestonu, bentosu, planktonu, nárostů, biofilmů, vloček plovoucích bakterií a hub, apod.

**Chemikálie:** Během rozboru se používá demineralizovaná voda pro případné ředění vzorků a pro čištění komůrek. Pro promytí centrifugačních zkumavek se používá čistý ethanol. Pro případné nejasnosti při taxonomickém určování Lugolův roztok.

**Přístroje a pomůcky:** Binokulární mikroskop s přidavným fluorescenčním zařízením, laboratorní odstředivka s výkyvným rotorem, centrifugační zkumavky kónicky zúžené s ostrou špičkou o objemu 10 ml (s kalibrací na 0,2 ml, 0,5 ml, 1 ml a 10 ml), počítací komůrka typu Cyrus I, Pasteurovy pipety (mikropipetky), kádinka s demineralizovanou vodou, preparační jehla, jednorázové ubrousky.

### Postup zkoušky:

Vlastnímu stanovení předchází vhodná úprava vzorku. Vzorek vody se upravuje centrifugací, jako v případě stanovení sestonu. V případě vzorku nárostu či stěru lze posuzovat mikroskopicky promíchaný podíl hustého vzorku. Do centrifugační zkumavky se odměří objem 10 ml promíchaného vzorku a po dobu 5 min se odstředí v centrifuze při otáčkách  $2\ 000\ \text{ot} \cdot \text{min}^{-1}$ . Po odstředění se vzorek slije tak, aby sediment zůstal ve zkumavce. Vodu ulpěnou na stěnách zkumavky spojíme se zbytkem tak, že provedeme opakovanou

centrifugacemi vzorku. Poté už vzorek nesléváme. Vzorek se opatrně promíchá a kapka se přenesse mikropipetou do počítací komůrky.

Provede se mikroskopické vyhodnocení vzorku, tj. kvalitativní analýza, kterou se určí jednotlivé taxony (druhy) nebo taxonomické skupiny a následně se vyjádří i jejich zastoupení (např. procentuální na základě hojnosti). Tam, kde není možné vyjádřit zastoupení organismu pomocí jeho počtu v 1 ml, lze použít pro vyjádření jeho hojnosti stupně hojnosti: 1 (ojediněle, pod 1 %), 2 (roztroušeně, 1 - 3 %), 3 (řídce, 3 - 10 %), 5 (hojně, 10 - 20 %), 7 (velmi hojně, 20 - 40 %) a 9 (hromadně, nad 40 %). Přesnější je spočítat jednotlivé taxony na rastru počítací komůrky Cyrus I. Počet se zjišťuje na ploše celé komůrky nebo na určitém počtu pruhů. Při práci s komůrkou typu Cyrus I se pro vyhodnocení počtu jedinců v 1 ml vzorku vody používají přepočítávací koeficienty ( $f$ ) podle toho, kolik pruhů komůrky se vyšetří a na jaký objem se vzorek odstředil (viz stanovení biosestonu a abiosestonu).

### Výpočet a výsledky:

Pro stanovení saprobního indexu ( $S$ ) je při hydrobiologické analýze vhodné určit cca více než 20 druhů, na jejichž základě lze vzorek vody posoudit. Čím více druhů se určí, tím bude stanovení saprobního indexu přesnější. Celkový rozsah stupnice saprobity je v dále uvedené tabulce. Pro přesnější stanovení saprobního indexu společenstva (vzorku) je vhodné zaznamenávat nejen individuální saprobní index ( $S$ ), ale také indikační váhu ( $w$ ,  $I$ ). Hodnoty saprobních indexů a indikační váhy se zjistí z příloh normy ČSN 75 7716 (nebo z Atlasů vodních organismů se zřetelem na vodárenství, povrchové vody a čistírny odpadních vod, 1. a 2. díl, autoři Sládeček V. a Sládečková A.). Platí, že každý taxon má své individuální hodnoty saprobního indexu i indikační váhy. Výpočet saprobního indexu uvádí následující rovnice:

$$S = \frac{\sum_{i=1}^n S_i \cdot w_i \cdot h_i}{\sum_{i=1}^n w_i \cdot h_i}$$

kde:  $S$  je saprobní index společenstva,  $S_i$  je individuální saprobní index  $i$ -tého taxonu ( $i = 1, 2, \dots, n$ ),  $h_i$  je individuální hojnost  $i$ -tého taxonu ( $i = 1, 2, \dots, n$ ) či jeho počet v 1 ml,  $w_i$  (popř. u starší literatury  $I_i$ ) individuální indikační váha  $i$ -tého taxonu ( $i = 1, 2, \dots, n$ ).

Pokud se v jednom místě odebírá více vzorků, provede se u každého z nich stanovení saprobního indexu a následně se vypočítá střední saprobní index  $\bar{S}$ .

$$\bar{S} = \frac{\sum_{j=1}^m S_j \cdot B_j}{\sum_{j=1}^m B_j}$$

kde:  $S_j$  je saprobní index  $j$ -tého vzorku ( $j = 1, 2, \dots, m$ ),  $m$  je počet vzorků,  $B_j$  je součet součinů hojnosti a indikační váhy v  $j$ -tém vzorku ( $j = 1, 2, \dots, m$ ).

Komentář ke stupňům v rámci Katarobity (k), Limnosaprobity (x, o,  $\beta$ ,  $\alpha$ , p) a Eusaprobity

(i, m, h, u) uvádí tabulka 3.

**Tabulka 3. Stupně saprobity a jejich rozsah**

Symbol stupně	Název stupně	Rozsah	Symbol stupně	Název stupně	Rozsah
<b>k</b>	katarobita	-1,5 až -0,5	<b>p</b>	polysaprobita	3,51 až 4,50
<b>x</b>	xenosaprobita	-0,51 až +0,5	<b>i</b>	isosaprobita	4,51 až 5,50
<b>o</b>	oligosaprobita	0,51 až 1,50	<b>m</b>	metasaprobita	5,51 až 6,50
<b>β</b>	β- mezosaprobita	1,51 až 2,50	<b>h</b>	hypersaprobita	6,51 až 7,50
<b>α</b>	α- mezosaprobita	2,51 až 3,50	<b>u</b>	ultrasaprobita	7,51 až 8,50

**Vzor protokolu se záznamem zjištěných výsledků při rozboru a výpočet saprobního indexu**

<b>Lokalita:</b> Nádrž 1	<b>Místo odběru:</b> 10 až 20 m od výpustě				
<b>Datum odběru:</b>	<b>Datum rozboru:</b>				
<b>Typ vzorku:</b> nárosty a stěry					
<b>Úprava a vyhodnocení vzorku:</b> stanovení mikroskopického obrazu dle ČSN 75 7712 a 15, stanovení saprobního indexu <i>S</i> dle ČSN 75 7716					
<b>Taxon</b>	<b>S<sub>i</sub></b>	<b>w<sub>i</sub></b>	<b>h<sub>i</sub></b>	<b>S<sub>i</sub> · w<sub>i</sub> · h<sub>i</sub></b>	<b>w<sub>i</sub> · h<sub>i</sub></b>
<i>Lyngbya limnetica</i>	3,0	2	2	12,0	4
<i>Oscillatoria limosa</i>	2,3	2	3	13,8	6
<i>Phormidium breve</i>	2,8	4	5	56	20
<i>Pseudanabaena catenata</i>	2,8	3	1	8,4	3
<i>Navicula accomoda</i>	2,9	5	4	58	20
<i>Navicula mutica</i>	1,2	2	2	4,8	4
<i>Navicula cuspidata</i>	2,5	3	2	15,0	6
<i>Navicula cryptocephala</i>	2,4	2	3	14,4	6
<i>Nitzschia umbonata</i>	2,6	3	2	15,6	6
<i>Oocystis solitaria</i>	1,7	4	1	6,8	4
<i>Oocystis parva</i>	2,3	2	2	9,6	4
<i>Coelastrum microporum</i>	2,1	2	3	12,6	6
<i>Coelastrum astroideum</i>	2,0	3	3	18,0	9
<i>Lepocinclis ovum</i>	2,7	4	2	21,6	8
<i>Monoraphidium contortum</i>	2,2	1	2	4,4	2
<i>Scenedesmus acuminatus</i>	2,2	4	3	26,4	12
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	2,1	3	3	18,9	9
<i>Scenedesmus opoliensis</i>	2,2	3	3	19,8	9
<i>Scenedesmus alternans</i>	2,0	3	3	18,0	9
<i>Anthophysa vegetans</i>	3,2	4	2	25,6	8
<i>Arcella vulgaris</i>	1,9	1	2	3,8	2
<b>Saprobní index: 2,4</b>	<b>Stupeň saporobity: horší β-mezosaprobita</b>				

## 6 Barvicí metody

Z důvodu podobnosti indexu lomu pozorovaných mikroorganismů a vody, jsou některé struktury velmi obtížně viditelné (usnadněním je optický systém fázového kontrastu), a proto se vyvinuly některé barvicí metody usnadňující pozorování. Při mikroskopování jsou hojně využívané různé barvicí techniky a jejich smyslem je zdůraznit některé struktury, popř. je odlišit od jiných struktur. Barvicí techniky můžeme využít různým způsobem a k různým účelům. V praxi existuje barvení sloužící k diagnostice mikroorganismů (obecné barvicí metody, Gramovo barvení, atd.) a barvení sloužící ke studiu cytologických vlastností (bičíky, organely, atd.). Obecné barvicí metody nás informují o velikosti a morfologii bakteriální buňky a mají diagnostický význam. Barvení se aplikuje na nátěry fixované nad plamenem. Barvivo se nakápne přímo na fixovaný nátěr, ponechá se působit a po odlití přebytečného barviva se nátěr opláchne vodovodní vodou. K cytologickým metodám patří např. barvení bičíků, kapsulí, cyst, spor, volutinových inkluzí, intracelulárních lipidů, glykogenu a granulózy, polysacharidových inkluzí, jaderného preparátu.

### 6.1 Barvení dle Grama

Barvení podle Grama je základní procedura používaná při určování bakterií, kterou objevil v roce 1884 tým dánského vědce Hanse Christiana Grama. Umožňuje rozlišit bakterie dle typu buněčné stěny na tzv. grampozitivní a gramnegativní. V době objevu nebylo známo mnoho o struktuře bakteriální stěny, nicméně Gramovo barvení se začalo používat jako jeden z diagnostických a taxonomických ukazatelů a používá se tak dodnes. Principem procedury je barvení usmrcené bakteriální kultury roztokem krystalové violeti a Lugolova roztoku a následné odbarvení působením organického rozpouštědla, např. ethanolu nebo acetonu. Grampozitivní bakterie zůstanou fialově obarvené i po působení organického rozpouštědla, zatímco gramnegativní se odbarví. Aby byly i odbarvené gramnegativní bakterie lépe pozorovatelné pod mikroskopem, dobarví se kultura vhodným světlejším barvivem, nejčastěji safraninem na červenou.

**Komentář:** Důvodem různého chování bakterií ke Gramovu barvení je rozdílná struktura buněčné stěny. **Grampozitivní** bakterie mají peptidoglykanovou vrstvu velice silnou (20 - 80 nm), navíc vyztuženou tzv. **teichoovou kyselinou**. Teichoová kyselina je tvořena polyglycerolfosfátem nebo polyribitolfosfátem navázaným na aminokyseliny nebo sacharidy peptidoglykanu. Teichoová kyselina může tvořit až 50 % sušiny buněčné stěny. Na povrchu peptidoglykanové vrstvy mají grampozitivní bakterie navázané další polysacharidy složené zejména z monosacharidů glukózy, manózy a galaktózy. Struktura těchto polysacharidů je specifická pro různé taxonomické skupiny grampozitivních bakterií (tyto polysacharidy jsou také první strukturou bakteriální buňky, na kterou reaguje imunitní systém při průniku bakterie do organismu vyšších živočichů). **Gramnegativní bakterie** mají ve srovnání s grampozitivními peptidoglykanovou vrstvu velice tenkou (1 - 3 nm) a bez teichoové kyseliny. Nad touto vrstvou mají ale ještě tzv. **vnější membránu**, která je složena zejména

z fosfolipidů, bílkovin a lipopolysacharidů<sup>5</sup>. Tyto lipopolysacharidy představují opět první bakteriální strukturu, na kterou reaguje imunitní systém. Mezi peptidoglykanovou vrstvou a vnější membránou je tzv. **periplazmatický prostor**, ve kterém jsou mj. umístěny některé enzymy. Ve vnější membráně jsou poměrně časté póry tvořené bílkovinou **porinem**, které pronikají skrz periplazmatický prostor a peptidoglykanovou vrstvu až k cytoplazmatické membráně. Krystalová violet i jod jsou nízkomolekulární látky, které snadno projdou buněčnou stěnou i cytoplazmatickou membránou mrtvé buňky. Uvnitř buňky pak spolu reagují za vzniku polymeru, který už ale při odbarvení přes tlustý a hustý peptidoglykan grampozitivních bakterií zpět neprojde, naopak přes tenký a řídký peptidoglykan gramnegativních bakterií ano. Aplikace organického rozpouštědla pomůže odbarvení gramnegativních bakterií ještě tím, že vede k rozpuštění vnější lipidové membrány. I proto se gramnegativní bakterie odbarví a grampozitivní ne.

### 6.1.1 Provedení barvení dle Grama

Následující postup zopakujte několikrát pro vzorky grampozitivních i gramnegativních bakterií.

**Pomůcky:** Kahan, očkovací klička, podložní mikroskopická skla, pinzeta, roztoky barviv (krystalová violet, Lugolův roztok, safranin), stříčka s ethanolem (acetone), imerzní olej, kapátka (Pasteurovy pipety), mikroskop s imerzním objektivem, kultury mikroorganismů na ztuženém médiu, fixy.

#### Postup:

1. Vezměte podložní mikroskopické sklíčko a pomocí kličky na něj rozetřete **malé** množství bakteriální suspenze narostlé na agarové misce.
2. Kulturu vysušte **nad** plamenem (ne v plamenu) a pak fixujte protažením plamenem (1 - 2 s).
3. Fixovaný preparát převrstvěte roztokem krystalové violeti, nechte působit 60 s a přebytečné barvivo slijte, opláchněte vodou.
4. Dále převrstvěte Lugolovo roztokem, nechte působit 60 s, přebytečné barvivo slijte a opláchněte vodou.
5. Použijte odbarvovací roztok, např. ethanol (nebo aceton) a odbarvujte do té doby, dokud odtéká barvivo.
6. Opláchněte vodou, přebytečnou vodu vysušte (např. odcáknutím).
7. Kápněte na vzorek roztok safraninu a nechte působit 60 s.
8. Opláchněte vodou a opatrně vysušte nad kahanem (eventuálně pokud je časová rezerva a na stanovení nespěcháte, uložte preparát do termostatu, kde samovolně vyschne).
9. Následuje mikroskopování, které probíhá při 100× zvětšení objektivu. Tento objektiv je imerzní. Proto při mikroskopování použijte imerzní olej podle postupu uvedeného v kapitole 5.1.2. Pozorujte objekty.

<sup>5</sup> Lipopolysacharidy jsou tvořeny lipidy s navázaným polysacharidem.

**Poznámky:**

- Gramovo barvení vyžaduje poměrně přesnou práci a na první pokus se obvykle nepovede. V takovém případě nezoufejte a zkuste to znovu.
- Nejčastější problémy bývají způsobené příliš hustou nebo naopak nedostatečně hustou kulturou bakterií, příliš dlouhou fixací v plameni a nedostatečným odbarvením ethanolem.
- Pokud to práce dovoluje, je lepší nechat preparát zaschnout na vzduchu, a nebo v termostatu.
- Sklíčko s kulturou je vhodné si označit v levém horním rohu nesymetrickým nápisem, aby se zabránilo mylnému otočení sklíčka při barvení. Samozřejmě má smysl použít fix, který se působením dekolizačních roztoků (ethanolu, acetonu), nesmyje.

**Vyhodnocení:**

- Pozorované buňky bakterií nakreslete (zda se jedná o koky či tyčinky).
- Uveďte jejich barvu na základě Gramova barvení (grampozitivní jsou tmavě fialově zbarvené a gramnegativní jsou červené, růžové).
- Výsledek uveďte do protokolu.

## 6.2 Barvení mikromycet

**Postup 1:**

1. Připraví se nativní preparát tak, že se na podložní sklo (může být i s jamkou) kápne sterilní destilovaná voda.
2. Do kapky destilované vody na skle se preparační jehlou vloží část mycelia.
3. K obarvení se použije methylenová modř.
4. Přiloží se krycí sklíčko.
5. Tímto způsobem se zbarví plazma sledovaného objektu.

**Postup 2:**

1. Připraví se polotrvalý preparát tak, že se na podložní sklo kápne kapka ethanolu a do něho se vloží část mycelia mikromycet.
2. Do kapky s myceliem na skle se přidá kapka laktofenolu.
3. Nefixuje se (míněno nad plamenem).
4. Přikryje se krycím sklíčkem.
5. Případně vzniklé bublinky lze odstranit rychlým protažením preparátu nad plamenem.
6. Tím je preparát nejen konzervován, ale i obarven, hyfy jsou modré.
7. K identifikaci se používají určovací klíče a literatura.

### 6.3 Neisserovo barvení

Neisserova metoda slouží jako důkaz přítomnosti polyfosfátů, tj energetických zdrojů v buňce. Metoda spočívá v rozlišení buněk/vláken na světle hnědá až žlutavá jako Neisser–negativní ( $N^-$ ) a tmavě šedomodrá až fialová jako Neisser–pozitivní ( $N^+$ ).

**Pomůcky a činidla:** Podložní mikroskopické sklo, destilovaná voda, Neisserovo činidlo (viz kapitola 14.3.6 str. 109), imerzní olej.

**Postup:**

1. Vzorek se přeneše na čisté odmaštěné podložní sklo, lze provést tzv. roztěrový preparát, který se převrství na dobu 30 s směsí roztoku I. a II. (např. 2 ml roztoku I. a 1 ml roztoku II.).
2. Po opláchnutí destilovanou vodou se dobarví roztokem III. během 1 min.
3. Po opláchnutí a zaschnutí se pozoruje pod imerzním objektivem.

**Poznámka:** Součástí činidla je methylenová modř selektivně se vážající na anionická místa polymerního polyfosfátového řetězce, čímž vzniká barevná reakce.

## 7 Vliv vnějších faktorů na mikroorganismy

### 7.1 Stanovení citlivosti mikroorganismů k antibiotikům

Tato metoda se používá pro účely zjištění (stanovení) citlivosti mikroorganismů (vybraných kmenů) k antibiotikům. Antibiotika jsou heterogenní skupinou chemických látek vykazující více či méně negativní účinky na organismy (bakterie, plísně, kvasinky, vyšší organismy), všeobecně využívané k potlačení růstu nežádoucích mikroorganismů. Spektrum a mechanismus působení antibiotik je velmi variabilní, organismy vystavené působení antibiotika tak mohou být označeny za citlivé nebo rezistentní.

**Podstata zkoušky:** Citlivost mikroorganismů k antibiotikům se testuje na základě standardní diskové difúzní metody. Pracuje se buď s čistou kulturou, oživenou z želatinového disku a nebo s bakteriální suspenzí (např. kolonie cílového organismu vyrostlá na agarovém médiu se kličkou přepíchne do fyziologického roztoku a zhomogenizuje se na třepačce). Zkoušený objem kmenu mikroorganismu se rovnoměrně naočkuje na povrch živného média. Na zaschlý, mikroorganismem naočkovaný povrch média, se přenesou papírové disky napuštěné antibiotiky. Naočkované misky s disky antibiotik se kultivují při teplotě  $36 \pm 2$  °C po dobu 24 h až 36 h. Po skončení kultivace se zjišťuje citlivost mikroorganismu k antibiotikům na základě velikosti inhibiční zóny v milimetrech, která se kolem disku vytváří (minimální inhibiční koncentrace, tzv. MIC).

**Chemikálie:** Používané chemikálie jsou stupně čistoty ch.č. nebo p.a. Voda se používá destilovaná nebo demineralizovaná bez specifických požadavků na jakost.

- Müller-Hintonův agar.
- Roztok 0,5% trifenylnitrazolium chlorid (TTC) - není nutný.
- Ředící roztok (fyziologický roztok).

**Čisté kultury mikroorganismů:** Želatinové disky testovaných mikroorganismů ze sbírky CCM (*Czech Collection of Microorganisms*) se rozpustí ve fyziologickém roztoku. Po promíchání se lahvička s rozpuštěným diskem s mikroorganismy kultivuje v termostatu při teplotě  $36 \pm 2$  °C po dobu 24 h.

**Poznámka:** Sběrka mikroorganismů (CCM) udržuje živé nebo konzervované kultury mikroorganismů pro výzkumné, vědecké a technologické či pedagogické účely.

**Přístroje a pomůcky:** Pipety s možností aplikace objemu 0,1 a 0,2 ml, jednorázové špičky, pinzety, skleněná roztírací tyčinka (Drigalskiho), kahan, kalibrováný teploměr nebo teploměr porovnaný s kalibrováním, analytické váhy citlivost 0,01 g, autokláv ( $121 \pm 3$  °C), horkovzdušný sterilizátor ( $160 \pm 2$  °C), Erlenmayerovy láhve, odměrný válec 100 ml, lahve se šroubovým uzávěrem, sterilní plastové Petriho misky o průměru 90 mm, disky s antibiotiky.

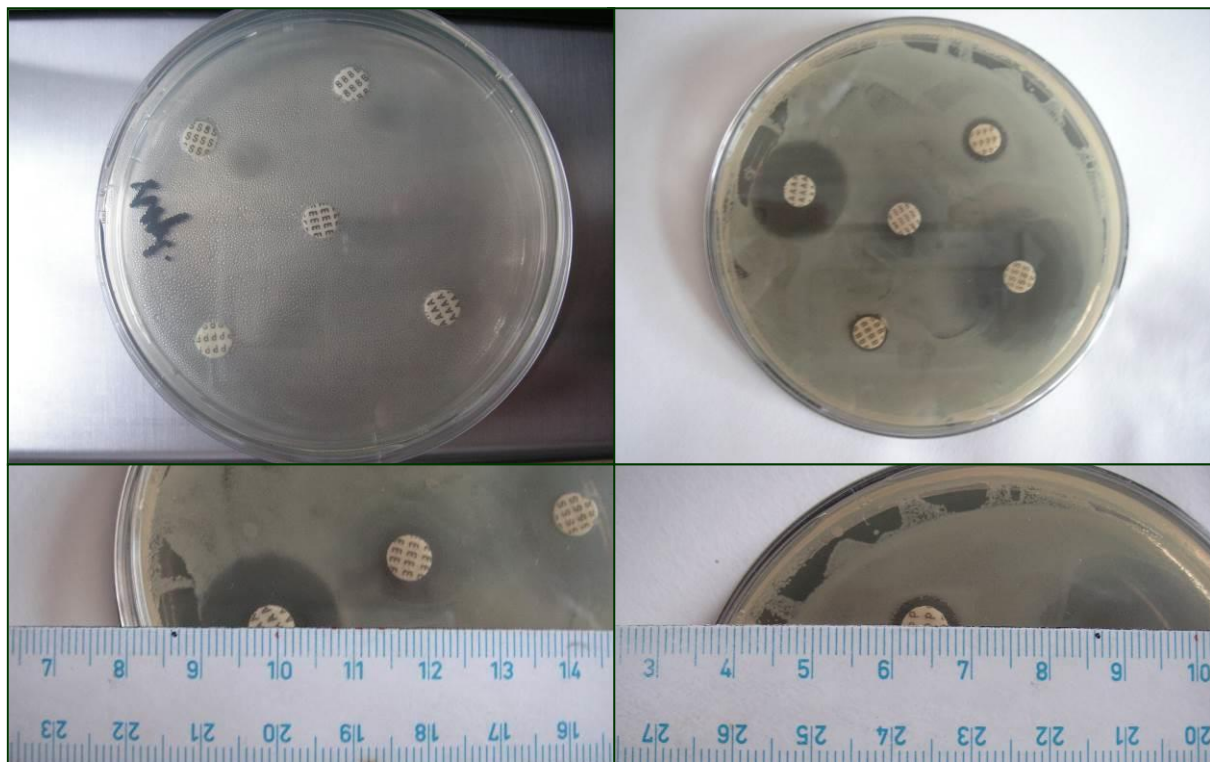


**Postup zkoušky:**

1. Na povrch Müller-Hintonova agaru v Petriho miskách se napipetuje 0,1 (0,2) ml kultury testovaného mikroorganismu, naaplikovaný objem se rozetře po povrchu agarového média tak, aby rovnoměrně pokryl povrch (agarové médium by mělo být předsušené a zbavené nadbytečné vlhkosti).
2. Po zaschnutí testované kultury mikroorganismu se sterilně (ožehnutou pinzetou) přenesou na povrch média testovací disky napuštěné antibiotiky o známém složení a koncentraci. Na povrch jedné Petriho misky s médiem lze umístit maximálně 6 disků s antibiotiky.
3. Probíhá inkubace vzorku po dobu 24 až 36 h v termostatu při teplotě 36 °C.

**Vyhodnocení zkoušky:**

Při kultivaci se z disku napuštěného antibiotiky vypouští účinné látky, které difundují do agarového média. Na okraji zóny koncentrace antibiotika představuje minimální inhibiční koncentraci (MIC). Koncentrace látky ve směru od okraje disku postupně slábne. Účinné antibiotikum vytvoří kolem disku průzračnou zónu (bez nárůstu mikroorganismů), viz ilustrační Obr. 13.



**Obr. 13. Příklad velikostí MIC a způsob proměrování. Horní řada – na misce naaplikovaná čistá kultura bakteriálního kmene s disky před a následně po inkubaci. Dolní řada – proměrování zóny (minimální inhibiční koncentrace), jedná se o velmi citlivý kmen vůči ampicilinu a citlivý vůči penicilinu.**

Vyhodnocením účinnosti antibiotika na vystavený mikroorganismus se udává jako průměr vytvořené zóny v milimetrech. Zjištěné velikosti se zaznamenají do protokolu. Pro potřeby zjištění citlivosti či rezistence k antibiotikům lze použít přiloženou tabulku 2. Obecně však platí, že pro citlivý mikroorganismus je typická velikost zóny v rozmezí 5 až 10 mm a velmi citlivý mikroorganismus má charakteristickou velikost zóny více než 12 mm, viz tabulka 4.

Tabulka 4. Příklad velikostí inhibičních zón pro testovaná antibiotika

Název antibiotika (množství)	Označení / selekce	Průměr inhibiční zóny [mm]	
Ampicilin (10 µg)	AM / G <sup>-</sup> , enterokoky	rezistentní < 13	citlivý > 17
Ampicilin (10 µg)	AM / stafylokoky	rezistentní < 28	citlivý > 29
Bacitracin (10 U)	B	rezistentní < 8	citlivý > 13
Carbenicilin (100 µg)	CB / <i>E.coli</i> , <i>Proteus</i>	rezistentní < 19	citlivý > 23
Carbenicilin (100 µg)	CB / <i>Ps.aeruginosa</i>	rezistentní < 13	citlivý > 17
Chloramfenikol (30 µg)	C	rezistentní < 12	citlivý > 18
Erythromycin (15 µg)	E	rezistentní < 13	citlivý > 18
Kanamycin (30 µg)	K	rezistentní < 13	citlivý > 18
Methicilin (5 µg)	ME	rezistentní < 9	citlivý > 14
Penicilin (10 U)	P / stafylokoky	rezistentní < 20	citlivý > 21
Penicilin (10 U)	P / další bakterie	rezistentní < 11	citlivý > 22
Polymyxin B (300 U)	PB	rezistentní < 8	citlivý > 12
Streptomycin (10 µg)	S	rezistentní < 11	citlivý > 15
Sulfonamidy (300 µg)	ST	rezistentní < 12	citlivý > 17
Tetracyklin (30 µg)	T	rezistentní < 14	citlivý > 19
Trimethyloprim sulfomethoxazol (23 µg)	SXT	rezistentní < 10	citlivý > 16

U = tzv. unit, jednotka antimikrobiální aktivity

## 7.2 Vliv ultrafialového záření na růst mikroorganismů

Ultrafialové záření působí na mikroorganismy inhibičně až letálně v závislosti na intenzitě a délce ozáření. Příčinou je silná absorbance UV záření některými biogenními molekulami, zejména nukleovými kyselinami. Silné dávky UV záření se proto používají pro usmrcování mikroorganismů. Používané zařízení se nazývá **germicidní lampa**. Germicidní lampy využívají vlnových délek 260 - 290 nm, při kterých vznikají v DNA dimery sousedních bází, které brání replikaci i expresi genetické informace. Řada bakterií disponuje schopností tzv. **fotoreparace**, při které dochází k enzymatické opravě těchto poruch v DNA. Fotoreparace je indukována viditelným světlem (což souvisí evolučně pravděpodobně s tím, že v přírodě pochází UV záření ze slunce a je tedy vždy v kombinaci s viditelným světlem). I proto se germicidní lampy používají častěji v noci (spolu s praktickou výhodou obvykle prázdného pracoviště). Některé mikroorganismy disponují barevnými pigmenty (např. karotenoidními), které UV záření také absorbují a poskytují tak vyšší ochranu. Ze základních složek životního

prostředí se s přirozeným UV zářením setkávají organismy nejčastěji ve vzduchu a i proto bývá ve vzduchu četnost „barevných“ mikroorganismů vyšší.

Cílem práce je hledání doby působení UV záření, která způsobí kompletní usmrcení použité mikrobiální kultury.

**Podstata zkoušky:** Princip testu spočívá v tom, že se kultura na agarové misce ozáří UV zářením germicidní lampy. Část plochy agarové misky s naočkovanými mikroorganismy se před ozářením pokryje alobalem, který UV nepropouští a překryté mikroorganismy před účinky záření ochrání. Tato kontrola umožňuje odlišit skutečný vliv UV záření od případných dalších negativních vlivů a chyb (špatné zaočkování, nevhodná kultivační teplota apod.).

**Pomůcky:** Mikrobiální kultury, misky s PCA (Plate Count Agar), pinzeta, Drigalskiho tyčinka (tzv. očkovací hokejka), alobal, nůžky, fixy, kultivační box.

### Postup:

1. Připravte si celkem tři Petriho misky s PCA.
2. Suspenzi mikroorganismu (0,1 ml) rozetřete na agar na všechny misky.
3. Vystříhnete z alobalu několik menších koleček nebo jiných jednoduchých tvarů a sterilní pinzetou (ožehnutou v plameni kahanu) jimi přikryjte několik míst na misce. Alobal by měl pokrývat cca 25 – 50 % plochy misky.
4. Vložte misku pod germicidní lampu, odklopte víčko a ozařujte po stanovené časy (každou misku samozřejmě po jiný čas).
5. Sterilní pinzetou odeberte alobal.
6. Přikryjte znovu misku, zabalte do parafilmu a dejte inkubovat v termostatu dnem vzhůru.

**Pozor! Germicidní lampa je nebezpečná i pro člověka, zejména může poškodit zrak.** Nikdy se nedívejte přímo do lampy, ideální je pracovat v tmavém boxu (krabici).

**Vyhodnocení:** Po kultivaci porovnejte nárůst přikryté a nepřikryté populace v závislosti na čase ozáření. Pokud je doba ozařování nedostatečná, nebude znatelný rozdíl mezi ozářenou a přikrytou kulturou. Pokud má UV záření inhibiční vliv na mikroorganismy, bude hustota nekryté populace nižší a zřetelně bude vidět původní tvar alobalu. Při plném letálním účinku pak naroste jen kultura pod alobalem.

UV záření působí na organismy jako stresující faktor. Jak bylo popsáno výše v textu, mají některé organismy schopnost SOS reparace. Toto lze pozorovat tak, že na médiu narůstají zvláštní útvary kolonií v porovnání s těmi, které rostou na kontrolních a UV zářením neovlivněných miskách.

## 8 Mikrobiologické rozbory vod

Tato kapitola uvádí pouze několik vybraných postupů pro analýzu mikroorganismů přítomných v různých typech vod (povrchové, podzemní, pitné, bazénové, odpadní). Postupy vycházejí z normovaných standardních metod. V této kapitole jsou uvedeny postupy zaměřené na stanovení organotrofních mikroorganismů, konkrétně mikroorganismů kultivovatelných při 22 °C a 36 °C, psychrofilních a mezofilních bakterií; a na indikátory fekálního znečištění, kterými jsou koliformní bakterie, termotolerantní koliformní bakterie (*Escherichia coli*) a enterokoky.

### 8.1 Stanovení kultivovatelných mikroorganismů při 22 °C a 36 °C

Stanovení celkového počtu mikroorganismů je důležitou informací pro posouzení jakosti vody a její kontrolu. Jednotlivá kvantitativní stanovení se obvykle provádějí s mikroorganismy, které jsou schopné růst a tvořit kolonie na živném agarovém médiu při teplotě 22 °C a 36 °C. Stanovení počtu kolonií je účelné pro posouzení čistoty podzemních vod a účinnosti procesů úpravy vody, jako je koagulace, filtrace a dezinfekce, a zároveň indikuje čistotu a neporušenost distribučního systému. Metoda slouží ke stanovení kultivovatelných mikroorganismů v pitné, povrchové, podzemní a bazénové vodě.

**Podstata zkoušky:** Odměřený objem vzorku nebo příslušného ředění vzorku se v Petriho misce dokonale promíchá s roztopeným specifickým živným kultivačním médiem. Jedna sada misek se kultivuje při teplotě 36 °C po dobu 44 h, druhá sada při teplotě 22 °C po dobu 68 h. Z celkového počtu kolonií vyrostlých v kultivačním médiu se vypočte počet kolonie tvořících jednotek v 1 ml.

**Chemikálie:** Používané chemikálie jsou stupně čistoty ch.č. nebo p.a. Voda se používá destilovaná nebo demineralizovaná bez specifických požadavků na jakost.

- Agar s kvasničným extraktem.
- Ředící roztok (fyziologický roztok).

**Přístroje a pomůcky:** Pipety s možností aplikace objemu 0,1 a 0,2 ml, jednorázové špičky, sterilní skleněné pipety o objemu 1 ml a 2 ml, pinzety, kahan, analytické váhy citlivost 0,01 g, autokláv (121 ± 3 °C), horkovzdušný sterilizátor (160 ± 2 °C), Erlenmayerovy láhve, odměrný válec 100 ml, lahve se šroubovým uzávěrem, sterilní plastové Petriho misky o průměru 90 mm, termostat 22 °C ± 2 °C, termostat (36 ± 2 °C), chladičí brašny s chladičími vložkami.

**Postup zkoušky:**

1. **Temperování vzorku:** Před vlastním rozbořem se vzorek, pokud je odebírán za nízkých teplot nebo uchováván v lednici, nechá vytemperovat na laboratorní teplotu 20 °C až 25 °C. K vytemperování obvykle stačí doba nutná pro přípravu pracovní plochy a všech pomůcek nutných ke zpracování vzorku.
2. **Promíchání vzorku:** Bezprostředně před vlastním rozbořem i před zředováním se vzorek musí dokonale promíchat intenzivním protřepáním, aby se bakterie rovnoměrně rozptýlily v celém objemu vzorku.
3. **Volba vhodného objemu k očkování a zředování vzorku:** Objem zkoušeného vzorku nebo zředěného vzorku má být volen tak, aby na/v kultivačním médiu v Petriho misce průměru 90 mm vyrostlo od 30 do 300 kolonií.  
Přímé očkování 1 ml vzorku se používá u vod pitných a u čistých surových vod. Zde se vyhodnocuje i nižší počet než 30 kolonií.  
Zředují se vzorky více znečištěných vod (surových, ze studní). Stupeň zředění se určuje u známých vzorků podle zkušenosti z předcházejících rozborů, u vzorků neznámého složení se připravuje stupňů ředění více.  
Pro každý stupeň zředění se užívá zředování v poměru 1:10. Zředování se provádí v lahvičkách obsahujících 9 ml sterilního ředícího roztoku přidáním 1 ml vzorku neředěného nebo již zředěného v nižším stupni. Lahvička se uzavře a promíchá se intenzivním protřepáním.
4. **Očkování:** Do předem označených sterilních Petriho misek o průměru 90 mm se pipetuje sterilní pipetou po 1 ml vzorku vody, nejvýše 2 ml. Předpokládá-li se vyšší znečištění vzorku, očkuje se po 1 ml příslušného ředění.
5. **Kultivace:** Po naočkování se Petriho misky se vzorkem zalijí přibližně 15 ml rozehřátého kultivačního média, temperovaného na  $45 \pm 3$  °C. Po zakrytí misek víčkem se médium se vzorkem opatrně, ale důkladně promíchá krouživým pohybem. Pak se obsah nechá ztuhnout.  
Doba, mezi naočkováním vzorku (nebo jeho zředěním) a přidáním roztopeného média, nesmí překročit 15 min. Očkují se dvě misky (duplikáty) pro každý vzorek a ředění.  
Misky se obrátí dnem vzhůru a jedna sada se kultivuje při teplotě  $36 \pm 2$  °C po dobu  $44 \pm 4$  h, druhá sada se kultivuje při teplotě  $22 \pm 2$  °C po dobu  $68 \pm 4$  h.

**Vyhodnocení zkoušky:**

- Misky se vyhodnotí ihned po vyjmutí z termostatu.
- Misky se splývajícím růstem kolonií se vyloučí.
- Kolonie vyrostlé na/v médiu se počítají proti světlu stolní lampy a tmavému podkladu. Odečtené kolonie se označují na dně misky fixem nebo počítací tužkou. Při paralelním stanovení se počítá průměr. Odečtený počet kolonií se podle stupně zředění přepočte na 1 ml vzorku vody.
- V nezředěném vzorku se udává celkový počet kolonií i v tom případě, že vyrostlo méně než 30 kolonií na misce.
- Ve zředěném vzorku se uvádějí výsledky pouze z ředění, kde na miskách vyrostlo 30 až 300 kolonií.

- Jestliže vyrostlo i v nejvyšším stupni ředění (-n) více než 300 kolonií a stanovení nelze zopakovat, uvádí se do protokolu  $>300 \times 10^n$  v 1 ml.
- Misky, na nichž došlo v důsledku nesprávné volby zředění k nadměrnému růstu kolonií (nad 300), se označují jako nepočítatelné a nevyhodnocují se. Nevyhodnocují se a jako přerostlé se označují misky, u nichž na větší části plochy nebo na celém povrchu došlo k růstu obřích kolonií některých pohyblivých bakterií.



Obr. 14. Příklad misky s přerostlými koloniemi (vlevo) a nepočítatelnými (vpravo).

**Poznámka:** Počet kolonií po přepočtu na 1 ml vzorku se zaokrouhluje následovně:

- **Počet kolonií** je 1 až 100 - nezaokrouhluje se.
- **Počet kolonií** je 101 až 1 000 - zaokrouhluje se na desítky.
- **Počet kolonií** je 1 001 až 10 000 - zaokrouhluje se na stovky.
- **Počet kolonií** je 10 001 až 100 000 - zaokrouhluje se na tisíce.
- **Počet kolonií** je 100 001 až 1 000 000 - zaokrouhluje se na desetitisíce.

## 8.2 Stanovení psychrofilních a mezofilních bakterií

Metoda slouží ke stanovení psychrofilních a mezofilních bakterií v pitné, povrchové, podzemní a bazénové vodě. Psychrofilní bakterie jsou mikroorganismy rostoucí na masopeptonovém agaru s optimem růstu při teplotě 20 °C. Jsou hygienickým indikátorem mikrobiálního rozkladu rychle rozložitelných organických látek za nižších teplot. Mezofilní bakterie jsou mikroorganismy rostoucí na masopeptonovém agaru s optimem růstu při teplotě 37 °C. Jsou hygienickým indikátorem znečištění mikroflórou teplokrevných živočichů včetně člověka.

**Podstata zkoušky:** Odměřený objem vzorku nebo příslušného ředění vzorku se v Petriho misce dokonale promíchá s roztopeným specifickým živným kultivačním médiem. Jedna sada misek se kultivuje při teplotě 37 °C po dobu 48 h, druhá sada při teplotě 20 °C po dobu 72 h. Z celkového počtu kolonií vyrostlých v kultivačním médiu se vypočte počet kolonie tvořících jednotek v 1 ml.

**Chemikálie:** Používané chemikálie jsou stupně čistoty ch.č. nebo p.a. Voda se používá destilovaná nebo demineralizovaná bez specifických požadavků na jakost.

- Masopeptonový agar.
- Ředící roztok (fyziologický roztok).

**Přístroje a pomůcky:** Pipety s možností aplikace objemu 0,1 a 0,2 ml, jednorázové špičky, sterilní skleněné pipety o objemu 1 ml a 2 ml, pinzety, kahan, analytické váhy citlivost 0,01 g, autokláv ( $121 \pm 3$  °C), horkovzdušný sterilizátor ( $160 \pm 2$  °C), Erlenmayerovy láhve, odměrný válec 100 ml, lahve se šroubovým uzávěrem, sterilní plastové Petriho misky o průměru 90 mm, termostat  $20 \pm 2$  °C, termostat  $37 \pm 2$  °C, chladičí brašny s chladičími vložkami.

### Postup zkoušky:

1. **Temperování vzorku:** Před vlastním rozbořem se vzorek, pokud je odebírán za nízkých teplot nebo uchováván v lednici, nechá vytemperovat na laboratorní teplotu  $20$  °C až  $25$  °C. K vytemperování obvykle stačí doba nutná pro přípravu pracovní plochy a všech pomůcek nutných ke zpracování vzorku.
2. **Promíchání vzorku:** Bezprostředně před vlastním rozbořem i před zředováním se vzorek musí dokonale promíchat intenzivním protřepáním, aby se bakterie rovnoměrně rozptýlily v celém objemu vzorku.
3. **Volba vhodného objemu k očkování a zředování vzorku:** Objem zkoušeného vzorku nebo zředěného vzorku má být volen tak, aby na/v kultivačním médiu v Petriho misce průměru 90 mm vyrostlo od 30 do 300 kolonií. Přímé očkování 1 ml vzorku se používá u vod pitných a u čistých surových vod. Zde se vyhodnocuje i nižší počet než 30 kolonií. Zředují se vzorky více znečištěných vod (surových, ze studní). Stupeň zředění se určuje u známých vzorků podle zkušenosti z předcházejících rozborů, u vzorků neznámého složení se připravuje stupňů ředění více. Pro každý stupeň zředění se užívá zředování v poměru 1:10. Zředování se provádí v lahvičkách obsahujících 9 ml sterilního ředícího roztoku přidáním 1 ml vzorku neředěného nebo již zředěného v nižším stupni. Lahvička se uzavře a promíchá se intenzivním protřepáním.
4. **Očkování:** Do předem označených sterilních Petriho misek o průměru 90 mm se pipetuje sterilní pipetou po 1 ml vzorku vody, nejvýše 2 ml. Předpokládá-li se vyšší znečištění vzorku, očkuje se po 1 ml příslušného ředění.
5. **Kultivace:** Po naočkování se Petriho misky se vzorkem zalijí přibližně 15 ml rozehřátého kultivačního média, temperovaného na  $45 \pm 3$  °C. Po zakrytí misek víčkem se médium se vzorkem opatrně, ale důkladně promíchá krouživým pohybem. Pak se obsah nechá ztuhnout. Doba, mezi naočkováním vzorku (nebo jeho zředěním) a přidáním roztopeného média, nesmí překročit 15 min. Očkují se dvě misky (duplikáty) pro každý vzorek a ředění.

Misky se obrátí dnem vzhůru a jedna sada se kultivuje při teplotě  $37$  °C po dobu 48 h, druhá sada se kultivuje při teplotě  $20$  °C po dobu 72 h.

**Vyhodnocení zkoušky:**

- Misky se vyhodnotí ihned po vyjmutí z termostatu. Misky se splývajícím růstem kolonií se vyloučí. Kolonie vyrostlé na/v médiu se počítají proti světlu stolní lampy a tmavému podkladu. Odečtené kolonie se označují na dně misky fixem nebo počítací tužkou. Při paralelním stanovení se počítá průměr. Odečtený počet kolonií se podle stupně zředění přepočte na 1 ml vzorku vody.
- V nezředěném vzorku se udává celkový počet kolonií i v tom případě, že vyrostlo méně než 30 kolonií na misce.
- Ve zředěném vzorku se uvádějí výsledky pouze z ředění, kde na miskách vyrostlo 30 až 300 kolonií. Jestliže vyrostlo i v nejvyšším stupni ředění (-n) více než 300 kolonií a stanovení nelze zopakovat, uvádí se do protokolu  $>300 \times 10^n$  v 1 ml. Misky, na nichž došlo v důsledku nesprávné volby zředění k nadměrnému růstu kolonií (nad 300), se označují jako nepočitatelné a nevyhodnocují se. Nevyhodnocují se a jako přerostlé se označují misky, u nichž na větší části plochy nebo na celém povrchu došlo k růstu obřích kolonií některých pohyblivých bakterií. Počet kolonií po přepočtu na 1 ml vzorku se zaokrouhluje, viz kap. 8.1.

**8.3 Stanovení koliformních bakterií**

Tato metoda platí pro stanovení koliformních bakterií v nedezinfikovaných vodách (povrchových, podzemních, odpadních vodách, apod.). Lze ji použít i pro pitné vody, kde je nadměrný růst doprovodné mikroflóry. Není vhodná pro vzorky s vysokým obsahem nerozpuštěných látek, které ruší membránovou filtraci nebo kde vysoký počet jiných organismů omezuje růst stanovovaných bakterií. Koliformní bakterie jsou gramnegativní tyčinky z čeledi *Enterobacteriaceae*, které netvoří spóry, jsou schopné růst na kultivačním médiu obsahujícím žlučové soli (na Endo agaru). Mají schopnost fermentovat laktózu při teplotě  $36 \pm 2$  °C se současnou tvorbou kyselin, plynu a aldehydu během 24 h a mají negativní cytochromoxidázový test.

**Podstata zkoušky:** Zkoušený objem vzorku nebo zředěného vzorku se filtruje přes membránový filtr, který se přenese na selektivní kultivační agarové médium s laktózou. Naočkované misky s membránovými filtry se kultivují při  $36 \pm 2$  °C po dobu 18 h až 24 h. Pozitivním cytochromoxidázovým testem se vyloučí kolonie bakterií, které nepatří do skupiny koliformních bakterií.

**Chemikálie:** Používané chemikálie jsou stupně čistoty ch.č. nebo p.a. Voda se používá destilovaná nebo demineralizovaná bez specifických požadavků na jakost.

- Endo agar.
- Roztok bazického fuchsínu.
- Roztok pro cytochromoxidázový test.
- Ředící roztok (fyziologický roztok).



**Přístroje a pomůcky:** Pipety s možností aplikace objemu 0,1 a 0,2 ml, jednorázové špičky, sterilní skleněné pipety o objemu 10 ml, pinzety, kahan, analytické váhy citlivost 0,01 g, autokláv ( $121 \pm 3$  °C), horkovzdušný sterilizátor ( $160 \pm 2$  °C), Erlenmayerovy láhve, odměrný válec 100 ml, lahve se šroubovým uzávěrem, sterilní plastové Petriho misky o průměru 60 mm, membránové filtry (průměr 50 mm, velikost pórů 0,45  $\mu$ m), filtrační zařízení s vývěvou, termostat  $36 \pm 2$  °C, chladnička  $5 \pm 3$  °C, chladicí brašny s chladicími vložkami.

### Postup zkoušky:

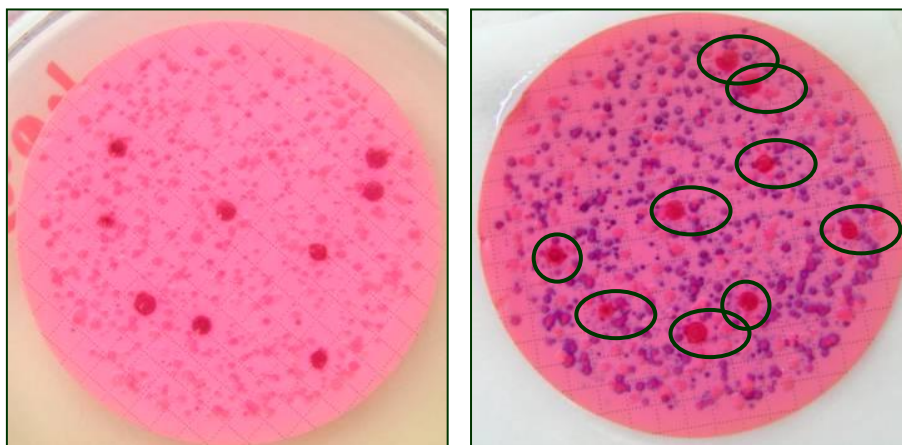
- 1. Temperování vzorku:** Před vlastním rozbořem se vzorek, pokud je odebírán za nízkých teplot nebo uchováván v lednici, nechá vytemperovat na laboratorní teplotu 20 °C až 25 °C. K vytemperování obvykle stačí doba nutná pro přípravu pracovní plochy a všech pomůcek nutných ke zpracování vzorku.
- 2. Promíchání vzorku:** Bezprostředně před vlastním rozbořem i před zředováním se vzorek musí dokonale promíchat intenzivním protřepáním, aby se bakterie rovnoměrně rozptýlily v celém objemu vzorku.
- 3. Volba vhodného objemu k očkování a zředování vzorku:** Objem zkoušeného vzorku nebo zředěného vzorku má být volen tak, aby na membránovém filtru o průměru 50 mm vyrostlo od 10 do 100 kolonií.  
Pro pitné vody nedezinfikované (např. studny) je stanoven objem filtrovaného vzorku 100 ml.  
U surových vod povrchových, kde je předpoklad vyššího mikrobiálního znečištění, se použije přiměřeně menší objem filtrovaného vzorku, případně vzorek zředěný. Stupeň zředění se určuje podle zkušenosti z předchozích rozborů, u vzorků neznámého složení se připravuje stupňů ředění více. Pro každý stupeň zředění se užívá zředování v poměru 1:10. Zředování se provádí v lahvičkách se šroubovým uzávěrem obsahujících 9 ml nebo 90 ml sterilního ředícího roztoku přidáním 1 ml nebo 10 ml vzorku neředěného nebo již zředěného v nižším stupni. Lahvička se uzavře a promíchá intenzivním protřepáním.
- 4. Filtrace:** Zapojí se filtrační přístroj a vývěva. Plamenem kahanu se vysterilizuje pevný, porézni disk spodní části filtrační nálevky. Sterilní pinzetou se na něj umístí sterilní membránový filtr a upevní se sterilní nálevka. Při zavřeném kohoutu vývěvy se nalije nebo odpipetuje do nálevky požadovaný objem vzorku.  
Následuje otevření výpustného kohoutu spodní části nálevky a pomocí vakua vývěvy se vzorek přefiltruje.
- 5. Kultivace:** Po odsátí celého objemu vody se odstraní nálevka a membránový filtr se přenesení sterilní pinzetou na pevné kultivační médium (Endo agar) v Petriho misce. Filtr se klade pozvolna tak, aby nevznikly mezi kultivačním médiem a filtrem vzduchové bubliny.  
Takto připravené misky se obrácené dnem vzhůru uloží do termostatu a kultivují se 18 - 24 h při teplotě  $36 \pm 2$  °C.
- 6. Potvrzující test:** Cytochromoxidázovým testem se vyloučí kolonie bakterií, které mají podobné morfologické a biochemické vlastnosti, ale nepatří do skupiny koliformních bakterií.

Pinzetou se z Petriho misky přenesou membránový filtr s vyrostlými koloniemi na kousek filtračního papíru nasyceného roztokem pro cytochromoxidázový test. Je nutné používat filtrační papír, který se činidlem nebarví modře.

Po dvou minutách se spočítají kolonie koliformních bakterií, které jsou tmavočervené a mají negativní cytochromoxidázový test (vyloučí se kolonie, které působením činidla na cytochromoxidázu zmodraly).

#### Vyhodnocení zkoušky:

- Počet koliformních bakterií se vyjadřuje u nezředěných vzorků na zpracovaný objem vzorku, tj. na 100 ml. U vzorků filtrovaných z menšího objemu a u zředěných vzorků se přepočítává na 100 ml.
- V nezředěném vzorku se udává celkový počet kolonií i v tom případě, že vyrostlo méně než 10 kolonií na misce.
- Ve zředěném vzorku se uvádějí výsledky pouze z ředění, kde na miskách vyrostlo 10 až 100 kolonií.
- Misky, na kterých vyrostlo v důsledku nesprávné volby ředění více než 100 kolonií, se označují jako nepočítatelné a nevyhodnocují se.



Obr. 15. Příklad vyhodnocení misek s narostlými koloniemi koliformních bakterií. Vlevo – vzhled kolonií před potvrzením cytochromoxidázovým testem. Vpravo – vzhled kolonií po cytochromoxidázovém testu, modré kolonie nejsou koliformní, červené jsou koliformní a cytochromoxidáza negativní.

## 8.4 Stanovení termotolerantních koliformních bakterií a *Escherichia coli*

Tato metoda platí pro stanovení termotolerantních koliformních bakterií v surových povrchových a podzemních vodách a pro stanovení *Escherichia coli* v nedezinfikovaných pitných vodách a v surových vodách. Není vhodná pro vzorky s vysokým obsahem nerozpuštěných látek nebo s vysokým počtem jiných organismů inhibujících růst stanovovaných bakterií. Termotolerantní koliformní bakterie jsou gramnegativní tyčinky, které netvoří spóry, mají negativní cytochromoxidázový test. Za aerobních podmínek během 24 h kultivace a při teplotě 44 °C tvoří kolonie na selektivním diferenačním médiu s laktózou za současné tvorby kyselin (nebo aldehydu). *Escherichia coli* jsou termotolerantní bakterie, které mají schopnost ve druhém stupni kultivace hydrolyzovat specifickým enzymem,  $\beta$ -D-glukuronidázou, v médiu přítomný MUG (4-methyl-umbelliferyl- $\beta$ -D-glukuronid) za vzniku 4-methyl-umbelliferonu, který vykazuje v dlouhovlnném UV záření světle modrou fluorescenci.

**Podstata zkoušky:** Zkoušený objem vzorku nebo zředěného vzorku se přefiltruje přes membránový filtr, který se pak přenesou na selektivní kultivační agarové médium s laktózou. Naočkované misky s membránovými filtry se kultivují po dobu 18 - 24 h při teplotě  $44 \pm 2$  °C. Spočítají se kolonie termotolerantních koliformních bakterií. Vyhodnocené membránové filtry se přenesou na kultivační podložku nasycenou tekutým kultivačním médiem (podložka nasycená MUG), na níž se kultivují další 2 až 4 h ve tmě při teplotě  $36 \pm 2$  °C. Pod UV lampou se spočítají kolonie *Escherichia coli*.

**Chemikálie:** Používané chemikálie jsou stupně čistoty ch.č. nebo p.a. Voda se používá destilovaná nebo demineralizovaná bez specifických požadavků na jakost.

- m-FC agar.
- Alkalický roztok kyseliny rosolové.
- Kultivační přípravek mCOLItest (komerční dodávaný test, lze nahradit přípravou činidla MUG).
- Ředící roztok (fyziologický roztok).

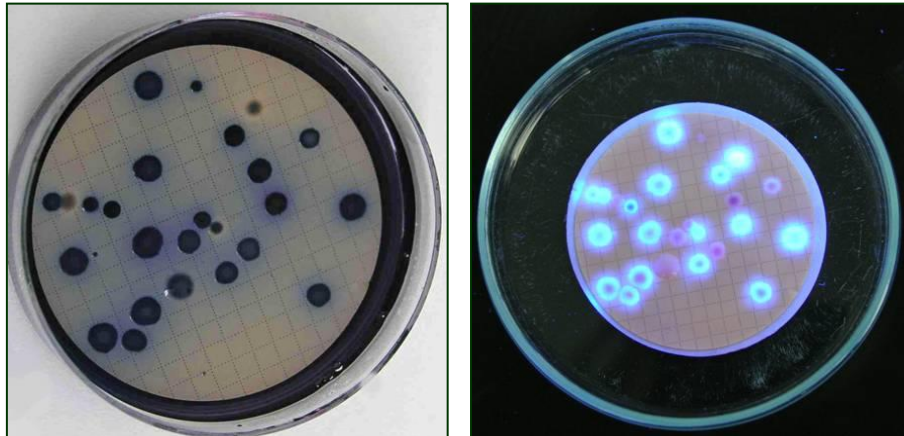
**Přístroje a pomůcky:** Pipety s možností aplikace objemu 0,1 a 0,2 ml, jednorázové špičky, sterilní skleněné pipety o objemu 10 ml, pinzety, kahan, analytické váhy citlivost 0,01 g, autokláv ( $121 \pm 3$  °C), horkovzdušný sterilizátor ( $160 \pm 2$  °C), Erlenmayerovy láhve, odměrný válec 100 ml, lahve se šroubovým uzávěrem, sterilní plastové Petriho misky o průměru 60 mm, membránové filtry (průměr 50 mm, velikost pórů 0,45  $\mu$ m), filtrační zařízení s vývěvou, termostat  $36 \pm 2$  °C, termostat  $44 \pm 2$  °C, chladnička  $5 \pm 3$  °C, chladicí brašny s chladicími vložkami.

**Postup zkoušky:**

1. **Temperování vzorku:** Před vlastním rozbořem se vzorek, pokud je odebírán za nízkých teplot nebo uchováván v lednici, nechá vytemperovat na laboratorní teplotu 20 °C až 25 °C. K vytemperování obvykle stačí doba nutná pro přípravu pracovní plochy a všech pomůcek nutných ke zpracování vzorku.
2. **Promíchání vzorku:** Bezprostředně před vlastním rozbořem i před zředováním se vzorek musí dokonale promíchat intenzivním protřepáním, aby se bakterie rovnoměrně rozptýlily v celém objemu vzorku.
3. **Volba vhodného objemu k očkování a zředování vzorku:** Objem zkoušeného vzorku nebo zředěného vzorku má být volen tak, aby na membránovém filtru o průměru 50 mm vyrostlo nejvýše 100 kolonií.  
Pro pitné vody nedezinfikované je stanoven objem filtrovaného vzorku 100 ml. U surových vod povrchových, kde je předpoklad vyššího mikrobiálního znečištění se použije přiměřeně menší objem filtrovaného vzorku, případně vzorek zředěný. Stupeň zředění se určuje podle zkušenosti z předchozích rozborů, u vzorků neznámého složení se připravuje stupňů ředění více. Pro každý stupeň zředění se užívá zředování v poměru 1:10. Zředování se provádí v lahvičkách se šroubovým uzávěrem obsahujících 9 ml nebo 90 ml sterilního ředícího roztoku přidáním 1 ml nebo 10 ml vzorku neředěného nebo již zředěného v nižším stupni. Lahvička se uzavře a promíchá intenzivním protřepáním.
4. **Filtrace:** Zapojí se filtrační přístroj a vývěva. Plamenem kahanu se vysterilizuje pevný, porézni disk spodní části filtrační nálevky. Sterilní pinzetou se na něj umístí sterilní membránový filtr a upevní se sterilní nálevka. Při zavřeném kohoutu vývěvy se nalije nebo odpipetuje do nálevky požadovaný objem vzorku. Následuje otevření výpustného kohoutu spodní části nálevky a pomocí vakua vývěvy se vzorek přefiltruje.
5. **Kultivace:** Po odsátí celého objemu vody se odstraní nálevka a membránový filtr se přenesse sterilní pinzetou na pevné kultivační médium (m-FC agar) v Petriho misce. Filtr se klade pozvolna tak, aby nevznikly mezi kultivačním médiem a filtrem vzduchové bubliny.  
Takto připravené misky se obrácené dnem vzhůru uloží do termostatu a kultivují se 18 - 24 h při teplotě  $44 \pm 2$  °C. Po skončení kultivace se počítají kolonie termotolerantních koliformních bakterií.
6. **Stanovení *Escherichia coli*:** Membránový filtr s koloniemi se přenesse na povrch kultivační podložky nasycené kultivačním médiem obsahujícím MUG (komerční test, tzv. mCOLItest navlhčený sterilním fyziologickým roztokem).  
Misky s podložkami se umístí do termostatu a kultivují se při  $36 \pm 2$  °C po dobu 2 h. Po skončení kultivace se kolonie pozorují v zatemněné místnosti pod UV lampou při 360 nm. Počítají se kolonie se světle modrou fluorescencí. Pokud je odečet negativní, kultivuje se další 2 h.

**Vyhodnocení zkoušky:**

- Počet termotolerantních koliformních bakterií a počet *Escherichia coli* se vyjadřuje u nezředěných vzorků na zpracovaný objem vzorku, tj. na 100 ml. U vzorků filtrovaných z menšího objemu a u zředěných vzorků se přepočítává na 100 ml.
- V nezředěném vzorku se udává celkový počet kolonií i v tom případě, že vyrostlo méně než 10 kolonií na misce.
- Ve zředěném vzorku se uvádějí výsledky pouze z ředění, kde na miskách vyrostlo 10 až 100 kolonií.
- Misky, na kterých vyrostlo v důsledku nesprávné volby ředění více než 100 kolonií, se označují jako nepočítatelné a nevyhodnocují se.



Obr. 16. Příklad vyhodnocení misek s narostlými koloniemi termotolerantních koliformních bakterií a *Escherichia coli*. Vlevo – kolonie s narostlými koloniemi termotolerantních bakterií na m-FC agaru před confirmací. Vpravo – modře svítící/fluoreskující kolonie jsou potvrzené *Escherichia coli*.

## 8.5 Stanovení intestinálních enterokoků

Tato metoda platí pro stanovení intestinálních enterokoků v pitné a povrchové vodě. Není vhodná pro vzorky s vysokým obsahem nerozpuštěných látek nebo s mnoha interferujícími mikroorganismy. Intestinální enterokoky jsou grampozitivní koky vyskytující se v párech nebo řetězcích. Vyskytují se ve střevním traktu člověka a zvířat. Enterokoky lze považovat za indikátory fekálního znečištění. Avšak některé enterokoky nalezené ve vodě mohou občas pocházet i z jiných zdrojů. Mají schopnost redukovat 1,3,5-trifenylnitrotetrazoliumchlorid na formazan a hydrolyzovat aeskulin při teplotě 44 °C na specifických médiích.

**Podstata zkoušky:** Zkoušený podíl vzorku nebo zředěného vzorku se filtruje přes membránový filtr, který se přenesou na pevné kultivační médium obsahující azid sodný a bezbarvý 2,3,5-tri-fenyltetrazoliumchlorid (TTC), který je činností enterokoků redukován na červený formazan. Kultivace se uskutečňuje při teplotě 36 ± 2 °C po dobu 44 ± 4 h. Po kultivaci se počítají jako presumptivní enterokoky všechny vyrostlé kolonie, které jsou

kaštanové, červené či růžově zbarvené. Pokud se vyskytnou typické kolonie, přenesou se celý membránový filtr na misku s pevným konfirmačním žluč-aeskulin-azidovým agarem. Médium s bakteriemi se inkubuje při teplotě  $44 \pm 2$  °C po dobu 2 h. Enterokoky hydrolyzují aeskulin na 6,7-dihydroxikumarin, který s železitými ionty dává tříslově hnědou až černou sloučeninu, která difunduje do média.

**Chemikálie:** Používané chemikálie jsou stupně čistoty ch.č. nebo p.a. Voda se používá destilovaná nebo demineralizovaná bez specifických požadavků na jakost.

- Médium dle Slanetz – Bartley (m-enterokokový agar).
- Žluč-aeskulin-azidový agar.
- Ředící roztok (fyziologický roztok).

**Přístroje a pomůcky:** Pipety s možností aplikace objemu 0,1 a 0,2 ml, jednorázové špičky, sterilní skleněné pipety o objemu 10 ml, pinzety, kahan, analytické váhy citlivost 0,01 g, autokláv ( $121 \pm 3$  °C), horkovzdušný sterilizátor ( $160 \pm 2$  °C), Erlenmayerovy láhve, odměrný válec 100 ml, lahve se šroubovým uzávěrem, sterilní plastové Petriho misky o průměru 60 mm, membránové filtry (průměr 50 mm, velikosti pórů 0,45 μm), filtrační zařízení s vývěvou, termostat  $36 \pm 2$  °C, termostat  $44 \pm 2$  °C, chladnička  $5 \pm 3$  °C, chladicí brašny s chladicími vložkami.

#### Postup zkoušky:

1. **Temperování vzorku:** Před vlastním rozбором se vzorek, pokud je odebírán za nízkých teplot nebo uchováván v lednici, nechá vytemperovat na laboratorní teplotu  $20$  °C až  $25$  °C. K vytemperování obvykle stačí doba nutná pro přípravu pracovní plochy a všech pomůcek nutných ke zpracování vzorku.
2. **Promíchání vzorku:** Bezprostředně před vlastním rozбором i před zředěním se vzorek musí dokonale promíchat intenzivním protřepáním, aby se bakterie rovnoměrně rozptýlily v celém objemu vzorku.
3. **Volba vhodného objemu k očkování a zředění vzorku:** Zkoušený objem vzorku nebo zředěného vzorku má být volen tak, aby na membránovém filtru o průměru 50 mm vyrostlo nejvýše 100 kolonií.  
Pro pitné vody je stanoven objem filtrovaného vzorku 100 ml.  
U surových vod povrchových, kde je předpoklad vyššího mikrobiálního znečištění se použije přiměřeně menší objem filtrovaného vzorku, případně vzorek zředěný. Stupeň zředění se určuje podle zkušenosti z předchozích rozborů, u vzorků neznámého složení se připravuje stupňů ředění více.  
Pro každý stupeň zředění se užívá zředění v poměru 1:10. Zředění se provádí v lahvičkách se šroubovým uzávěrem obsahujících 9 ml nebo 90 ml sterilního ředícího roztoku přidáním 1 ml nebo 10 ml vzorku neředěného nebo již zředěného v nižším stupni. Lahvička se uzavře a promíchá intenzivním protřepáním.
4. **Filtrace:** Zapojí se filtrační přístroj a vývěva. Plamenem kahanu se vysterilizuje pevný, porézní disk spodní části filtrační nálevky. Sterilní pinzetou se na něj umístí sterilní membránový filtr a upevní se sterilní nálevka. Při zavřeném kohoutu vývěvy se nalije nebo odpipetuje do nálevky požadovaný objem vzorku. Následuje otevření

výpustného kohoutu spodní části nálevky a pomocí vakua vývěvy se vzorek přefiltruje.

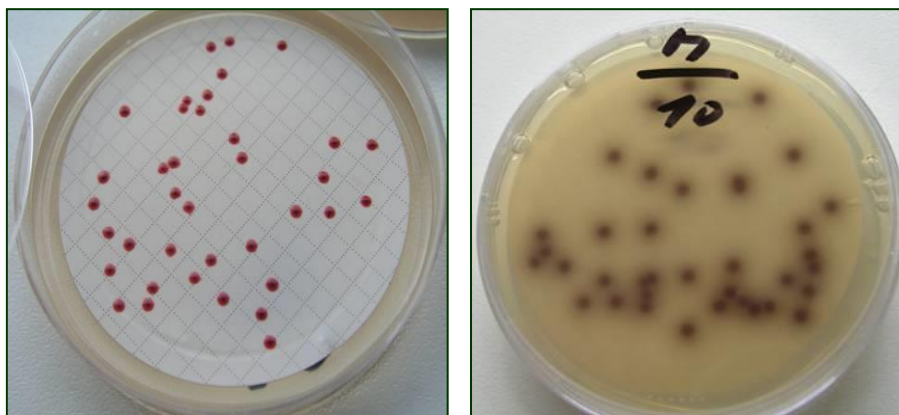
5. **Kultivace:** Po odsátí celého objemu vody se odstraní nálevka a membránový filtr se přenesse sterilní pinzetou na pevné kultivační médium (Slanetz–Bartley agar) v Petriho misce. Filtr se klade pozvolna tak, aby nevznikly mezi kultivačním médiem a filtrem vzduchové bubliny.

Takto připravené misky se obrácené dnem vzhůru uloží do termostatu a kultivují se  $44 \text{ h} \pm 4 \text{ h}$  při teplotě  $36 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ .

6. **Potvrzující test a stanovení enterokoků:** Po kultivaci se za typické považují všechny vyrostlé kolonie červeně, kaštanově nebo růžově zbarvené, a to celé, nebo i takové, které jsou zbarvené pouze ve středu. Pro potvrzení enterokoků se filtr se všemi koloniemi otiskne na žluč-aeskulin-azidový agar a toto médium se kultivuje, spolu s přenesenými koloniemi, při  $44 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  po dobu 2 h. Počítají se kolonie vykazující tříslově hnědé až černé zbarvení média v bezprostředním okolí.

### Vyhodnocení zkoušky:

- Počet kolonií potvrzených konfirmačním testem se vyjadřuje u nezředěných vzorků (pitná voda) na zpracovaný objem vzorku, tj. na 100 ml. U vzorků filtrovaných z menšího objemu a u zředěných vzorků se přepočítává na 100 ml.
- V nezředěném vzorku se udává celkový počet kolonií i v tom případě, že vyrostlo méně než 10 kolonií na misce.
- Ve zředěném vzorku se uvádějí výsledky pouze z ředění, kde na miskách vyrostlo 10 až 100 kolonií.
- Misky, na kterých vyrostlo v důsledku nesprávné volby ředění více než 100 kolonií, se označují jako nepočítatelné a nevyhodnocují se.



Obr. 17. Příklad vyhodnocení misek s narostlými koloniemi intestinálních enterokoků. Vlevo – kolonie vyrostlé na Slanetz–Bartley agaru. Vpravo – Přenesený a otisknutý filtr na žluč-aeskulin-azidový agar s potvrzenými enterokoky.

## 9 Vybrané metody půdní mikrobiologie

Tato kapitola uvádí některé jednodušší i složitější metody vhodné pro analýzu půdních mikroorganismů a jejich aktivit. Většinou se jedná o metody poněkud složitější. Analýza půdních mikroorganismů má svoje specifika. Půda je velice heterogenní prostředí a je to vlastně živý systém, který se neustále proměňuje mj. i činností půdních mikroorganismů. Řada mikroorganismů je pevně vázaných na nejrůznější půdní částice. Při použití kultivačních technik je třeba brát v úvahu, že současnými kultivačními technikami lze kultivovat jen asi 1 - 2 % půdních mikroorganismů. Na aktivitu mikroorganismů pak působí řada faktorů, jako je např. teplota, vlhkost apod.

### 9.1 Stanovení fosfolipidových mastných kyselin v půdě

Metoda je stále rozšířenější v půdní mikrobiologii, protože umožňuje relativně snadno charakterizovat půdní mikrobiální společenstvo z několika hledisek:

- **Kvantitativní:** koncentrace fosfolipidových mastných kyselin je úměrná živé mikrobiální biomase.
- **Kvalitativní:** některé mastné kyseliny (tzv. indikátorové) jsou produkovány jen některými skupinami půdních mikroorganismů. To umožňuje hrubý odhad složení mikrobiálního společenstva popř. sledování změny u vybraných skupin mikroorganismů.
- **Fyziologické:** znalosti o adaptaci biologických membrán je možné využít k indikaci fyziologických změn půdního mikrobiálního společenstva (zejména indikace stresu).

**Podstata metody:** Metoda využívá toho, že fosfolipidy jsou u mikroorganismů přítomné výhradně v buněčných membránách (nejsou ukládány jako zásobní látky), jejich množství v buňce je v poměru k hmotnosti cca konstantní a po buněčné smrti jsou rychle rozkládány. Lze je tak využít jako ukazatel **živé mikrobiální biomasy**. Cytoplazmatická membrána jako osmotické rozhraní buňky prochází neustálými přeměnami, jejichž cílem je udržet přiměřenou propustnost a přiměřenou fluiditu (tekutost) membrány. Složení membránových fosfolipidů tak rychle reaguje na vnější prostředí. Taxonomické odlišnosti v biosyntéze mastných kyselin umožňují vymezit sadu indikátorových mastných kyselin. Vlastní provedení metody je založeno na extrakci fosfolipidů z půdy, jejich následné purifikaci (přečištění) a konečném stanovení methylesterů fosfolipidových mastných kyselin metodou plynové chromatografie.

**Etapizace stanovení:** Celý postup je rozdělený do čtyř etap, mezi kterými je možné vzorky uchovávat zmrazené. Etapové zpracování je účelné i vzhledem k různé časové náročnosti jednotlivých etap:

- **1. etapa:** Extrakce celkových lipidů z půdy.
- **2. etapa:** Separace lipidových frakcí na neutrální lipidy, glykolipidy a polární lipidy (zahrnující i fosfolipidy).



evropský  
sociální  
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost

UNIVERZITA J. E. PURKYNĚ V ÚSTÍ NAD LABEM



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ  
CZ.1.07/2.2.00/28.0205 - ENVIMOD



- **3. etapa:** Rozklad fosfolipidů a příprava methylesterů fosfolipidových mastných kyselin.
- **4. etapa:** Analýza methylesterů fosfolipidových mastných kyselin plynovou chromatografií.

**Přístroje a pomůcky:** Předvážky, analytické váhy, ultrazvuková lázeň, třepačka s chlazením, centrifuga, tlaková láhev s dusíkem, rotační odparka, zařízení pro kolonkovou kapalinovou chromatografii, vodní lázeň, vortex, plynový chromatograf nejlépe s hmotnostním detektorem, skleněné reagenční lahve 250 ml („pyrexky“), dělicí nálevky 250 ml, centrifugační zkumavky skleněné nebo teflonové, odměrné baňky (na standard 19:0, objem dle počtu vzorků), automatické dávkovače rozpouštědel, pipety skleněné, 10 ml vialky (pro stanovení CHSK a celkového dusíku), 2 ml vialky s víčkem a septem.

**Chemikálie a roztoky:** Čistá rozpouštědla by měla mít kvalitu „pro GC“. Chloroform bez ethanolu, methanol vysušený, aceton, toluen, hexan, koncentrovaná kyselina octová (ledová), dihydrogenfosforečnan draselný ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), hydrogenfosforečnan sodný ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), hydroxid draselný (KOH), methylnonadekanoát.

- **Fosfátový pufr (pH 7,4, 50 mmol/l):** naváží se 2,8 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a 5,2 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  do 1 litru destilované vody a upraví se pH na 7,4.
- **Kyselina octová 0,2 mol/l:** naváží se do kádinky 0,1207 g ledové kyseliny, rozpustí se v menším množství deionizované vody, kvantitativně převede do odměrné baňky a doplní do 10 ml.
- **Roztok KOH v methanolu:** naváží se 0,1122 g KOH, rozpustí se v menším množství methanolu, kvantitativně převede do odměrné baňky a doplní do 10 ml. Musí být vždy čerstvý!
- **Směs methanol – toluen 1:1 (v/v):** musí být vždy čerstvě připravené!
- **Směs hexan – chloroform 4:1 (v/v)**
- **Promývací směs chloroform-pufr-methanol 1:0,8:2:** smíchá se 10 ml chloroformu, 8 ml fosfátového pufru a 20 ml methanolu.
- **Standard methylnonadekanoátu 2 g/l v hexanu:** naváží se do kádinky 0,0200 g methylnonadekanoátu, převede se kvantitativně hexanem do odměrné baňky a doleje hexanem do 10 ml. Musí být vždy čerstvý!

**Pozor!** Fosfolipidy jsou citlivé a snadno podléhají rozkladu, zejména světlem a teplem. Laboratorní sklo je nutné pečlivě vymýt, nejlépe kyselinou chlorovodíkovou.

**Pozor!** Při práci se pracuje s těkavými a hořlavými organickými rozpouštědly, **pracujte v digestoři**. Methanol je **vysoce toxická látka!**

**Pracovní postup:****1. etapa: Extrakce celkových lipidů z půdy (časová náročnost cca 4 h)**

Cílem této etapy je vyextrahovat z půdy všechny lipidy, pokud možno kvantitativně.

1. Do 250 ml skleněné láhve se odváží cca 10 g půdy, přesná váha se zaznamená.
2. Přidá se fosfátový pufr (15 ml).
3. Přidá se methanol (37,5 ml).
4. Přidá se chloroform (18,8 ml).
5. Vzorek se ochladí v lednici na cca 10 °C.
6. Následuje 15 min ultrazvuková lázeň.
9. Po dobu 2 h se vzorek třepá na třepačce při 200 rpm a 10 °C.
10. Vzorek se odstředí při 4 000 rpm, 30 min, 10 °C.
11. Supernatant se přelije opatrně do dělicí nálevky.
12. K sedimentu se přidá cca 10 ml promývacího roztoku a důkladně se protřepe na vortexu.
13. Vzorek se odstředí při 4 000 rpm, 10 min, 10 °C.
14. Supernatant se přidá do dělicí nálevky.
15. Do dělicí nálevky se přidá 18,8 ml destilované vody a 18,8 ml chloroformu.
17. Dělicí nálevka se uzavře a důkladně protřepe.
18. Separace fází probíhá přes noc v lednici.
19. Spodní chloroformová fáze se přelije do baňky s kulatým dnem.

Po tomto kroku je možné vzorek zamrazit a pokračovat později.

**2. etapa: Separace lipidových frakcí na neutrální lipidy, glykolipidy a polární lipidy, zahrnující i fosfolipidy (časová náročnost cca 2 h)**

Cílem této etapy je rozdělit vyextrahované lipidy na jednotlivé lipidové frakce, aby bylo dále možné pracovat jen s frakcí polárních lipidů, která obsahuje i žádoucí fosfolipidy. Separace lipidových frakcí probíhá na polárních silikátových kolonkách. Podle zkušenosti pracovníka je vhodné zpracovávat současně maximálně 2 - 4 vzorky. Vakuum na odparce je třeba nastavit tak, aby eluční rychlost byla cca 1 ml/min.

Pro každý vzorek se používá nová kolonka.

Při práci s kolonkami je vždy třeba dávat pozor, aby horní okraj nevyschnul. Tomu lze zabránit dočasným uzavřením průtoku před napipetováním dalšího elučního činidla. Na druhou stranu by se eluční činidla neměla míchat, tj. dávkovat další je třeba až po vsáknutí předchozího.

**Dávkou** se rozumí nalití až po okraj kolonky, obvykle cca 3 ml.

1. Vzorek se zahustí na vakuové odparce na cca 1 - 5 ml.
2. Zapne se vakuum na přístroji pro kolonkovou chromatografii. Na kolonku se nalije dávka methanolu a otevře se kohout na kolonce.
3. Upraví se vakuum na rychlost cca 1 ml/min a počká se až prokape methanolu, který se jímá do odpadu.
4. Nalije se dávka chloroformu a počká se až prokape, jímá se do odpadu.
5. Nalije se vzorek a počká se, až se vsákne, eluent se jímá do odpadu.
6. Nádoba se vymyje malým množstvím chloroformu (3×) a vše se převede na kolonku a nechá vsáknout, eluent se jímá do odpadu.
7. Eluují se neutrální lipidy chloroformem (2 dávky), jímají se do odpadu.
8. Eluují se glykolipidy acetonem (8 dávek), jímají se do odpadu.
9. Eluují se polární lipidy methanolem (2 dávky), jímají se do 10 ml vialky pro další práci.
10. Vzorek polárních lipidů se vysuší proudem dusíku.

Po tomto kroku je možné vzorek fosfolipidů zamrazit a pokračovat později.

### 3. etapa: Rozklad fosfolipidů a příprava methylesterů fosfolipidových mastných kyselin.

Cílem této etapy je transesterifikace fosfolipidových mastných kyselin methanolem za vzniku methylesterů, které jsou těkavé a dají se dobře analyzovat plynovou chromatografií.

1. Vysušený vzorek ve vialce se smíchá s 0,5 ml směsí methanol-toluen a protřepe se na vortexu.
2. Přidá se 0,5 ml roztoku KOH v methanolu.
3. Promíchá se směs a zazátkuje vialka.
4. Zahřívá se na vodní lázni 30 - 45 min při 37 °C, občas se protřepe.
5. Vzorek se zchladí na laboratorní teplotu.
6. Přidá se 0,5 ml kyseliny octové (0,2 mol/l) a důkladně se protřepe na vortexu.
7. Přidají se 2 ml směsí hexan:chloroform (4:1) a následně 2 ml destilované vody.
8. Promíchá se a odstředí (4 000 rpm, 10 min).
9. Skleněnou pipetou se opatrně přenese horní hexanová fáze do čisté skleněné 10 ml vialky.
10. Do spodní fáze se přidají 2 ml směsí hexan-chloroform (4:1).
11. Znovu se odstředí (4 000 rpm, 10 min).
12. Horní hexanová fáze se přidá ke vzorku.
13. Do spodní fáze se přidají 2 ml směsí hexan-chloroform (4:1).
14. Potřetí se odstředí (4 000 rpm, 10 min).
15. Horní hexanová fáze se přidá ke vzorku.
16. Přidá se 10 µl standardu methylnonadekanoátu.
17. Vzorek se vysuší v proudu dusíku na cca 0,5 - 1 ml a kvantitativně se převede do 1 ml vialky na GC.

Po tomto kroku je možné vzorky zamrazit a pokračovat v práci později.

#### 4. etapa: Analýza methylesterů fosfolipidových mastných kyselin plynovou chromatografií.

Vzorky je vhodné umístit do vialek pro automatický injektor. Pro detekci se obvykle používá hmotnostní spektrometr. Kvantifikace se provádí pomocí přidaného vnitřního standardu methylnonadekanoátu. Identifikace jednotlivých mastných kyselin se provádí srovnáním retenčních časů s časy standardů a porovnáním hmotnostních spekter.

Tabulka 5. Příklad použitelného nastavení parametrů GC-MS pro stanovení FAME

GC parametry	
Plynový chromatograf	Varian GC 3800
Teplota injektoru	300 °C
Objem nastříkovaného vzorku	1 µl
Metoda nástřiku	Splitless, 0,2 min
Lineární rychlost	37 cm/s
Průtok kolonou (konstantní)	1,0 ml/min
Teplotní program	50 °C, 1min, 25 °C/min, 150 °C, 0 min, 4 °C/min, 250 °C, 5 min
Kolona	VF-5 (firma Varian) 30 m × 0,25 mm × 0,25 µm
MS parametry	
Hmotnostní detektor	Varian 4000
Typ MS detektoru	Iontová past
Ionizace	EI (nárazem elektronu)
Teplota „transferline“	280 °C
Teplota iontové pasti	230 °C
Teplota manifoldu	40 °C
Měřený rozsah hmotností (m/z)	45 - 500

#### Nomenklatura mastných kyselin:

Názvosloví mastných kyselin využívá jak systematické chemické názvy, tak triviální názvy. Také se používá krátká symbolika ve tvaru  $vCC:X\omega Yt$ , přičemž **CC** označuje počet atomů uhlíku v molekule, **X** počet dvojných vazeb,  **$\omega$**  polohu dvojných vazeb od alifatického řetězce (např. 16:1 $\omega$ 7 = k. *cis*-9-hexadecenová = palmitolejová, 18:2 $\omega$ 6,9 = k. *cis,cis*-9,12-oktadidecenová = k. linoleová), **t** označuje *trans* konfiguraci na dvojných vazbách (např. 16:1 $\omega$ 7t = k. *trans*-9-hexadecenová = k. palmitelaidová). Větvení **i** označuje *iso* mastné kyseliny s methylovou skupinou na předposledním uhlíku od alifatického konce (např. i17:0 = k. 15-methylhexadekanová), větvení **a** označuje *anteiso* mastné kyseliny s methylovou skupinou na třetím uhlíku od alifatického konce (např. a17:0 = k. 14-methylhexadekanová), **cy** označuje mastné kyseliny s cyklopropylovým kruhem (např. cy19:0 = k. 9-methylenoktadekanová). Ostatní větvení se obvykle vyjadřují běžnými předponami z chemického názvosloví (např. 10Me-16:0 = k. 10-methylhexadekanová, 3OH-14:0 = k. 3-hydroxytetradekanová).



evropský  
sociální  
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost

UNIVERZITA J. E. PURKYNĚ V ÚSTÍ NAD LABEM



**Indikátorové mastné kyseliny:**

V odborné literatuře je uvedena řada indikátorových mastných kyselin, k častým kombinacím patří následující:

- **Houbová biomasa** je kvantifikována pomocí obsahu 18:2 $\omega$ 6,9.
- **Bakteriální biomasa** je reprezentována sumou koncentrací i14:0, i15:0, a15:0, 16:1 $\omega$ 7t, 16:1 $\omega$ 9, 16:1 $\omega$ 7, 18:1 $\omega$ 7, 10Me-16:0, i17:0, a17:0, cy17:0, 17:0, 10Me-17:0, 10Me-18:0, cy19:0; z toho gramnegativní bakterie představují sumu koncentrací cy17:0, cy19:0 a 18:1 $\omega$ 7, grampozitivní bakterie sumu koncentrací i14:0, i15:0, a15:0, i17:0, a17:0 a aktinomycety jsou kvantifikovány dle obsahu 10Me-16:0, 10Me-17:0, 10Me-18:0.
- **Environmentální stres** (poměr *trans/cis*) je vypočítán jako poměr koncentrací (18:1 $\omega$ 7+16:1 $\omega$ 7)/(18:1 $\omega$ 7t+16:1 $\omega$ 7t). Hodnoty do 0,1 jsou považovány za normální, nad 0,1 za stresové.
- **Nutriční stres** (*cy/pre*) je indikován součtem a poměrem koncentrací (cy17:0+cy19:0)/(16:1 $\omega$ 7+18:1 $\omega$ 7). Vyšší hodnoty než cca 0,4 jsou považovány za indikátory přechodu gramnegativních bakterií do stacionární fáze, což je v přirozených půdách způsobené obvykle nedostatkem živin nebo vody.

**9.2 Stanovení respirace půdy**

Metoda ukazuje na okamžitou metabolickou aktivitu (převážně aerobní) půdních mikroorganismů. Vhodná je zejména pro opakovaná měření a vzájemná srovnávání (např. sezónní variabilita, porovnání různých typů půd, různých zásahů v půdách apod.). Aktivita závisí významně i na vlhkosti, proto se často realizuje i varianta s optimalizací půdní vlhkosti, čímž se více zvýrazní vliv dalších faktorů (sezónnost, přísun živin, narušení půdy apod.) na mikrobiální metabolismus. Lze realizovat i variantu, kdy se měří metabolický potenciál, tj. k půdě se přidá vhodný substrát (např. glukóza nebo jiné rozložitelné organické látky) a sleduje se nárůst respirace.

**Podstata metody:** Oxid uhličitý produkovaný mikroorganismy je zachycován v roztoku hydroxidu sodného za vzniku hydrogenuhličitanu. Nezreagovaný hydroxid je pak titrován kyselinou chlorovodíkovou.

**Pomůcky:** Skleněné láhve se širokým hrdlem a šroubovacím uzávěrem („pyrexky“) o objemu 100 ml, kádinky o objemu 5 ml (lze i 10 ml), byreta, pipety, kapátko, analytické váhy, lžička, pinzeta, titrační baňky, inkubátor, parafilm.

**Chemikálie:**

- Čerstvě připravený 0,5 mol/l NaOH (20 g/l).
- Kyselina chlorovodíková 0,1 mol/l (cca 4,3 ml koncentrované HCl na litr).
- Tetraboritan sodný  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ .
- Fenolftalein (0,1% roztok v 60% ethanolu).
- Methyloranž (0,1% roztok ve vodě).
- Chlorid barnatý  $\text{BaCl}_2$  12,5 %.

**Přípravné práce:**

- Na každý vzorek jsou potřeba dvě 100 ml pyrexky, plus navíc 3 - 6 dalších na kontroly (pro všechny vzorky).
- Pro každý vzorek jsou potřeba dvě 5 ml kádinky, plus navíc 3 - 6 dalších na kontroly.

**Založení vzorků:**

1. Do každé pyrexky se naváží cca 1 g vzorku půdy (kontroly jsou bez vzorku), pro každý vzorek dvě opakování.
2. Do pyrexky se pinzetou vloží 5 ml kádinka a do ní se napipetují 2 ml NaOH (0,5 mol/l).
3. Pyrexka se těsně uzavře (pro jistotu je vhodné omotat uzávěr parafilmem) a zaznamená se datum a čas uzavření.
4. Inkubuje se při 25 °C 1 - 7 dní dle předpokládané respirační aktivity.

**Stanovení titru kyseliny:**

1. Naváží se 0,4 g tetraboritanu sodného  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ .
2. Kvantitativně se převede do titrační baňky a rozpustí se v celkovém objemu cca 20 ml deionizované vody.
3. Přikápnou se 2 kapky methyloranže.
4. Titruje se do oranžového zabarvení (cca 20 ml).

O správném konci titrace se lze přesvědčit přikápnutím 1 kapky NaOH (0,1 mol/l), přičemž roztok by měl opět zežloutnout.

**Titrace vzorků:**

1. Zapiše se datum a čas ukončení.
2. Otevře se pyrexka a opatrně se vyjme kádinka s hydroxidem.
3. Hydroxid se kvantitativně převede do 50 ml kádinky, tj. 3× se provede výplach destilovanou vodou.
4. Přidá se 1 ml 12,5 %  $\text{BaCl}_2$  a 1 - 2 kapky fenolftaleinu.
5. Titruje se kyselinou až do úplného odbarvení.

Ke konci titrace přechází fialová barva v růžovou než dojde k úplnému odbarvení. Roztok není čirý, protože obsahuje sraženinu. O správném konci titrace se lze přesvědčit přidáním 2 - 3 kapek fenolftaleinu, přičemž by nemělo dojít k opětovnému zabarvení roztoku.

**Vyhodnocení výsledků:**

- Výpočet titru kyseliny probíhá na základě rovnice:

$$c_k = \frac{2000 \cdot m_t}{381,3721 \cdot V_k}$$

kde:  $c_k$  je skutečná koncentrace kyseliny v mol/l,  $m_t$  je navážka tetraboritanu v gramech,  $V_k$  je spotřeba kyseliny v ml a 381,3721 je molární hmotnost tetraboritanu sodného.

- Respirace se vypočítá na základě rovnice:

$$R = \frac{(V_k - V_v) \cdot c_k \cdot 1000}{t \cdot m_v}$$

kde:  $R$  je respirace v  $\mu\text{mol CO}_2$  za hodinu na gram půdy,  $V_k$  je průměrná spotřeba kyseliny na titraci kontrol,  $V_v$  je spotřeba kyselina na titraci vzorku,  $t$  je čas inkubace v hodinách a  $m_v$  je navážka vzorku. Výsledky je vhodné přepočítat na suchou hmotnost.

**9.3 Stanovení enzymových aktivit v půdě**

Mikroorganismy provádí intenzivní metabolickou činnost, která je katalyzována enzymy. Tyto enzymy mohou být intracelulární (lokalizované uvnitř buňky), povrchové (vázané na povrch mikroorganismu popř. u gramnegativních bakterií v periplazmatickém prostoru) nebo mohou být extracelulární (do prostředí záměrně uvolňované). Aktivitu enzymů je možné stanovit a získat tak představu o metabolických preferencích mikrobiálního společenstva.

Většina enzymů je selektivních a katalyzují metabolickou přeměnu jen jednoho substrátu popř. jemu chemicky podobných substrátů. Enzymové aktivity se proto nejčastěji stanovují pomocí umělých substrátů, ze kterých se reakcí uvolňuje dobře detekovatelná část (barevná, fluorescenční apod.), popř. které se samy na takovou přeměňují. Enzymová aktivita závisí významně na teplotě, tu je proto třeba pečlivě dodržovat používáním inkubátoru. Řada enzymů vyžaduje doplňkový substrát (např. peroxid vodíku), který by normálně poskytoval mikroorganismus a který se proto musí přidávat externě.

**9.3.1 Vyjadřování enzymových aktivit**

Podle SI se pro vyjádření aktivity enzymů používá jednotka **katal** (kat), 1 kat = mol/s. Pro praktické použití je ale tato jednotka příliš velká, obvyklé hodnoty jsou v řádech mikrokatalů nebo nanokatalů, i nižší. V praxi se proto daleko častěji využívá umělá **enzymová jednotka** (*enzyme unit* = U), která je definovaná jako  $\mu\text{mol}/\text{min}$ . Při vyjadřování enzymové aktivity v půdě je nutné výsledek přepočítat na jednotku hmotnosti půdy (tj. např. U/g), navíc obvykle suché půdy (sušinu v procentech je třeba stanovit zvlášť). Při vyjadřování výsledků je nutné doplnit údaj o použité teplotě a pH, na kterých enzymové aktivity významně závisí.

### 9.3.2 Stanovení enzymových aktivit v půdě pomocí substrátů uvolňujících p-nitrofenol

Principem stanovení je rozklad umělých substrátů, které enzymatickým rozkladem uvolňují p-nitrofenol. Ten je v zásaditém prostředí žlutý a je možné ho stanovit snadno spektrofotometricky při 400 nm. Metodou je možné stanovit jak enzymy volné po extrakci do vhodného pufru, tak enzymy vázané tzv. přímou inkubací, kdy se roztok substrátu přidává přímo k vzorku půdy. Umělý substrát je možné rozpustit buď ve vodě (pak se stanovuje aktivita při pH půdy) nebo ve vhodném pufru optimálním pro určité skupiny enzymů. Vhodných substrátů dodávají komerční firmy celou řadu pro stanovení aktivity zejména hydrolytických enzymů, viz Tabulka 6.

**Tabulka 6. Příklady vhodných substrátů pro stanovení hydrolytických enzymů základních geochemických cyklů**

Substrát	Enzym	Katalyzuje reakci	Použití
p-nitrofenolfosfát (pNPP)	Fosfatáza	Hydrolytické odštěpování fosfátových skupin	Jeden ze základních enzymů geochemického cyklu fosforu
p-nitrofenolsulfát (pNPS)	Arylsulfatáza	Hydrolytické odštěpování síranů z aromatických jader	Jeden ze základních enzymů geochemického cyklu síry
L-alaninnitroanilid (ANA)	Proteáza	Hydrolytické štěpení peptidových vazeb	Jeden ze základních enzymů geochemického cyklu dusíku

**Pomůcky a přístroje:** Vortex, hodinky/stopky, automatická pipeta (100 - 1 000  $\mu$ l), inkubátor, centrifuga, mikrotitrační destička, destičkový reader.

#### Chemikálie:

- Uhličitan sodný 1 mol/l.
- Roztoky umělých substrátů.

Substrát	Koncentrace
pNPP	$7,6 \cdot 10^{-3}$ mol/l
ANA	$1 \cdot 10^{-3}$ mol/l
pNPS	$3,333 \cdot 10^{-3}$ mol/l

#### Postup metody:

1. Do plastových mikrozkuvek (typu eppendorf) se naváží cca 0,05 g a přesná hmotnost vzorku se zaznamená.
2. Připraví se čerstvé roztoky substrátů ve vodě (viz chemikálie a uvedená tabulka) a vytemperují se na 40 °C.
3. Vytemperují se navážené vzorky v eppendorf zkumavkách.
4. Spustí se měření času.



5. Napipetuje se do každé eppendorf zkumavky 0,5 ml roztoku substrátu, zvortexuje (cca 5 s) a zaznamená se přesný čas (start reakce).
6. Vzorky se vloží do inkubátoru a temperují po zadaný čas.
7. Do každé eppendorf zkumavky se přidá 0,25 ml roztoku 1M uhličitanu sodného, zvortexuje se (cca 5 s) a zaznamená se přesný čas (konec reakce).
8. Po přidání uhličitanu do poslední eppendorf zkumavky se následně všechny zvortexují.
9. Vzorky se odstředí při 13 000 rpm 5 min.
10. Pipetou se odebere 300  $\mu$ l supernatantu do mikrotitrační destičky a měří se absorbance při 400 nm.

Paralelně je třeba stejným způsobem změřit sadu kontrol, ke kterým však nebude přidáván substrát, ale pouze pufr, resp. voda. Ke konci měření je vhodné udělat kontrolu, zda nedochází k samovolnému rozkladu substrátů, tj. smíchat v mikrotitrační destičce 200  $\mu$ l substrátu a 100  $\mu$ l uhličitanu. Pokud je absorbance vyšší, je vhodné její hodnotu odečíst.

### Poznámky:

- Aktivita enzymů je v různých půdách velmi variabilní a podle toho se liší i časy reakce. Např. pro stanovení fosfatáz stačí zpravidla inkubace po dobu několika minut, pro jiné enzymy je třeba i několik hodin. Pokud s danými vzorky není zkušenost, nezbyvá než vyzkoušet časový interval naslepo a podle výsledku stanovení zopakovat s upravenými časy. Při kratších intervalech je třeba dbát na přesné měření času velice úzkostlivě, protože případná chyba je velká.
- Lineární rozsah měření absorbancí je při 400 nm poměrně velký, na moderních spektrofotometrech lze měřit až po hodnoty 2 i 2,5. Je-li absorbance vyšší, je nutné provést ředění vzorku. V takovém případě je ale třeba změřit i stejně zředěnou kontrolu.

### Vyhodnocení výsledků:

- Nejprve je třeba vypočítat rozdíl absorbancí, podle vzorce:

$$\Delta A = A_v - A_k \frac{m_v}{m_k}$$

kde:  $A_v$  a  $A_k$  jsou absorbance vzorku a kontroly,  $m_v$  a  $m_k$  jsou navážky vzorku a kontroly.

- Aktivita se pak vypočítá jako  $U = \frac{1000\Delta A V}{\epsilon t m_v}$ .

kde:  $U$  je aktivita enzymu v jednotkách U/g ( $\mu$ mol/min/g),  $V$  je objem tekutiny v eppendorf zkumavce v ml (0,75 ml),  $\epsilon$  je extinkční koeficient ( $11600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ),  $t$  je čas inkubace v min.

### 9.3.3 Stanovení aktivity dehydrogenáz v půdě

Aktivita dehydrogenázových enzymů vypovídá celkově o aktivitě mikrobiálního společenstva. Principem metody je redukce trifenyltetrazolium chloridu (TTC), který slouží jako akceptor elektronů, na trifenylformazan (TFF). Ten je růžový a je možné ho stanovit spektrofotometricky při 546 nm. Vzorek půdy v pufru je inkubován s roztokem TTC, TFF je následně extrahován acetonem a stanoven.

#### Chemikálie:

- Tris-HCl pufr (12,1 g/l, pH 7,6).
- Roztok TTC 1 g/l v TRIS pufru.
- Sada kalibračních roztoků TFF v acetonu (cca 10 - 20, doporučený kalibrační rozsah 1 - 300  $\mu\text{mol/l}$ ).
- Aceton (p.a.).

#### Postup:

1. Do plastových kónických centrifugačních zkumavek se naváží po 2 g vzorku půdy (navážka nemusí být přesně 2 g, ale přesnou navážku je třeba zapsat). Od každého vzorku se naváží 4 zkumavky.
2. Ke třem zkumavkám se přidá 5 ml roztoku TTC, ke čtvrté se přidá 5 ml čistého TRIS pufru (kontrola).
3. Zkumavky se zavřou a promíchají na vortexu.
4. Zkumavky se nechají inkubovat při 25 °C po dobu cca 24 h (přesný čas je třeba zaznamenat) za soustavného třepání (150 rpm).
5. Po inkubaci se přidá 16 ml acetonu a směs se promíchá na vortexu.
6. Směs se nechá třepat 1 h na třepače.
7. Směs se odstředí při 4 000 rpm po dobu 10 min.
8. Čistý supernatant se pipetuje do kyvety a měří se absorbance při 546 nm proti čistému acetonu (blank).

#### Vyhodnocení výsledků:

V enzymové praxi bývá zvykem uvádět výsledky v enzymových jednotkách U ( $\mu\text{mol/min}$ ) resp. v případě půdních vzorků v U/g sušiny. Koncentrace je proto třeba dosazovat v  $\mu\text{mol/l}$ , časy v minutách a navážky v gramech, sušinu stanovit separátně a vyjádřit v intervalu 0 - 1.

1. Nejprve je třeba proměřit kalibrační křivku TFF v acetonu v lineárním rozsahu absorbancí ( $A$ ) a vyjádřit ji ve tvaru  $A = kc + q$ .

kde:  $k$  je směrnice kalibrační křivky,  $c$  koncentrace v  $\text{mmol/l}$  a  $q$  absolutní člen kalibrační křivky.

V případě statistické nevýznamnosti absolutního členu se použije jen tvar  $A = kc$  (tj.  $q=0$ ).

2. Pro každý vzorek se dále vypočítá rozdíl mezi absorbancí vzorku ( $A_v$ ) a kontroly ( $A_k$ ) opravený o navážky vzorku ( $m_v$ ) a kontroly ( $m_k$ ), viz rovnice.

$$A = A_v - A_k \frac{m_v}{m_k}$$

3. Z kalibrační křivky se vypočítá koncentrace TFF pomocí  $c = \frac{A - q}{k}$ .
4. Nakonec se vypočítá aktivita ( $D$ ) dehydrogenáz v jednotkách U/g sušiny po dosažení koncentrace TFF ( $c$ ), objemu činidla ( $V=0,016$  l), času inkubace ( $t$ ), navážky ( $m_v$ ) a hmotnostního zlomku sušiny ( $w_s$ ) do vztahu:

$$D = \frac{cV}{tm_v w_s}$$

5. U výsledků z více opakování se vypočítají podle potřeby statistické charakteristiky (průměr, medián, směrodatná odchylka, interval spolehlivosti, kvartily apod.).

## 10 Stanovení mikroorganismů přítomných ve vzduchu

Ve vzduchu jsou přítomné částice prachu, na kterých se vyskytují bakterie, a nebo jsou přítomné spory hub, které tvoří stálou složku tzv. aeroplanktonu. Ve vzduchu převládají saprofytické bakterie i bakterie patogenní, které jsou přítomny na zaschlých kapénkách slin a hlenu jako tzv. infekční prach, jehož vířením jsou částice vdechovány, čímž se šíří infekce.

### 10.1 Stanovení mikroorganismů ve vzduchu spadem

V mikrobiologické praxi se metoda stanovení mikroorganismů spadem používá pro potřeby zjištění úrovně kontaminace laboratorního prostoru. Aplikace této metody je součástí systému zajištění správné laboratorní praxe, v rámci akreditace laboratoří a dále ověření toho, zda prostředí, ve kterém se provádí mikrobiologické analýzy, je skutečně dostatečně dezinfikované a sterilní.

**Princip metody:** Metoda využívá faktu přítomnosti mikroorganismů ve vzduchu v různé formě vázaných na částicích prachu, které se samozřejmě gravitačně usazují. Rychlost tohoto spadu se detekuje pomocí misky se ztuženým kultivačním médiem, která se na sledovaném místě nechá otevřená po definovaný čas a následně se kultivuje, aby zachycené mikroorganismy utvořily kolonie, které je nakonec možné spočítat pouhým okem.

**Pomůcky:** Miska s PCA (alternativně lze použít Sabouraudův agar), lihová fixa, hodinky (stopky), parafilm.

#### Postup:

1. Misku s PCA popište a doneste **zavřenou** na místo, kde chcete sledovat spad mikroorganismů ze vzduchu.
2. Vyznačte na misku čas začátku měření a odklopte víčko. Při umístování dbejte na to, aby misku někdo omylem nepoškodil (nerozšlápl, nenamočil apod.).
3. Misku nechte otevřenou na místě po dobu cca 1 až 2 h, v čistém prostředí popř. i déle.
4. Misku přiklopte víčkem a vyznačte čas konce měření.
5. Misku dokola obalte po okrajích parafilmem a nechte kultivovat v termostatu (30 °C, 24 h) v zavěšené poloze.
6. Spočítejte narostlé kolonie a výsledek vyhodnoťte.

#### Vyhodnocení:

Změřte průměr misky a vypočítejte její povrch. Spočítejte počet narostlých kolonií (KTJ) a výsledek vyjádřete jako rychlost spadu v  $\text{KTJ}/\text{cm}^2/\text{h}$ .

**Poznámka:** Míra pokrývnosti plochy misky se vztahuje i k ploše objektu, ve kterém byl spad hodnocen. Např. pro potřeby zjištění úrovně sterilního prostředí v mikrobiologické laboratoři by neměl být počet kolonií na misce o průměru 90 mm větší než 1 (tj. 160  $\text{KTJ}/\text{m}^2$  místnosti).

## 11 Bakteriální růstový test toxicity

Testy toxicity jsou nezbytné v mnoha odvětvích, ať už se jedná o testování kvality pitných a odpadních vod, testování rizikových vlastností chemikálií, hodnocení nebezpečných vlastností odpadů nebo monitorování dekontaminačních zásahů. Pro environmentální účely jsou testy toxicity prováděny na organismech s různou ekologickou rolí na různé trofické úrovni. Jednou z významných skupin mikroorganismů jsou bakterie, jejichž převažující a nejvýznamnější ekologická role spočívá v rozkladu a mineralizaci organické hmoty. Nejpoužívanějším testem toxicity na bakteriích je test zhášení luminiscence mořských světélkujících bakterií *Vibrio fischeri*, který testuje akutní toxicitu. U bakterií lze ale rychle provádět i chronické testy (inhibice růstu bakteriální populace) vzhledem k jejich rychlému rozmnožování.

Metoda není zatím normovaná a lze ji použít pro stanovení toxicity jakékoliv látky rozpustné ve vodě (resp. živném médiu). V případě, že je vzorek ve vodě špatně rozpustný, lze ho rozpustit ve vhodném rozpouštědle (v netoxické koncentraci, např. 5 % methanol), nicméně je nutné přidat kontrolní vzorek se stejným množstvím rozpouštědla.

**Podstata zkoušky:** Principem metody je sledování nárůstu bakteriální suspenze na vhodném médiu a porovnání růstových křivek ovlivněných přidavkem toxikantu a bez jeho přidavku. Nárůst lze sledovat mnoha způsoby, nejjednodušší je turbidimetrické (spektrofotometrické) měření zákalu (optické denzity, OD). S výhodou lze v tomto případě využít přístrojů schopných měřit vzorky na mikrotitračních destičkách ve větším počtu najednou (nejčastěji v 96 jamkách).

**Přístroje a pomůcky:** Destičkový spektrofotometr (ideálně s inkubací a třepáním), mikrotitrační destička, odměrné baňky, sterilizační lahve, automatické pipety (ideálně vícekanalové), špičky k automatickým pipetám, krabička pro sterilaci špiček, sterilní Petriho misky, sterilní Erlenmayerovy baňky.

**Chemikálie:** sterilní voda, LB médium, bakteriální suspenze.

### Postup:

Práce zahrnuje 5 etap, kterými jsou: příprava sterilních médií a pomůcek; kultivace bakteriální suspenze; nasazení (napipetování) pokusu; vlastní měření růstových křivek a vyhodnocení výsledků. Činnosti vyžadující sterilní práci provádějte v laminárním boxu nebo u plamene kahanu.

1. Připravte LB médium (500 ml) do 1 000 ml sterilační lahve.
2. Do sterilační lahve napusťte cca 100 ml destilované vody.
3. Spolu s Erlenmayerovými baňkami a špičkami pro automatické pipety ve sterilační krabičce sterilujte vše v autoklávu (15 min, 121 °C).
4. Do Erlenmayerovy baňky nalijte sterilně cca 100 ml LB média.

5. Zaočkujte vybranou bakterií.
6. Kultivujte na třepače přes noc (teplota dle bakterie, obvykle 30 °C) do pozdní exponenciální fáze.
7. Zřeďte bakteriální suspenzi na hodnotu OD<sub>600</sub> (měřeno spektrofotometricky) cca 1,0.
8. Do mikrotitrační destičky napipetujte koncentrační řadu toxikantu (ideálně ve třech popř. i více opakováních).
9. Odlijte si menší množství LB média do Petriho misky a pomocí multikanálové pipety napipetujte do každé použité jamky 25 µl.
10. Odlijte si menší množství bakteriální suspenze do Petriho misky a pomocí multikanálové pipety napipetujte do každé použité jamky 25 µl.
11. Spusťte destičkový spektrofotometr a vyberte vhodnou metodu (kinetické měření s průběžným promícháváním a temperací).
12. Vložte mikrotitrační destičku do přístroje a spusťte měření; zpravidla stačí 3 - 5 h měření k dosažení žádoucích výsledků.

### Návrh experimentu:

Konkrétní návrh (uspořádání) experimentu (obsazení jamek mikrotitrační destičky, koncentrační řada, počet opakování apod.) se liší pokus od pokusu dle potřeby. Pro statistické zpracování je vhodné mít každou koncentraci ve třech i více opakováních, 96 volných jamek na destičce tomu dává dostatečný prostor. Každý experiment musí mít i svou kontrolu, tj. tři jamky, do kterých je místo toxikantu napipetována sterilní destilovaná voda. Kontrola je důležitá při následujícím vyhodnocování (viz dále). Pokud byl toxikant rozpuštěn v organickém rozpouštědle, je třeba přidat i kontrolu jen s tímto rozpouštědlem. Pokud by toxikant potenciálně interferoval s měřením zákalu (zakalené vzorky, výrazně barevné vzorky), je třeba udělat i kontroly bez LB média a bakterií a jejich zákal před vyhodnocením odečíst. Při návrhu experimentu je vhodné vycházet z rozměrů mikrotitrační destičky (8×12 jamek) a koncentrační řady volit tak, aby pokryly řádky a sloupce (např. 7 koncentrací plus kontrola do sloupce, 5 koncentrací plus kontrola na polovinu řádku apod.).

Tabulka 7. Příklad návrhu toxikologického experimentu na mikrotitrační destičce

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	Toxikant 160 µg/g											
<b>B</b>	Toxikant 80 µg/g											
<b>C</b>	Toxikant 40 µg/g											
<b>D</b>	Toxikant 20 µg/g											
<b>E</b>	Toxikant 10 µg/g											
<b>F</b>	Toxikant 5 µg/g											
<b>G</b>	Toxikant 2,5 µg/g											
<b>H</b>	Kontrola											

Samozřejmě je možné měřit více toxikantů současně, v takovém případě stačí jedna společná kontrola (alespoň tři jamky). Při navrhování koncentrační řady je důležité neopomenout, že připravená koncentrace se ještě zředí nutným přídatkem živného média a bakteriální suspenze

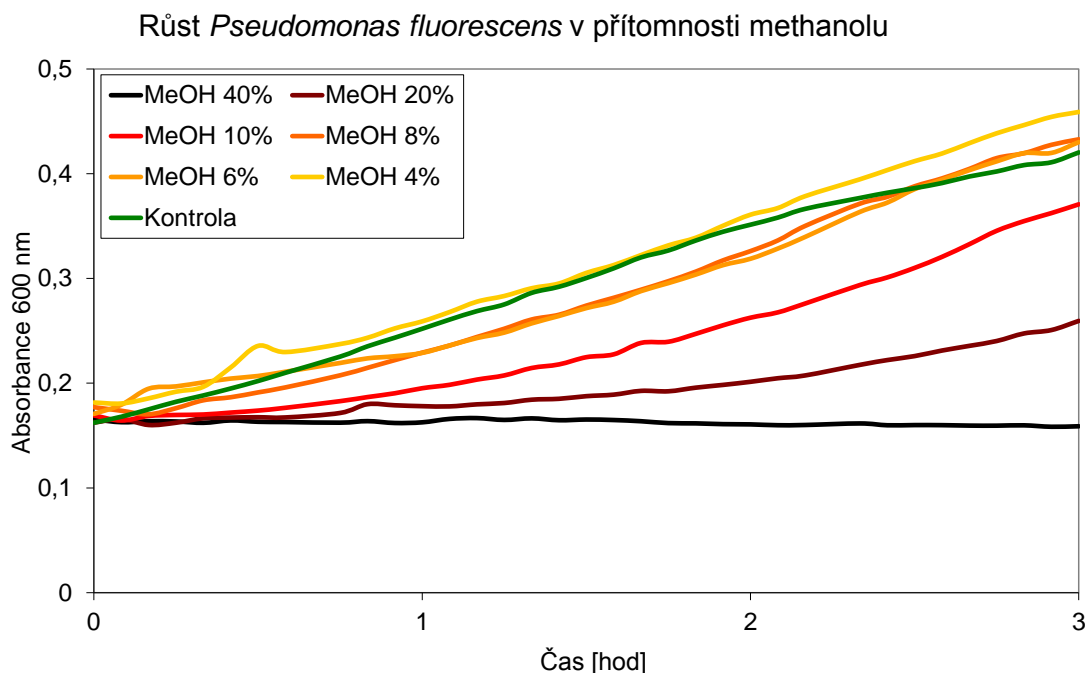
(v uvedeném případě z celkového objemu 250  $\mu\text{l}$  v jamce představuje toxikant 200  $\mu\text{l}$  (80 %), tj. připravené koncentrace je při vyhodnocení třeba násobit koeficientem 0,8 resp. pokud je třeba testovat přesné koncentrace, je třeba je připravit 1,25 $\times$ vyšší.

Standardně se používají plastové mikrotitrační destičky, nicméně pro speciální použití (při stanovení toxicity málo polárních látek apod.) je možné použít i skleněné. Pozor ale na jejich křehkost.

### Vyhodnocení:

1. Ze získaných hodnot závislosti množství bakterií na čase sestavte grafy růstových křivek pro jednotlivé koncentrace toxikantu.
2. Na každém grafu vymezte exponenciální fázi a vypočítejte specifickou růstovou rychlost  $\mu$  resp. plochu pod křivkou.
3. Pro každou koncentraci toxikantu vypočítejte inhibici růstu  $I = \mu_{\text{tox}} / \mu_{\text{kon}}$ .
4. Vytvořte graf závislosti inhibice na koncentraci.
5. Vhodnou metodou (např. probitovou analýzou nebo nelineární regresí) vypočítejte požadované toxikologické parametry, zejména hodnotu IC50.

Naměřená data z destičkového spektrofotometru je možné snadno exportovat do textového souboru, který lze otevřít v programu MS Excel nebo jiném tabulkovém procesoru. Každý sloupec obsahuje časovou řadu naměřených hodnot, stačí požadované vynést do grafu (je jasnější dát koncentrační řadu a kontrolu na jeden graf a vhodně barevně odlišit). Graf by měl být typu XY bodový (ne spojnicový, který nebere v úvahu hodnoty na ose X).



Obr. 18. Příklad růstové křivky *Pseudomonas fluorescens* v přítomnosti methanolu jako toxikantu. Je zřejmé, že koncentrace do 8% nemají vliv na růst bakterie, zatímco při vyšších koncentracích už k inhibici dochází, koncentrace 40% inhibuje růst úplně.

Výpočet inhibice růstu je možné provést dvěma způsoby: buď jako poměr specifických růstových rychlostí ( $\mu$ ) v přítomnosti toxikantu a v kontrole nebo porovnáním nárůstu biomasy, který se počítá jako plocha pod křivkou (integrál růstové křivky).

**Specifická růstová rychlost**  $\mu$  se vypočítá z exponenciální fáze růstové křivky podle vztahu:

$$\mu = \frac{\ln N_K - \ln N_Z}{t_K - t_Z}$$

kde:  $\mu$  je specifická růstová rychlost,  $N_K$  je koncentrace mikroorganismů na konci exponenciální fáze,  $N_Z$  je koncentrace mikroorganismů na začátku exponenciální fáze,  $t_K$  je čas konce exponenciální fáze,  $t_Z$  je čas začátku exponenciální fáze.

Inhibice se pak vypočítá jako  $I = 1 - (\mu_t / \mu_k)$ .

kde:  $I$  je inhibice,  $\mu_t$  je specifická růstová rychlost ovlivněná toxikantem,  $\mu_k$  je specifická růstová rychlost kontroly.

**Pozor:** Specifickou růstovou rychlost lze vypočítat skutečně jen z exponenciální fáze růstové křivky, proto je potřeba sestavit graf a exponenciální fázi si vymezit (v ukázkovém případě je to 0 - 4 h).

**Integrál růstové křivky** (plocha pod křivkou) se spočítá některou z numerických integračních metod, např. lichoběžníkovou metodou (tj. plocha pod křivkou se rozdělí na lichoběžníky ohraničené naměřenými body a jejich plochy se sečtou):

$$S = \sum_1^n \frac{1}{2} (t_n - t_{n-1}) (N_n + N_{n-1})$$

kde:  $S$  je plocha pod růstovou křivkou,  $N_n$  je koncentrace bakterií (popř. OD) u n-tého měření,  $t_n$  je čas n-tého měření.

Inhibice se pak vypočítá jako  $I = 1 - (S_t / S_k)$ .

kde:  $I$  je inhibice,  $S_t$  je plocha pod růstovou křivkou s vlivem toxikantu,  $S_k$  je plocha pod růstovou křivkou kontroly.

Vypočítané inhibice se vynesou do XY-bodového grafu v závislosti na koncentraci toxikantu. Vzniklá závislost by měl být přibližně sigmoidní (esovitá). Pokud je koncentrační řada exponenciální (např. koncentrace klesají cca o polovinu), je vhodné použít logaritmické měřítko na ose X.

**Hodnota IC50 je nejvýznamnější toxikologický ukazatel.** Vyjadřuje koncentraci toxikantu, která způsobí snížení růstu bakterií právě o 50 %. **Hodnota IC50 se vypočítá, stejně jako případné další toxikologické ukazatele, regresí získaných dat. To lze udělat několika způsoby:**



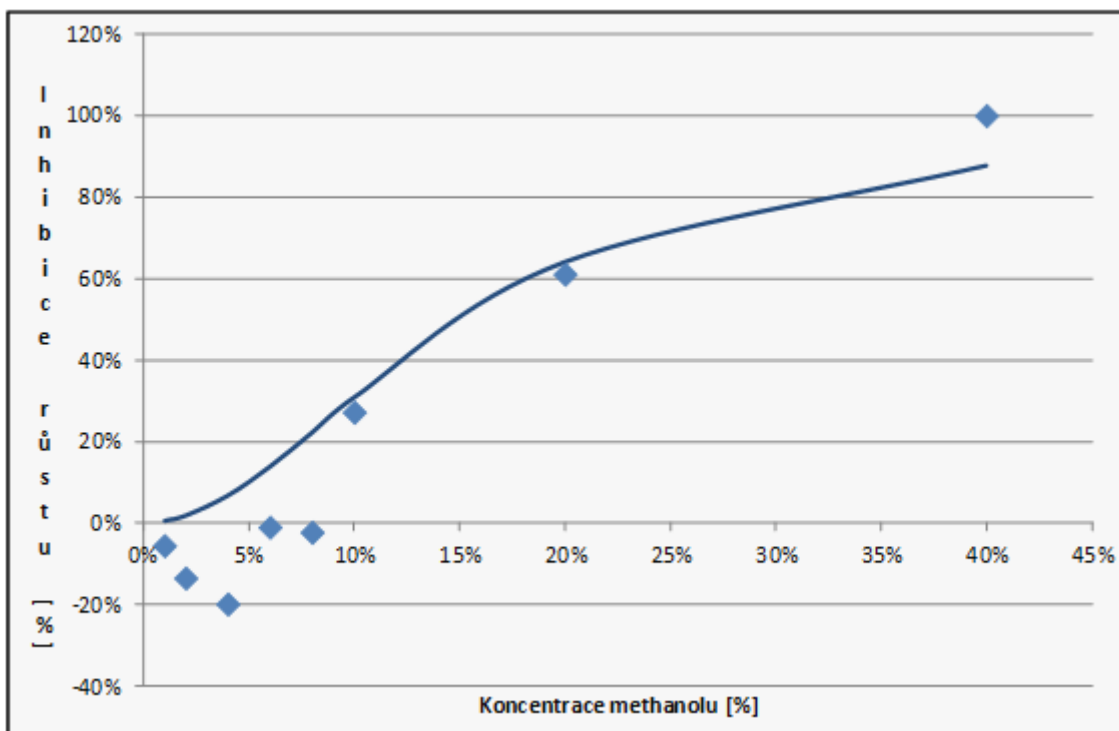
1. Proložit experimentální koncentračně-inhibiční data **nelineární regresí** vhodnou rovnicí popisující **sigmoidní křivku**.

Rovnic popisujících sigmoidu existuje celá řada (Weibülova rovnice, Gompertzova funkce, Hillova rovnice atd.). Jako příklad bude dále využita tzv. logistická funkce (též známá jako Boltzmannova sigmoida) v mírně upraveném tvaru, kdy hodnota IC50 už je vyjádřena jako regresní parametr křivky.

$$I = \frac{1}{1 + e^{-m \frac{IC50-c}{IC50-c}}}$$

kde:  $I$  je inhibice,  $c$  je koncentrace toxikantu,  $IC50$  je žádaná hodnota IC50, kterou počítáme,  $m$  je regresní parametr vyjadřující sklon křivky,  $e$  je základ přirozených logaritmů (2,71828..).

Nelineární regrese sigmoidních křivek se v nejčastěji používané aplikaci MS Excel počítá poněkud složitě, protože Excel nemá předdefinované sigmoidy na prokládání křivek v grafech. Je proto vhodné použít některý z dostupných programů schopných počítat nelineární regrese. Pro účely jednoho protokolu je možné např. stáhnout zkušební verzi balíku QCExpert od české firmy Trilobyte software ([www.trilobyte.cz](http://www.trilobyte.cz)) nebo využít i některé programy s licencí freeware, popř. školou předplacený software v počítačové učebně. Výhoda statistických balíčků v porovnání s aplikací Excel je v tom, že vypočítají regresní hodnoty i s příslušnými intervaly spolehlivosti.



Obr. 19. Příklad závislost inhibice růstu *Pseudomonas fluorescens* na koncentraci methanolu (viz Obr. 14). Všimněte si, že nižší koncentrace způsobují stimulaci růstu bakterií (tj. zápornou inhibici). Naměřená data jsou proložena logistickou křivkou.

2. Hodnoty inhibic je také možné přepočítat na tzv. **probity** dle Tabulky 8. Probity, pokud jsou vyneseny do grafu proti logaritmu koncentrace, tvoří obvykle lineární závislost, kterou lze proložit snadno lineární regresí a vypočítat hodnotu IC50.

**Probitová metoda** byla vyvinuta ve 30. letech 20. století, aby umožnila linearizovat sigmoidní závislost a usnadnit tak výpočet i bez použití tehdy nedostupné výpočetní techniky. Je založena na teoretickém předpokladu, že citlivost jednotlivých jedinců testované populace k toxikantu má tzv. normální rozdělení. Probity představují inverzní funkce k distribuční funkci normálního rozdělení, kterou ale nelze vyjádřit analyticky (vzorcem), proto se používá tabulka resp. počítač.

#### Postup:

1. Pro každou hodnotu inhibice nalezněte v tabulce nejbližší probitovou hodnotu.
2. Pro každou koncentraci vypočítejte její dekadický logaritmus.
3. Sestrojte graf, kdy na ose X budou logaritmy koncentrace a na ose Y zjištěné probity.
4. Hodnoty proložte lineární regresí  $probit = kx + q$  (např. v Excelu funkcí *Spojnice trendu* v grafu nebo *Lin.regrese* v datech).
5. Z regresní křivky vyjádřete  $x$  a vypočítejte hodnotu odpovídající probitové hodnotě 5 (probit 5 odpovídá 50 % inhibici, viz tabulka 8).
6. Z této hodnoty vypočítejte hodnotu  $IC_{50} = 10^x$ .

**Poznámka:** Vychází-li záporné a nulové inhibice, kterým odpovídá probit 0, pak je třeba počítat regresi jen s jedním, který má nejvyšší koncentraci. Naopak u 100 % inhibic, kterým odpovídá probit  $10^6$ , je třeba počítat jen s tím, který má nejnižší koncentraci.

<sup>6</sup> Přiřazení probitu 10 inhibici 100% a probitu 0 inhibici 0% je jen aproximace. Matematicky přesně se určují pro každou sadu dat individuálně iteračním postupem, který je ale prakticky nemožné provést při ručních výpočtech.

Tabulka 8. Probitové hodnoty

Inhibice I [%]	Probit	Inhibice I [%]	Probit	Inhibice I [%]	Probit	Inhibice I [%]	Probit	
0.000	0.0%	0.000	0.250	25.0%	4.325	0.500	50.0%	5.000
0.005	0.5%	2.424	0.255	25.5%	4.341	0.505	50.5%	5.012
0.010	1.0%	2.673	0.260	26.0%	4.356	0.510	51.0%	5.025
0.015	1.5%	2.830	0.265	26.5%	4.372	0.515	51.5%	5.037
0.020	2.0%	2.946	0.270	27.0%	4.387	0.520	52.0%	5.050
0.025	2.5%	3.040	0.275	27.5%	4.402	0.525	52.5%	5.063
0.030	3.0%	3.119	0.280	28.0%	4.417	0.530	53.0%	5.075
0.035	3.5%	3.188	0.285	28.5%	4.432	0.535	53.5%	5.088
0.040	4.0%	3.249	0.290	29.0%	4.446	0.540	54.0%	5.100
0.045	4.5%	3.304	0.295	29.5%	4.461	0.545	54.5%	5.113
0.050	5.0%	3.355	0.300	30.0%	4.475	0.550	55.0%	5.125
0.055	5.5%	3.402	0.305	30.5%	4.490	0.555	55.5%	5.138
0.060	6.0%	3.445	0.310	31.0%	4.504	0.560	56.0%	5.151
0.065	6.5%	3.486	0.315	31.5%	4.518	0.565	56.5%	5.163
0.070	7.0%	3.524	0.320	32.0%	4.532	0.570	57.0%	5.176
0.075	7.5%	3.560	0.325	32.5%	4.546	0.575	57.5%	5.189
0.080	8.0%	3.595	0.330	33.0%	4.560	0.580	58.0%	5.202
0.085	8.5%	3.628	0.335	33.5%	4.574	0.585	58.5%	5.215
0.090	9.0%	3.659	0.340	34.0%	4.587	0.590	59.0%	5.227
0.095	9.5%	3.689	0.345	34.5%	4.601	0.595	59.5%	5.240
0.100	10.0%	3.718	0.350	35.0%	4.614	0.600	60.0%	5.253
0.105	10.5%	3.746	0.355	35.5%	4.628	0.605	60.5%	5.266
0.110	11.0%	3.773	0.360	36.0%	4.641	0.610	61.0%	5.279
0.115	11.5%	3.799	0.365	36.5%	4.655	0.615	61.5%	5.292
0.120	12.0%	3.825	0.370	37.0%	4.668	0.620	62.0%	5.305
0.125	12.5%	3.849	0.375	37.5%	4.681	0.625	62.5%	5.318
0.130	13.0%	3.873	0.380	38.0%	4.694	0.630	63.0%	5.332
0.135	13.5%	3.897	0.385	38.5%	4.707	0.635	63.5%	5.345
0.140	14.0%	3.919	0.390	39.0%	4.720	0.640	64.0%	5.358
0.145	14.5%	3.942	0.395	39.5%	4.733	0.645	64.5%	5.372
0.150	15.0%	3.963	0.400	40.0%	4.746	0.650	65.0%	5.385
0.155	15.5%	3.985	0.405	40.5%	4.759	0.655	65.5%	5.399
0.160	16.0%	4.005	0.410	41.0%	4.772	0.660	66.0%	5.412
0.165	16.5%	4.026	0.415	41.5%	4.785	0.665	66.5%	5.426
0.170	17.0%	4.046	0.420	42.0%	4.798	0.670	67.0%	5.440
0.175	17.5%	4.065	0.425	42.5%	4.811	0.675	67.5%	5.454
0.180	18.0%	4.084	0.430	43.0%	4.823	0.680	68.0%	5.467
0.185	18.5%	4.103	0.435	43.5%	4.836	0.685	68.5%	5.482
0.190	19.0%	4.122	0.440	44.0%	4.849	0.690	69.0%	5.496
0.195	19.5%	4.140	0.445	44.5%	4.861	0.695	69.5%	5.510
0.200	20.0%	4.158	0.450	45.0%	4.874	0.700	70.0%	5.524
0.205	20.5%	4.176	0.455	45.5%	4.887	0.705	70.5%	5.539
0.210	21.0%	4.193	0.460	46.0%	4.899	0.710	71.0%	5.553
0.215	21.5%	4.211	0.465	46.5%	4.912	0.715	71.5%	5.568
0.220	22.0%	4.228	0.470	47.0%	4.925	0.720	72.0%	5.583
0.225	22.5%	4.244	0.475	47.5%	4.937	0.725	72.5%	5.598
0.230	23.0%	4.261	0.480	48.0%	4.950	0.730	73.0%	5.613
0.235	23.5%	4.277	0.485	48.5%	4.962	0.735	73.5%	5.628
0.240	24.0%	4.293	0.490	49.0%	4.975	0.740	74.0%	5.643
0.245	24.5%	4.309	0.495	49.5%	4.987	0.745	74.5%	5.659
						1.000	100.0%	10.000



evropský  
sociální  
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost



UNIVERZITA J. E. PURKYNĚ V ÚSTÍ NAD LABEM

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ  
CZ.1.07/2.2.00/28.0205 - ENVIMOD

## 12 Biochemické metody

Do této kapitoly byly zařazeny doplňkové metody, které jsou zaměřeny na mikrobiální identifikaci významných kmenů bakterií v klinické mikrobiologii. Do textu byla zařazena i metoda stanovení koncentrace chlorofylu-a (založená na spektrofotometrickém stanovení).

### 12.1 Mikrobiální identifikace pomocí MikroLA-testu

V klinické i praktické mikrobiologii se pro identifikace významných kmenů používají rychlé testy (MikroLA-testy), které jsou založené na biochemických reakcích testovaných organismů. Známé jsou např. testy ANAEROTest 23 (rutinní identifikace anaerobních bakterií, 23 biochemických reakcí), CANDIDA-Screen (pro klinický materiál, určení kvasinek), CANDIDATest 21, EN-COCCUSTest (identifikace druhů *Enterococcus*), ENTERO-Rapid 24 (stanovení enterobakterií během 24 h), ENTERO-Screen (pro klinický materiál, enterokoky), ENTEROTest 16 (identifikace enterobakterií), ENTEROTest 24N, ENTEROTest 24, NEFERMtest 24 (gramnegativní nefermentující bakterie), NEISSERIATest (bakterie *Neisseria*, zjm. *N. gonorrhoeae*), OFtest (rozlišení fermentujících/nefermentujících gramnegativních tyček na základě metabolismu glukózy), STAPHYtest 16 (stanovení stafylokoků), STAPHYtest 24, STREPTOTest 24 (stanovení bakterií rodu *Streptococcus* a *Enterococcus*), URE-HPtest (test aktivity ureázy u *Helicobacter pylori*), detekční proužky, pomůcky pro presumptivní stanovení (OXITest, mCOLITest pro *E. coli* apod.).

#### 12.1.1 Stanovení enterobakterií pomocí ENTEROTestu 16

Pro rutinní identifikaci významných druhů střevních bakterií z čeledi *Enterobacteriaceae* je možné použít komerčně dodávanou soupravu ENTEROTest 16. Sada je určena pro identifikaci intestinálních (střevních) bakterií na základě celkem 16 biochemických reakcí (sulfan, lysin, indol, ornithin, ureáza, fenylalanin, eskulin, Simmons citrát, malonát, inositol, adonitol, celobióza, sacharóza, sorbitol, trehalóza, mannitol). Testovací soupravu představuje dělená mikrotitrační destička, která v jamkách umístěných ve dvou řadách (stripech) obsahuje dehydratovaná diagnostická média.

**Přístroje a pomůcky:** Mikrotitrační destička ENTEROTest 16, Petriho misky s kultivačním médiem, zkumavky se sterilním fyziologickým roztokem, Vortex, automatická mikropipeta (po 0,1 ml) a sterilní špičky, termostat vytemperovaný na 37 °C, běžné laboratorní mikrobiologické vybavení (kličky, popisovače, kahan, nůžky).

**Chemikálie:** Používané chemikálie jsou stupně čistoty ch.č. nebo p.a. Voda se používá destilovaná bez specifických požadavků na jakost.

- Činidlo pro test INDOL.
- Činidlo pro test FENYLALANIN.
- Sterilizovaný parafinový olej (činidla a olej jsou součástí dodávané sady).

**Postup zkoušky:**

- Příprava inokula:** Z 24 h staré kultury bakterií se připraví ve sterilním fyziologickém roztoku suspenze, která se důkladně zhomogenizuje pomocí Vortexu. Alternativně lze připravit inokulum ze suspektní kolonie, rostoucí na agarovém médiu. Kolonie se sterilní kličkou přenese do zkumavky obsahující (alespoň) 3 ml sterilního fyziologického roztoku a důkladně se promíchá vortexováním.
- Příprava ENTEROtestu 16:** Z transportní vaničky se odřízne tři strany krycí fólie, která se odklopí a destička se vyjme. Podle toho, kolik bude provedeno stanovení (pro suspenzi, kolonii či kmen), se sejme ochranná hliníková fólie tak, aby pro 1 test (stanovení 1 typu kolonie, suspenze, kmene) byly odkryty dva stripy (řady s jamkami).
- Inokulace:** Suspenze se před použitím důkladně zhomogenizuje. Do každé jamky, zde 16, se inokuluje 0,1 ml suspenze. Přenesení objemu 0,1 ml do jamky musí být přesné, je důležitá minimalizace přenesení objemu do vedlejší jamky.  
Po naplnění všech testovaných jamek (biochemických reakcí) se v případě první jamky s testem na sulfan ( $H_2S$ ), druhé jamky s testem na lysin (LYS), třetí jamky s testem na indol (IND), čtvrté jamky s testem na ornithin (ORN) a páté jamky s testem na ureázu (URE) přidají cca 2 kapky sterilního parafinového oleje (z důvodu zajištění anaerobního prostředí, které je potřeba pro biochemickou identifikaci reakce).
- Inkubace:** Destička s naočkovanými stripy se zasune do polyethylenového obalu (sáčku), jehož otevřený konec se zahne pod destičku, čímž se minimalizuje případné vysychání inokula. Inkubace probíhá po dobu 18 až 24 h při teplotě 37 °C.

**Vyhodnocení zkoušky:**

- Po 18 až 24 h inkubace se k testu jamky IND přidá kapka činidla pro test na indol a do jamky PHE se přidá kapka činidla pro test na phenylalanin. Důležité je dodržet přímou aplikaci do daných jamek a zamezit případné kontaminaci jamek sousedních, která by byla následkem falešně pozitivních nebo negativních reakcí.
- Test na phenylalanin je nutné odečíst, díky rychlé reakci a odeznění signálu, během 2 - 3 min od doby kápnutí činidla.
- Při hodnocení zkoušky ENTEROtest 16 se používá barevná srovnávací stupnice doplněná informací o výsledku testu (pozitivní/negativní), viz Obr. 20 a tabulka 9.

1		H	G	F	E	D	C	B	A
		H <sub>2</sub> S	LYS	IND	ORN	URE	PHE	ESL	SCI
	⊕	● ●	● ●	● ●	● ●	● ●	● ●	● ●	● ●
2		H	G	F	E	D	C	B	A
		MAL	INO	ADO	CEL	SUC	SOR	TRE	MAN
	⊕	● ●	● ●	● ●	● ●	● ●	● ●	● ●	● ●
	⊖	● ●	● ●	● ●	● ●	● ●	● ●	● ●	● ●

Obr. 20. Interpretace barvené škály reakcí na destičce ENTEROtestu 16.

Tabulka 9. Interpretace reakcí na destičce ENTEROtestu 16

Sloupec	Test	Zkratka testu	Reakce	
			Pozitivní	Negativní
<b>Řádek (strip) 1</b>				
<b>H</b>	Sulfan	H <sub>2</sub> S	černá, tmavě šedá	bezbarvá, naředlá
<b>G</b>	Lysin	LYS	modrá, modrozelená	zelená, žlutozelená
<b>F</b>	Indol	IND	červenofialová, růžová	žlutá
<b>E</b>	Ornithin	ORN	modrá, modrozelená	zelená, žlutozelená
<b>D</b>	Ureáza	URE	červená, oranžovo-červená	žlutá, světle oranžová
<b>C</b>	Phenylalanin	PHE	tmavě zelená, zelená	žlutá, žlutohnědá
<b>B</b>	Eskulin	ESL	černá, tmavě hnědá, tmavě šedá	bezbarvá, světle šedá, světle hnědá
<b>A</b>	Simmons citrát	SCI	modrá, modrozelená	zelená
<b>Řádek (strip) 2</b>				
<b>H</b>	Malonát	MAL	modrá, modrozelená	zelená
<b>G</b>	Inositol	INO	žlutá, žlutozelená	zelená
<b>F</b>	Adonitol	ADO	žlutá, žlutozelená	zelená
<b>E</b>	Celobióza	CEL	žlutá, žlutozelená	zelená
<b>D</b>	Sacharóza	SUC	žlutá, žlutozelená	zelená
<b>C</b>	Sorbitol	SOR	žlutá, žlutozelená	zelená
<b>B</b>	Trehalóza	TRE	žlutá, žlutozelená	zelená
<b>A</b>	Mannitol	MAN	žlutá, žlutozelená	zelená

- Biochemické reakce se postupně hodnotí a porovnávají pomocí barevné škály (pozitivní a negativní reakce, +/-) a následně se záznam +/- převede do formy numerického kódu – profilu (oktalový profil). Dále se pak jednotlivé testy rozdělí do následujících trojic (popř. dvojic) a v každé vytvořené skupině přísluší hodnoty 1, 2 a 4 podle následujícího schématu.

1. řádek (strip)							
H	G	F	E	D	C	B	A
H <sub>2</sub> S	LYS	IND	ORN	URE	PHE	ESL	SCI
1. skup.		2. skup.			3. skup.		
2	4	1	2	4	1	2	4
2. řádek (strip)							
H	G	F	E	D	C	B	A
MAL	INO	ADO	CEL	SUC	SOR	TRE	MAN
4. skup.			5. skup.			6. skup.	
1	2	4	1	2	4	1	2

- Pokud je test v jamce pozitivní, pak je konkrétnímu testu přiřazena patřičná hodnota 1, 2 a 4. V případě negativní reakce je vždy zaznamenána 0.
- Hodnoty, které se přiřadily k testům v každé trojici (dvojici) se sečtou. Tím vznikne šestice čísel, která reprezentuje daný profil.
- Podle tohoto šestimístného číselného kódu se provede identifikace pomocí Diagnostického seznamu.

#### Příklad postupu identifikace organismu:

- Po skončení inkubace ENTERotestu 16 a přidání činidel do jamky F (indol) a C (phenylalanin) byly pomocí barevné škály k jednotlivým reakcím zapsány +/- hodnoty.



- Hodnoty +/- byly následně převedeny podle výše uvedeného schématu do číselné podoby (1, 2 a 4 za pozitivní reakce) a v případě negativní reakce 0. Po rozdělení do trojic (dvojic) byly hodnoty sečteny, čímž vzniklo šestimístné číslo.

1. řádek (strip)							
H	G	F	E	D	C	B	A
H <sub>2</sub> S	LYS	IND	ORN	URE	PHE	ESL	SCI
1. skup.		2. skup.			3. skup.		
2	4	1	2	4	1	2	4
-	+	-	-	-	-	-	-
0 + 4		0 + 0 + 0			0 + 0 + 0		
4		0			0		
2. řádek (strip)							
H	G	F	E	D	C	B	A
MAL	INO	ADO	CEL	SUC	SOR	TRE	MAN
4. skup.			5. skup.			6. skup.	
1	2	4	1	2	4	1	2
-	-	-	-	-	-	-	+
0 + 0 + 0			0 + 0 + 0			0 + 2	
0			0			2	

- V tomto případě vyšlo diagnostické číslo: **400002**.
- Podle diagnostického čísla pomocí Diagnostického seznamu byl organismus identifikován ze 73,54 % jako *Salmonella gallinarum*, ze 7,84 % jako *Salmonella pullorum* a z 11,82 % jako *Shigella* serovar A,B,C.
- Závěrečné zhodnocení: jedná se o nízké rozlišení. Pro přijatelnou identifikaci by byla potřebná alespoň 90 % úspěšnost identifikace.

## 12.2 Stanovení koncentrace chlorofylu-a

Metoda se používá pro povrchové vody a obsah chlorofylu-a ve vzorku vody se vztahuje k množství přítomného fytoplanktonu. Chlorofyl-a je základní fotosyntetický pigment, který obsahují organismy schopné primární produkce, tj. fotosyntézy, např. vyšší rostliny, sinice a řasy. Přítomnost chlorofylu-a v planktonních sinicích a řasách odlišuje tuto skupinu mikroorganismů od ostatních složek planktonu povrchových vod, kterými jsou mikromycety, bakterie, zooplankton, apod.

**Podstata zkoušky:** Postup popisuje stanovení koncentrace chlorofylu-a v povrchových vodách dle ČSN ISO 10 260 (75 7575): Jakost vod - Měření biochemických ukazatelů - Spektrofotometrické stanovení koncentrace chlorofylu-a. Jedná se o spektrofotometrické stanovení chlorofylu-a extrahovaného horkým ethanolem ze sinic a řas zachycených filtrací vzorku na filtru ze skleněné vlákniny.

### Chemikálie:

- Ethanol (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH), vodný roztok, 90% (V/V)
- Kyselina chlorovodíková (HCl) v koncentraci 3 mol/l

**Přístroje a pomůcky:** Filtrační aparatura, vodní vývěva, filtry ze skleněné vlákniny (WhatmanGF/C), extrakční zkumavky s těsným uzávěrem (skleněné nebo plastové), automatická dávkovací mikropipeta, špičky, vodní lázeň s tepelnou regulací (75 ± 1 °C) a s nosičem zkumavek, spektrofotometr pro měření ve viditelné oblasti spektra do 750 nm, šířka (optická dráha) kvety od 1 do 5 cm.

### Odběr vzorků a úprava:

Vzorky se odebírají do polyethylenových lahví o objemu 1 000 – 2 000 ml. Konzervace vzorků se neprovádí. Vzorky se zpracovávají ihned po odběru. Ve výjimečných případech je možné skladování vzorků méně než 8 h, a to ve tmě a v chladničce při teplotě 2 – 5 °C.

### Postup zkoušky:

- Vzorek se důkladně promíchá protřepáním.
- Odměřená část vzorku, jejíž objem závisí na koncentraci přítomných suspendovaných částic, se zfiltruje přes filtr ze skleněné vlákniny za pomoci jemného podtlaku (obvykle 100 ml – 1 000 ml).
- Do extrakční zkumavky se nadávkuje přesný objem 90% ethanolu (např. 10 ml).



- Filtr se zachyceným materiálem se přeloží filtrační plochou dovnitř a pomocí pinzety se vloží do připravené zkumavky s ethanolem. Zkumavka se pevně uzavře.
- Zkumavky se umístí do nosiče a vloží do připravené vodní lázně vytemperované na teplotu  $75 \pm 1$  °C. Ve vodní lázni se zkumavky zahřívají po dobu 5 min.
- Po vyjmutí z vodní lázně se zkumavky ponechají zchladit na laboratorní teplotu po dobu 15 min.
- Po vytemperování se extrahovaný supernatant vyčistí tak, že se opatrně vyjme filtr. Vzorek se přelije do centrifugační zkumavky a vyčistí se od případně zbylých skleněných vláken.
- Po slití se vyčištěný supernatant proměří spektrofotometrem.

**Poznámka:** Doba mezi extrakcí a následujícím spektrofotometrickým měřením by měla být co nejkratší. Extrakt však může být před měřením skladován přes noc v chladničce při teplotě 4 °C (doba skladování by neměla přesáhnout 3 dny). Skladovat extrakty při teplotě -25 °C je možné až 30 dní.

- Část vyčištěného extraktu se přelije do kyvety spektrofotometru a proměří se při vlnové délce 665 nm a 750 nm proti referenční kyvetě s extrakčním činidlem, tj. 90% ethanolem.
- Po proměření se extrakt oddělí do zkumavky a okyselí přidáním 0,01 ml kyseliny chlorovodíkové (3 mol/l) na 10 ml objemu extraktu. Obsah zkumavky se protřepe.

**Pozor! Množství přidávané kyseliny je třeba upravit podle skutečného objemu extraktu!**

- Po 5 min se změří absorbance znovu při 665 nm a 750 nm.

#### Vyhodnocení a výpočty:

Zjištěné hodnoty absorbance extraktu před okyselením a po okyselení se použijí pro výpočet koncentrace chlorofylu-a a koncentrace feopigmentů.

$$\text{Chlorofyl-a } (\mu\text{g/l}) = 29,6 \cdot (A - A_a) \cdot \{v/(V \cdot d)\}$$

$$\text{Feopigmenty } (\mu\text{g/l}) = [20,8 \cdot A_a \cdot \{v/(V \cdot d)\}] - \text{chlorofyl-a}$$

kde:  $A$  je ( $A_{665} - A_{750}$ ) absorbance před okyselením,  $A_a$  je ( $A_{a665} - A_{a750}$ ) absorbance po okyselení,  $v$  je objem extraktu v mililitrech,  $V$  je objem zfiltrovaného vzorku v litrech,  $d$  je délka kyvety v cm.

Výsledky se uvádějí v mikrogramech na litr, nebo miligramech na metr krychlový, na jedno desetinné místo.

(Poznámka: Hodnota koncentrace feopigmentů slouží jako indikace stavu organismů. Feopigmenty jsou produkty rozkladu chlorofylu. Poměr chlorofylu k feopigmentům indikuje fyziologický stav sinic a řas.)

## 13 Výpočty a vyhodnocování výsledků

Tato kapitola je zaměřená na vybraná vyhodnocování výsledků praktických stanovení a výpočty. Na modelových příkladech jsou uvedena vyhodnocení výsledků z kultivačních stanovení (přepočty na KTJ/ml), z mikroskopických analýz (přepočty dat z počítačící komůrky), vyhodnocení testů toxicity apod.

### 13.1 Kultivační stanovení - výpočty

Při všech kultivačních stanoveních se výsledky udávají jako KTJ (kolonie tvořící jednotku/y), v angličtině se používá ekvivalentně CFU (*Colony Forming Unit/s*) na jednotku výchozího materiálu, např. na objem vzorku (1 ml v případě povrchové vody, na 100 ml v případě pitné vody, na 250 ml v případě balené vody, apod.), na hmotnost vzorku (např. u vzorku půdy na gramy), na plochu povrchu (na  $\text{cm}^2$  v případě stěrů z plochy apod.). Při těchto jednoduchých přepočtech se zpravidla vystačí s trojčlenkou, jen je třeba do matematické podoby převést manipulace se vzorkem a správně započítat objemy, ředění apod.

#### **Příklad 1. Výpočet koncentrace kultivovatelných mikroorganismů ve vzorku vody.**

*Zadáni:* Ve vzorku vody z jezírka byly kultivačně stanoveny počty mikroorganismů. Voda byla zředěna desítkovým ředěním sterilním fyziologickým roztokem v řadě: 10×, 100×, 1 000×. Na misky s PCA agarem byl rozstírán objem 0,1 ml, nasazen byl neředěný vzorek a následně zředěné vzorky.

Po kultivaci narostly následující počty kolonií:

Neředěný vzorek	Ředění 10× (tj. $10^{-1}$ )	Ředění 100× (tj. $10^{-2}$ )	Ředění 1 000× (tj. $10^{-3}$ )
Nárůst: nepočítatelné	Nárůst: 695 KTJ	Nárůst: 95 KTJ	Nárůst: 8 KTJ

Vypočítejte koncentraci kultivovatelných mikroorganismů ve vzorku.

*Řešení:* K výpočtu je vhodný jen výsledek z ředění 100× (95 kolonií). 695 kolonií u ředění 10× je více než horní limit (500 kolonií), výsledek by mohl být zkreslený vzájemným antagonismem jednotlivých kolonií. Naopak 8 kolonií u ředění 1000× je příliš nízká hodnota (dolní limit pro výpočet je 30 kolonií), výsledek by byl příliš nepřesný. Budeme tedy počítat jen s hodnotou 95 kolonií (dále už jen KTJ).

Nejprve si vypočítáme koncentraci mikroorganismů v 1 ml zředěné suspenze (přímá úměrnost):

0,1 ml.....95 KTJ  
1 ml.....X

$$X = 1/0,1 \times 95 = 10 \times 95 = 950 \text{ KTJ/ml.}$$

Dále je třeba násobit faktorem zředění.

$$X = 100 \times 950 = \underline{95\,000 \text{ KTJ/ml}}$$

*Závěr:* Ve vzorku vody z rybníka bylo zjištěno 95 000 KTJ/ml kultivovatelných mikroorganismů.

### **Příklad 2. Výpočet koncentrace kultivovatelných mikroorganismů ve vzorku vody.**

*Zadání:* Ve vzorku vody z bazénu byly kultivačně stanoveny počty mikroorganismů. Voda byla zředěna desítkovým ředěním sterilním fyziologickým roztokem v řadě: 10×, 100×, 1000×. Na misky s PCA médiem byl roztírán objem 0,2 ml.

Po kultivaci narostly následující počty kolonií:

Ředění 10× (tj. $10^{-1}$ )	Ředění 100× (tj. $10^{-2}$ )	Ředění 1 000× (tj. $10^{-3}$ )
Nárůst: 348 KTJ	Nárůst: 39 KTJ	Nárůst: 4 KTJ

Vypočítejte koncentraci kultivovatelných mikroorganismů ve vzorku.

*Řešení:* K výpočtu jsou vhodné jen výsledky z ředění 10× a 100×. Pouze 4 narostlé kolonie u ředění 1 000× je příliš nízká hodnota (dolní limit pro výpočet je 30 kolonií), výsledek by byl příliš nepřesný.

Nejprve si vypočítáme koncentraci mikroorganismů v 1 ml zředěné suspenze 10× (přímá úměrnost):

0,2 ml.....348 KTJ  
1 ml.....X

$$X = 1/0,2 \times 348 = 5 \times 348 = 1\,740 \text{ KTJ/ml.}$$

Dále je třeba násobit faktorem zředění.

$$X = 10 \times 1\,740 = \underline{17\,400 \text{ KTJ/ml.}}$$

Stejným způsobem spočítáme koncentraci mikroorganismů v 1 ml zředěné suspenze 100× (přímá úměrnost):

0,2 ml.....39 KTJ  
1 ml.....X

$$X = 1 / 0,2 \times 39 = 5 \times 39 = 195 \text{ KTJ/ml.}$$

Dále je třeba násobit faktorem zředění.

$$X = 100 \times 195 = \underline{19\,500 \text{ KTJ/ml.}}$$

Na závěr z obou výsledků vypočítáme průměr (18 450) a směrodatnou odchylku (1 485).

*Závěr:* Ve vzorku vody z bazénu bylo zjištěno  $18\,450 \pm 1485$  KTJ/ml kultivovatelných mikroorganismů.

### 13.2 Mikroskopická stanovení - výpočty

V těchto případech se obvykle pracuje s počítací komůrkou. Je třeba si vždy zaznamenat jaké rozměry daná komůrka má (hloubka, plocha čtverce). Pokud se pracuje se zahuštěným nebo naopak ředěným roztokem, je třeba zahrnout do výpočtu i příslušné ředění. Pokud jsou počty mikroorganismů v jednotlivých čtvcích dostatečně vysoké, je možné výsledky i statisticky zhodnotit (průměr ± směrodatná odchylka).

#### **Příklad 3. Výpočet koncentrace řas pomocí počítací komůrky typu Cyrus I**

*Zadání:* Koncentrace řas ve vodě byla stanovena přímým počítáním s využitím počítací komůrky typu Cyrus I (hloubka 0,1 mm, plocha čtverce  $1/16 \text{ mm}^2$ ). Ve 20 čtvcích bylo celkem napočítáno 580 řas. Vypočítejte koncentraci řas v 1 ml vody.

*Řešení:* Při práci s počítací komůrkou pozorujeme vždy přesně definovaný (malý) objem, ve kterém je zjištěna přesná koncentrace mikroorganismů. Vlastní výpočet tedy sestává z převodu jednotek a jednoduché trojčlenky.

Nejprve vypočítáme pozorovaný objem podle vztahu:  $V = 1/16 \times 20 \times 0,1 = 0,125 \text{ mm}^3$ .  
Výsledek se dle zadání má vyjádřit v 1 ml;  $1 \text{ ml} = 1 \text{ cm}^3 = 1000 \text{ mm}^3$ .

Sestavíme trojčlenku:

0,125 mm<sup>3</sup>.....580 řas  
1 000 mm<sup>3</sup>.....X

$$X = 1\,000/0,125 \times 580 = 8\,000 \times 580 = \underline{4\,640\,000 \text{ řas/ml}}$$

*Závěr:* Ve vzorku vody bylo zjištěno 4 640 000 řas/ml.

**Příklad 4. Výpočet koncentrace řas pomocí počítací komůrky typu Cyrus I**

*Zadání:* Abundance (výskyt) krásnooček rodu *Euglena* ve vodě z nádrže byla zjišťována přímým počítáním pomocí počítací komůrky. 10 ml vzorku bylo nejprve zahuštěno centrifugací, po slití supernatantu zůstal ve zkumavce objem 0,2 ml, ve kterém byly sedimentované mikroorganismy resuspendovány. S využitím počítací komůrky typu Cyrus I (hloubka 0,1 mm, plocha čtverce  $1/16 \text{ mm}^2$ ) bylo v 10 řadách ( $10 \times 40 = 400$  čtverců) napočítáno celkem 152 krásnooček. Vypočítejte počet krásnooček v 1 ml vody.

*Řešení:*

Nejprve vypočítáme pozorovaný objem:  $V = 1/16 \times 400 \times 0,1 = 2,5 \text{ mm}^3$ .

Výsledek se dle zadání má vyjádřit v 1 ml;  $1 \text{ ml} = 1 \text{ cm}^3 = 1000 \text{ mm}^3$ .

Sestavíme trojčlenku:

$2,5 \text{ mm}^3$ .....	152 krásnooček
$1\ 000 \text{ mm}^3$ .....	X

$$X = 1\ 000 / 2,5 \times 152 = 8000 \times 152 = 60\ 800 \text{ krásnooček/ml}$$

Nakonec započítáme zahuštění vzorku na centrifuze (pozorujeme koncentrovanou suspenzi, tj. výsledek je třeba faktorem zahuštění vydělit).

$$\text{Faktor zahuštění} = 10/0,2 = 50$$

$$X = 60\ 800/50 = 1\ 216 \text{ řas/ml}$$

*Poznámka:* Pro rutinní výpočty je vhodné využít už odvozenou rovnici pro komůrku Cyrus I a odstředění objemu 10 ml (viz kapitola 5.4).

$$f = (K/n) \times v \times 10$$

$$f = (1\ 600/400) \times 0,2 \times 10 = 8$$

Tímto faktorem se vynásobí napočítaný počet mikroorganismů a získá se koncentrace v 1 ml

$$X = 8 \times 152 = 1\ 216 \text{ řas/ml}$$

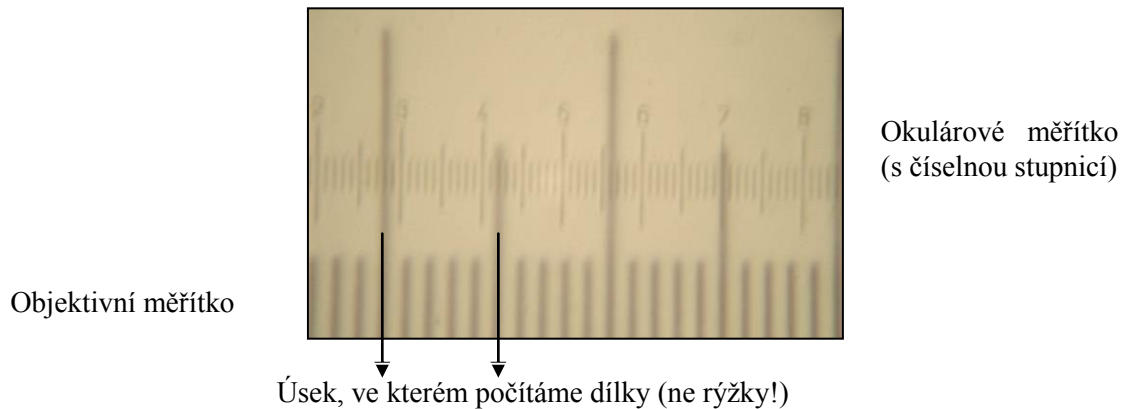
*Závěr:* V nádrži bylo zjištěno 1 216 krásnooček rodu *Euglena* v 1 ml vody.

**Příklad 5. Proměření objektivu 20× zvětšení**

*Zadáni:* Proměřte objektiv o zvětšení 20×.

*Řešení:*

1. Nastavení objektivového mikrometru a měřicího okuláru, postavení měřítek do vhodných poloh. Vhodný výběr stejně se překrývajících rýžek obou měřítek (viz následující fotografie).



2. Spočítání dílků na úseku vymezeném stejně se překrývajícími rýžkami obou měřítek. V tomto případě je počet dílků okulárového mikrometru ( $y$ ) 14, počet dílků objektivového mikrometru ( $y'$ ) je 5.
3. Dle rovnice provedeme výpočet, kterým zjistíme velikost odpovídající 1 dílku při 20× zvětšení objektivu.

$$1 \text{ dílek } 20x \text{ objektivu} = \left(\frac{5}{14}\right) \times 0,01 \text{ mm} = 3,57 \mu\text{m}$$

*Závěr:* Tento údaj ( $3,57 \mu\text{m} = 1$  dílek při použití 20× objektivu) pak používáme při proměřování velikosti organismů, a to u daného objektivu na daném mikroskopu, který jsme proměřili (viz příklad proměření velikosti organismu).

**Příklad 6. Zjištění velikosti pozorovaného organismu.**

*Zadáni:* Pozorujeme objekt při 20× zvětšení objektivu a potřebujeme zjistit jeho velikost např. z důvodu taxonomického zařazení, výpočtu objemové biomasy, posouzení separační účinnosti, apod.

*Řešení:*

5. Použijeme měřicí okulár, který nastavíme tak, aby měřítko pokrylo pozorovaný objekt a mohli jsme tak zjistit počet dílků, kterými ho překrývá. Současně si pomáháme nejen otáčením okuláru v tubusu, ale i posunem preparátu posuvnými šrouby křížového stolku.

6. Spočítáme množství dílků, které odpovídají velikosti sledovaného objektu (viz ilustrativní obrázek). V tomto případě je to 19 dílků.



5. Z předchozího proměření 20× objektivu víme (viz příklad 5), že 1 dílek měřicího okuláru odpovídá 3,57 μm. Toto číslo použijeme pro výpočet výsledné velikosti (šířky, délky) pozorovaného objektu (rozsivka *Diatoma vulgaris*).
6. V tomto případě,  $19 \times 3,57 \mu\text{m}$ , délka schránky pozorovaného objektu je  $67,8 \mu\text{m}$ .
7. Obdobným způsobem můžeme proměřit i šířku schránky. Zjištěné údaje pak můžeme použít i pro výpočet objemové biomasy.

### **Příklad 7. Zjištění velikosti objemové biomasy**

**Zadání:** Zjistěte velikost objemové biomasy, kterou ve vzorku vody tvoří rozsivka rodu *Diatoma*. Dále máte k dispozici údaj o počtu buněk v 1 ml, který odpovídá 2 458 org./ml.

**Řešení:**

1. Při vhodném zvětšení objektivu si proměříme buňky rozsivek rodu *Diatoma*, a to ve dvou rozměrech „a“ (šířka, kratší osa) a „b“ (délka, delší osa). Proměříme minimálně 25 jedinců. Ze zjištěných hodnot šířek a délek vypočítáme průměr.
2. Zjištěný průměrný údaj o délce a šířce dosadíme do vzorce pro výpočet válce (viz stanovení objemové biomasy), zde  $0,7854 a^2 \times b$ .
3. Zjistili jsme, že  $a = 12 \mu\text{m}$ ,  $b = 69 \mu\text{m}$ . Pak do dosazení do vzorce na výpočet objemu válce je průměrná biomasa 1 rozsivky  $7\,803,74 \mu\text{m}^3$ .
4. V zadání máme informaci o počtu 2 458 jedinců rozsivek *Diatoma* v 1 ml. Tímto číslem vynásobíme zjištěnou hodnotu objemové biomasy, pak  $7\,803,74 \times 2\,458 =$   $19\,181\,579 \mu\text{m}^3$ .
5. Objemovou biomasu je možné převést na živou hmotnost, za předpokladu specifické hmotnosti řas rovnou 1,0. Potom  $10^6 \mu\text{m}^3$  odpovídá 1 μg.

**Závěr:** *Diatoma* v objemu 1 ml tvoří  $19\,181\,579 \mu\text{m}^3$  biomasy, což odpovídá 19,18 μg.

### 13.3 Výpočty z růstových křivek

#### Příklad 8. Výpočet generační doby a specifické růstové rychlosti z růstové křivky

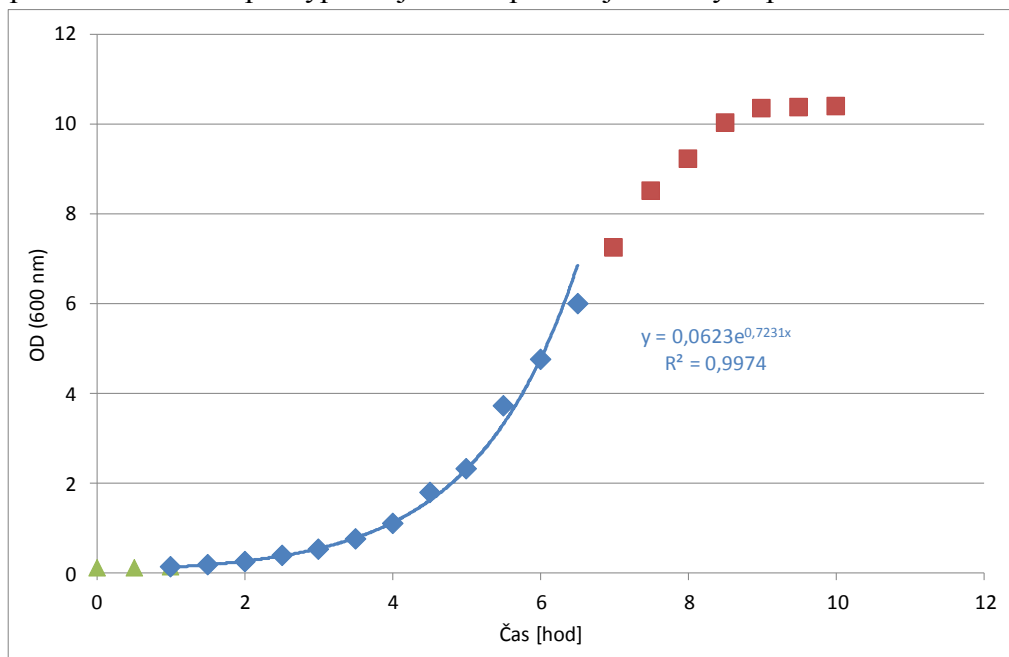
*Zadání:* Bakterie *Pseudomonas fluorescens* byla kultivována na LB médiu při 25 °C a byla naměřena následující růstová křivka:

Čas [hod]	0	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5
OD (600nm)	0,12	0,11	0,13	0,18	0,25	0,39	0,54	0,76	1,11	1,8	2,32
Čas [hod]	5,5	6	6,5	7	7,5	8	8,5	9	9,5	10	
OD (600nm)	3,72	4,75	5,99	7,23	8,49	9,21	10,01	10,34	10,36	10,38	

Vypočítejte specifickou růstovou rychlost a generační dobu bakterie.

*Řešení:*

Nejprve je třeba si vytvořit graf a z grafického zobrazení vymezit jednotlivé fáze růstové křivky. V našem případě je lag-fáze označena zeleně, exponenciální fáze modře a fáze zpomalujícího se růstu dohromady se stacionární fází červeně. Hlavním důvodem je to, že generační doba i specifická růstová rychlost jsou definované jen v exponenciální fázi a při výpočtu je nutné počítat jen s daty exponenciální fáze.



Vlastní výpočet lze poté realizovat několika způsoby:

*Varianta 1:* V exponenciální fázi dochází po uplynutí generační doby ( $g$ ) ke zdvojnásobení mikrobiální populace ( $N$ ). Po uplynutí času  $t$  dojde celkem  $t/g$ -krát ke zdvojnásobení buněčné populace ve srovnání s počáteční populací ( $N_0$ ). Aktuální

buněčná koncentrace se tak vypočítá jako  $N = N_0 2^{\frac{t}{g}}$ . Z této rovnice lze vyjádřit



generační dobu jako  $g = \frac{t}{\log_2 \frac{N}{N_0}}$  dosazením hodnot začátku a konce exponenciální

fáze. Za hodnoty  $N$  se dosadí snadněji naměřitelné přímo úměrné hodnoty optické density OD. V našem případě tedy  $t_0=1$  hod,  $N_0=0,13$ ,  $t=6,5$  hod,  $N=5,99$ .

$$g = \frac{6,5 - 1}{\log_2 \frac{5,99}{0,13}} = 0,995 \text{ hod}$$

Specifická růstová rychlost se pak vypočítá jako  $\mu = \frac{\ln 2}{g} = \frac{0,693}{0,995} = 0,696 \text{ hod}^{-1}$ .

*Varianta 2:* Definiční vztah pro specifickou růstovou rychlost (přírůstek jednotkového množství mikrobiální populace)  $\frac{dN}{dt} = \mu N$  lze v intervalu exponenciální fáze

integrovat  $\int_{N_0}^N \frac{dN}{N} = \int_{t_0}^t \mu dt$  a obdržet výsledný vztah  $\ln N - \ln N_0 = \mu(t - t_0)$ . Z něj lze

vyjádřit specifickou růstovou rychlost jako  $\mu = \frac{\ln N - \ln N_0}{(t - t_0)}$ . Dosazením hodnot

začátku a konce exponenciální fáze vyjde  $\mu = \frac{\ln 5,99 - \ln 0,13}{(6,5 - 1)} = 0,696 \text{ hod}^{-1}$ .

Z hodnoty specifické růstové rychlosti pak lze vypočítat generační dobu

$$g = \frac{\ln 2}{\mu} = \frac{0,693}{0,696} = 0,995 \text{ hod}.$$

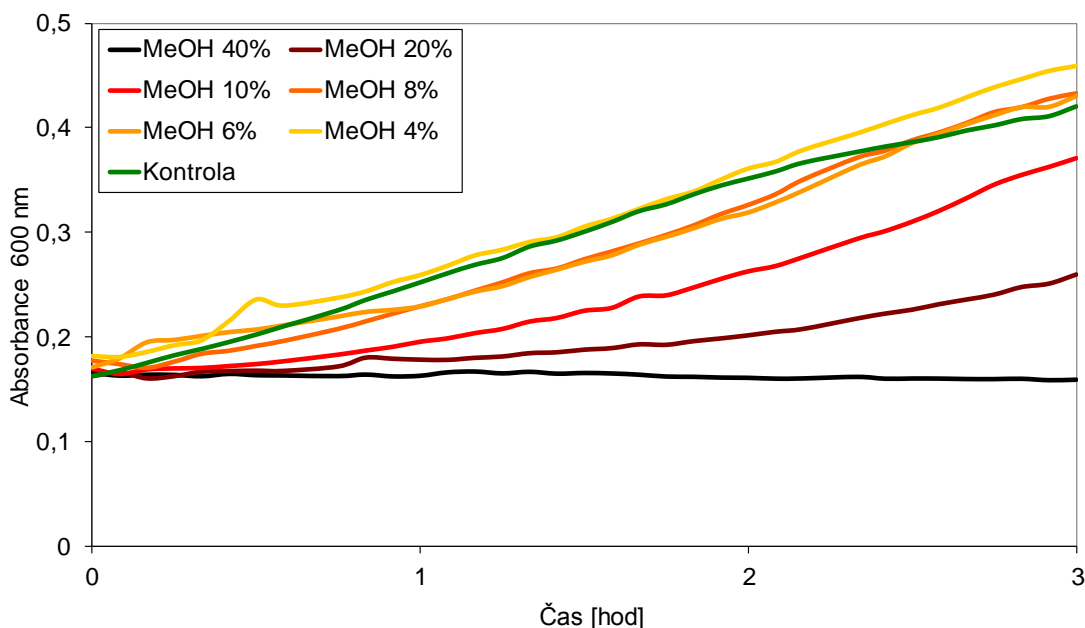
*Varianta 3.* Předchozí varianty jsou nejjednodušší, ale za cenu toho, že počítají pouze s hodnotami začátku a konce exponenciální fáze a mezilehlé hodnoty ignorují. Správnější je proto použít regresní analýzu a proložit naměřené hodnoty exponenciální fáze exponenciální funkcí (viz graf)  $N = N_0 e^{\mu t}$ . Hodnota specifické růstové rychlosti ( $0,7231 \text{ hod}^{-1}$ ) zde figuruje přímo jako regresní parametr, generační dobu lze vypočítat

opět jako  $g = \frac{\ln 2}{\mu} = \frac{0,6931}{0,7231} = 0,959 \text{ hod}$ . Hodnoty se jen mírně liší od předchozích.

**Závěr:** Generační doba bakterie *Pseudomonas fluorescens* byla  $0,959 \text{ hod}$ , specifická růstová rychlost  $0,7231 \text{ hod}^{-1}$ .

### 13.1 Vyhodnocení bakteriálního růstového testu toxicity - výpočet hodnoty IC50

*Zadání:* Byl zjišťován vliv inhibice methanolu na růst bakterie *Pseudomonas fluorescens*. Byly získány následující růstové křivky. Vypočítejte hodnotu IC50.

Růst *Pseudomonas fluorescens* v přítomnosti methanolu

**Řešení:** Nejprve je nutné vypočítat pro každou růstovou křivku specifickou růstovou rychlost např. postupy popsány v kapitole 11.3. a následně inhibici  $I = 1 - (S_t / S_k)$ . Růst není v daném případě ideálně exponenciální, nicméně za exponenciální fázi lze považovat celý naměřený interval 0-3 hodiny. Závislost inhibice na koncentraci toxikantu je vhodné zpracovat graficky. Ke každé inhibici se následně nalezne podle tabulky probitová hodnota a vypočítá logaritmus koncentrace (viz Tabulka 8). Z těchto hodnot se pak vytvoří druhý graf závislosti probitů na logaritmu koncentrací a proloží se lineární funkcí (např. v Excelu funkce „Přidat spojnicí trendu“). Z regresní rovnice  $y = 4,9555x + 9,2234$  se vypočítá hodnota pro  $y=5$  (probitu 5 odpovídá inhibice 50%):

$$5 = 4,9555x + 9,2234$$

$$x = (5 - 9,2234) / 4,9555$$

$$x = -0,852$$

Vypočítaná hodnota  $x$  představuje logaritmus  $IC_{50}$ , tj. výsledná hodnota  $IC_{50}$  se vypočítá jako

$$IC_{50} = 10^{0,852} = 14\%$$

**Tabulka 10** Naměřené inhibice a probitové hodnoty vzorového výpočtu

c(%)	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	I (%)	Probit	Log c		
40%	-0,0135	100%	92%	8%	8	-0,39794
20%	0,156351	49%	54%	-5%	4,975	-0,69897
10%	0,261467	17%	11%	6%	4,046	-1
8%	0,297891	6%	6%	0%	3,445	-1,09691
6%	0,308128	3%	2%	0%	3,119	-1,22185
4%	0,309192	2%	1%	2%	2,946	-1,39794
0%	0,317216	0%	<b>Sum.čtv.</b>	<b>2%</b>		



evropský  
sociální  
fond v ČR

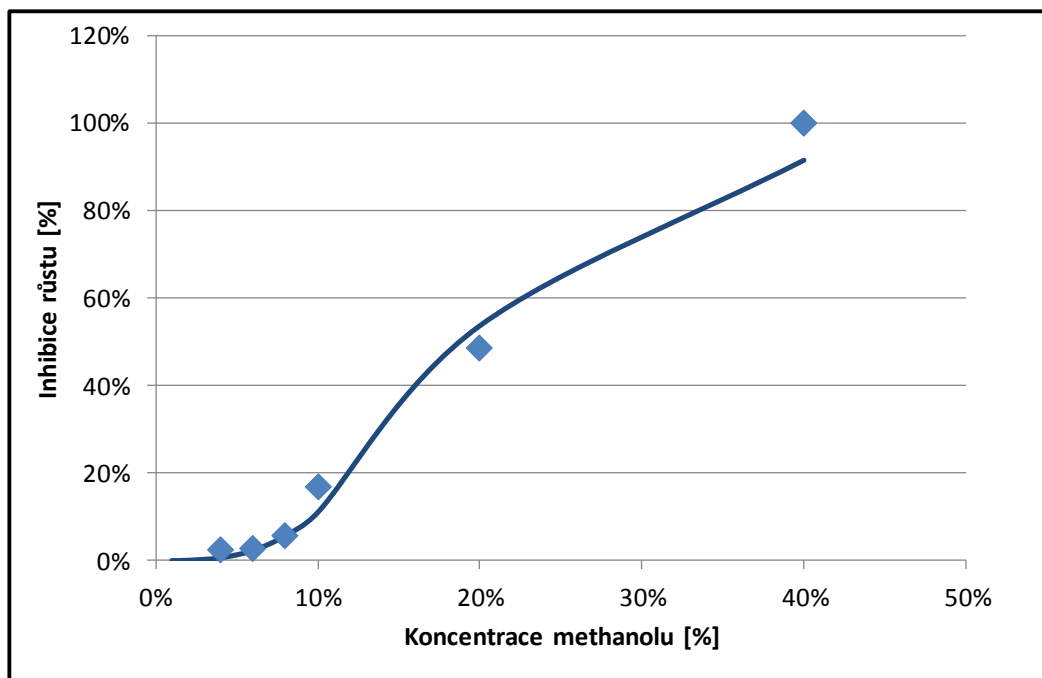


MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

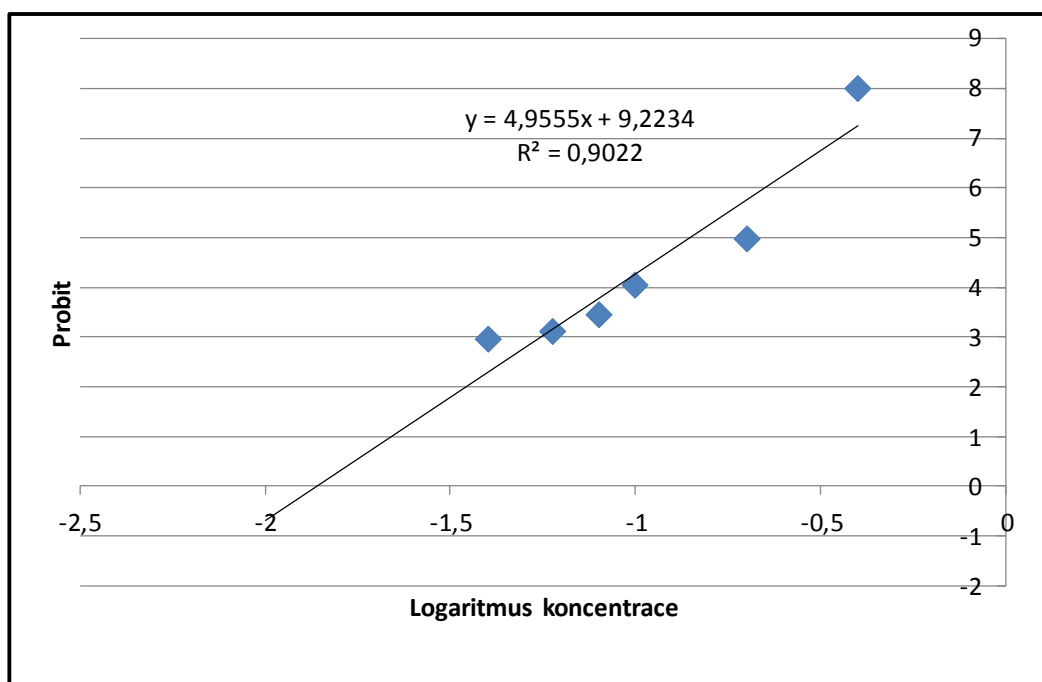


UNIVERZITA J. E. PURKYNĚ V ÚSTÍ NAD LABEM

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ  
CZ.1.07/2.2.00/28.0205 - ENVIMOD



Obr. 21 Závislost inhibice na koncentraci u vzorového výpočtu hodnoty IC50 inhibice růstu *Pseudomonas fluorescens* methanolem.



Obr. 22 Závislost probitových hodnot na logaritmu koncentrace methanolu.

## 14 Přehled médií a roztoků

Tato kapitola uvádí přehled roztoků, pufrů, živných médií apod. z celých návodů. Pro větší přehlednost jednotlivých úloh je ale jejich příprava uvedena i přímo v návodech pro jednotlivé úlohy a stanovení.

### 14.1 Kultivační média

Všechna tekutá média je možné ztuzit agarem o koncentraci 1-2% (10-20 g/l). Není-li uvedeno jinak, zpravidla se sterilují autoklávováním (0,1 MPa, 15 min, 121 °C).

#### 14.1.1 LB (Luria Broth)

Trypton	10 g/l
Yeast extract	5 g/l
NaCl	10 g/l

Bohaté médium určené pro kultivaci bakterií. Hodnota pH se upravuje před autoklávováním na  $7,2 \pm 0,2$ .

#### 14.1.2 Plate Count Agar (PCA)

Trypton	5 g/l
Yeast extract	2,5 g/l
Glukóza	1 g/l

Bohaté médium je využíváno ve ztužené podobě při kultivačních stanoveních organotrofních mikroorganismů. Hodnota pH se upravuje na  $7,0 \pm 0,2$ .

#### 14.1.3 Malt extract

Malt extract	20 g/l
--------------	--------

Bohaté médium vhodné pro kultivaci mikroskopických hub. Hodnota pH se upravuje na  $7,2 \pm 0,2$ .

#### 14.1.4 Škrobový agar

Trypton	5 g/l
Yeast extract	2,5 g/l
Glukóza	1 g/l
Škrob	10 g/l

Ve ztužené podobě se médium používá pro kultivaci amylolytických bakterií, např. bacilů. Hodnota pH se upravuje na  $7,0 \pm 0,2$ .

### 14.1.5 Müller-Hintonův agar

Hovězí výtažek	300 g/l
Hydrolyzát kaseinu	17,5 g/l
Škrob	1,5 g/l
Agar	17,0 g/l

Médium je určené pro potřeby testování citlivosti mikroorganismů vůči antibiotikům (popř. pro stanovení bakterií rodu *Neisseria*). K přípravě pevného kultivačního média se používá komerčně vyráběné dehydratované médium od firmy Hi Media.

Po nabobtnání se sterilizuje autoklárováním při 121 °C. Hotové médium se po ochlazení asi na 50 °C vylévá do sterilních Petriho misek. Po ztuhnutí se misky skladují v chladničce ve tmě.

### 14.1.6 Selektivní médium na stanovení mikromycet

Pepton	5 g
Glukóza	10 g
MgSO <sub>4</sub>	0,5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g
Bengálská červeň	0,035 g
Agar	15 až 20 g

Po nabobtnání se sterilizuje autoklárováním 15 min při 121 ± 3 °C. Pokud není kultivační médium použito ihned, skladuje se ve sterilním stavu v chladničce při teplotě 4 ± 2 °C nejdéle 2 týdny.

**Poznámka:** Bengálská červeň působí antimikrobiálně vůči další doprovodné mikroflóře a rychle rostoucím organismům, které by pomalu rostoucí mikromycety přerůstaly. Pokud jsou misky s vyrostlými koloniemi déle ponechány na světle, bengálská červeň se začíná rozkládat a působit antimykoticky. V technické mikrobiologii je vhodnější používat jiná média, např. Sabouraudův agar, který je dodáván pod různým označením.

### 14.1.7 Sabouraudův glukózový agar

Pepton	10 g
Glukóza	40 g
Agar	15 až 20 g

Po nabobtnání se sterilizuje autoklárováním 15 min při 121 ± 3 °C. Pokud není kultivační médium použito ihned, skladuje se ve sterilním stavu v chladničce při teplotě 4 ± 2 °C nejdéle 2 týdny.

### 14.1.8 Agar s kvasničným extraktem

Tryptone / pepton z kaseinu	6 g
Dehydratovaný kvasničný extrakt	3 g
Agar	12 g

K přípravě pevného kultivačního média se používá komerčně vyráběné dehydratované médium od firmy Hi Media (M 1272). Výrobce předepsané množství dehydratovaného média se rozpustí v předepsaném množství destilované vody, sterilizuje se autoklávováním 15 min při  $121 \pm 3$  °C. Před použitím se kultivační médium roztopí, nechá se zchladnout, případně se pak udržuje na vodní lázni při teplotě  $45 \pm 3$  °C.

### 14.1.9 Masopeptonový agar

Pepton	10 g
Chlorid sodný	5 g
Masopepton	5 g
Agar	15 g

K přípravě pevného kultivačního média se používá komerčně vyráběné dehydratované médium Nutrient agar w/1% pepton od firmy Hi Media. Výrobce předepsané množství dehydratovaného média se rozpustí v předepsaném množství destilované vody, sterilizuje se autoklávováním 15 min při  $121 \pm 3$  °C. Před použitím se kultivační médium roztopí, nechá se zchladnout, případně se pak udržuje na vodní lázni při teplotě  $45 \pm 3$  °C.

### 14.1.10 Endo agar

Masový extrakt	8,6 g
Pepton	10 g
Laktóza	10 g
Chlorid sodný	5 g
Sířičitan sodný bezvodý	1,2 g
Agar	12 g

K přípravě pevného kultivačního média se používá komerčně vyráběné dehydratované médium od firmy Hi Media (M 1481). Výrobce předepsané množství dehydratovaného média se rozpustí v předepsaném množství destilované vody, přidá se odpovídající množství roztoku bazického fuchsinu. Po nabobtnání se sterilizuje autoklávováním 15 min při 121 °C. Hotové médium se po ochlazení asi na 50 °C vylévá do sterilních Petriho misek. Po ztuhnutí se misky skladují v chladničce ve tmě při teplotě  $5 \pm 3$  °C nejdéle dva týdny. Médium musí být slabě růžové, pokud zčervená, nehodí se již k použití.

**14.1.11 m-FC agar**

Tryptose	10 g
Proteose pepton	5 g
Kvasničný extrakt	3 g
Chlorid sodný	5 g
Laktóza	12,5 g
Zlučové sole	1,5 g
Anilinová modř	0,1 g
Agar	12 g

K přípravě pevného kultivačního média se používá komerčně vyráběné dehydratované médium od firmy Hi Media (M 1122). Výrobce předepsané množství dehydratovaného média se rozpustí v předepsaném množství demineralizované vody, která již obsahuje 10 ml alkalického roztoku kyseliny rosolové. Potom se médium zahřeje těsně pod bod varu (nesterilizuje se!), ihned se ochladí na teplotu 45 °C až 50 °C a rozlévá se do sterilních Petriho misek. Po ztuhnutí se misky skladují v chladničce při teplotě 5 ± 3 °C nejdéle dva týdny.

**14.1.12 Médium dle Slanetz – Bartley (m-enterokokový agar)**

Tryptose-pepton	20 g
Kvasničný extrakt	5 g
Glukosa	2 g
Hydrogenfosforečnan draselný	4 g
2,3,5-trifenyltetrazoliumchlorid	0,1 g
Agar	12 g

K přípravě pevného kultivačního média se používá komerčně vyráběné dehydratované médium od firmy Hi Media (M 612I). Výrobce předepsané množství dehydratovaného média se rozpustí v předepsaném množství demineralizované vody. Na vodní lázni se zahřívá za stálého míchání až do úplného rozpuštění agarové složky. Hotové médium se po ochlazení asi na 50 °C vylévá do sterilních Petriho misek a po ztuhnutí se skladuje v chladničce ve tmě při teplotě 5 ± 3 °C maximálně týden.

**14.1.13 Žluč-aeskulin-azidový agar**

Trypton	17 g
Pepton	3 g
Kvasničný extrakt	5 g
Volská žluč dehydratovaná	10 g
Chlorid sodný	5 g
Aeskulin	1 g
Citran železitoamonný	0,5 g
Azid sodný	0,15 g
Agar	15 g

K přípravě pevného kultivačního média se používá komerčně vyráběné dehydratované médium od firmy Hi Media (M 493). Výrobce předepsané množství dehydratovaného média se rozpustí v předepsaném množství demineralizované vody a sterilizuje se v autoklávu 20 minut při teplotě  $121 \pm 3$  °C. Hotové médium se po ochlazení asi na 50 °C vylévá do sterilních Petriho misek a po ztuhnutí se skladuje v chladničce ve tmě při teplotě  $5 \pm 3$  °C maximálně týden.

**Pozor! Azid sodný je látka vysoce toxická a mutagenní.** Musí být proto dodržována opatření, aby se zbránilo kontaktu s ní, především inhalaci aerosolu během přípravy. Kultivační média obsahující azid sodný nesmí být směřována se silnými anorganickými kyselinami, protože může být produkován silně toxický azoimid ( $\text{HN}_3$ ). Roztoky obsahující azid sodný mohou také tvořit explozivní sloučeniny ve styku s kovovým potrubím. Azid může být bezpečně rozložen přidávkou nadbytku nasyceného roztoku dusitanu.

#### 14.1.14 Médium pro kultivaci sladkovodních řas

Mírně upraveno podle ČSN EN ISO 8692 a podle chemikálií dostupných na pracovišti FŽP UJEP. Roztoky by před použitím měly být vysterilizované; roztoky 1, 2, 3 a 5 je možné autoklávkovat, roztok 4 se autoklávkovat nesmí (hydrogenuhličitan se rozkládá) a je třeba ho pouze přefiltrovat přes antibakteriální filtr.

##### Roztok 1 – Makrosložky živin

Látka	Koncentrace	Navážka na 250 ml
$\text{NH}_4\text{Cl}$	1,5 g/l	0,375 g
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,2 g/l	0,300 g
$\text{CaCl}_2$	1,4 g/l	0,350 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,5 g/l	0,375 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,16 g/l	0,040 g

##### Roztok 2 – Fe-EDTA

Látka	Koncentrace	Navážka na 250 ml
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	64 mg/l	0,016 g
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	100 mg/l	0,025 g

##### Roztok 3 – stopové prvky

Zde je odchylka od normy, z roztoku 3 jsou vyjmuty nejméně zastoupené stopové prvky a jsou vyčleněny do samostatného koncentrovanějšího roztoku 5.

Látka	Koncentrace	Navážka na 250 ml
$\text{H}_3\text{BO}_3$	185 mg/l	0,0463 g
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	415 mg/l	0,1038 g

##### Roztok 4 – hydrogenuhličitan

Látka	Koncentrace	Navážka na 250 ml
$\text{NaHCO}_3$	50 g/l	12,5 g



**Roztok 5 – ostatní stopové prvky**Odchylka proti normě, na místo  $ZnCl_2$  je  $ZnSO_4$ .

Látka	Koncentrace	Navážka na 250 ml
$ZnSO_4$	355 mg/l	0,0888 g
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	150 mg/l	0,0375 g
$CuCl_2$	7,89 mg/l	0,0020 g
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	700 mg/l	0,1750 g

Do výsledného média se dávákuje:

Typ roztoku	Dávkovaný objem	Doplň se destilovanou vodou do 1 000 ml!
Roztok 1	10 ml	
Roztok 2	1 ml	
Roztok 3	1 ml	
Roztok 4	1 ml	
Roztok 5	0,01 ml	

**14.2 Roztoky****14.2.1 Fyziologický roztok**

NaCl	9 g
Destilovaná voda	1 000 ml

Po rozpuštění chloridu sodného v destilované vodě se roztok doplní na objem do 1 000 ml. Po rozplnění do lahviček po 9 ml (k přípravě desítkového ředění) se část ponechá v baňkách na 250 ml (pro ředění při membránové filtraci). Vše se sterilizuje v autoklávu při  $121 \pm 3$  °C po dobu 20 min. Skladuje se v chladničce při teplotě  $4 \pm 2$  °C nejdéle 1 měsíc.

**14.2.2 Fosfátový pufř 0,066 M pH 7**

Roztok A: $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	23,637 g/l
Roztok B: $KH_2PO_4$	8,98 g/l

Do 500 ml odměrné baňky se odměří 306 ml roztoku A a dolije se roztokem B po rysku. Jiným poměrem roztoků A a B lze dosáhnout jiného pH.

**14.2.3 Ringerův roztok**

NaCl	2,25 g
KCl	0,105 g
bezvodý $CaCl_2$	0,12 g
$Na_2HPO_4$	0,05 g

Naváží se a doplní do 1 000 ml destilovanou vodou a sterilizuje se v autoklávu při  $121 \pm 3$  °C po dobu 20 min. Skladuje se v chladničce při teplotě  $4 \pm 2$  °C nejdéle 1 měsíc.

#### 14.2.4 Roztok bazického fuchsinu

K přípravě roztoku bazického fuchsinu se používají komerčně připravené lahvičky s navážkou od firmy Hi Media (FD 059A). Navážka v lahvičce se rozpustí v 5 ml ethanolu. Obsah lahvičky odpovídá přípravě 1 000 ml Endova agaru.

Rovněž lze použít 5 % roztok bazického fuchsinu od firmy Hi Media (RM 112).

Bazický fuchsin	1 g
95 % ethanol	20 ml

Po dokonalém rozpuštění 1 g bazického fuchsinu v ethanolu se roztok v případě potřeby přefiltruje. Skladuje se v chladničce při teplotě 2 °C až 8 °C. Na připravovaných 1 000 ml Endova agaru se přidává 3,4 ml tohoto roztoku.

**Pozor! Fuchsin je karcinogenní látka, proto při manipulaci s ním (zejména při navažování) musí být dodržována náležitá bezpečnostní opatření.**

#### 14.2.5 Roztok pro cytochromoxidázový test

Chelaton 3	0,1 g
Thiosíran sodný	0,2 g
Tetramethylparafenylendiamindihydrochlorid	1,0 g
Destilovaná voda	100 ml

Chemikálie v uvedeném pořadí se rozpustí v destilované vodě a doplní se do 100 ml. Roztok nesmí přijít do styku s železem a musí se chránit před světlem. Uchovává se v chladničce při teplotě 5 ± 3 °C maximálně týden (pokud zmodrá dříve, likviduje se ihned).

#### 14.2.6 Alkalický roztok kyseliny rosolové

Hydroxid sodný o koncentraci 0,2 mol/l	10 ml
Kyselina rosolová	0,1 g

K přípravě roztoku se používá kyselina rosolová od firmy Hi Media (FD 058), jejíž hmotnost v jednotlivých lahvičkách odpovídá 1 litru připravovaného m-FC média. Při přípravě se dodržuje návod výrobce, to znamená, že kyselina v lahvičce se rozpustí v roztoku hydroxidu.

## 14.3 Barviva

### 14.3.1 Krystalová violeť

<u>Roztok A:</u> Krystalová violeť v 96 % ethanolu	25 g/l
<u>Roztok B:</u> Šťavelan amonný ve vodě	10 g/l

Smíchá se 20 ml roztoku A a 80 ml roztoku B, zfiltruje se.

### 14.3.2 Safranin

Safranin	2,5 g/l
----------	---------

Po rozpuštění se roztok zfiltruje.

### 14.3.3 Methylenová modř

Methylenová modř	0,3 g
96 % ethanol	30 ml
Destilovaná voda	100 ml

Barvivo se rozpustí v ethanolu, přidá se destilovaná voda a nakonec se zfiltruje.

### 14.3.4 Lugolův roztok

Jód	1 g
Jodid draselný	2 g
Destilovaná voda	300 ml

Navážené množství se rozetře v třecí misce s vodou a doplní do 300 ml. Roztok se uchovává v tmavé láhvi.

### 14.3.5 Roztok 0,5% TTC

Tento roztok se používá pro potřeby zvýraznění inhibiční zóny (MIC) u metody pro stanovení citlivosti mikroorganismů k antibiotikům. K 1 000 ml připravené půdy se přidá 1 ml 0,5% vodného roztoku trifenyl tetrazolium chlorid (TTC). Po jeho přidání do agaru se růst projevuje červeným zabarvením.

### 14.3.6 Neisserovo činidlo

Barvicí roztoky se musí před použitím zfiltrovat a připravují se na dobu 3 až 6 měsíců. Roztoky I. a II. se před vlastním barvením míchají v poměru 2:1 (2 díly roztoku I. a 2 díly roztoku II., např. 2 ml roztoku I. a 1 ml roztoku II.). Tato směs se připravuje vždy čerstvá!

**Roztok I.**

Methylenová modř	0,1 g
Ethanol	5 ml
Kyselina octová	5 ml
Destilovaná voda	100 ml

**Roztok II.**

Krystalová violet (10% roztok v 95% ethanolu)	3,3 ml
Ethanol	6,7 ml
Destilovaná voda	100 ml

**Roztok III.**

Bismarckova hněď (1%)	33 ml
Destilovaná voda	66,7 ml

Poznámka: Alternativně lze použít 0,33% vodný roztok chrysoidinu Y.

**14.3.7 Laktofenol dle Amanna**

Krystalický fenol	10 g
Kyselina mléčná o 1,21 sp.hm	10 g
Glycerol	20 g
Destilovaná voda	10 ml

V horké destilované vodě se rozpustí fenol a další chemikálie (index lomu je 1,45).

Takto připravený laktofenol lze obohatit modří. Do 100 ml laktofenolu se přidá 0,5 g soluble blue 2 R, (cotton blue), čímž se připraví 0,5 % roztok. V některých případech je vhodnější koncentrace 0,05 %, čímž se obarví pouze hyfy, které barvivo přijímají intenzivně a zorné pole je téměř bezbarvé.

## 15 Seznam literatury

### 15.1 Použité literární zdroje

- Baldrian, P., 2009. Microbial enzyme-catalyzed processes in soils and their analysis. *Plant Soil and Environment* 55, 370-378.
- Bondi, A., Spaulding, E. H., Smith E. D., Dietz C. C., 1947. A routine method for the rapid determination of susceptibility to penicillin and other antibiotics. *Amer. J. Med. Sci.* 214, 221-225.
- Frostegard, A., Baath, E., 1996. The use of phospholipid fatty acid analysis to estimate bacterial and fungal biomass in soil. *Biology and Fertility of Soils* 22, 59-65.
- Kaur, A., Chaudhary, A., Choudhary, R., Kaushik, R., 2005. Phospholipid fatty acid - A bioindicator of environment monitoring and assessment in soil ecosystem. *Current Science* 89, 1103-1112.
- Sládeček V., Sládečková A. Atlas vodních organismů se zřetelem na vodárenství, povrchové vody a čistírny odpadních vod. 1. díl: Destruenti a producenti. ČVTVS Praha, 351 pp., 1996.
- Sládeček V., Sládečková A. Atlas vodních organismů se zřetelem na vodárenství, povrchové vody a čistírny odpadních vod. 2. díl: Konzumenti. ČVTVS Praha, 358 pp., 1997.

### 15.2 Přehled použitých norem

Ukazatel	Platná norma
Kultivovatelné mikroorganismy při 22 °C a 36 °C	ČSN ISO 6222
Psychofilní bakterie	ČSN 75 7842
Mezofilní bakterie	ČSN 75 7841
Koliformní bakterie	ČSN ISO 9308-1; prodloužena platnost ČSN 83 0531 (povrchové vody) TNV 75 7837 (kontaminované vody)
Termotolerantní koliformní bakterie	TNV 75 7835
<i>Escherichia coli</i>	TNV 75 7835; ČSN EN ISO 9308-1; ČSN EN ISO 9308-3
Intestinální enterokoky	ČSN EN ISO 7899-1; ČSN EN ISO 7899-2
Sulfítredukující anaerobní klostridia	ČSN EN 26461-1; ČSN EN 26461-2
<i>Clostridium perfringens</i>	Metoda dle přílohy vyhlášky MZd. č. 252/2004 Sb.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ČSN EN ISO 16266
Salmonely	TNV 75 7855

<i>Staphylococcus aureus</i>	ČSN EN ISO 6888-1
Legionely	ČSN ISO 11731 ČSN ISO 11731-2
Mikroskopický obraz (bioseston)	ČSN 75 7712
Mikroskopický obraz (abioseston)	ČSN 75 7713
Stanovení bentosu	ČSN 75 7714
Stanovení nárůstů	ČSN 75 7715
Stanovení saprobního indexu	ČSN 75 7716
Kvalita biologického a ekologického hodnocení vod	ČSN EN 14996
Modifikace morfologie řek	ČSN EN 15843
Hydromorfologie řek	ČSN EN 14614
Makrofyta – stojaté vody	ČSN EN 15460
Svlečky pakomárů (ekolog.h.)	ČSN EN 15196
Fytoplankton, inverzní mikroskop	ČSN EN 15204
Stanovení planktonních sinic	TNV 75 7717
Separční účinnost vodárenské technologie	TNV 75 5940
Jakost vody dopravované potrubím	TNV 75 5941
Rozsivky – tekoucí vody	ČSN EN 13946, ČSN EN 14407
Makrofyta – tekoucí vody	ČSN EN 14148
Fytobentos – tekoucí vody	ČSN EN 15708
Makrozoobentos tekoucích vod (PERLA)	ČSN 75 7701
Makrofyta – stojaté vody	ČSN EN 15460
Odběr zooplanktonu (stojaté vody)	ČSN EN 15110