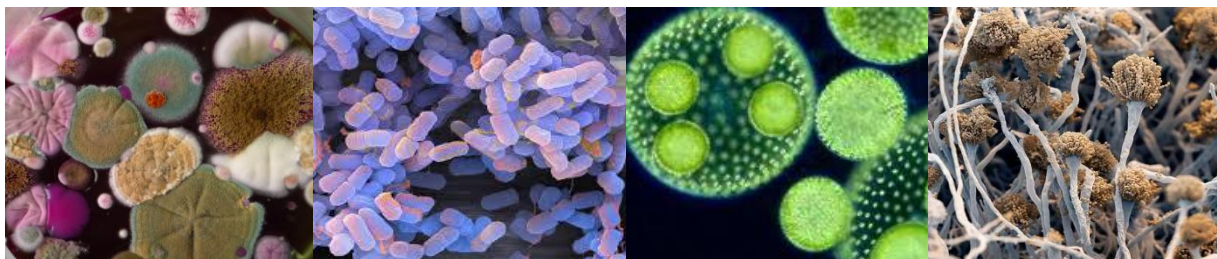


VŠB TECHNICKÁ  
UNIVERZITA  
OSTRAVA

HORNICKO  
GEOLOGICKÁ  
FAKULTA

KATEDRA  
ENVIRONMENTÁLNÍHO  
INŽENÝRSTVÍ



# ZÁKLADY HYDROBIOLOGIE A MIKROBIOLOGIE

## Studijní opory k praktickým cvičením

Hana Vojtková

Vysoká škola báňská - Technická univerzita Ostrava

2022



EVROPSKÁ UNIE  
Evropské strukturální a investiční fondy  
Operační program Výzkum, vývoj a vzdělávání

MS  
MT  
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

## **Základy hydrobiologie a mikrobiologie: Studijní opory k praktickým cvičením**

© doc. Mgr. Hana Vojtková, Ph.D.  
Katedra environmentálního inženýrství, Hornicko-geologická fakulta, Vysoká škola báňská -  
Technická univerzita Ostrava, 2022

Výstup grantového projektu ESF TpB3 Vzdělávání pro praxi - inovace studijních programů  
VŠB-TU Ostrava

První vydání  
Rukopis neprošel jazykovou úpravou.

Obrázek na titulní straně:  
mikroskopické vláknité houby na živné půdě, bakterie *Rhodococcus degradans*, cenobia  
zelené řasy *Volvox globator*, konidie *Aspergillus niger* (SEM mikrofotografie)

## OBSAH

### PŘEHLED TÉMAT

1.	Mikrobiologická laboratoř	str.	3
2.	Základy mikroskopování		12
3.	Hodnocení hydrobiologických vzorků		23
4.	Základy kultivace mikroorganismů		32
5.	Mikroorganismy v prostředí		42
6.	Bakterie		48
7.	Mikromycety		54
8.	Sinice a řasy		62
	Použitá literatura		69



## MIKROBIOLOGICKÁ LABORATOŘ

### Téma 1

Mikrobiologická laboratoř patří z hygienického hlediska k rizikovým pracovištím, a proto je bezpodmínečně nutné dodržování zásad bezpečnosti, zejména pořádku, naprosté čistoty a aseptické práce. Mikrobiologické pracoviště je určeno pouze pro provádění předepsaných cvičení v rámci výuky, pro výzkumné experimenty a nesmí být využívána pro jiné účely. Zařízení mikrobiologické laboratoře by mělo odpovídat kritériím a normám ČSN, EN a ISO.

## Pravidla pro práci v mikrobiologické laboratoři

### Obecně platné zásady

1. Na každé praktické cvičení se předem teoreticky připravte, seznáňte se s úkoly a postupem práce.
  2. Dodržujte zásady pro práci s chemikáliemi, elektrickými a plynovými spotřebiči.  
V průběhu cvičení pečlivě uzavírejte přívod plynu do kahanu. Seznáňte se také s umístěním hlavního uzávěru plynu, který je nutné uzavírat vždy při opuštění laboratoře.
  3. Svě pracovní místo udržujte v pořádku.
  4. Každý menší požár ihned haste, při hašení vypněte přívod plynu. Malý oheň nehaste nikdy rukou - použijte hadr, knihu apod.; k hašení většího plamene použijte hasicí přístroj. Seznáňte se s umístěním hasicího přístroje a jeho použitím.
- Při požáru ihned opusťte laboratoř a ohlaste požár vrátnici budovy A tel. 3111, případně volejte hasiče tel. 150.

### Specifické zásady pro práci s mikroorganismy

Práce s mikroorganismy vyžaduje důsledné dodržování předepsaných pravidel osobní i pracovní hygieny, neboť se vyznačuje zvýšeným rizikem nákazy.

Práce, která přísně respektuje potřebná preventivní opatření směřující k zabránění jakékoli kontaminace, se označuje jako aseptická.

#### Základní zásady aseptické práce

1. Pro práci v mikrobiologické laboratoři je předepsán ochranný plášť.
2. Před začátkem práce i po jejím ukončení je nutné umýt ruce mýdlem.
3. Při určených činnostech je nutné pracovat v ochranných gumových rukavicích (např. při dekontaminaci použitého materiálu).
4. Je nezbytné dodržovat naprostý pořádek na pracovním stole a úzkostlivou čistotu. Na počátku i na konci cvičení je nutné pracovní plochu otřít dezinfekčním roztokem.
5. Použité laboratorní sklo se ihned po použití odkládá do zvláštních nádob s dezinfekčním roztokem. Použité předměty se nesmí odkládat na pracovní stůl.

6. Očkovací jehly a kličky je nutné před a po použití pečlivě vyžítat v plameni.

Pokud dojde ke kontaktu sterilních pomůcek s rukou, pracovním stolem, oděvem nebo s jiným nesterilním předmětem, musí se odložit a je nutné použít nové = sterilní nástroje.

7. Suspenze mikroorganismů se většinou pipetuje automatickými pipetami nebo pomocí balónku.

Pokud se do pipety suspenze mikroorganismů nasává ústy, ústí pipety se předem zajistí vatou tak, aby roztok nemohl proniknout do úst.

Po použití se vata vyjme pinzetou a odhodí do dezinfekčního roztoku.

8. Nádoby s kulturami nesmí nikdy zůstat zbytečně dlouho otevřené, neboť hrozí jejich kontaminace mikroorganismy z prostředí. Všechna hrdla skleněných Erlenmeyerových baněk a zkumavek se musí po odzátkování a před jejich uzavřením sterilizovat ožiháním v plameni. Žihá se tak dlouho, dokud nezmizí zamlžený prstenec na hrdle.

9. Při práci s kulturami mikroorganismů se nesmí zbytečně mluvit, aby se kapénkami nekontaminovala živná média; ze stejného důvodu se při práci s kulturami nesmí otvírat okno a větrat. Vhodné je také používat ústní roušku.

Je zakázáno v mikrobiologické laboratoři jíst a pít.

10. Použité kultury mikroorganismů se nikdy nesmí vylévat do výlevky, musí se nejprve usmrtit teplem nebo chemicky.

11. Do dřezu nepatří ani zbytky rozpuštěných agarových půd, neboť hrozí ucpání odpadu.

12. Rozbité sklo se vkládá do igelitových sáčků do odpadkového koše k tomu určenému, které se pak uzavírají a likvidují předepsaným způsobem.

### První pomoc při nehodách v mikrobiologické laboratoři

1. Seznamte se s umístěním lékárničky v laboratoři a s jejím vybavením.

2. Při proniknutí infekčního materiálu do úst jej ihned vyplivněte. Ústa si pak opakovaně vypláchněte nejprve čistou vodou, pak zředěným dezinfekčním roztokem, např. 0,1% hypermanganem, Lugolovým roztokem, peroxidem vodíku. Někdy se doporučuje žvýkat kousek chleba a poté jej vyplivnout.

3. Při polknutí infekčního materiálu vypijte malé množství základního (masopeptonového) bujónu. Tím se podnítl sekrece žaludečních šťáv, jejichž kyselou reakcí je přirozeně zničena většina patogenních mikroorganismů. Po 20 min. spolkněte několik tablet živočišného uhlí. Doporučuje se také vypít asi 20 ml zředěné 0,2% kyseliny chlorovodíkové.

4. Při infekci oka ihned oko pečlivě propláchněte čistou vodou a pak Ophthalem nebo Ophthalmo-Septonexem.

5. Při povrchovém poranění kůže případně potřísnění infekčním materiálem postižené místo ihned dezinfikujte.

6. Pečlivě zvažte všechny okolnosti týkající se vniknutí infekčního materiálu do organismu, zejména virulenci a patogenitu infekčního agens, podle závažnosti se případně poradte se svým ošetřujícím lékařem o nutnosti preventivních opatření, např. o podávání antibiotik. Přestože jsou při výuce studentů přednostně používány nevirulentní nebo málo virulentní mikroorganismy, pracujte s největší opatrností. Pamatujte, že všechny mikroorganismy mohou být potencionálními patogeny.

7. Všechny nehody je nutné ihned hlásit vyučujícímu.

## Mikrobiologická laboratoř a její vybavení

Zařízení mikrobiologické laboratoře musí vyhovovat především hygienickým požadavkům časté dezinfekce.

### Laboratorní přístroje

- **Očkovací boxy (laminární boxy, flow-boxy)**

Očkovací boxy jsou určeny pro práci s kontaminovaným mikrobiologickým materiálem a toxickými látkami bez přístupu vzduchu z vnějšího okolí laboratoře. Ochrana je zajištěna prouděním sterilního vzduchu s vlastní filtrací, sterilita atmosféry v boxu se musí pravidelně ověřovat. Pro speciální účely mohou být vybaveny například přívodem plynu, mikroskopem, germicidní lampou s časovačem i dalším zařízením podle potřeb laboratoře.

- **Termostaty (inkubátory)**

Termostaty jsou používány ke kultivaci mikroorganismů, tkáňových kultur, biologických a biochemických vzorků vyžadujících stálou teplotu. Zpravidla to jsou kovové skříně s dvojitým pláštěm, ve kterých cirkuluje voda či vzduch. Jejich hlavní součástí jsou regulační teploměry, které při dosažení určité teploty temperovaného prostoru vypínají nebo při poklesu teploty zapínají elektrické vytápění. Mezi doplňující výbavu patří digitální systémy řízení osvětlení, alarmy, čidla pro nezávislé měření teploty vzorků, vlhkosti, CO<sub>2</sub>.

Základní typy termostatů:

- standardní = udržují teplotu  $\pm 5^{\circ}\text{C}$  oproti teplotě v laboratoři
- chlazené = mohou kromě vyhřívání vzduch v termostatu také ochlazovat, neboť jsou napojeny na chladicí jednotku; udržují teplotu v rozmezí 0-99°C

- **Sterilizátory**

Sterilizátory slouží k dokonalému usmrcení všech živých mikroorganismů a jejich spor, které se vyskytují na laboratorním skle, v čerstvě připravených živných médiích i v dalším laboratorním materiálu, moderní přístroje jsou schopny vyvíjet teplotu až 250°C.

Základní typy sterilizátorů:

- horkovzdušné = využívají se nejčastěji pro sterilizaci laboratorního skla za sucha (sušárny), bývají vybaveny automatickou regulací teploty v rozmezích 60-200°C. V sušárnách je zakázáno sušit těkavé látky nebo materiál se zbytky organických rozpouštědel, neboť hrozí nebezpečí výbuchu. Nesmí se v nich sterilizovat materiál z umělé hmoty, pryžové a textilní předměty, látky obsahující vodu a kovové nástroje s ostřím - skalpely, nůžky, jehly;
- parní (autoklávy) = umožňují sterilizaci působením syté vodní páry při stanovené teplotě, tlaku a délce sterilizační expozice. Vlastní sterilizační proces probíhá v uzavřené tlakové komoře vyrobené z nerezavějící oceli. Přístroje mají systémy velmi rychlého vyvíjení páry, přednastavené programy pro možnost volby v závislosti na druhu sterilizovaného materiálu, testovací programy, vakuový test vzduchotěsnosti komory, programy vícefázového sušení s odvětráváním. Přístroje také umožňují dekontaminaci vzorků v uzavřených lahvích a použitých živných půd. U moderních přístrojů bývá uvnitř bezpečnostní čidlo (teplotní závora), které znemožňuje otevření dveří, je-li teplota vyšší než 80°C, neboť hrozí nebezpečí opaření. Tyto přístroje jsou v mikrobiologické laboratoři nejčastěji používány ke sterilizaci živných půd před jejich použitím a roztoků obsahujících tepelně nestálé složky.

- vakuové = tyto přístroje pracují ve vakuu při vytěsnění vzduchu inertním plynem a používají se při sterilizaci na oxidaci citlivých substancí (prášky, granuláty)

V souladu s platnými předpisy pro sterilizaci (Vyhláška MZ ČR 195/2005 Sb., kterou se upravují hygienické požadavky na provoz zdravotnických zařízení ve spojení s platnými normami ČSN EN) musí být o sterilizaci vedeny záznamy, kontrola a archivace sterilizačních protokolů je možná standardně pomocí tiskárny. Pro moderní a přehledné zobrazení protokolů jednotlivých cyklů a jejich bezpečné archivování na pevném disku je možné moderní přístroje propojit s počítačem nebo počítačovou sítí.

V mikrobiologické praxi se nejčastěji využívá programů pro sterilizaci živných půd, které se řídí konkrétním návodem pro jejich přípravu. Nejpoužívanější program je na 15-30 min. při teplotě 121°C.

- **Destilační aparatura**

V mikrobiologické praxi se používá výhradně destilovaná (demineralizovaná) voda, kterou vyrábí destilační přístroj; moderní přístroje pracují na principu reverzní osmózy a deionizace.

- **Vodní lázně**

Vodní lázně jsou vyhřívané nádoby naplněné destilovanou vodou, které umožňují udržovat stálou teplotu pomocí termostatu. Slouží k rozehtívání médií, mohou být využívány také ke kultivaci. Cirkulační systém ve vodní lázni zajišťuje teplotní stabilitu v celé lázni.

Při provozu lázně se voda trvale odpařuje, proto se musí množství vody neustále kontrolovat a její objem doplňovat tak, aby hladina vody byla vždy výše než topné těleso; modernější přístroje již obsahují elektronickou kontrolu vodní hladiny se zvukovou signalizací jejího doplnění.

- **Chladničky, mrazničky a mrazicí boxy**

Chladničky slouží ke krátkodobému uchování vzorků, kultivačních medií, roztoků či kultur mikroorganismů.

Dlouhodobé (asi tříměsíční) uchování kultur umožňují mrazničky do -20°C; po delší dobu lze uchovávat vzorky pouze v hlubokomrazících boxech při teplotách v rozmezí -50°C až -85°C.

Špičkové mikrobiologické laboratoře bývají také vybaveny lyofilizátory, které umožňují lyofilizaci (vymražování) vzorků, kdy se ze vzorku pod vakuem odpařuje voda za jejich současného namrazování při teplotě -50°C na kondenzační spirálu. Lyofilizované kultury bakterií jsou opět životaschopné po rozsuspendování ve vodě.

- **Třepačky (vortexy) a magnetická míchadla**

Třepací a míchací přístroje slouží k protřepávání a promíchávání roztoků a tekutých kultivačních medií, kde se tímto způsobem vytvářejí optimální podmínky pro růst kultur. Krouživý horizontální pohyb zajišťují elektromotory, bývají opatřeny elektronicky řízenou regulací teploty a časovým spínačem.

- **Centrifugy**

Centrifugy se používají k separaci jednotlivých suspenzí v kapalinách pomocí odstředivé síly. Otáčivý pohyb je generován rotorem, do centrifugy se vkládají květy se vzorkem. Moderní přístroje, které zajišťují odstředování vzorků při určité teplotě, bývají vybaveny mikroprocesorem umožňujícím jejich programování a chlazení.

- **Vývěvy**

Vývěvy jsou zařízení, která se používají k membránové filtraci, mohou být vodní nebo olejové.

- **Laboratorní váhy**

Součástí každé laboratoře musí být kvalitní laboratorní váhy s vysokou citlivostí; váhy mohou mít interní či externí (meteorologicky ověřenou) kalibraci.

- **Laboratorní pH metry**

Přístroje se používají ke stanovení kyselosti kultivačních médií a roztoků, nejvhodnější jsou pH metry s přesností 0,1 pH jednotek.

- **Kahany**

K přívodu plynu na laboratorní stůl se nejčastěji používá Bunsenův nebo Meckerův plynový kahan, případně lihové kahany; oheň je nutný k pohotovostní sterilizaci ožiháním hrdel kultivačních nádob a očkovacích nástrojů.

- **Fotometry a spektrofotometry**

Mezi důležitá zařízení pro měření absorpce světla vzorkem patří fotometrická zařízení, která představují optické přístroje užívané k hodnocení množství propuštěného nebo pohlceného světla v závislosti na vlnové délce a koncentraci látky v roztoku.

- **UV (germicidní) lampa**

Ke sterilizaci kontaminovaného prostředí se v mikrobiologické laboratoři využívají germicidní (UV) zářiče, které jsou umístěny nejčastěji na stropu místnosti. Lamy se zapínají zpravidla v noci, zásadně v době nepřítomnosti pracovníků. Nejvyšší účinnosti je dosaženo při záření v rozmezí vlnové délky 200-280 nm, optimální vlnová délka záření je 260 nm.

Komerčně vyráběné germicidní lampy emitují záření o vlnové délce 253,7 nm a nelze je zaměňovat s UV lampami využívanými k vyhodnocení fluorescence, které emitují záření o vlnové délce 360 nm.

- **Mikroskopy**

Každá mikrobiologická laboratoř by měla být vybavena kvalitními laboratorními mikroskopy. Pro pozorování mikroorganismů v procházejícím světle se používají optické mikroskopy s imerzními objektivy se zvětšením 1500-2000krát; velmi vhodné jsou také fluorescenční či elektronové mikroskopy.

## Laboratorní sklo a nástroje

- **Kultivační nádoby**

Mikrobiologické zkumavky jsou na rozdíl od běžně používaných zkumavek v chemické laboratoři z umělé hmoty nebo silnostěnného skla a mají rovné okraje. Používají se ke kultivaci v tekutých, tuhých i polotuhých půdách a k biochemickým testům. Zkumavky se uzavírají vatovými zátkami, které by měly zasahovat do 2/3 zkumavky nebo kovovým (hliníkovým) uzávěrem.

Zvláštním typem jsou Durhamovy zkumavky (plynovky), které se používají k zachycení plynu tvořeného mikroorganismy.

Petriho misky jsou používány ke kultivaci mikroorganismů na pevných živných půdách, k izolaci kultur, ke studiu kolonií i různým testům. Nejčastěji se používají misky o průměru 90-100 mm (vyrábějí se v rozmezí velikostí 40-200 mm). Některé mohou mít dělené dno na čtyři oddíly, což umožňuje očkování kultury na čtyři odlišná média.



Erlenmeyerovy baňky jsou využívány zvláště ke kultivaci mikroorganismů v tekutém médiu; mohou však být využity i ke kultivaci na tuhých rovných nebo šikmých půdách. Jsou vhodné pro kultivaci za aerobních podmínek i pro přípravu zásobních roztoků a kultivačních médií.

Fernbachovy baňky a Rouxovy láhve se v mikrobiologii používají méně často. Slouží ke kultivaci mikroorganismů na tekutých médiích, při které je vyžadován velký povrch substrátu.

- **Odměrné sklo**

Skleněné dělené pipety na objemy 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml, 25 ml se používají k měření přesných objemů roztoků nebo suspenzí mikroorganismů. Při zpracování většího množství vzorků se v mikrobiologické praxi velmi často využívají automatické pipety (i multikanálové) a mikropipety s nastavitelným objemem. Použité špičky se odhazují do nádob s dezinfekčním roztokem nebo do uzavíratelných igelitových sáčků.

Odměrné válce pro objemy 10 ml a více se používají k méně přesnému odměřování objemů kapalin při míchání různých roztoků a kultivačních medií.

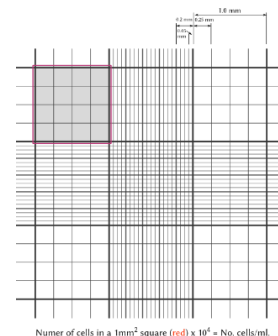


- **Mikroskla**

Mikroskopická sklíčka – podložní a krycí sklíčka se používají při přípravě preparátů. V mikrobiologické laboratoři se čistá sklíčka uchovávají v roztoku kyselého alkoholu (ethanol + 3% HCl) nebo v 95% etanolu, aby byla sterilní, nezaschla a neslepila se.

Použitá sklíčka se shromažďují v uzavřené nádobě s kyselým alkoholem, pak se odmašťují xylenem nebo chromsírovou kyselinou, a po opakovaném opláchnutí destilovanou vodou se vkládají do 50% alkoholu.

Pro počítání kultur mikroorganismů se v mikrobiologii a hydrobiologii využívají speciálně upravená podložní sklíčka s Thomovou nebo Bürkerovou komůrkou.



Number of cells in a 1mm<sup>2</sup> square (red) x 10<sup>4</sup> = No. cells/ml.

- **Očkovací nástroje**

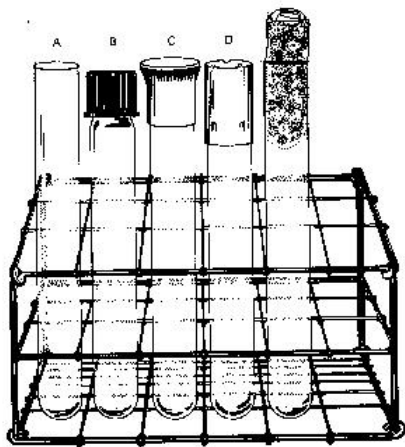
Očkovací nástroje slouží k přenášení mikroorganismů do kultivačních médií – k očkování (přeočkování) mikrobiologických kultur.

Mezi základní očkovací nástroje patří:

- očkovací kličky jsou tvořeny niklovým, niklchromovým nebo platinovým drátkem na konci s očkem; vyrovnáním drátku lze získat očkovací jehlu, drátek je upevněn v Kolleho držáku;
- očkovací lancety jsou tvořeny drátkem s rozšířeným koncem, jehož hrany jsou vybroušeny do ostří;
- Pasterovy pipety jsou skleněné trubičky na jednom konci zúžené do kapiláry. Používají se při odběru suspenzních kultur z tekutých médií, při očkování do tekutých médií a pro přidávání různých reagentů; jsou vhodné také k barvení mikroskopických preparátů.

Laboratorní sklo používané pro práci s mikroorganismy musí být velmi pečlivě umyto, neboť růst mikroorganismů brzdí i stopová množství (1 µg/ml) mycích prostředků a chemikálií. Z toho důvodu je nutné důkladně sklo opláchnout pod tekoucí vodou a pak opakovaně v destilované vodě. Po dokonalém opláchnutí se sklo vkládá do sušárny a suší se při teplotě 60°C asi 20 až 30 minut. K mytí běžného laboratorního skla je vhodné, alespoň občas, použít 3% roztok kyseliny chlorovodíkové, umyté sklo se pak neutralizuje sodou (5% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), nakonec se sklo důkladně opláchně.

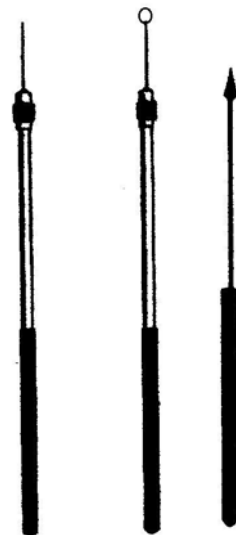
Použité pipety se odkládají do válce s dezinfekčním roztokem (2% roztok ajatinu), ostatní použité laboratorní sklo se odkládá do nádoby s vodou a přídavkem vhodného detergentu.



zkumavky



Petriho miska



očkovací nástroje



## Téma: MIKROBIOLOGICKÁ LABORATOŘ

Pracovní list 1

Jméno: Skupina:		Akademický rok: Datum:	
<b>Úkol: Uzavírání mikrobiologických zkumavek</b>			
Materiál: mikrobiologické zkumavky a baňky, buničitá vata, gáza			
Pracovní postup: 1. Z buničité vaty nastříhejte asi 6 cm široké proužky (podle průměru zkumavky nebo baňky), které podélně postupně překládejte na polovinu, až nakonec vznikne jediná vrstva. Takto připravené pruhy sviňte do tuhého válečku, který se obalí gázou a na horním konci bal zajistěte zavázáním nití. 2. Hotová zátka nesmí být v hrdle zkumavky (baňky) příliš volná (hrozí, že při sterilizaci zapadne dovnitř) ani těsná (obtížné otvírání při manipulaci). Zátka s optimální velikostí vydává při otevírání zkumavky charakteristický zvuk.			

Při kultivaci aerobních mikroorganismů lze použít k uzavírání zkumavek a Erlenmeyerových baněk vatové a papírové zátky nebo kovové uzávěry typu Kapsenberg.

Všechny uzávěry musí být schopné sterilizace, umožnit dobrou výměnu plynů mezi vnějším prostředím a kultivační nádobou a současně zamezit vstupu nežádoucích mikroorganismů, takže nedochází k sekundární kontaminaci z vnějšího prostředí.

Správné uzavření zkumavek a Erlenmeyerových baněk je klíčové pro celou další aseptickou práci.





## Otázky k opakování

## Pracovní list 1

1. Uved'te základní rozdíly mezi mikrobiologickou a běžnou biologickou laboratoří:  
.....  
.....  
.....
2. Vyjmenujte základní zásady aseptické laboratorní práce:  
.....  
.....
3. Popište postup první pomoci při nasátí mikroorganismů do úst:  
.....  
.....
4. Popište postup první pomoci při vniknutí mikroorganismů do očí:  
.....  
.....
5. Které laboratorní sklo lze použít ke kultivaci mikroorganismů v tekutých médiích?  
Které sklo je vhodné pro kultivaci v tuhých médiích?  
.....  
.....
6. Vyjmenujte nástroje, které lze použít k očkování mikroorganismů:  
.....
7. Jakým způsobem se odmašťuje nové laboratorní sklo?  
.....  
.....
8. Zakreslete rozmístění teplot v plameni kahanu. Která část plamene je nejvhodnější pro sterilizaci očkovacích nástrojů?
9. Seznamte se s tvarem Fernbachových a Rouxových laboratorních nádob.  
K jakým účelům se nejčastěji využívají v laboratořích?  
.....  
.....  
.....  
.....



## ZÁKLADY MIKROSKOPOVÁNÍ

### Téma 2

Nejrozšířenější metodou studia vnější a vnitřní struktury buněk mikroorganismů jsou mikroskopická pozorování. Mikroskopie je souhrnný název metody, která zahrnuje přípravu preparátů k pozorování a práci s mikroskopem. Mikroskopy dnes patří mezi základní vybavení každé biologické laboratoře, pro náročná pozorování se používají mikroskopy ve spolupráci s moderní PC technikou.

Každý mikroskop se skládá z mechanické části, optické části a zdroje světla.

Mechanickou část mikroskopu tvoří stativ, stůl na preparáty s křížovým posuvem, tubus s revolverovým nosičem objektivů, mikrometrická a makrometrická posuvná zařízení.

Stativ tvoří nosnou část mikroskopu a zajišťuje jeho stabilitu, často vybíhá v rameno, které slouží k přenášení mikroskopu. Střední část mikroskopu tvoří tubus a na jeho spodní straně je umístěn revolverový nosič objektivů. Uchycení a posun mikroskopických preparátů na stolku zajišťují držáky a šrouby pro křížový posuv preparátů. Zaostřování při pozorování se provádí zaostřovacími šrouby: makrošroub slouží k hrubému zaostření a mikrošroub slouží k jemnému doostření výsledného obrazu.

Optická část mikroskopu zahrnuje soustavu objektivů a okulár, optické filtry a clonu.

Kvalita obrazu závisí zejména na vlastnostech objektivu. Objektiv představuje systém čoček, které vytváří skutečný a zvětšený obraz pozorovaného objektu. Na objektivěch zpravidla bývají vyznačeny dvě hodnoty: zvětšení a numerická apertura ( $A$ ); čím větší je numerická apertura objektivu, tím větší je jeho rozlišovací schopnost. Objektivy se dělí na suché (pro pozorování ve vzduchu) a imerzní (pozorování v oleji).

Prosvětlení zorného pole zajišťuje kondenzor, jehož intenzitu lze měnit nastavitelnou clonou a vkládáním filtrů. Výsledný obraz do oka pozorovatele přivádí okulár.

Zdrojem světla v mikroskopu může být denní viditelné světlo, které je u starších typů mikroskopu přiváděno pohyblivým zrcátkem, nebo umělé světlo z osvětlovacího zařízení, které je zabudováno jako součást stativu.

### Vybrané druhy mikroskopie

- **Optická (světelná) mikroskopie**

Optický mikroskop umožňuje pozorovat objekty výrazně zvětšené za použití přirozeného nebo umělého světla. Naše laboratorní mikroskopy typu CX31 firmy Olympus nejsou závislé na vnějším zdroji světla, k osvětlení využívají LED diodové lampy.

Obraz vstupující do mikroskopu je objektivem zvětšen a otočen, takto zvětšený obraz je poté ještě zvětšen okulárem. Okulár má obvyklé zvětšení 10x až 20x, objektivy 5x až 100x, výsledné zvětšení mikroskopu tak může být až 2000x. Výsledné zvětšení mikroskopu je součinem obou zvětšení – okuláru a objektivu.

Zvětšování u světelné mikroskopie má však svoje limity, které jsou dány zejména vlnovou délkou použitého světla a vlastnostmi optických částí mikroskopu. Maximální rozlišení detailů je dáno numerickou aperturou objektivu ( $A$ ), kterou lze určit ze vztahu  $A = n \cdot \sin a$ , kde  $n$  je index lomu prostředí mezi čočkou objektivu a preparátem,  $a$  je polovina otvorového úhlu objektivu (úhel mezi dvěma krajními paprsky, které mohou projít do objektivu).

Numerická apertura každého objektivu by na něm měla být napsána, obvykle pod číslem udávajícím jeho zvětšení. Na numerické apertuře závisí také rozlišovací schopnost objektivu ( $d$ ), tedy nejmenší vzdálenost mezi dvěma odlišitelnými body. Rozlišovací schopnost lze vypočítat podle vzorce  $d = \lambda : A$ , kde  $\lambda$  je vlnová délka přiváděného světla,  $A$  je numerická apertura objektivu.

Rozlišovací schopnost ovlivňuje i tzv. hloubku ostrosti, která představuje vzdálenost dvou nad sebou položených rovin, mezi kterými je obraz ostrý. Čím větší je rozlišovací schopnost, tím menší je hloubka ostrosti.

- **Mikroskopie ve fázovém kontrastu**

Metodu mikroskopování ve fázovém kontrastu poprvé popsal a zavedl do mikroskopické praxe v roce 1935 nizozemský fyzik Frederik Zernike (1888 – 1966). Za konstrukci tohoto fázově kontrastního mikroskopu mu byla udělena v roce 1935 Nobelova cena za fyziku.

Zařízení pro fázový kontrast se skládá z fázového kondenzoru s fázovými clonami, pomocného mikroskopu, sady objektivů a sady filtrů. Pro mikroskopii ve fázovém kontrastu se dnes vyrábějí speciální mikroskopy, ale je možné takto upravit pomocí přídatného zařízení i běžný světelný mikroskop.

Metoda se používá při pozorování nebarvených nebo málo kontrastních objektů. Princip této metody spočívá v tom, že zařízení na fázový kontrast posouvá fázi světla ze světelného zdroje oproti fázi světla procházejícího přes pozorovaný objekt o čtvrtinu vlnové délky. To se pak projeví v zorném poli mikroskopu diferencovanou světlostí jednotlivých struktur, čímž se zvyšuje jejich kontrast a možnost rozpoznání.

Metoda fázového kontrastu umožňuje pozorovat v buňkách struktury, které mají odlišný index lomu. To se uplatní především u pozorování živých buněk, které jsou ve světleném mikroskopu téměř transparentní (nebarevné). Protože u jednotlivých částí buněk (organel) se vyskytují rozdíly v indexu lomu vlivem jejich rozdílné tloušťky, vzniká kontrast, a mnohé struktury se takto stávají viditelnými. Pomocí této metody se tedy dosáhne kontrastního zobrazení pozorovaných struktur; výhodou této metody je, že nepoškozuje živé biologické objekty a umožňuje jejich přímé pozorování v čase.

Běžně konstruovaný fázový mikroskop umožňuje rozeznávat mnoho původně průhledných objektů, jako jsou mikroorganismy, tenké tkáňové řezy, buněčné organely i jejich části, a to s rozlišovací schopností okolo  $0,1 \mu\text{m}$ . Určitou nevýhodou fázového kontrastu je tzv. „halo efekt“, který je způsoben lomem světla na strukturách s velkým rozdílem indexu lomu (např. u buněk kvasinek ve vodním prostředí). Projevuje se jasně zářícím rozhraním mezi objektem a jeho prostředím, a tím někdy dochází k rozmazání hranice pozorovaných objektů.

- **Mikroskopování v zástině**

Světelný optický mikroskop upravený pro pozorování v zástině využívá primárního záření nevstupujícího do objektivu. Centrální paprsky světla jsou vyřazeny např. speciální clonou zabudovanou přímo do kondenzoru nebo zvláštní clonou, kterou lze vložit do roviny kondenzorového filtru.

Pozorovaný objekt je pak osvětlen pouze odraženými světelnými paprsky od struktur preparátu a pozorované objekty se proto jeví jako světle zářící na tmavém pozadí. Tato mikroskopie je velmi vhodná pro pozorování mikroorganismů a jejich částí, které jsou ve světelném poli běžného mikroskopu špatně rozlišitelné, pozorováním v temném poli naopak dobře vystoupí hranice pozorovaných objektů.

- **Polarizační mikroskopie**

V polarizačním mikroskopu jsou do toku světelných paprsků vloženy dva hranoly - před kondenzor je vložen tzv. polarizátor a za objektiv tzv. analyzátor. Jejich vzájemným mechanickým natáčením dochází k efektu lineární polarizace světla. Polarizované světlo po průchodu pozorovaným objektem rozliší ve výsledném obrazu látky dle jejich indexu lomu. Látky dvojlomné (anizotropní) se jeví jako tmavé struktury, látky jedlomné (izotropní) se jeví jako světlé.

Výhodou této mikroskopie je, že pozorováním určitých buněčných struktur organel získáme spolu s informací o pozorovaném objektu také určitou představu o jeho prostorové orientaci.

Tato metodika je velmi vhodná k pozorování bezbarvých nebo málo zbarvených živých organismů v nativních preparátech, v temném poli se kontrastně zobrazí samotné organismy i detaily jejich struktur. Nespornou výhodou této techniky je, že lze pozorovat živé buňky, které není nutno barvit.

- **Fluorescenční mikroskopie**

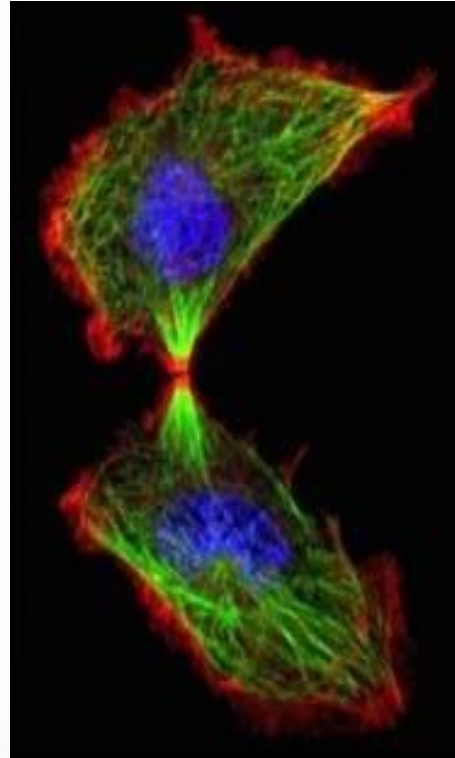
Metoda fluorescenční mikroskopie umožňuje pozorování preparátů, ve kterých jsou na mikrobiální buňky nebo jejich struktury navázány fluoreskující látky, které transformují UV paprsky na delší vlnové délky ve viditelné oblasti. Fluorescenční mikroskopie se používá zejména při identifikaci živých buněk a jejich struktur včetně buněk mikroorganismů.

Funkce fluorescenčního mikroskopu je založena na ultrafialovém záření, které je po dopadu na preparát některými jeho složkami absorbováno, a po této absorpci vychází z těchto látek jiný typ záření – fluorescence, která je snímána mikroskopem. Z hlediska fluorescence se rozlišuje autofluorescence (přirozená, primární fluorescence), kterou vykazují např. pigmenty, vitamíny, chlorofyl i některé další buněčné části; tato přirozená autofluorescence však bývá velmi slabá. V diagnostické praxi se proto využívá umělá, tzv. sekundární fluorescence, kdy jsou na zkoumané struktury navázány fluoreskující látky – speciální barviva fluorochromy, a ta jsou následně snímána mikroskopem. Nejčastěji se využívá vazby fluorochromu na molekulu bílkovin či specifickou sekvenci nukleových kyselin; fluorochrom v excitačním (vzbuzeném) stavu pak jasně září.

Výrazný posun ve fluorescenční mikroskopii živých buněk přinesl objev zeleného proteinu GFP (*green fluorescent protein*) u mořské medúzy rodu *Aequorea*. Genovými manipulacemi byl gen pro GFP přenesen také do jiných organismů a umožnil tak „označení“ sledovaných struktur; tím je možné pozorovat jejich fyziologii i vnitřní složení.

Fluorescenční mikroskopie má nejširší využití v buněčné biologii a molekulární genetice při nalézání specifických molekul (bílkovin, lipidů, sacharidů) včetně zviditelnění některých buněčných struktur (jádro, cytoskelet); stále širší uplatnění má také v diagnostice mikroorganismů založené na nalezení určitých sekvencí nukleotidů v DNA či RNA. V mikrobiologii se využívá k mikroskopické identifikaci mikroorganismů; například lze přímo v preparátu identifikovat patogenní bakterie ve směsi s ostatními bakteriemi (při požití specifické sondy budou hledané bakterie barevně svítit). Použití komerčně dostupných, fluorescenčně značených protilátek otevřelo rozsáhlé možnosti využití imunofluorescenčních technik.

Nevýhodou této moderní mikroskopické metody je pouze skutečnost, že fluorochromy jsou většinou mutageny, proto je nezbytné při práci s nimi zachovávat zvláštní bezpečnostní opatření (oddělený prostor, oddělený oběh laboratorního skla, speciální likvidace roztoků, nepipetovat ústy, při práci se substancí používat ochranné prostředky (roušku, ochranné brýle), nepotřísnit si pokožku apod.).



Fluorescenční mikroskop (vpravo) a dělení buňky (vlevo) zachycené ve fluorescenčním mikroskopu (modře je nabarveno jádro a zeleně je zbarven cytoskelet buňky)

- **Mikroskopie v infračerveném a ultrafialovém světle**

je založena na schopnosti některých buněk rozdílně absorbovat záření určité vlnové délky. Cytofotometricky je možné pomocí UV záření identifikovat a lokalizovat v buňkách nukleové kyseliny, bílkoviny i další sloučeniny; infračervené záření se používá také při studiu hrubých a neprůsvitných objektů.

- **Elektronová mikroskopie**

Vynálezcem elektronového mikroskopu (TEM, transmisní elektronové mikroskopie) byl německý vědec Ernst Ruska (1906 – 1988), který představil první jednoduchý elektronový mikroskop již v roce 1931. Elektronový mikroskop umožňoval zvětšení výrazně převyšující možnosti optického mikroskopu, které jsou limitovány délkou světelného paprsku.

Princip elektronové mikroskopie spočívá v tom, že světelné paprsky jsou nahrazeny svazkem urychlených elektronů, jehož vlnová délka je výrazně nižší než vlnová délka světla. Skleněné čočky, regulující sbíhavost a rozbíhavost paprsků světla u optického mikroskopu, jsou zde nahrazeny elektromagnetickými čočkami.

Metoda je založena na zrychleném a usměrněném proudu emitovaných elektronů, které jsou vedeny vakuem. Elektrony procházejí tenkým mikroskopovaným vzorkem, část elektronů se odráží od atomů a molekul vzorku. Jejich opětovným soustředěním pomocí magnetové čočky se vytváří „stínový obraz“ mikroskopovaného vzorku. K jeho zviditelnění se u zdokonalených typů elektronových mikroskopů využívá stejného principu, na jakém vzniká obraz na monitoru počítače. Výsledný obraz tak může být až stotisíc krát větší než pozorovaný objekt.

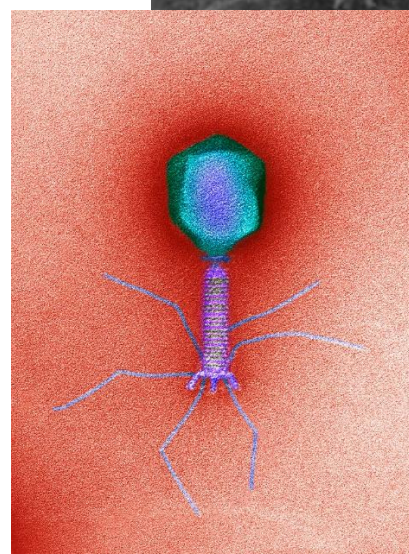
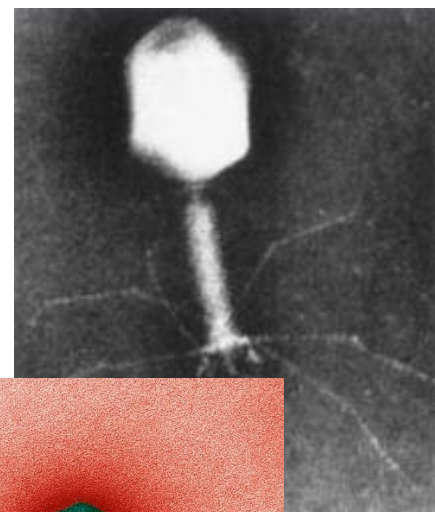


Podle způsobu zobrazování se elektronové mikroskopy dnes dělí na transmisní, emisní a odrazové (v praxi však málo používané), a na novější řádkovací (skenovací či rastrovací). Elektronový mikroskop se stal cenným nástrojem v řadě vědeckých odvětví, od mikrobiologie a medicíny až po fyziku a technologii materiálů. Díky této metodě byly s vysokou rozlišovací schopností studovány jednotlivé části buněk mikroorganismů i jevy, které v nich probíhají, stejně jako např. povrch a struktura krystalů celé řady materiálů.

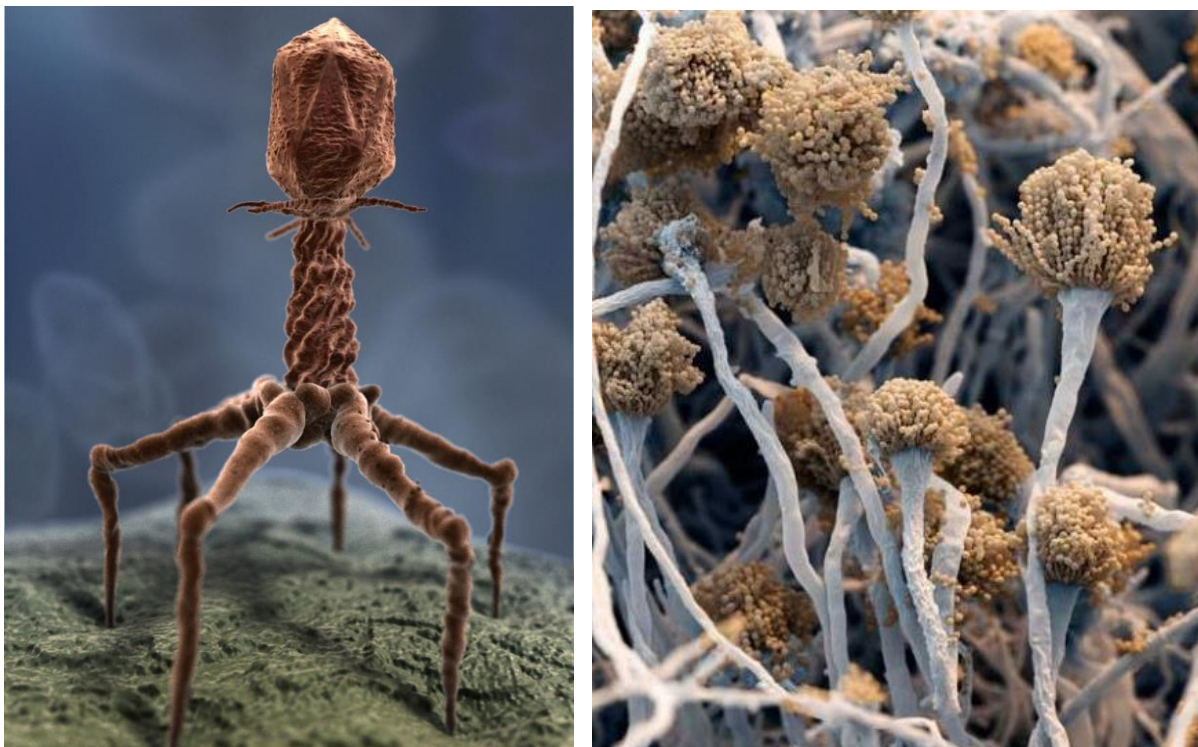
Na základě revolučních prací na poli elektronové mikroskopie vyvinuli Gerd Binnig a Heinrich Rohrer ve švýcarském výzkumném pracovišti IBM v Zurichu skenovací tunelový mikroskop (STM, z angl. *scanning tunneling microscope*). Tento přístroj, léty neustále vylepšovaný, umožnil lidskému oku nahlédnout na povrch hmoty v rozměrech nanometrů. Skenovací tunelové mikroskopie se začalo využívat nejen v mikroelektronice (například ke studiu a konstrukci polovodičů), ale především dala základ pro rozvoj nanotechnologie.

Vývoj elektronové mikroskopie ovšem nekončí. Mezi nejvýznamnější inovace patří např. atomový silový mikroskop (AFM, z angl. *atomic force microscope*) a skenovací sondový mikroskop (SPM, z angl. *scanning probe microscope*), který kombinuje metodu STM a AFM. Jednou z jeho modifikací je například chemický silový mikroskop (CFM, z angl. *chemical force microscope*), sloužící k pozorování vazeb mezi jednotlivými molekulami.

Trojice vědců Ruska, Binnig a Rohrer získala v roce 1986 Nobelovu cenu za fyziku. Polovina ceny náležela Ernestu Ruskovi „za fundamentální práce na poli elektronové optiky a za objev elektronového mikroskopu“, o druhou polovinu se rozdělili Gerd Binnig a Heinrich Rohrer „za konstrukci skenovacího tunelového mikroskopu“.



Elektronový mikroskop (vlevo), vpravo transmisní elektronová mikrofotografie a barevná transmisní elektronová mikrofotografie (TEM) bakteriofága T4 z rastrovacího mikroskopu



T4 bakteriofág (vpravo) a *Aspergillus fumigatus*, oba snímky z rastrovacího elektronového mikroskopu (SEM), zvětšeno 110000x. Bakteriofágy T4 parazitují např. v bakteriích *Escherichia coli*. Bakteriofágy nikdy nepronikají do buněk, pouze prorazí buněčnou stěnu a do hostitelské bakterie vpustí svou DNA.

## Příprava mikrobiologických preparátů

Pro pozorování vzorků mikroorganismů je třeba nejprve připravit mikroskopický preparát.

- **Nativní preparát**

umožňuje pozorovat živé mikrobiální buňky včetně jejich pohybu. Připravuje se přímo z přírodních vzorků nebo z mikrobů kultivovaných na živných půdách. Nativní preparát se připravuje na podložním skle a překrývá se krycím sklíčkem nebo se zhotovuje roztěrem na krycím sklíčku a pozoruje se ve visuté kapce.

- **Fixovaný preparát**

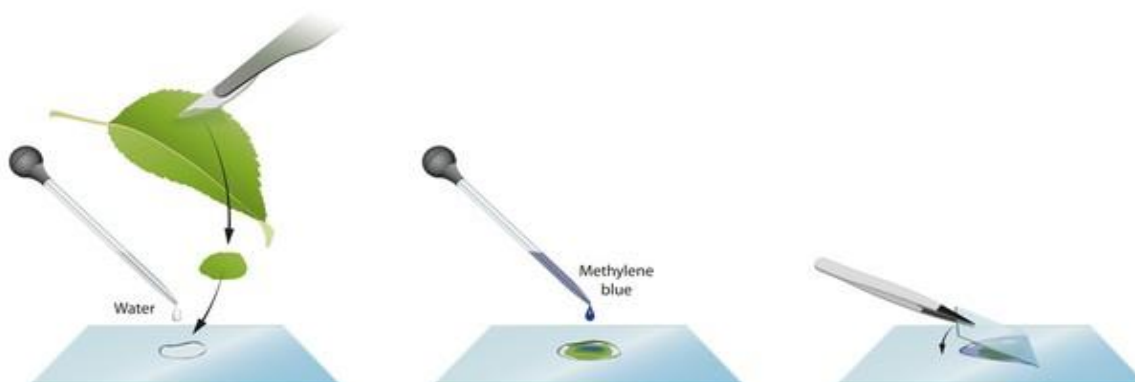
slouží k pozorování morfologie odumřelých mikroorganismů. Fixace je rychlé a šetrné usmrcení živých buněk teplem nebo fixačními roztoky. Bakteriální buňky se nejrychleji fixují teplem, kdy se sklíčko s připravenou suspenzí třikrát rychle protáhne plamenem. Mikroskopické houby a kvasinky mohou teplem měnit svůj tvar, proto je zde vhodnější použít fixaci chemickými látkami, nejčastěji organickými kyselinami (octová, pikrová), acetonem, etanolem, metanolem, formaldehydem.

- **Trvalý preparát**

se připravuje tehdy, když je nutné vzorky mikroorganismů uchovat jako srovnávací a dokladový materiál na delší dobu (několik let). Pro přípravu trvalých preparátů se používá kanadský balzám, který se nanáší v podobě tenké vrstvy mezi podložní a krycí sklíčko tak, aby vyplnil celý prostor. Takto zhotovený preparát se uchovává v suchu a temnu ve vodorovné poloze několik týdnů, než dojde k zaschnutí a vytvrzení.

## Pracovní postup při mikroskopování

1. Na začátku cvičení je třeba zkontrolovat stav mikroskopu - veškeré závady je třeba ihned nahlásit vedoucímu cvičení.
  2. Mikroskop je nutné postavit na pevné místo tak, aby jeho poloha umožňovala pohodlné pozorování a provedení nákresu. Měl by být otočen volnou stranou stolku od sebe a ramenem stativu směrem k sobě.
  3. Preparát se pokládá na stolek mikroskopu a upevňuje se svorkami křížového posuvu.
  4. Revolverovým měničem objektivů se nastaví nejvhodnější zvětšení (postupuje se od objektivu s nejmenším zvětšením).
  5. Při pozorování ze strany se makrošroubem sníží objektiv až k preparátu. Teprve pak se pozoruje preparát v okuláru za současného oddalování objektivu otáčením makrošroubu. Po zachycení obrazu se mikrošroubem jen doostří.
  6. Upraví se clona a nejvhodnější vzdálenost kondenzoru - k většímu zvětšení je třeba silnější světlo, které se upravuje kondenzorem tak, aby zorné pole bylo co nejsvětlejší. Čím více se cloní, tím je obraz ostřejší.
  7. Pro pozorování v imerzi slouží zvlášť označené imerzní objektivy (zpravidla bílým pruhem). Pozorování se provádí přímo v kapce imerzního oleje, který se nanáší na preparát, objektiv se oleje dotýká. Po skončení pozorování se musí vše pečlivě očistit benzínem či xylenem.
  8. Pozorovaný preparát se kreslí tužkou, popis preparátu se provádí perem, obrázek musí být označen názvem a musí mít zaznamenáno celkové zvětšení při pozorování (okulár x tubus).
  9. Po každé práci je třeba mikroskop přikrýt ochranným obalem a uložit jej do skříňky. Mikroskop je třeba chránit před náhlými změnami teploty, před vlhkostí, před působením chemických látek (par kyselin, rozpouštědel) a před prachem.
- Je třeba průběžně odstraňovat prach z přístroje jemným štětečkem a bavlněným hadříkem. Na optiku mikroskopu se nikdy nesahá prsty, rozebírání a čištění optiky mikroskopu provádí pravidelně pracovníci profesionální firmy.
11. Pokud se mikroskop přenáší, levou rukou se uchopí za rameno stativu a pravou rukou se podepře stativ zespodu.



Příprava nativního preparátu

## Postup práce při pozorování v imerzi

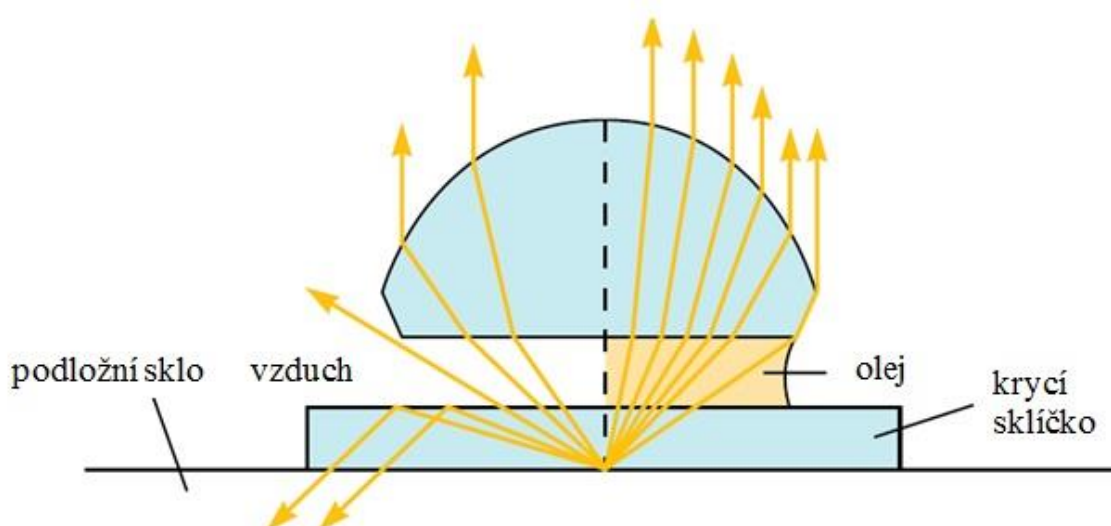
Při pozorování v imerzním objektivu se vzduch nahrazuje opticky hustším prostředím s vyšším indexem lomu světelných paprsků (světelné paprsky procházejí prostředím, které má index lomu blízký sklu preparátu: index lomu imerzního oleje  $n = 1,51$ , index lomu skla  $n = 1,52$ ). Přírodní imerzní olej se získává z cedru (*Juniperus virginia*) nebo se používá směs olejů z kanadských borovic; jako imerzní olej lze také použít čistý parafínový olej nebo glycerín.

1. Před použitím imerzního objektivu se kápne na krycí sklíčko nebo na nátěrový preparát kapka imerzního oleje. Kapku je třeba umístit do středu podložního sklíčka v poloze mezi výměnou suchého objektivu s největším zvětšením za objektiv imerzní (bílé pruhy).

2. Imerzní objektiv se ponoří do kapky imerzního oleje až se zlehka dotkne krycího skla nebo svrchní strany podložního skla preparátu. Přitom je nutné sledovat z boku pohyb tubusu a dávat pozor, aby mikroskoplo neprasklo.

3. Obvyklým způsobem se upraví zaostření otáčením makrošroubu a mikrošroubu. Je vhodné maximální osvětlení pozorovaného místa a clonění pomocí kondenzoru. Není vhodné clonit na zdroji světla, neboť se zhoršuje viditelnost preparátu.

4. Po ukončení mikroskopování je třeba objektiv i preparát pečlivě očistit od použité imerze vhodným rozpouštědlem (např. xylemem).



Průchod paprsků suchým a olejovým imerzním objektivem (upraveno podle Prescott, 2013)



EVROPSKÁ UNIE  
Evropské strukturální a investiční fondy  
Operační program Výzkum, vývoj a vzdělávání



## Téma: ZÁKLADY MIKROSKOPOVÁNÍ

Pracovní list 2

Jméno: Skupina:		Akademický rok: Datum:	
<b>Úkol: Pozorování trvalých preparátů</b>			
Materiál: trvalé preparáty mikroorganismů, základní pomůcky pro mikroskopování			
Pracovní postup: 1. Seznamte se s obsluhou mikroskopu Olympus CX31. 2. Pozorujte trvalé preparáty, pozorované objekty zakreslete.			

Vypracování:



## Otázky k opakování

## Pracovní list 2

1. Vysvětlete rozdíly mezi monokulárním a binokulárním mikroskopem:

.....  
.....  
.....

2. Co je stereomikroskop a k čemu se v laboratoři využívá?

.....  
.....

3. Jaká další přídavná zařízení může nést mikroskop?

.....  
.....

4. K pozorování byl použit objektiv se zvětšením 40x a okulár se zvětšením 15x. Vypočítejte celkové zvětšení:

.....

5. Co je numerická apertura? Jak ji zjistíme?

.....  
.....  
.....

6. Co vyjadřuje index lomu a jak souvisí s hloubkou ostrosti při pozorování?

.....  
.....  
.....

7. Proč se nesmí po použití imerzního oleje znovu použít suchý objektiv?

.....  
.....

8. Jakým způsobem se připravují preparáty pro elektronovou mikroskopii?

.....  
.....  
.....

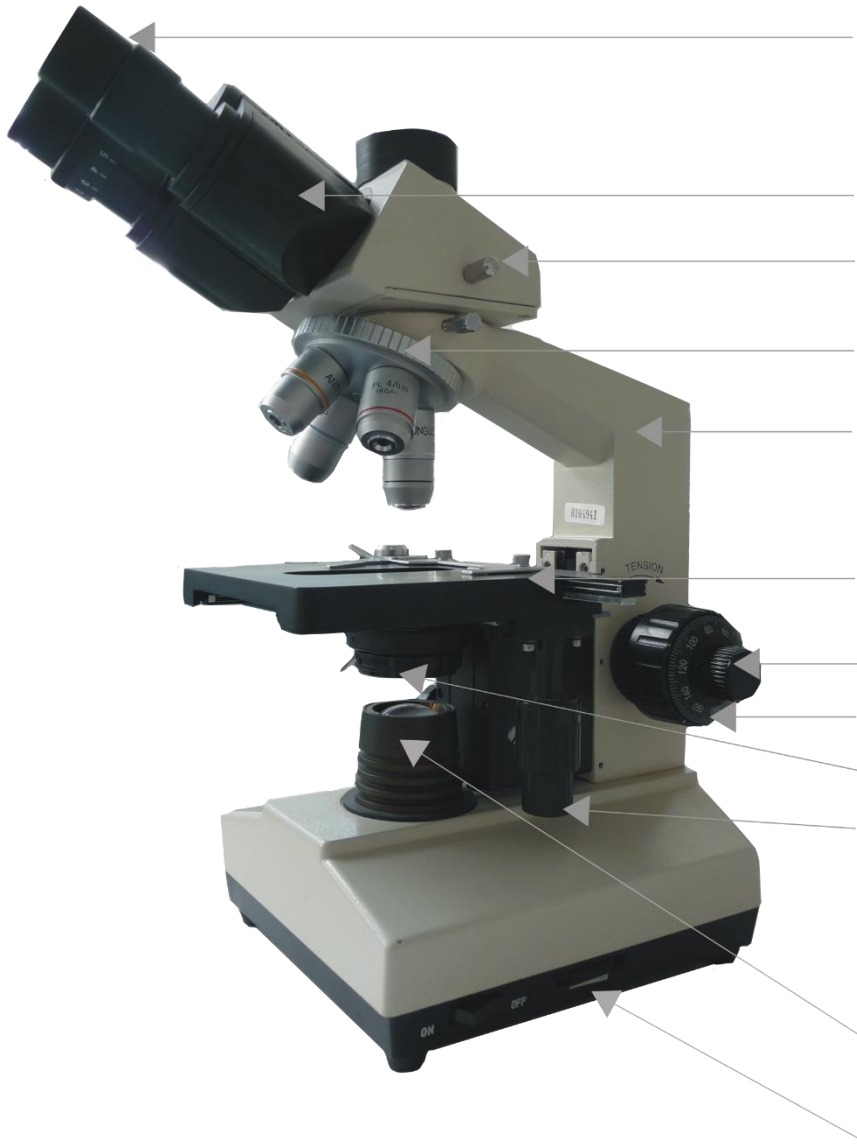
9. Uveďte alespoň 2 možnosti, lze provést fixaci preparátu:

.....  
.....  
.....

10. Co je kanadský balzám a k čemu se v mikroskopii využívá?

.....  
.....  
.....  
.....

11. Popište základní části mikroskopu:





## HODNOCENÍ HYDROBIOLOGICKÝCH VZORKŮ

Téma 3

Pro hydrobiologické sledování lokality je nesmírně důležité, aby vzorek, odebraný z této lokality, byl dostatečně reprezentativní (tj. aby obsahoval dostatečné množství organismů, i neživých součástí). Teprve na základě správně odebraného a reprezentativního vzorku může být proveden správný kvantitativní a kvalitativní hydrobiologický rozbor, vyjadřující početní zastoupení organismů, (příp. neživých součástí), včetně jejich druhového zastoupení.

### Odběr vzorků

Před provedením vlastního odběru vzorku je nutné vymezit cíle a účely, ke kterým mají zjištěné hydrobiologické výsledky sloužit. Podle toho je třeba zvolit metodiku zpracování vzorků, od které se pak odvíjí také vhodné zvolení metodiky odběru. Metody odběru vzorků jsou zaměřeny na odběry vzorků volné vody s přítomnými organismy, na odběry společenstev vodních organismů nebo na odběry vodních organismů přichycených na různých substrátech.

Postup odběru spolu s vhodnou metodou, konzervací vzorků i s jejich skladováním je souhrnně uveden v normách ČSN 75 - Vodní hospodářství: 7570 Jakost vod. Odběr vzorků. Jedná se o ČSN EN ISO 5667 (757051), kde jednotlivé části této normy řeší návody na odběry vzorků z různých typů vod včetně pokynů pro konzervaci vzorků vod a manipulaci s nimi.

Pro jednorázový odběr vzorků volné vody se používá např. Mayerova láhev, zhotovená z obyčejné láhve zatížená závažím a se zátkou upevněnou provazem k hrdlu a k tažnému lanku. Uzavřená láhev se spustí lanem do požadované hloubky, trhnutím za lanko se zátka uvolní a láhev se naplní volnou vodou. Pro odběr většího objemu vzorku jsou vhodné odběráky typu Van Dorna, konstruované jako široké plastové válce, opatřené na obou koncích gumovými víky, navzájem spojených gumou procházející vnitřkem válce. Gumová víka jsou při spuštění válce do vody fixována k uzavíracímu mechanismu. Po spuštění válce do požadované hloubky se prudkým trhnutím za uzavírací mechanismus elasticitou gumy obě víka uzavřou a ve válci je zachycen potřebný objem vzorku z lokality. Tzv. "směsný vzorek" lze získat při použití plastové hadice o průměru cca 3-5 cm, která se spustí nade dno sledované lokality a volný horní konec se uzavře zátkou. V hadici je vzorek reprezentující jednotlivé vrstvy např. na stratifikované nádrži.

Pro zachycení planktonu se používají planktonní sítě, pro odběr bentických organismů z jejich přirozených podkladů se mohou používat různé škrabáky a drapače dna. Nárostové formy organismů se mohou odebírat také pomocí různých kartáčků, stěrek a pinzet, popř. se vytváří umělé podklady, na kterých se po určité době nárostové formy organismů uchyť.

Vlastní hydrobiologický rozbor závisí nejen na kvalitě odběru vzorku, ale také na jeho skladování. Vzorky vody je nutné odebírat do předem vymytých lahví (skleněných i polyethylenových) o objemu 100 ml až 300 ml. Láhve se nikdy neplní až po okraj, vždy do dvou třetin, z důvodu přítomnosti vzduchu pod zátkou. Při transportu se odebraný materiál chrání před teplotními výkyvy za použití přenosného chladicího boxu. Vzorky se skladují v chladu, při teplotě do 4°C po dobu maximálně 24 hodin (vzorky nesmí zmrznout). Po uplynutí této doby jsou již výsledky biologických rozborů zkreslené. V případě, že není možné vzorek během 24 hodin zpracovat, je třeba vzorky fixovat Lugolovým činidlem dle Utermöhl.



Vlastní hydrobiologické hodnocení vzorku spočívá ve stanovení sestonu, který se skládá z kvantitativního stanovení biosestonu (tj. hodnocení živých organismů), z kvalitativního hodnocení biosestonu a ze stanovení abiosestonu (tj. hodnocení neživých součástí vzorku). V případě hodnocení abiosestonu se doporučuje stanovit také procento pokryvnosti abiosestonu, které se hodnotí odhadovou stupnicí.

## Kvalitativní a kvantitativní rozbor biosestonu

Pod pojmem kvalitativní a kvantitativní rozbor se v hydrobiologii rozumí zejména mikroskopické hodnocení vzorku na základě zjištění přítomnosti a počtu jedinců v 1 ml vody. V laboratořích se používají rozborů v souladu s metodikami uvedenými v normách ČSN 75 - Vodní hospodářství: 7577 Jakost vod. Biologický rozbor vod. Jedná se především o ČSN 75 7712 (stanovení biosestonu) a ČSN 75 7713 (stanovení abiosestonu).

V praxi existuje několik typů metod kvantitativního stanovení biosestonu.

Nejpoužívanější je centrifugační metoda kvantifikace biosestonu, která slouží pro rychlé provozní biologické rozborů. Přesnější než centrifugace je však metoda sedimentace. V této metodě se vzorky nejprve fixují Lugolovým roztokem dle Utermöhla a pak se nechají sedimentovat 24 hodin v sedimentačních komůrkách (malé umělohmotné válečky o různých objemech). Lugolův roztok funguje jako zatěžkávadlo, které umožňuje sedimentaci buněk. Buňky sedimentují na dno komůrky, kvantifikace pak probíhá v upraveném mikroskopu, který je přizpůsoben k zasunutí celé komůrky (pozorování se provádí na spodní části komůrky). Tato metoda, v porovnání s centrifugací, umožňuje zachycení vyššího počtu buněk organismů (mikroorganismů) v 1 ml vzorku včetně jejich přesnějšího taxonomického zařazení, protože umožňuje pracovat také při velkém zvětšení.

Kromě metod kvantitativního stanovení biosestonu založených na počítání buněk v počítacích komůrkách existují také další metody. Příkladem je metoda membránové filtrace, při které se přes filtr přefiltruje známý objem fixovaného vzorku; následně se počítají organismy zachycené přímo na filtru. Z dalších metod je to např. metoda založená na zjištění koncentrace chlorofylu-a, nebo metoda na stanovení objemové biomasy. Ukazuje se, že tato metoda je velmi přesnou metodou nejen při stanovení celkové objemové biomasy organismů, ale také koresponduje s obsahem vylučovaných metabolitů, např. toxinů v buňkách sinic.

## Kvantitativní stanovení biosestonu

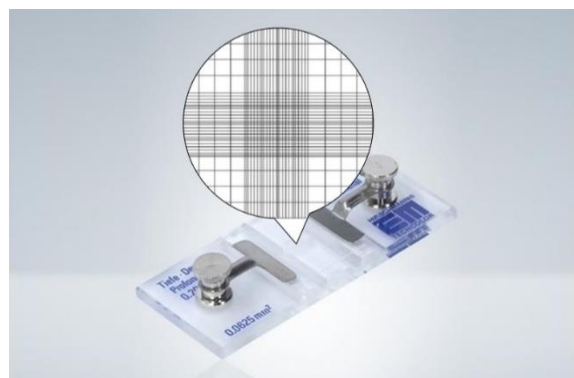
### Metoda cetrifugace

Nejběžnější a v praxi nejpoužívanější metodou kvantitativního stanovení biosestonu je metoda založená na centrifugaci.

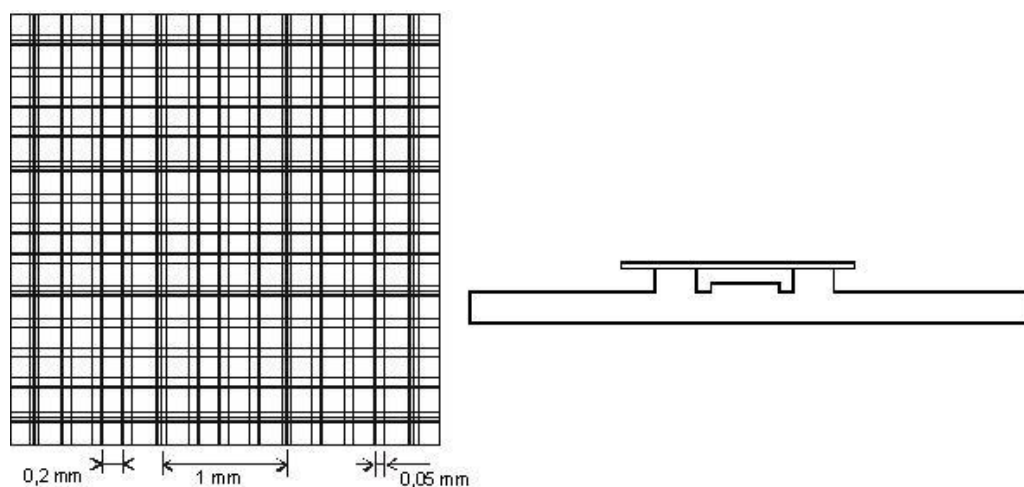
Podle platné metodiky je nejprve vzorek homogenizován (tj. obsah vody ve vzorkovnici se musí několikrát protřepat). Poté se 10 ml zhomogenizovaného vzorku vody centrifuguje při 2000 otáčkách za minutu po dobu 5 minut. (V případě biologického hodnocení podzemních vod se volí pro centrifugaci větší objemy, a to 50-100 ml). Postup centrifugace je standardizován normou ČSN pro biologický rozbor a stanovení mikroskopického obrazu. Centrifugovaný vzorek se slije, po slití vzorku se mikropipetou nebo preparační jehlou jemně promíchá zahuštěný podíl ve zkumavce a objem se upraví na 0,2 ml. Poté probíhá druhá centrifugace po dobu 1 minuty při stejných otáčkách. Zahuštěný podíl se pak přenesse ze zkumavky mikropipetou na mřížku počítací komůrky (např. typu CYRUS I).

## Práce v počítací komůrce CYRUS I

Na sklíčku počítací komůrky je vyryta mřížka, která je složená ze základních čtverců o velikosti  $250 \times 250 \mu\text{m}$  umístěných ve 40 řadách ve vodorovném i ve svislém směru (tj. celkem 1600 čtverců). Některá pole čtverců jsou ještě rozdělena pomocnými liniemi na obdélníky o velikosti  $125 \times 250 \mu\text{m}$  a čtverečky o velikosti  $125 \times 125 \mu\text{m}$ . Celá plocha komůrky odpovídá  $100 \text{ mm}^2$ , (hloubka  $0,1 \text{ mm}$  a objem  $10 \text{ mm}^3$ ). Z uvedených parametrů je odvozen i způsob vyhodnocení vyšetřené plochy počítací komůrky, viz obr. Kromě tohoto typu existuje větší množství jiných počítacích komůrek, lišících se hloubkou, tj. objemem vzorku hodnocené vody mezi krycím sklíčkem a rastrem počítací komůrky (mřížkou), a tedy také přepočítávacími koeficienty. Příkladem je komůrka Thomova, Bürkerova atd.



Počítací komůrka CYRUS I (vlevo) a Neubauerova počítací komůrka (vpravo)



Bürkerova komůrka - počítací pole a pohled z boku

Pro kvantifikaci organismů v počítací komůrce je důležité vymezení pojmu “jedinec”, kterým se rozumí v souvislosti s normou ČSN pro biologický rozbor samostatně žijící jednobuněčný či vícebuněčný organismus - buňka, kolonie, cenobium o průměrné velikosti do  $60 \mu\text{m}$  nebo vlákno do  $100 \mu\text{m}$ . Při překročení uvedených velikostí se zaznamenávají jejich násobky.

Výběr způsobu kvantifikace, tj. zda počítat buňky či jedince, se odvíjí od vlastního účelu hydrobiologického rozboru. Pro účely stanovení objemové biomasy se hodí výsledky se zaznamenanými počty buněk, pro účely stanovení saprobity vod jsou vhodné výsledky s počty jedinců.

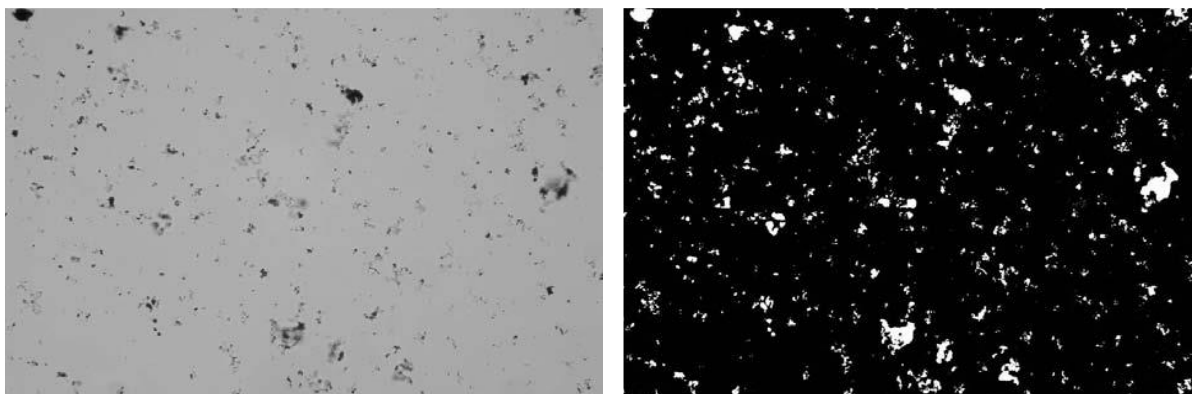
## Stanovení abiosestonu

Při mikroskopickém rozboru je velmi důležitým parametrem stanovení neživého materiálu, tzv. abiosestonu. Abioseston je tvořen částicemi organického i anorganického původu. Může obsahovat části rostlinných a živočišných tkání, částice půdy, prachu, saze, popílek, částice textilií, pylová a škrobová zrna, produkty koroze, úlomky skla, plastů i zrnka písku nebo sraženiny železa, manganu a dalších kovů. Do abiosestonu patří i prázdné schránky organismů, jejich úlomky, zbytky chitinu hmyzu, těl vířníků, korýšů, larev hmyzu, apod.

Abioseston v pitné vodě většinou pochází z rozvodného systému. Může se však do pitné vody dostat i ze surové vody nebo kontaminací během její distribuce. Abioseston má především indikační hodnotu pro analýzu vod, neboť vypovídá o zdroji znečištění, původu nežádoucí kontaminace, stavu a čistoty rozvodné sítě, apod. Pro stanovení abiosestonu ve vodách se v laboratořích v ČR používá metoda podle ČSN 75 7713. Stanovení abiosestonu se zpravidla provádí v rámci běžného stanovení biosestonu.

Kromě mikroskopického vyhodnocení jednotlivých součástí abiosestonu se provádí ještě odhad pokryvnosti zorného pole v procentech, který se provádí srovnáním s obrázkem z normy (při zv. 200x). Na srovnávacích obrázcích jsou zobrazeny případy 1 %, 3 %, 5 %, 10 %, 20 % a 40 % pokryvnosti, popř. odhadovou stupnicí, tj. 1, 2, 3, 5, 7 a 9. Takový způsob stanovení pokryvnosti odhadem je však velmi subjektivní analýza.

Ve snaze o objektivnější hodnocení lze tento subjektivní odhad pokryvnosti zorného pole nahradit použitím metody analýzy obrazu s využitím PC. Vzorek se nejprve zpracuje postupem podle ČSN 75 7713, ale místo odhadu pokryvnosti se v mikroskopu nasnímá několik zorných polí. Větší počet snímků lépe eliminuje variabilitu způsobenou velkými částicemi. Snímky se následně převedou do šedé škály (obr. níže vlevo). Následuje tzv. prahování, které představuje převod snímků do binárního obrazu. Při něm se volí hranice, podle kterých budou všechny pixely v obrázku převedeny na černé nebo bílé (obr. vpravo). Posledním krokem je automatické spočítání procentuálního zastoupení černých a bílých pixelů v binárním obrázku, což je vlastně výsledek stanovení pokryvnosti zorného pole abiosestonem.

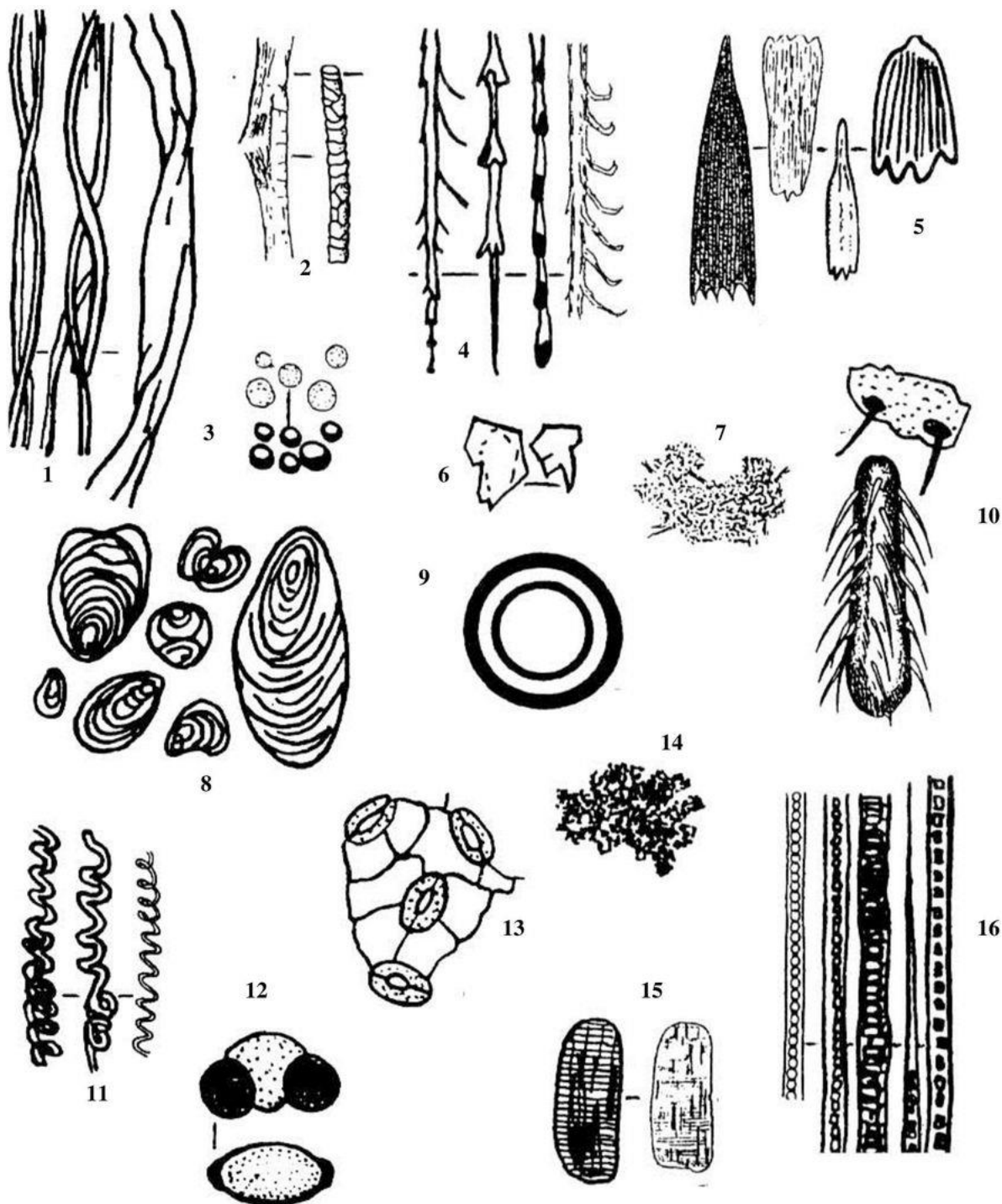


Stanovení pokryvnosti zorného pole abiosestonem pomocí analýzy obrazu. Vlevo je snímek převedený do šedé škály, vpravo binární obraz po prahování. Pokryvnost byla stanovena na 4,75 %.

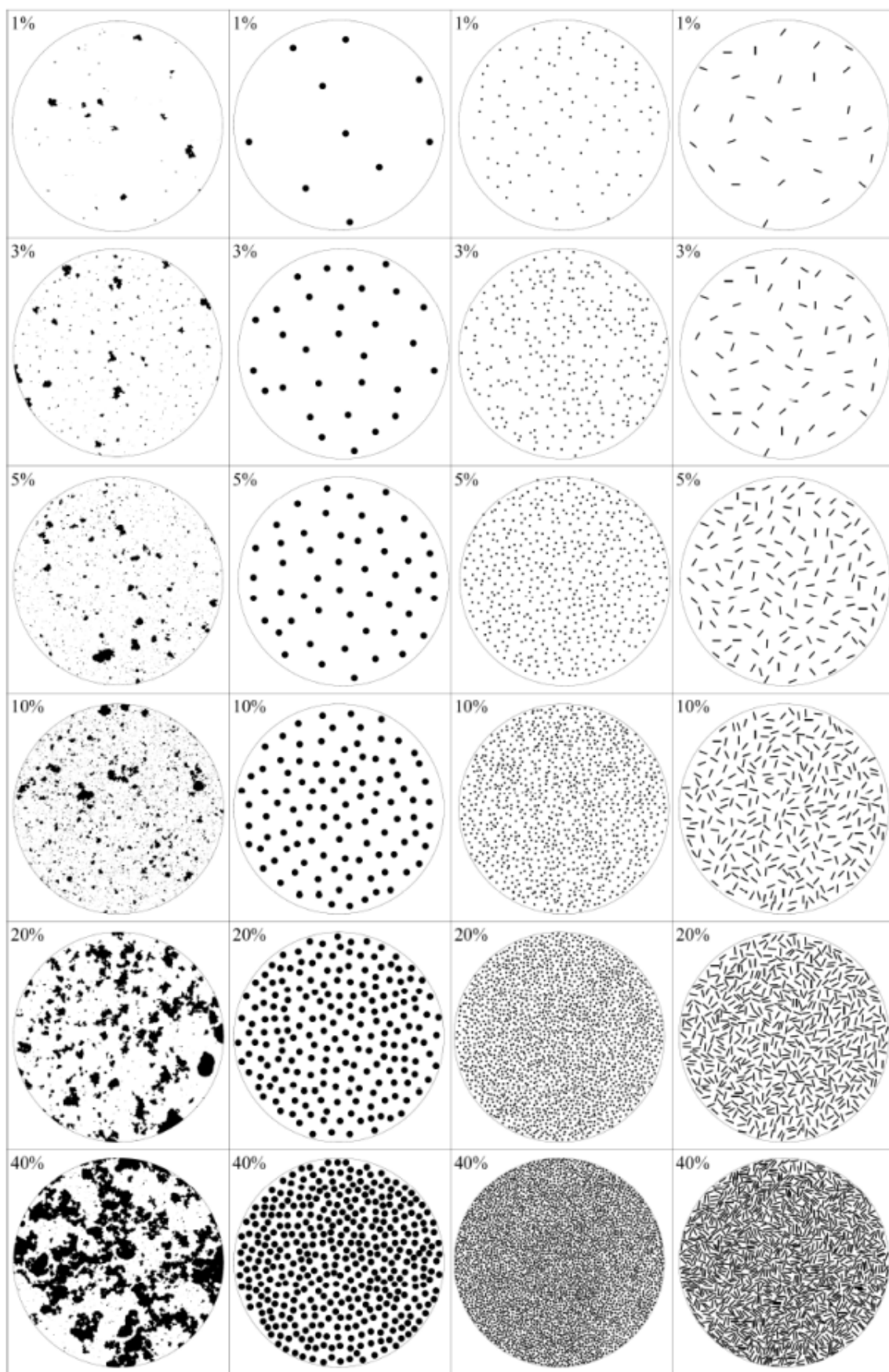
Stanovení abiosestonu analýzou obrazu má však také řadu úskalí a nevýhod. Ve srovnání s ČSN 75 7713 je nepochybně pracnější a náročnější na vybavení. Pro některé vzorky, ve kterých se vyskytují např. střípky skla nebo prázdné schránky rozsivek (průsvitné částice), může být obtížné najít hranice pro prahování. Také bývá někdy obtížné automaticky odlišit abioseston od organismů, což vadí především při jejich vyšším výskytu. Přes všechny uvedené problémy je však analýza obrazu zřejmě jedinou cestou, jak standardizovat kvantitativní stanovení abiosestonu vyjádřené jako pokryvnost zorného pole mikroskopu.

Příklady běžných částic abiosestonu ve vodách:

(1) vlákna bavlny, (2) vlákna vlny, (3) olejové krůpěje, (4) ptačí peří, (5) motýlí šupiny, (6) úštěpky křemičité horniny, (7) detritus, tj. neidentifikovatelné organické zbytky, (8) škrobová zrna brambor, (9) vzduchová bublina, (10) zbytky chitinu hmyzu, (11) vlákna rostlinného pletiva, (12) pylová zrna (zde borovice), (13) část listu s průduchy, (14) sraženina železa, (15) saze, (16) chlupy živočichů (zde potkan).



Příklady % abiosestonu na základě pokrývnosti zorného pole mikroskopu:





## Téma: MIKROSKOPICKÝ ROZBOR ABIOSESTONU

Pracovní list 3

Jméno: Skupina:		Akademický rok: Datum:	
<b>Úkol: Hodnocení abiosestonu</b>			
Materiál: vzorky vody různého původu, základní pomůcky pro mikroskopování			
Pracovní postup: 1. Odeberte malé množství vzorku, zhotovte preparát a pozorujte. Pokuste se o kvantitativní hodnocení pomocí odhadové stupnice pokrývnosti preparátu. 2. Vyhledejte částice abiosestonu a zakreslete je. 3. Pokuste se o zařazení pozorovaných částic do některé ze základních kategorií, případně o přesnější identifikaci. 4. Identifikujte možné zdroje tohoto znečištění vzhledem k původu vzorku.			

Vypracování:



**Otázky k opakování**

**Pracovní list 3**

1. Co je seston? Vysvětlete rozdíly mezi biosestonem a abiosestonem:

.....  
.....  
.....

2. Ve kterých vodách lze očekávat přítomnost pylových zrn?

.....  
.....

3. Co je saprobita vody a jak se vyjadřuje?

.....  
.....  
.....

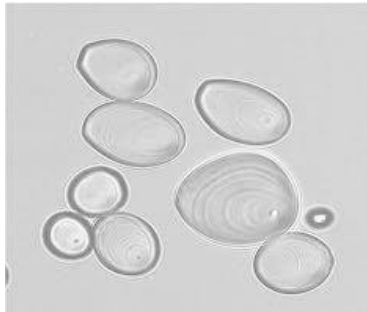
4. Vysvětlete pojem „jedinec“ z hlediska hydrobiologického rozboru vody:

.....  
.....

5. U následujících obrázků se pokuste o správné zařazení abiosestonu:



.....



.....



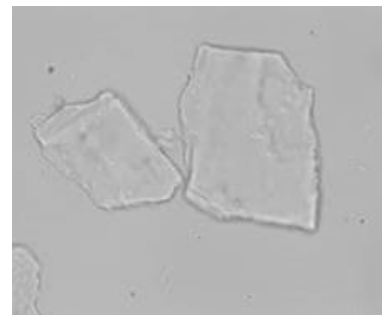
.....



.....



.....



.....

6. Sepište vybavení pro odběr hydrobiologických vzorků menšího/většího objemu v terénu:

.....  
.....  
.....  
.....

7. Co je plankton? Jak se odebírá?

.....  
.....  
.....

8. Co je bentos? Jakým způsobem se odebírají vzorky bentosu?

.....  
.....  
.....

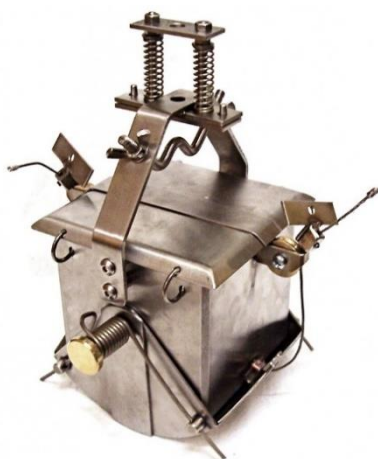
9. Popište podmínky transportu a skladování hydrobiologických vzorků:

.....  
.....  
.....

10. Jaké přístrojové vybavení potřebujete pro kvalitní analýzu biosestonu?

.....  
.....  
.....  
.....

11. Pojmenujte následující nástroje a vysvětlete, k čemu se používají:



.....  
.....  
.....  
.....





## ZÁKLADY KULTIVACE MIKROORGANISMŮ

### Téma 4

Kultivace mikroorganismů je způsob jejich pomnožení v laboratorních podmínkách na živných půdách (kultivačních médiích).

Kultivace mikroorganismů v laboratořích je úspěšná jen tehdy, jestliže se složení živného média co nejvíce přiblíží podmínkám příslušného přirozeného stanoviště a splňuje-li nutriční požadavky daného druhu mikroorganismu.

Požadavky na živiny jsou u různých mikroorganismů velmi rozdílné. Pro jejich kultivaci existuje celá řada různých médií (živných půd), které se navzájem odlišují zastoupením výživných látek.

Mezi nejvýznamnější složky živných půd pro mikroorganismy patří:

- **Uhlík (C)**

Uhlík je jedním ze základních biogenních prvků, který se do médií přidává většinou ve formě sacharidů. Při sestavování média je důležité, aby se příslušný sacharid během sterilizace nerozkládal nebo nereagoval s ostatními komponentami v médiu.

V případě, že se zvolené cukry při sterilizaci rozkládají, je nutné roztok cukrů vysterilizovat zvlášť filtrací a teprve pak jej asepticky přidat do ochlazeného média. Zdrojem uhlíku mohou být, především v přirozených půdách, také látky, které jsou současně i růstovými faktory - např. pepton, masový extrakt, kaseinový hydrolyzát; v poslední době se uplatňuje jako zdroj uhlíku také celulóza.

- **Dusík (N)**

Zdrojem dusíku může být pro mikroorganismy vzdušný dusík, dusitany, dusičnany, amonné soli nebo organicky vázaný dusík v aminokyselinách, peptidech, peptonech a nativních bílkovinách. Vzdušný dusík jsou schopny vázat jen některé mikroorganismy v procesech nitrifikace; nejvhodnějším zdrojem dusíku pro většinu heterotrofních mikroorganismů jsou amonné soli. Vhodným zdrojem dusíku je pro mnohé mikroorganismy také močovina, která se však při vyšší teplotě rozkládá, proto se musí sterilizovat filtrací.

- **Růstové faktory**

Mikroorganismy, které nemají schopnost syntetizovat růstové faktory, vyžadují jejich přítomnost v kultivačním médiu. Růstovými faktory mohou být vitamíny, aminokyseliny, purinové a pyrimidinové látky, vyšší mastné kyseliny nebo aminy.

- **Peptony**

Pepton je produkt hydrolytického štěpení molekul bílkovin působením příslušného enzymu (pepsin, trypsin, papain). Působením enzymu jsou polypeptidové řetězce natolik zkráceny, že se stávají rozpustnými ve vodě. Stupeň hydrolýzy je závislý na použitém enzymu, na čase působení i na druhu štěpené bílkoviny. Kvalitní pepton je světle žlutý, silně hygroskopický a je dobře rozpustný ve vodě. Skládá se z aminokyselin, peptidů a dalších rozpustných látek jako jsou sacharidy, vitamíny, soli apod.

- **Minerální látky**

Velmi důležitým mikroelementem v živných médiích je fosfor, jehož zdrojem jsou většinou soli kyseliny fosforečné. Nedostatek fosforu způsobuje zpomalení růstu, případně inhibici metabolických reakcí mikroorganismů.

Ve formě solí se přidávají do živných půd také další prvky specifické pro konkrétní mikroorganismy, nejčastěji hořčík, draslík, vápník, železo, zinek, měď.

- **Kultivační extrakty**

Extrakty se získávají varem substrátů ve vodě, následným odstraněním vody a jejich úpravou do práškového stavu. Jsou bohaté na nízkomolekulární proteiny a růstové faktory. Mezi základní typy používaných extraktů v mikrobiologické praxi patří:

Kvasničný extrakt (yeast extract) je průmyslově vyráběný preparát, který se získává několikanásobnou extrakcí rozmnožených kvasinek ve vodě a jejich následným šetrným vysušením. Přidává se do tekutých i pevných půd jako zdroj vitamínů či růstových látek.

Masový extrakt (beef extract) je průmyslově vyráběná hmota z libového masa, která se vyrábí několikanásobnou extrakcí. Používá se do základních půd a je velmi vhodný pro kultivaci většiny aerobních bakterií.

Sladový extrakt (malt extract) je nejčastěji kapalina sirupovité konzistence, která se získává extrakcí a následnou koncentrací ječmenného sladu ve vodě. Takto vzniklý extrakt obsahuje vysoký podíl sacharidů, dusíkatých látek i vitamínů. Přidává se zejména do živných médií pro kultivaci kvasinek a mikromycet.

Kukuřičný extrakt (corn extract) obsahuje redukující látky, kyselinu mléčnou, velké množství aminokyselin a růstových faktorů. Do vybraných živných médií se přidává k podpoře růstu mikroorganismů a ke zvýšení jejich metabolické aktivity.

Sójový extrakt (soyabean extract) se přidává se do univerzálních i selektivních kultivačních médií pro vysoký obsah škrobu, bílkovin, ale také tuků, které působí při kultivaci jako protipěnicí látka.

- **Ztužující komponenty**

Součástí tuhých půd jsou látky zajišťující gelový charakter kultivačních půd. Mezi základní typy ztužujících přísad patří:

Agar (agar-agar) je přírodní polysacharid získávaný ze stélek červených mořských řas, především z rodu *Gelidium* (rosolenka), dnes také z dalších druhů (*Gracilaria*, *Ptyllophora*, *Euchlema*, *Ceramium*). Tato látka byla původně v Malajsii používána jako želírující přísada do jídel, do mikrobiologické praxe byla zavedena v roce 1880.

Agar se prodává mletý nebo vláknitý, který je však nutné před použitím nastříhat na vlákna 10-20 mm dlouhá. Pro použití k mikrobiologickým účelům se agar nejprve pečlivě čistí od obsažených pigmentů, což se provádí několikanásobným promýváním destilovanou vodou, pak se drtí a mele na požadovanou jemnost. Podle gelujících schopností se přidává do kultivačních médií nejčastěji v koncentraci 1-3 %, buď se rozvaří přímo s půdou ve vodní lázni, nebo se rozpouští při sterilizaci (agar taje při teplotě 95-98°C a tuhne při teplotě 45-48°C). Po ztuhnutí vylučuje agarová půda tzv. kondenzační (agarovou) vodu, proto se Petriho misky s agarovou půdou ukládají po naočkování dnem vzhůru, aby kondenzační voda stékala do víčka Petriho misky a nesuspendovala kolonie mikroorganismů vyrůstajících na povrchu půdy.

Želatina je bílkovinná látka, která se získává extrakcí ze zvířecích kostí, chrupavek, šlach a kůže. Je to bezbarvá, průhledná látka s neutrální reakcí bez vůně a chuti. Rozpouští se v horké vodě, po ochlazení tuhne v gelovitou hmotu. Taje při teplotě 28-30°C, tuhne při 23°C a do živných médií se přidává zpravidla v 10-20% koncentraci. Nevýhodou je, že opakovaným zahříváním ztrácí želatina své ztužující vlastnosti, proto se v mikrobiologické praxi používá v menší míře. Některé mikroorganismy (bakterie, houby) ji rozkládají, a tím ji zkapalňují.

Gel kyseliny křemičité je ztužující látka ke kultivaci těch mikroorganismů, které nesnášejí přítomnost organických sloučenin. Přípravuje se z vodního skla a kyseliny chlorovodíkové tak, že vodní sklo se pomalu nalévá do kyseliny. Gel je pak nutné před jeho použitím důkladně promýt, aby se vyplavily zbytky kyseliny chlorovodíkové.

## Základní typy živných půd

Živné půdy ke kultivaci mikroorganismů lze rozdělit z různých hledisek - např. podle původu, konzistence, použití, a dalších.

Rozdělení živných půd podle původu:

- **Přirozené půdy**

jsou půdy organického původu, např. mléko, brambory, vejce, maso, zelenina, ovoce, krev, apod. Jejich složení často není možné přesně stanovit. Tyto půdy jsou vhodné ke krátkodobé kultivaci určitých mikroorganismů nebo k jejich izolaci z přírodních zdrojů. Pro laboratorní kultivaci mikroorganismů jsou komerčně zpracovávány a dodávány např. hydrolyzáty kaseinu, masové extrakty, kvasnicový extrakt, peptony a další látky.

- **Syntetické půdy**

jsou přesně definovanou směsí organických a anorganických sloučenin. Používají se pro studijní účely nebo ke kultivaci litotrofních mikroorganismů.

- **Polosyntetické půdy**

jsou směsí syntetických a přirozených půd, kromě anorganických sloučenin obsahují také různé přírodní složky - odvary, maceráty, výluhy nebo hydrolyzáty některých přírodních materiálů. V praxi mají největší uplatnění.

Rozdělení živných půd podle konzistence:

- **Tekuté půdy**

slouží především k pomnožení mikroorganismů, k přípravě čistých kultur, k oživení mikrobiálních kultur i k dalším účelům. Tyto půdy neobsahují žádné ztužující látky, proto jsou po celou dobu kultivace mikroorganismů tekuté. Po naočkování mikroorganismů a jejich inkubaci se tekutá půda buď zakalí, nebo se biomasa mikroorganismů usadí na dně kultivační nádoby v podobě sedimentu, případně se koncentruje při povrchu média v podobě blanky. Jednotlivé růstové typy se mohou kombinovat, např. kmen roste v zákalu a současně vytváří sediment.

V tekutých médiích jsou projevy růstu mikroorganismů málo charakteristické, a pokud je do nich naočkována směšná kultura, není možné jednotlivé mikrobiální druhy od sebe vůbec rozlišit. Kmeny téhož druhu mohou růst v tekuté půdě různým způsobem v závislosti na růstové fázi, některé kmeny rostou v tekutých půdách zcela charakteristicky.

- **Pevné (tuhé) půdy**

jsou dnes nejrozšířenějším typem médií pro laboratorní účely a vždy obsahují ztužující složku. V mikrobiologii se pro výrobu tuhých půd využívá nejčastěji želírujících vlastností červených mořských řas (ruduch); agar se pro běžné účely přidává v poměru 15-30 g na 1 litr média.

- **Polotekuté půdy**

jsou kombinací obou předchozích, mají krémovitou konzistenci, neboť obsahují nízkou koncentraci (obvykle 0,5 %) ztužujících látek.

Rozdělení živných půd podle jejich použití:

- **Univerzální (základní) nutriční půdy**

jsou běžné půdy, vhodné pro růst a množení většiny mikroorganismů, např. masopeptonový bujón a masopeptonový agar, trypton-sójový bujón a agar, různá média pod označením „nutriční“, např. média Luria Bertani, ale také např. Columbia agar, který je základem pro přípravu krevních agarů, čokoládových agarů a různých selektivních a diagnostických médií.

- **Selektivní půdy**

svým složením podporují růst jen určité skupiny mikroorganismů a růst ostatních záměrně inhibují. Jako inhibiční faktory se většinou používají různá barviva, antibiotika, žlučové soli, azid sodný a celá řada dalších látek. Např. krevní agar je vhodný pro kultivaci náročnějších mikroorganismů a pro izolaci streptokoků a stafylokoků, Sabouraud agar se využívá pro izolaci mikroskopických hub a kvasinek, Ashbyho agar pro izolaci půdních bakterií apod.

- **Diagnostické půdy**

se využívají k identifikaci jen určité skupiny mikroorganismů, neboť obsahují složky, které hledaný druh svým metabolismem specificky pozměňuje. Na základě těchto biochemických reakcí pak lze konkrétní rod či druh mikroorganismu dokonce diagnostikovat. Tyto půdy umožňují izolovat patogeny, ale také málo běžné, případně ojediněle se vyskytující druhy, a to i ve vysoce převládající indigenní mikroflóře. Např. citrátový agar se využívá k důkazu salmonel, Endova půda pro diagnostiku střevních (entero) bakterií a koliformních bakterií.

- **Selektivně-diagnostické půdy**

jsou kombinací obou předchozích typů - selektivní přísady brání v růstu nežádoucím mikroorganismům, diagnostické přísady umožňují barevná odlišení hledaných druhů. Tyto půdy jsou v praxi velmi žádané, příkladem je Wilson-Blairův agar či Slanetz-Bartleyův agar.

- **Testovací půdy**

se používají především k ověření sterility, např. Clausen medium.

## Přehled některých selektivně-diagnostických agarových půd

Dnes existuje celá řada tekutých i pevných půd přesného složení odpovídající požadavkům a nárokům jednotlivých mikroorganismů na jejich růst a množení. Komerčně se vyrábí nejen základní ingredience pro namíchání půd v laboratoři, ale také různé růstové doplňky a suplementy. Celá řada firem je dnes schopná dodávat hotové půdy konkrétního složení (zpravidla ve formě práškových směsí), případně i Petriho misky s konkrétním médiem.

Příklady některých známých agarových médií:

Ashby's agar se využívá především pro kultivaci půdních druhů bakterií, schopných využívat atmosférický dusík.

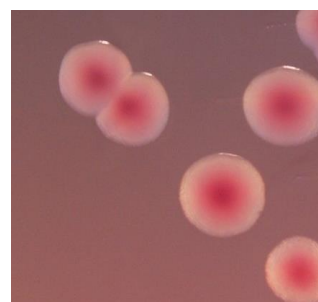
Czapkův agar (Czapek dox agar) je univerzální médium pro kultivaci vláknitých mikroskopických hub včetně kvasinek a některých půdních bakterií.

Základem půdy je směs anorganických solí (sírany, dusičnany, fosforečnany, chloridy) a sacharózy; v praxi se používá také celá řada modifikací těchto půd - např. Czapek malt agar pro detekci saprofytických druhů mikroskopických hub nebo Czapek yeast agar s příměsí kvasničného extraktu zvláště vhodný pro selektivní kultivaci hub z rodu *Aspergillus*.

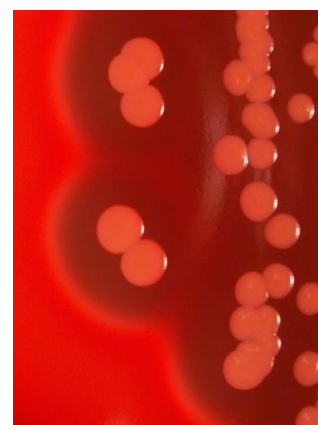


Endův agar (Endo agar) je půda pro detekci a izolaci patogenních enterobakterií a koliformních bakterií. Půda obsahuje kromě základu laktózu a bazický fuchsin, který je odbarven siřičitanem sodným.

Při růstu bakterií fermentujících laktózu dochází ke vzniku aldehydů, jejichž vlivem se mění původní růžová barva kolonií na fialovou. Bakterie, které laktózu nezkvašují, mají kolonie růžové. Barva půdy se mění také vlivem světla, proto se musí Petriho misky s touto půdou uchovávat v temnu.



Krevní agar (blood agar) je jednou nejpoužívanějších kultivačních půd, která je vhodná pro kultivaci většiny běžných lidských i zvířecích patogenních bakterií a umožňuje rozlišovat u naočkovaných bakterií různou intenzitu hemolýzy. Tento agar se vyrábí smícháním horkého agaru (80-85 °C) s 5-10 % defibrované beraní krve. Teplotou dochází k hemolýze červených krvinek a uvolnění hemoglobinu, podle míry využití barviva mikroorganismy se dají kultivované bakterie i dále určovat. Při částečném rozkladu hemoglobinu vzniká v okolí kolonií zřetelná viridace (tvorba zeleného zbarvení), v důsledku kompletního rozkladu červeného krevního barviva v okolí kolonie dochází k výraznému projasnění půdy. Krevní agar se používá k diagnostice některých významných patogenních druhů bakterií např. rodu *Neisseria* a *Haemophilus*.



V praxi se používají také jiné druhy krevních agarů, např. Fortnerův agar s přidáním králičí, hovězí, koňské i lidské krve. Zvláštním typem krevního agaru je také čokoládový agar (chocolate agar), ve kterém však hemolýza neprobíhá.

Löwenstein-Jensen agar je pevná půda pro záchyt a diagnostiku mykobakterií. Půda kromě nutričního základu obsahuje glycerin, škrob, vaječnou bílkovinu a malachitovou zeleň.

Mac Conkey agar je selektivní médium pro detekci gramnegativních bakterií zkvašujících laktózu. Obsahuje žlučové soli, které inhibují růst většiny grampozitivních bakterií a barviva, která umožňují na základě barevné změny média rozlišit bakterie fermentujících laktózu od bakterií, které ji nekvasí vlivem produktů metabolismu.



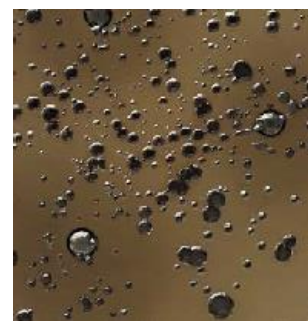
Mueller-Hinton agar se využívá pro testování citlivosti většiny patogenních bakterií k antimikrobiálním látkám; vhodné médium pro difúzní diskovou metodu.

Slanetz-Bartley agar je selektivně-diagnostická půda pro enterobakterie. Půda je chudá na živiny, protože enterokoky jsou oproti jiným bakteriím nenáročné; kolonie enterokoků mají v masivním nárůstu fialovohnědou barvu. Půda se využívá také pro detekci a stanovení počtu fekálních streptokoků z vod membránově-filtrační technikou.

Wilson-Blair agar je selektivně diagnostické médium pro izolaci a identifikaci rodu *Salmonella*, zejména pak pro patogenní druh *Salmonella typhi* z klinických vzorků.

Tato půda je poměrně náročná na přípravu, kromě agarového základu obsahuje bizmut-sulfitový roztok a brilantovou zeleň.

Salmonely lze na této půdě diagnostikovat v podobě kovově lesklých kolonií, kolem kterých se bizmut redukuje na lesklé tmavé plošky. Hotovou půdu je třeba uchovávat v temnu a měla by se spotřebovat do 5 dnů od přípravy.

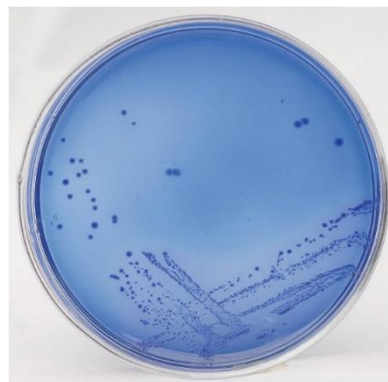




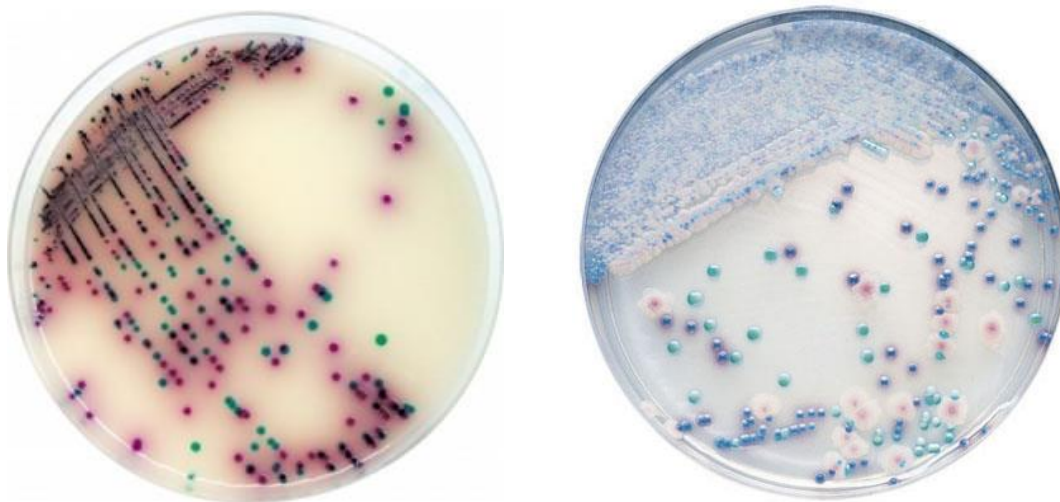
Sabouraudův agar (Sabouraud dextrose agar) je známé nutriční médium pro kultivaci mikroskopických vláknitých hub a kvasinek, které je běžně používáno k ověření mikrobiální kontaminace v potravinách, v kosmetice, ve vzorcích z klinického prostředí, atd. Základem média je mykologický pepton a dextróza; pepton je zdrojem dusíkatých sloučenin a cukr dextróza je pro rostoucí mikroorganismy základním zdrojem energie.

Další vhodnou půdou pro kultivaci hub je např. maltózový agar, bramboro-mrkvový agar, Czapkův agar a další.

China blue agar je standardní médium používané pro diferenciaci a kultivaci mléčných bakterií fermentujících laktózu. Médium obsahuje laktózu a modré barvivo (čínská modř), které je indikátorem pH. Při fermentaci laktózy bakteriemi na kyselinu mléčnou dochází ke změně barvy kolonií z bezbarvé na modrou, a tím se rozlišují bakterie fermentující laktózu od nefermentujících. Médium bylo původně vyvinuto pro indikaci přítomnosti fekálních bakterií v mléce (kontaminace vznikající např. při dojení); na této půdě dobře rostou také enterobakterie, např. *Enterococcus faecalis* nebo *Escherichia coli* (tvoří modře zbarvené kolonie).



Chromogenní média jsou moderní selektivně-diagnostické půdy k určování mikroorganismů na základě specifické barvy jejich kolonií. Obsahují patentované chromogenní substráty, což jsou bezbarvé nebo mírně barevné látky, které reagují s rostoucími mikroorganismy za vzniku výrazných barevných kolonií.



Na obr. (vlevo) lze pomocí chromogenního media (CHROMagar™ ECC) zřetelně odlišit bakterie rodu *Escherichia coli* (zelené) od ostatních enterobakterií (fialové, modré).

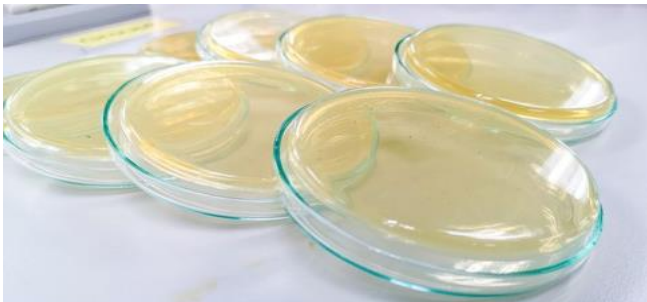
CHROMagar™ Candida (vpravo) je živné médium, které se využívá pro izolaci a identifikaci základních druhů kvasinek *Candida* z klinických vzorků: *C. albicans* (zelenomodré kolonie), *C. tropicalis* (modré kolonie) a *C. krusei* (růžové kolonie s bílou zónou)

## Některá základní kultivační média

Trypton-sójový agar (TSA) je obecně použitelné médium pro kultivaci nutričně nenáročných mikroorganismů, ale i náročnějších bakterií jako jsou bakterie rodu *Neisseria*, *Listeria* a *Brucella* a jiných. Médium lze modifikovat přidáním různých růstových komponent a faktorů, tak lze rozšířit jeho využití ke kultivaci celé řady dalších mikroorganismů.

Luria Bertani agar (LBA) je obecně použitelné médium pro rutinní kultivaci mikroorganismů, zejména pro kultivaci bakterií *Escherichia coli*.

Nutriční agar (NA) je obecně použitelné médium pro kultivaci mikroorganismů z různých prostředí. Nutriční média jsou média používaná např. pro mikrobiologické hodnocení vody včetně odpadních vod a potravin. Nutriční agar (no. 2) lze použít pro mikrobiologickou analýzu vody podle českých norem.



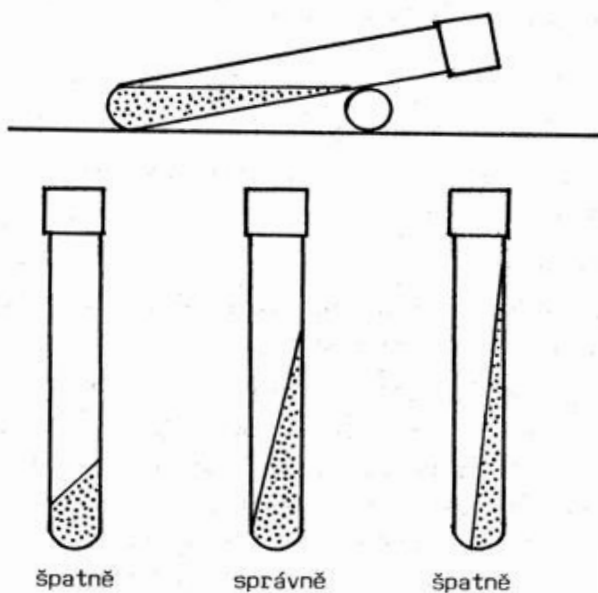
Základem půdy je masový pepton a hovězí extrakt, tyto složky poskytují potřebné sloučeniny dusíku, uhlíku, vitamínů a také stopových prvků pro růst většiny bakterií. Chlorid sodný se přidává pro osmotickou rovnováhu média.

Všechna univerzální média lze připravit také v tekuté formě (tzv. bujón) bez ztužující složky.

## Příprava kultivačních médií

Živná média se připravují buď ze základních ingrediencí daných předpisem, nebo rozpuštěním komerčně dodávaných dehydratovaných směsí. Média připravovaná laboratorně podle předem zvolené receptury jsou zvláště vhodná pro výzkumné práce, neboť umožňují provést v případě potřeby některé změny ve složení půdy či v její koncentraci.

U průmyslově vyráběných dehydratovaných médií je kromě vysoké standardnosti výhodou zpravidla jednoduchá a rychlá příprava, avšak nevýhodou je, zejména u selektivních a diagnostických půd, jejich vyšší cena.



Příprava šikmého agaru ve zkumavkách



## Téma: KULTIVAČNÍ MÉDIA

Pracovní list 4

Jméno: Skupina:		Akademický rok: Datum:	
<b>Úkol: Příprava kultivačních médií</b>			
Materiál: jednorázový sterilní materiál, kultury sinic, ZPM			
Pracovní postup: 1. Seznamte se se složením vybraných kultivačních médií. Připravte si vybraná kultivační média podle návodu a sterilizujte je. Zapište si jejich složení. 2. Sterilní zkumavky naplňte rozvařenou agarovou půdou (MPA) do ¼ jejich objemu a zazátkujte. Půdu nechejte utuhnout v šikmé poloze při sklonu přibližně 15 °C (šikmá plocha by neměla přesahovat 2/3 délky zkumavky). 3. Agarové půdy rozlévejte do sterilních Petriho misek, tloušťka agarové plotny by měla být 3-4 mm. Při nalévání MPA dodržujte zásady aseptické práce – levou rukou pootevřete Petriho misku, pravou rukou pak nalévejte půdu. Pracujte asepticky, hrdlo baňky s živnou půdou vždy sterilizujte před i po nalévání půdy v plameni kahanu (výhodné je pracovat ve dvojici). 4. Půdu v Petriho misce nechejte ztuhnout ve vodorovné poloze. 5. O sterilitě připravených půd se přesvědčíte tak, že je ponecháte 1-2 dny v termostatu při kultivační teplotě. (Pokud nedodržíte zásady aseptické práce, kontaminace se projeví nárůstem viditelných kolonií; tyto Petriho misky a zkumavky je pak nutné vyloučit z další práce) <b>6. Nezapomeňte připravené Petriho misky s půdou (plotny) vždy řádně označit!</b>			

Vypracování:





## Otázky k opakování

## Pracovní list 4

1. Živná média rozdělte podle jejich původu a využití:

.....  
.....  
.....

2. Vyjmenujte základní nutriční požadavky mikroorganismů:

.....  
.....  
.....

3. Vyjmenujte kultivační extrakty pro živná média. Proč se dodávají do živných půd?

.....  
.....  
.....

4. Uved'te příklady ztužujících komponent pro přípravu pevných půd a charakterizujte je:

.....  
.....

5. Popište způsob získávání agaru:

.....  
.....  
.....

6. Popište zásady pro správná uchovávání kultivačních médií v Petriho miskách:

.....  
.....

7. Jakou výhodu má šikmý agar oproti agaru v Petriho misce?

.....  
.....  
.....

8. Co je kontaminace? Co je její příčinou na připravené živné půdě?

.....  
.....  
.....

9. Co jsou koliformní bakterie? Uved'te jejich příklady.  
Na které kultivační půdě je lze spolehlivě diagnostikovat?

.....  
.....  
.....  
.....

10. K vybraným selektivním půdám doplňte jejich základní složku a praktické využití:

- Endův agar (Endo agar) .....  
pro kultivavaci .....
- Mléčný agar (Milk agar) .....  
pro kultivavaci .....
- Sójový agar (Soya agar) .....  
pro kultivavaci .....
- Krevní agar (Blood agar) .....  
pro kultivavaci .....
- Čokoládový agar (Chocolate agar) .....  
pro kultivavaci .....
- Citrátový agar .....  
pro kultivavaci .....
- Claubergův agar (Clauberg agar) .....  
pro kultivavaci .....

11. Uved'te příklady 5 živných půd, na kterých lze kultivovat mikroskopické houby:

.....  
.....

12. K čemu se používají testovací média?

.....

13. K jakým účelům se využívají transportní média? Uved'te příklady:

.....  
.....

14. Co jsou tzv. obohacená média a jak se připravují?

.....  
.....  
.....

15. Na stránkách výrobce kultivačních médií <https://www.himedia.cz> se blíže seznamte se sortimentem dodávaných médií.

Uved'te příklady kultivačních půd, které se v praxi využívají k laboratornímu ověřování mikrobiální kontaminace ve vzorcích vod:

.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....



## MIKROORGANISMY V PROSTŘEDÍ

### Téma 5

Mikroorganismy jsou kosmopolitní: obývají všechna okolní ekologická prostředí - půdu, vodu, vzduch, jsou přítomny i v tělech rostlin i živočichů. Řada mikroorganismů se vyskytuje také v prostředí s velmi extrémními podmínkami jako jsou ledovce, skály, horká vřídla, kyselé důlní vody, zasolené půdy; prakticky v každém typu prostředí se vyskytuje mikrobiální populace, složená z mnoha různých druhů mikroorganismů.

Populace mikroorganismů rostoucí na sterilním kultivačním médiu se nazývá mikrobiální kultura. Vydělení jednoho taxonomického druhu z takové směsi mikroorganismů se pak nazývá izolace. Kromě získání čisté kultury z přirozených materiálů se izolace používá při čištění kontaminovaných kultur, při získávání buněk požadovaných vlastností z dané kultury mikroorganismů nebo při určování nežádoucích mikroorganismů v potravinářských výrobcích, ve vodě, v půdě; lékařský nebo veterinární mikrobiolog získá izolaci ze vzorků patogenní mikroorganismy, které jsou původci hledaného onemocnění.

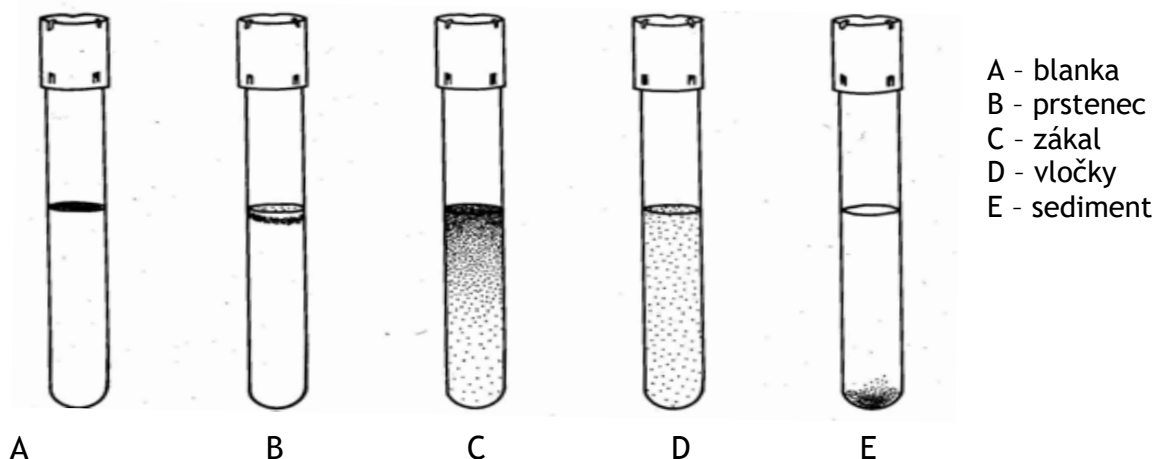
### Morfologie mikroorganismů v tekutých půdách

V tekutých médiích jsou projevy růstu u většiny mikroorganismů málo charakteristické, a pokud je do nich naočkována směs mikrobů, nelze jednotlivé mikrobiální druhy od sebe morfologicky rozlišit. Obecně platí, že tekutá půda se po naočkování a následné inkubaci buď zakalí, nebo se suspenze mikroorganismů usadí na dně kultivační nádoby v podobě sedimentu, případně se koncentruje při povrchu média v podobě blanky.

Při hodnocení růstu mikroorganismů v tekuté půdě se sleduje:

- povrch půdy – zda mikroorganismy vytvářejí blanku, která může být souvislá, vločkovitá, prstencovitá, pavučinkovitá, kožovitá nebo křehká
- zákal půdy – mikroorganismy rostou buď v souvislém difúzním zákalu, ve vločkách nebo v hrubších zrnech; rostou-li pouze v blance, může zákal úplně chybět
- sediment – pokud je vytvořen, může být zrnitý, vločkovitý, hlenovitý nebo jemně homogenní; hodnotí se také, zda je roztřepatelný či neroztřepatelný

Růst mikroorganismů v tekutém médiu:



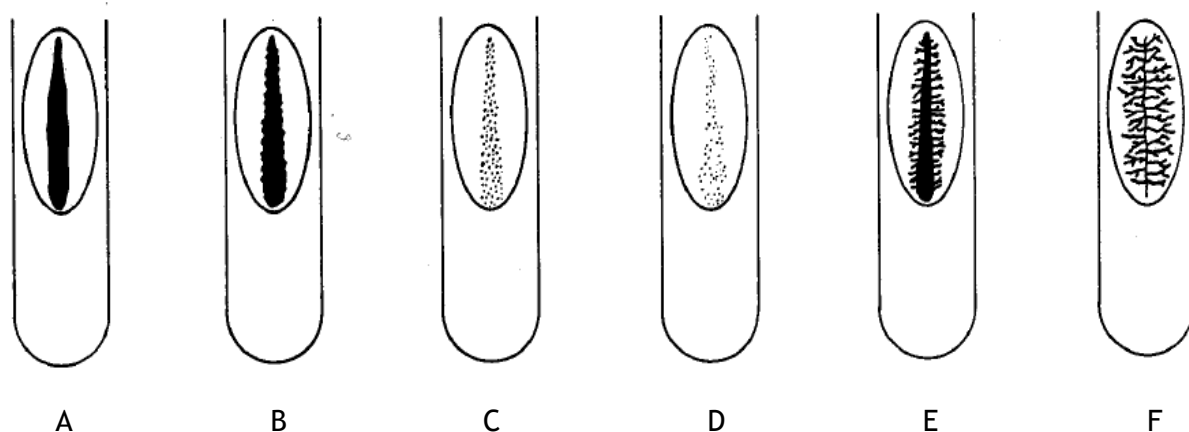
## Morfologie kolonií na tuhých půdách

Na pevné půdě se mikroorganismy mohou volně rozptýlit a rozmnožovat na místě, na kterém ulpěly. Po inkubaci vyrůstá na povrchu agarové plotny postupným dělením jediné bakteriální buňky uzavřená populace, i okem viditelná kolonie představovaná shlukem mnoha miliónů mikrobiálních buněk.

Při popisu mikrobiálních kolonií na tuhé půdě se hodnotí tyto znaky:

- velikost kolonie - měří se v mm a někdy se popisuje obecně, např. kolonie tečkovité, drobné, středně velké, velké, atd.
- tvar kolonie - hodnotí se pravidelnost tvarů
- povrch kolonie - lesklý, matný, hladký, zrnitý, krabátý, rýhovaný, zprohýbaný, drsný, pupkovitý, atd.
- okraj kolonie - rovný, vroubkovaný, laločnatý, vláknitý, krajkovitý, plstnatý, zvlněný, valovitě ztlustělý atd.
- barva kolonie - bezbarvá, čirá, zakalená, šedá, bílá, žlutá, okrová, zelená, červená, růžová, fialová, černá, jinak pigmentovaná
- konzistence - suchá, drolivá, hlenovitá, slizovitá, mazlavá, vodnatá; konzistence se zkouší vysterilizovanou bakteriologickou kličkou
- zápach - jemný, ostrý, čpavý, nasládlý, kyselý, plísňovitý, hnilobný, amoniakální, fekální, silážní, tlející atd.; často se charakteristický zápach hodnotí přirovnáním např. po droždí, po houbách, po citrónu, po česneku, apod.
- změny půdy v okolí kolonií - hodnotí se, zda barevný pigment z mikrobiální kolonie difunduje do živné půdy a mění nějak její charakter v okolí kolonie, nebo zda kolonie vrůstají (vnořují se) do kultivačního média v důsledku proteolytických reakcí do živné půdy, zda není např. na krevním agaru patrná hemolýza (úplný rozklad krevního barviva v okolí kolonie) nebo zda není patrná viridace (změna krevního barviva půdy do zelena vlivem částečného rozkladu hemoglobinu)

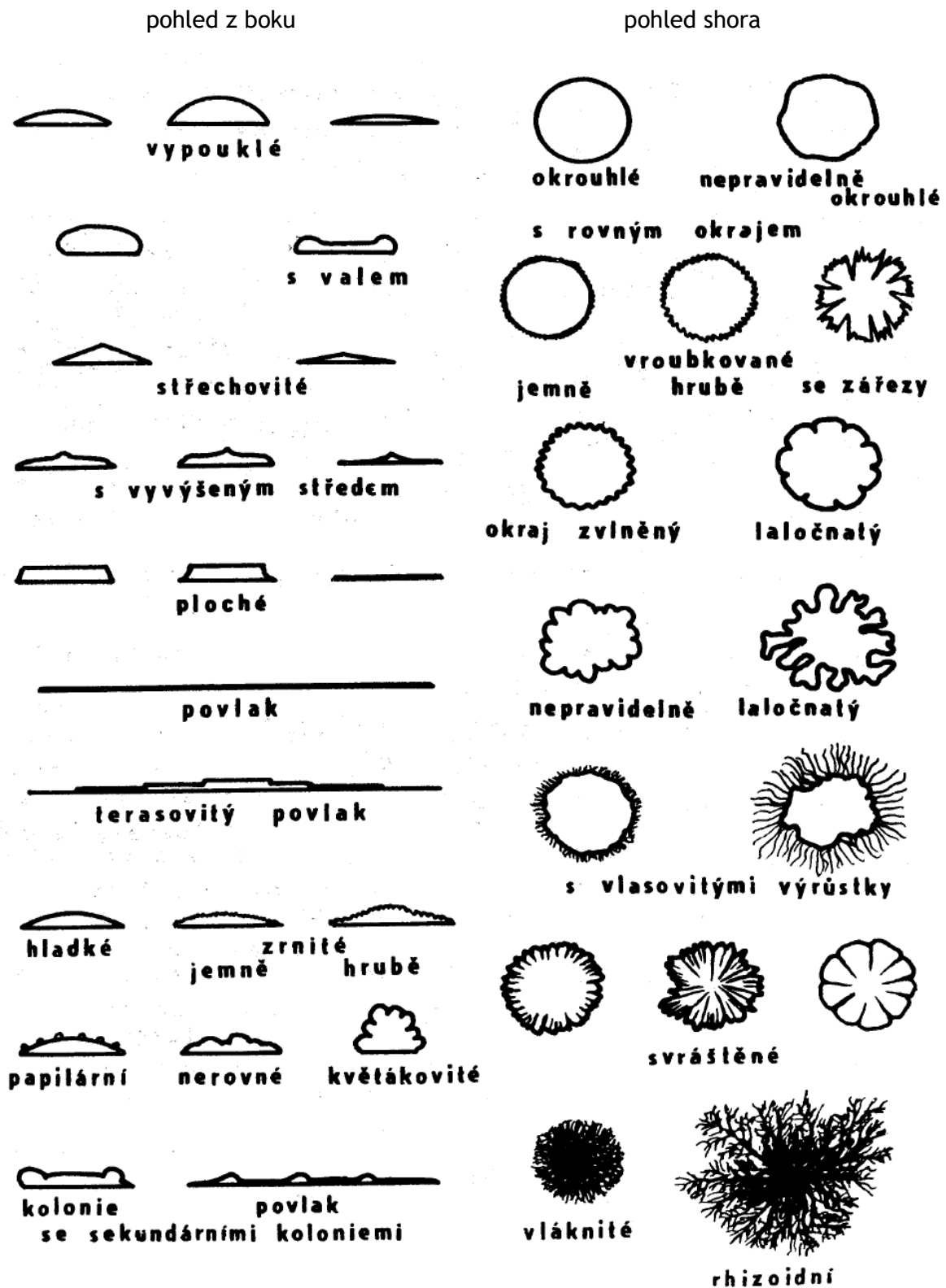
Růst mikroorganismů na šikmém agaru:



A - souvislý nárůst (s rovným okrajem)  
B - souvislý nárůst (se zvlněným okrajem)  
C - korálkovitý růst

D - rozptýlený růst  
E - péřovitý (stromovitý) růst  
F - rozvětvený růst

Morfologie kolonií mikroorganismů na agarových plotnách:





## Téma: MIKROORGANISMY V PROSTŘEDÍ

Pracovní list 5

Jméno: Skupina:		Akademický rok: Datum:	
<b>Úkol: Důkaz kosmopolitního výskytu mikroorganismů</b>			
Materiál: sterilní odběrové tampony, plotny s TSA, plotny s SDA, bakteriologická klička			
Pracovní postup:			
<ol style="list-style-type: none"><li>1. Izolace mikrobů ze špinavých rukou: na povrchu ½ agarové plotny zlehka otiskněte bříška prstů z nemyté ruky a na druhou část proveďte totéž po umytí ruky.</li><li>2. Izolace bakterií ze zubního plaku nebo jazyka, případně z dalších částí těla: sterilním tamponem zvlhčeným ve sterilní vodě proveďte stěr z povrchu zubů a přeneste jej na plotnu s TSA.</li><li>3. Izolace bakterií z povrchu různých materiálů: sterilním tamponem (suchým i zvlhčeným) proveďte stěry z povrchu pokojových rostlin, nábytku, sanitárního zařízení, podlahy v učebně a z dalšího zařízení. Stěry přeneste na plotny s TSA a SDA.</li><li>4. Izolace bakterií z prostředí školy: na sterilní půdy přeneste stěry z venkovního prostředí.</li><li>5. Izolace mikroorganismů z potravin: kličkou přeneste mikroorganismy z povrchu kazících se potravin - z ovoce, zeleniny, masa, kvasících nápojů, sýrů apod.</li><li>6. Izolace bakterií ze vzduchu: plotny nechejte 10 minut otevřené, pak je uzavřete a inkubujte.</li><li>7. Izolace mikroorganismů z půdy, vody, sněhu: malé množství půdy přeneste do 2 ml destilované vody a dobře protřepejte, pak nanášejte na plotny 0,2 ml této tekutiny, kývavými pohyby ji dobře rozprostřete po celém povrchu a nechejte chvíli difundovat, zbytek tekutiny odsajte.</li><li>8. Plotny se vzorky označte místem odběru, datem a svým jménem.</li><li>9. Plotny inkubujte 24 hod. při teplotě 20-30°C.</li><li>10. Výsledky vyhodnotte do tabulky, při hodnocení mikroorganismů si všimněte jejich původu, počtu a průměrné velikosti kolonií, tvaru a povrchu kolonií, konzistence, profilu, barvy, zápachu (při hodnocení zápachu použijte sterilní roušku).</li></ol>			

Vypracování:

Hodnocení výskytu mikroorganismů ve vzorcích z prostředí:

Původ mikroorganismu	Počet kolonií	Původ mikroorganismu	Počet kolonií

Hodnocení morfoložických znaků mikroorganismů v tekutých půdách:

Původ mikroorganismu	Barva média	Povrch média	Zákal média	Sediment

Název (původ) mikroorganismu	Původ mikroorganismu	Barva kolonie	Okraj kolonie	Profil kolonie	Poznámka



## Otázky k opakování

## Pracovní list 5

1. Kosmopolitní organismus je:

.....

2. Uveďte příklady 5 mikroorganismů s výskytem v extrémním prostředí:

.....  
.....  
.....

3. Mikrobiální kultura je:

.....  
.....

4. Kontaminovanou kulturou se rozumí:

.....  
.....

5. Proč se hodnotí morfologické znaky mikroorganismů?

.....  
.....

6. Jaké znaky se sledují při hodnocení morfologie mikrobiální kultury v tekutých médiích?

.....

7. Které další vlastnosti lze sledovat u mikroorganismů kultivovaných na pevných médiích?

.....  
.....

8. Jak se kultivují anaerobní mikroorganismy?

.....  
.....  
.....

9. Vysvětlete základní rozdíly růstu mikroorganismů v tekutých a tuhých živných půdách:

.....  
.....

10. Zhodnoťte, ve kterém ze sledovaných prostředí se mikroorganismy vyskytovaly nejvíce, a ve kterém nejméně (vycházejte z výsledků celé pracovní skupiny).  
Své výsledky zdůvodněte:

.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....





## BAKTERIE

### Téma 6

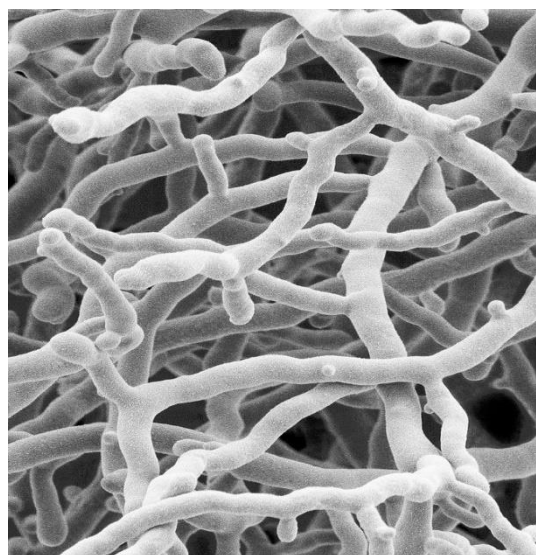
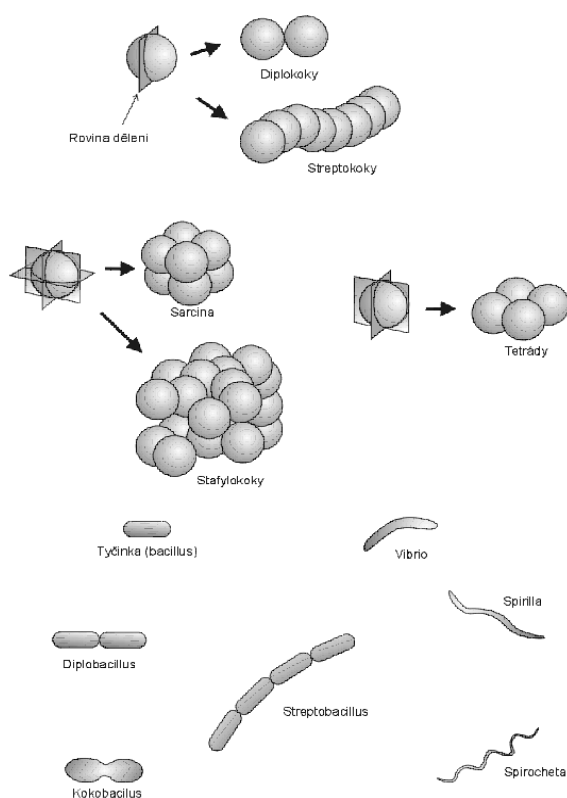
Bakterie jsou jednobuněčné kosmopolitní prokaryotní mikroorganismy, které dnes tvoří nejrozšířenější skupinu organismů na světě.

Bakterie jsou ve svých nárocích na prostředí neobyčejně přizpůsobivé - vykazují obrovskou fyziologickou diverzitu a vynikají metabolickou schopností využívat různé zdroje energie: jsou fotoautotrofní, ftoheterotrofní, chemoautotrofní, chemoheterotrofní. Bakterie se mohou vyskytovat také v prostředí bez přítomnosti kyslíku (anaerobní a fakultativně anaerobní bakterie), nepříznivé podmínky prostředí mohou některé bakterie přežívat ve formě velmi odolných klidových stadií, tzv. spor.

Bakterie mají nezastupitelný význam pro koloběh látek v prostředí, a to nejen jako symbiotické oboustranně prospěšné organismy, ale také jako významní destruenti, kteří se podílí na rozkladu mrtvé organické hmoty.

Stavba bakterií odpovídá stavbě prokaryotní buňky: na povrchu bakterií bývá slizová vrstva, kterou tvoří pouzdro - kapsula, případně ochranná vrstva - glykokalyx; pod ochrannou vrstvou je buněčná stěna a cytoplazmatická membrána, která ohraničuje vnitřní hmotu - základní cytoplazmu. Součástí buněčných povrchů mohou být také pohybové povrchové struktury, např. bičíky, fimbrie. Nejdůležitější součástí bakterií je nukleoid, který tvoří kruhovitě uzavřená makromolekula DNA, tzv. bakteriální chromozóm bez jaderné membrány. Součástí genetické výbavy bakterií mohou být i různé počty malých kruhových molekul DNA, tzv. plazmidů. Nejčastěji se bakterie rozmnožují příčným dělením a pučením.

Po rozdělení mohou bakterie zůstat ve shlucích a tvořit charakteristická seskupení.



Vlevo: Rozeznávají se bakterie kulovité (koky), bakterie tyčinkovité (bacily), bakterie zakřivené (např. vibria, spirily, spirochety) a vláknité.

Na obr. vpravo půdní vláknité bakterie rodu *Streptomyces*.

Velmi známý způsob rozdělení bakterií je podle barvicí metody, kterou objevil v roce 1884 dánský bakteriolog Hans Christian Gram. Mikroorganismy lze tímto způsobem rozdělit podle barvitelnosti jejich buněčné stěny na grampozitivní (G+) a gramnegativní (G-). Schopnost přijímat barvivo souvisí se stavbou jejich buněčné stěny: grampozitivní bakterie mají v buněčné stěně více peptidoglykanů, bráníci vyplavení barviva, proto se neodbarvují organickými rozpouštědly.

Tato metoda zůstává i dnes jednou z nejdůležitějších barvicích a diagnostických metod při základním rozdělení a taxonomickém zařazení bakterií do systému, i když uvedené rozdělení bakterií je zjednodušené. Existují bakterie, které se metodou podle Grama barví špatně nebo je touto metodou vůbec nelze nabarvit, příkladem jsou bakterie bez buněčné stěny, bakterie s jiným typem buněčné stěny nebo tzv. acidorezistentní bakterie, z nichž nejznámější jsou mykobakterie.

## Základní diagnostické barvení podle Grama

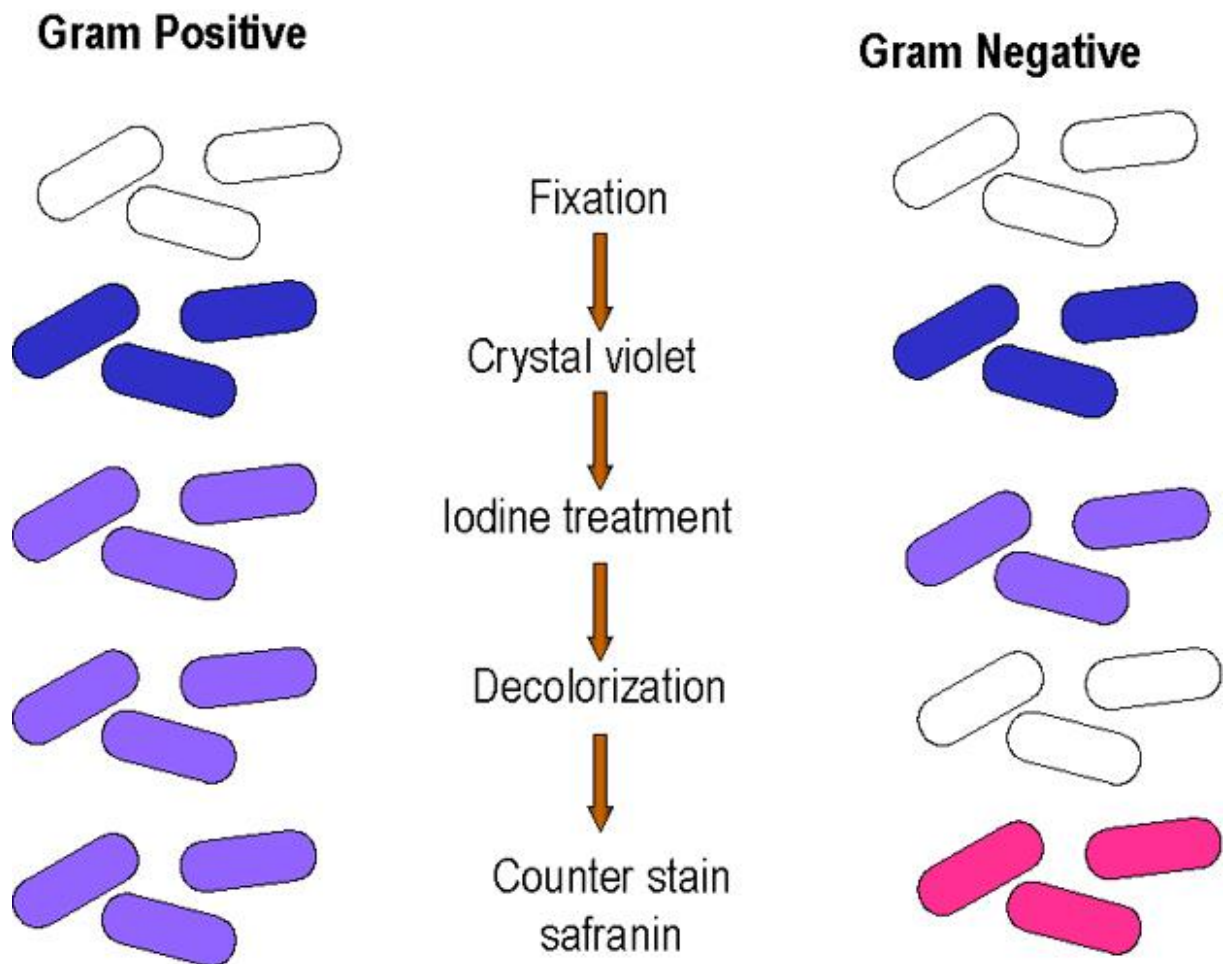
Gramova reakce je založena na reakci některých látek v buněčné stěně bakterií s určitými barvivy. Základem této barevné reakce je tloušťka a složení buněčné stěny bakterií, především přítomnost peptidoglykanu (mureinu) a kyseliny teichoové. Přítomnost kyseliny teichoové v buněčné stěně grampozitivních bakterií po obarvení krystalovou violetí a Lugolovým roztokem vytvoří pevný barevný komplex, který se dále nevymývá organickým rozpouštědlem (alkoholem nebo acetonem či jejich směsí). Buněčná stěna gramnegativních bakterií kyselinu teichovou neobsahuje, proto se zmíněný komplex nevytvoří a barviva se rozpouštědlem vymývají. Gramnegativní bakterie lze tak v další fázi opět nabarvit např. karbolfuchsinem nebo safraninem.

### Pracovní postup

1. Na podložní sklíčko se připraví sěr bakteriální kultury; vzorek se vysuší na vzduchu a fixuje rychlým protažením nad plamenem.
2. Preparát se převrství roztokem krystalové violeti a barví se 20 s.
3. Po ukončení barvení se přebytečná krystalová violet' slije a preparát se opatrně opláchně vodou.
4. Preparát se převrství Lugolovým roztokem a barví asi 1 min.
5. Po ukončení barvení se přebytečný Lugolův roztok odsaje a preparát se opatrně opláchně vodou stejným směrem.
6. Preparát se odbarvuje 96% ethanolem (nebo acetonem) 20 - 30 s; pak se oplachuje vodou tak dlouho, dokud barvivo odchází.
7. Dobarvení se provádí roztokem karbolfuchsinu nebo safraninu po dobu 1 min.
8. Po dobarvení se opět preparát opláchně a vysuší.
9. Při pozorování preparátu se hodnotí barva bakterií - grampozitivní bakterie jsou zbarveny modře až tmavě fialově, gramnegativní bakterie jsou zbarveny červeně nebo růžově, protože se odbarvily organickým rozpouštědlem a nabarvily červeným (růžovým) barvivem.

### Poznámka:

K rychlému rozlišení grampozitivních a gramnegativních bakterií lze použít také 3% KOH. Na podložní sklíčko se nanese bakteriální kultura a smíchá se s kapkou 3% roztoku KOH. Pomalým zvedáním očka bakteriologické kličky od podložního sklíčka se pozoruje, jestli se vytvoří viskózní hmota. Bakterie s pozitivním výsledkem testu jsou gramnegativní, bakterie s negativním výsledkem testu jsou grampozitivní.



#### Princip barvení podle Grama v základním přehledu:

fixace vzorku • barvení krystalovou violetí (modrofialová) • fixace jódovým roztokem (modrofialová)  
 • odbarvení vzorku organickým rozpouštědlem, např. acetonem, etanolem (G+ se neodbarví, G- se odbarví) • závěrečné barvení červeným barvivem (barví se pouze G- buňky)

### Další způsoby barvení bakterií

Pro pozorování bakterií lze použít různé další fixační a barvicí techniky.

- **Fixace preparátu**

Podstatou fixace je vysrážení buněčných koloidů, zejména bílkovin. Fixací buňky lépe přilnou ke sklíčku, nespláchnou se aplikací barviva či rozpouštědla a lépe přijímají barvivo. Při fixaci dochází k rychlému a šetrnému usmrcení živých buněk teplem nebo fixačními roztoky. Bakteriální buňky se nejrychleji fixují teplem, kdy se sklíčko s připravenou suspenzí třikrát rychle protáhne plamenem. (Preparát se fixuje až ve chvíli, kdy je nátěr suchý, aby nedošlo k zbytečnému poškození buněk teplem).

Je známo, že kvasinky a mikroskopické houby mohou teplem měnit svůj tvar, proto je u nich vhodnější používat fixaci chemickými látkami, nejčastěji organickými kyselinami (např. kyselina octová, pikrová), acetonem, etanolem, metanolem, případně formaldehydem.

Buňky se nikdy nefixují při přípravě tzv. nativního preparátu. Nativní preparát je nebarvený, a slouží ke zjištění skutečných tvarů a struktur buněk neporušených fixací a barvením. Mikroskopování nativního preparátu se využívá především při pozorování fyziologických projevů mikroorganismů - růstu, množení a pohybu bakterií. Má také význam při studiu buněčných útvarů, které se obtížně barví, např. spor. Pro pozorování bakterií v nativním preparátu se využívá speciálních mikroskopických technik, např. pozorování ve fázovém kontrastu nebo pozorování pomocí tzv. Nomarského kontrastu.

Základní barvicí metody se dělí na monochromatické (orientační), kdy se používá jediný druh barviva, a na polychromatické (diagnostické), kdy se využívá barvicích směsí, přičemž různá barviva různým způsobem barví jednotlivé druhy mikroorganismů nebo jejich struktur.

Pro pozorování morfologie buňky a charakteristických tvarů buněk bakterií stačí jednoduché nabarvení buněčné stěny (např. krystalovou violetí) bez dalšího rozlišování grampozitivního či gramnegativního typu buňky.

Diagnostická barvení představují složitější metodické postupy, které však umožňují lépe rozpoznat fyziologicky významné vlastnosti buněk, např. grampozitivitu, acidorezistenci, přítomnost pouzder, typy spor atd. Diagnostická barvení napomáhají také identifikaci bakterií, příkladem je Gramovo barvení, acidorezistentní barvení karbolfuchsinem, barvení dle Giemsky a další barvicí metody.

- **Vitální barvení**

Vitální barvení se používá např. k ověřování fyziologického stavu mikrobiálních kultur - např. ke kontrole životaschopných buněk ve vzorku. K metodě vitálního barvení se využívá některých méně toxických barviv, nejčastěji methylenová modř.

Na základě této techniky byl vyvinut tzv. vitální test, který se používá v biotechnologické praxi např. při provozní kontrole životaschopnosti kultur bakterií i kvasinek. Při této metodě živé buňky zůstávají nezbarveny, neboť prostřednictvím svých enzymů (reduktáz) metabolizují methylenovou modř na nebarevnou formu; u mrtvých buněk je produkce enzymů zastavena, a proto se dobře barví.

- **Negativní barvení**

Negativní barvení je metodou, která spočívá v obarvení pozadí, tedy plochy mezi buňkami. Buňky mikroorganismů tak zůstávají živé a nezbarvené, ale jejich obrysy výrazně vystupují z barevného pozadí. Tato metoda je vhodná např. k měření reálné velikosti buněk nebo k pozorování povrchových útvarů živých bakterií, které jinak fixací změny svůj tvar i velikost. K barvení se nejčastěji používá nigrosin či 2% Kongo-červeně.

Příkladem negativního barvení je Burriho metoda spočívající v barvení bakterií nigrosinem, který se přidává přímo do suspenze kultury na podložním skle. Vše se dobře promíchá kličkou a zhotoví se stěr; preparát se již nefixuje, nechá se volně sušit na vzduchu. Po zaschnutí se preparát pozoruje v imerzi.

Kromě negativního a vitálního barvení se preparát před nabarvením vždy fixuje. K barvení preparátů se používají zředěné vodné roztoky organických barviv. Při barvení bakterií se většinou používají bazická barviva (např. krystalová violet, metylenová modř, safranin, bazický fuchsin, malachitová zeleň).

Barvení lze zvýraznit také mořením buněk (např. fenolem, taninem), při kterém má mořidlo roli prostředníka zvyšující afinitu buňky k barvivu. K docílení lepšího barvicího účinku je možné také prodloužit dobu působení barviva nebo podpořit barvicí účinek teplotou.

Barvení bakterií je dnes pro celou řadu laboratoří rutinní záležitostí a pro konkrétní patogeny byly vyvinuty standardizované diagnostické barvicí postupy, např. Ziehl-Neelsenovo barvení, barvení podle Alberta, barvení podle Giemsky a další.



## Téma: POZOROVÁNÍ BAKTERIÍ

Pracovní list 6

Jméno: Skupina:		Akademický rok: Datum:	
<b>Úkol: Barvení bakterií</b>			
Materiál: bakteriální kultury na agarových plotnách, barviva: karbolfuchsin, krystalová violet, Lugolův roztok, safranin, nigrosin, methylenová modř, Kongo-červeň, neutrální červeň, imerzní olej, xylen, ZPM			
Pracovní postup: 1. Podložní sklíčko vyjměte pinzetou z alkoholu a sterilizujte nad plamenem. 2. Na podložní sklíčko kápněte nigrosin. 3. Kličkou odeberte malé množství zkoumané bakteriální kultury a přidejte ji do barviva, suspenzi kličkou rozmíchejte a krycím sklíčkem zhotovte stěr. Nechejte volně uschnout. 4. Po uschnutí preparát pozorujte v imerzi, zjištěné tvary bakterií zakreslete. 5. Na podložní sklíčko naneste stejnou bakteriální kulturu a zhotovte stěr, fixujte rychlým protažením v plameni kahanu. 6. Preparát barvěte metodou podle Grama a pozorujte v imerzním oleji. 7. Rozhodněte o grampozitivitě bakterií. 8. Výsledky celé skupiny zaznamenejte do tabulky, pozorované preparáty zakreslete.			

Vypracování:



## Otázky k opakování

Pracovní list 6

1. Schematicky nakreslete stavbu buněčné stěny G+ a G– bakterie. V čem je rozdílná?

2. Popište princip Gramova barvení. Co zjistíme touto metodou o bakteriích?

.....

.....

.....

.....

3. Uveďte příklady bakterií, které se nebarví podle Grama:

.....

4. Vysvětlete, proč se používá vitální barvení:

.....

.....

5. Jak lze rychle fixovat mikroskopický preparát?

.....

6. Seznamte se s principy níže uvedených diagnostických barvicích postupů. Které bakterie lze tímto způsobem nabarvit?

- Ziehl-Neelsonovo barvení .....
- Albertovo barvení .....
- Giemsovo barvení .....
- Wirtz-Conklinovo barvení .....

7. Seznamte se s tvary následujících bakterií a doplňte tabulku:

Název bakterie	Tvary buněk	G+/ G–	Název bakterie	Tvary buněk	G+/ G–
<i>Micrococcus luteus</i>			<i>Actinomyces</i> sp.		
<i>Bacillus subtilis</i>			<i>Neisseria</i> sp.		
<i>Pseudomonas</i> sp.			<i>Vibrio cholerae</i>		
<i>Escherichia coli</i>			<i>Proteus vulgaris</i>		
<i>Mycobacterium</i> sp.			<i>Borrelia</i> sp.		
<i>Clostridium</i> sp.			<i>Streptococcus</i> sp.		



## MIKROMYCETY

### Téma 7

Mikroskopické vláknité houby (mikromycety) jsou chemoorganotrofní jednobuněčné či vícebuněčné eukaryotní organismy bez obsahu chlorofylu, jejichž stáří se odhaduje na 300 milionů let. Spolu s kvasinkami a kvasinkovými mikroorganismy tvoří samostatnou skupinu hub (*Fungi*), tvořící velmi složitou systematickou skupinu organismů, jejíž zástupci vykazují značné rozdíly nejen z hlediska fylogenetického a taxonomického, ale i po stránce morfologie a ekologických nároků.

Velká morfologická rozmanitost, adaptabilita a schopnost mikroskopických hub přizpůsobit se nejruznějším ekologickým podmínkám, umožňuje jejich kosmopolitní výskyt prakticky ve všech biotopech (půda, voda, vzduch) a na různém rozkládajícím se materiálu. Půda, která poskytuje houbám vhodné podmínky pro jejich růst, tedy dostatek tepla, vlhkosti, organických látek a chrání je před slunečním zářením, je považována za jejich přirozený biotop.

Podle typu živných půd lze houby rozdělit na tyto základní skupiny:

- houby saprofytické - získávají živiny a energii z odumřelých rostlinných či živočišných organismů
- houby parazitické - získávají živiny a energii z živých těl organismů
- houby symbiotické - získávají živiny výměnou za látky, které produkují

V porovnání s pevnou půdou se mikroskopické houby v malém množství nacházejí také ve vodě; ve vodě se rozrůstají především v případě sekundárního znečištění vody např. při záplavách či pronikajícím znečištění, kdy se do vody dostává větší množství organických látek různého původu. Mikroskopické houby se nacházejí také ve vzduchu, zejména ve formě spor vlivem prašné kontaminace, nejčastěji z pevných půd.

V životním a pracovním prostředí člověka jsou přítomny také toxinogenní a patogenní mikromycety (zhruba 180 druhů), jejichž mykotoxiny patří k významným faktorům, které mohou negativně ovlivňovat zdraví člověka i chovaných zvířat. V současné době je známo přes 290 mykotoxinů. Toxikologický výzkum v oblasti hodnocení zdravotního rizika mykotoxinů na základě současných poznatků prokázal, že lidská populace je exponována mykotoxinům zejména z potravin a surovin rostlinného původu v potravinách.

Houby vyrůstají z podhoubí (mycelia), které tvoří navzájem propletená a rozrostlá vlákna hyf. Mycelium roste na živném substrátu (vzdušné mycelium) nebo do něj částečně proniká (substrátové mycelium). V životním cyklu mnoha mikroskopických hub převládá nepohlavní rozmnožování charakteristické tvorbou různě utvářených sporangioforů se spory, konidioforů s konidii nebo chlamydospor. Méně často se uplatňuje rozmnožování pohlavní, pro které je charakteristická tvorba zygospor nebo askospor.

## Kultivace mikroskopických vláknitých hub

Mikromycety se kultivují podobně jako bakterie na tuhých kultivačních médiích, mezi běžně používaná média ke kultivaci hub patří agar se sladovým extraktem (MEA), Czapkův agar (CZA), sladivový agar (MA) a Sabouraudův agar (SDA). Ke kultivaci jednotlivých skupin hub lze použít také celou řadu dalších kultivačních půd, např. bramboro-dextrózový agar (PDA), bramboro-mrkvový agar (PCA), glukózový agar s chloramfenikolem (GCA), případně další půdy s obsahem peptonu, kvasničného extraktu, maltózového extraktu i dalších organických přísad (MEYE, MSMA, YEA). Pro identifikaci zástupců půdních druhů je doporučován agar s

půdním výluhem (SEA). Všechna agarová média se sterilizují v autoklávu při 121°C po dobu 15 minut.

Složení vybraných agarových médií pro kultivaci hub:

- **Sladinový agar (Wort Beer Agar, WBA)**

Pivovarskou sladinu naředit vodou na požadovanou hodnotu stupňů cukernatosti podle Balinga (4° nebo 8°). Do 1000 ml takto získaného roztoku přidat 20 g agaru a rozvařit.

- **Maltózový agar - Agar se sladovým extraktem (Malt Extract Agar, MEA)**

Složení: sladový extrakt 20 g, glukóza 20 g, pepton 1 g, agar 15 g, destilovaná voda 1000 ml, pH 5,6.

- **Czapkův agar (Czapek Dox Agar, CZA)**

Složení: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 g, sacharóza 30 g, CZ koncentrát 10 ml, agar 15 g, Cu-Zn koncentrát 1 ml destilovaná voda 1000 ml

CZ koncentrát: NaNO<sub>3</sub> 30 g, KCl 5 g, MgSO<sub>4</sub> 5 g, FeSO<sub>4</sub> 0,1 g, destilovaná voda 100 ml

Cu-Zn koncentrát: ZnSO<sub>4</sub> 1 g, CuSO<sub>4</sub> 0,5 g, destilovaná voda 100 ml

- **Sabouraudův agar (Sabouraud Dextrose Agar, SDA)**

Složení: glukóza 40 g, pepton 10 g, agar 15 g, destilovaná voda 1000 ml

- **Agar s půdním výluhem (Soil Extract Agar, SEA)**

500 g zeminy vařit 1 hodinu v 1200 ml vody, přefiltrovat přes filtrační papír a doplnit na 1000 ml; přidat 15 g agaru, upravit pH na 6-6,5.

- **Brambora-mrkvový agar (Potato Carrot Agar, PCA)**

Složení: brambory 20 g, mrkev 20 g, agar 20 g, destilovaná voda 1000 ml + další na přidání

Brambory a mrkev nastrouhat a vařit 15 minut, přefiltrovat přes gázu, doplnit na 1000 ml a přidat agar.

- **Brambora-dextrózový agar (Potato Dextrose Agar, PDA)**

Složení: brambory 200 g, glukóza 15 g, agar 20 g, destilovaná 1000 ml

Oloupané brambory nakrájet na kostky a přilít 1 l vody, změřit objem směsi, vařit 1 hodinu. Směs rozmixovat, změřit objem směsi a doplnit vyvařenou vodu na předem změřenou hodnotu, přidat agar a dextrózu.

Po přeočkování na kultivační půdu rostou mikroskopické houby většinou ve tmě při 25 °C po dobu 3-7 dní (případně déle). Některé houby je vhodné kultivovat také při teplotách 15 °C, 37 °C, 45 °C nebo 50 °C (spory se však obvykle tvoří již při 20 °C).

Pro pozorování mikroskopických znaků významných pro identifikaci mikroskopických hub se doporučuje voda nebo roztoky s obsahem některých barviv, např. bavlníkové modři (cotton blue), případně 4% vodný roztok genciánové violeti. Při přípravě mikroskopických preparátů pro fotografování lze jako pozorovací médium použít Melzerovo činidlo, které má vysoké projasňující vlastnosti, a proto je pro fotografované preparáty velmi vhodné (Melzerův roztok - roztok jodidu draselného, jódu a chloralhydrátu).

Při manipulaci s mikroskopickými houbami je nutné plně respektovat zásady aseptické práce.



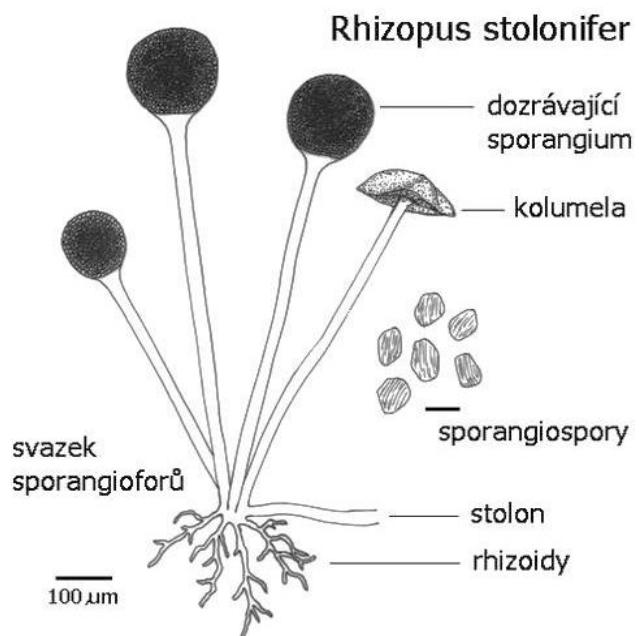
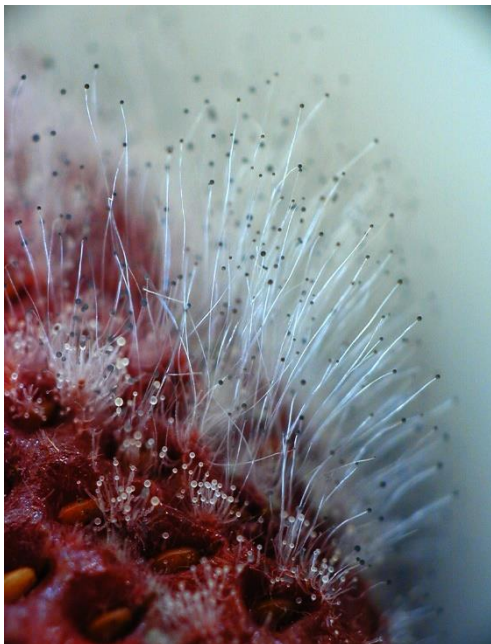
## Zygomycety

Zygomycety jsou mikroskopické vláknité houby, představující jedno ze šesti oddělení říše *Fungi*. Kmen *Zygomycota* (zejména řád *Mucorales*) obsahuje běžně rozšířené mikroskopické houby, které se hojně vyskytují v půdě, a odtud se mohou dostávat i do vody. Zástupci těchto hub jsou často označovány jako „plísňe“.

V přírodě mají významnou funkci dekompozitorů - rozkladačů organických zbytků v půdě (saprotrofní houby), často rostou na tlejících zbytcích rostlin, na hnoji, kompostu a na trusu živočichů (koprofilní houby). Někteří zástupci parazitují na hmyzu (entomopatogenní houby), na rostlinách (fytopatogenní houby), ale také na jiných houbách (mykoparazitické houby), mohou vyvolávat mykotická onemocnění u člověka i jiných obratlovců (oportunní patogenní houby).

Zygomycety patří k velmi rychle rostoucím mikroskopickým houbám, které rychle kolonizují substrát s vyšším obsahem cukrů (např. kazící se ovoce). Během krátké doby vytváří vysoké, husté, vatovité až plstnaté vzdušné mycelium světle béžových až šedých barevných odstínů. Zygomycety pronikají do substrátového mycelia rhizoidy, ze substrátového mycelia vyrůstají ve svazcích sporangiofory (výtrusorodá vlákna), nesoucí sporangia (výtrusnice) s kulovitou kolumelou, na které dozrávají spory (výtrusy).

Pohlavní rozmnožování zygomycet představuje konjugace (spájení) opačně pohlavně orientovaných vláken (+ a -), která se tvoří buď na jednom organismu (homotalické druhy) nebo na dvou různých jedincích stejného druhu (heterotalické druhy). Opačně orientovaná spájející se vlákna, která mají funkci gametangií, se začínají k sobě přibližovat, (někdy konec gametangií výrazně zduřuje a nazývá se suspensor). Ke konjugaci dochází při dotyku obou vláken, jejich buněčná stěna se rozpouští a dochází k splnutí obsahu obou vláken. Tak vzniká diploidní pohlavní zygospora, jejíž buněčná stěna postupně zpevňuje, inkrustuje a je výrazně tmavší než okolní mycelium. Zygospora je pohlavní spora, při jejím klíčení dochází k redukčnímu dělení, takže sporangiofor vyrůstající ze zygoty je opět haploidní (nepohlavní).



Zygomyceta *Rhizopus* sp. na povrchu jahody (vlevo), stavba *Rhizopus stolonifer* (vpravo). U zygomycet vyrůstají sporangiofory ve svazcích na vláknkách mycelia (stolony), v živném substrátu houba prorůstá nápadně rozvětvenými rhizoidy.

## Konidiální (mitospórické) houby

Významnou skupinou hub, které se mohou vyskytovat také jako kontaminanty vod, jsou konidiální (mitospórické houby). Jejich název je odvozen ze způsobu rozmnožování, který se děje pomocí konidií - nepohlavních spor, které uzrávají na konci hyf. Tyto houby tvoří převážně telemorfu, tedy nepohlavní stádium, jen u některých zástupců je známa také anamorfa - stadium pohlavní. Tato anamorfa, pokud je známa, je systematicky řazená nejčastěji do kmene Ascomycota (vřeckovýtrusé houby), případně do kmene Basidiomycota (stopkovýtrusé houby).

Vzhledem k tomu, že u většiny zástupců této skupiny není známo pohlavní stadium, byly dříve tyto houby označovány také jako houby nedokonalé (Deuteromycota, Fungi imperfecti). Tato umělá systematická skupina byla vytvořena pro houby, které nebylo dříve možné zařadit do žádného ze známých oddělení hub, protože klasická mykologická taxonomie byla založena především na pohlavních znacích, které u Deuteromycota chybí (výtrusy - spory těchto hub vznikají výhradně nepohlavní cestou). Tato uměle vytvořená skupina hub se však dnes už v moderní taxonomii hub téměř nepoužívá.

Jako houby mitospórické je dnes označováno asi 25 000 druhů hub, ale jejich počet díky moderním reklasifikačním metodám rychle klesá. Většina známých konidiálních hub je z oddělení Ascomycota (vřeckovýtrusé houby); mezi nejznámější patří např. zástupci z rodu Atenaria, Aspergillus, Cladosporium, Stachybotrys, Penicillium, Phoma.

### Rod *Penicillium*

Příslušníci rodu *Penicillium* patří k nejrozšířenějším mikroskopickým houbám teplého a mírného klimatu. Jejich spory jsou prakticky všudypřítomné, a proto jsou tyto plísně také velmi častými kontaminanty potravin, životního i pracovního prostředí člověka. V běžných podmínkách vytváří tyto houby zelenošedé či modrozelené povlaky, které se drží na povrchu zasaženého místa. Objevují se nejčastěji na pečivu, marmeládách, kompotech, ovocných štávách a citrusech, ale mohou růst i na vodou poškozených či vlhkých budovách, tapetách nebo kobercích.

Český název pro tento rod - štetičkovec vznikl tím, že tvar konidioforu připomínal našim botanikům štetec.

Do rodu *Penicillium* jsou řazeny také jedlé mikroskopické houby, s jejichž pomocí jsou vyráběny chuťově výrazné sýry zn. Roquefort, Camembert i Niva. Dnes je již známo, že se jedná o zástupce řádu Eurotiales (plesnivkotvaré), patřícího do vřeckovýtrusých hub třídy Eurotiomycetes.

### Rod *Aspergillus*

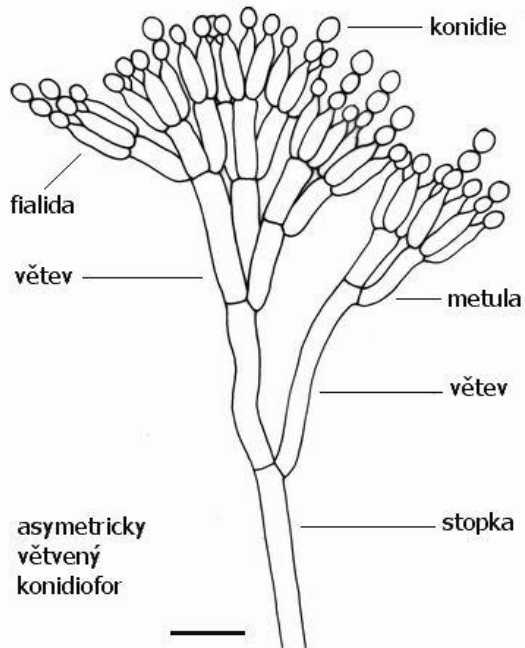
Také houby z rodu *Aspergillus* patří mezi časté v našem životním prostředí. V současnosti je popsáno přibližně 150 druhů těchto hub, které jsou známými kontaminanty vlhkých míst i vod. Někteří zástupci jsou patogenní: u člověka mohou vyvolat intoxikaci, infekce i alergie. Podobně jako mnohé další mikromycety, také aspergily jsou dnes významnými původci nosokomiálních nákaz a jejich nebezpečnost vzrůstá.

Rod *Aspergillus* zahrnuje poměrně rychle rostoucí mikromycety. Jejich kolonie produkují různé pigmenty, které dobře difundují do agaru. Na koncích vláken vzdušného mycelia dozrávají konidiofory, jejichž tvar připomíná kropenku na konvičce, odtud pochází český název kropidlák. Nepohlavní spory - konidie jsou nejčastěji kulovitěho tvaru.

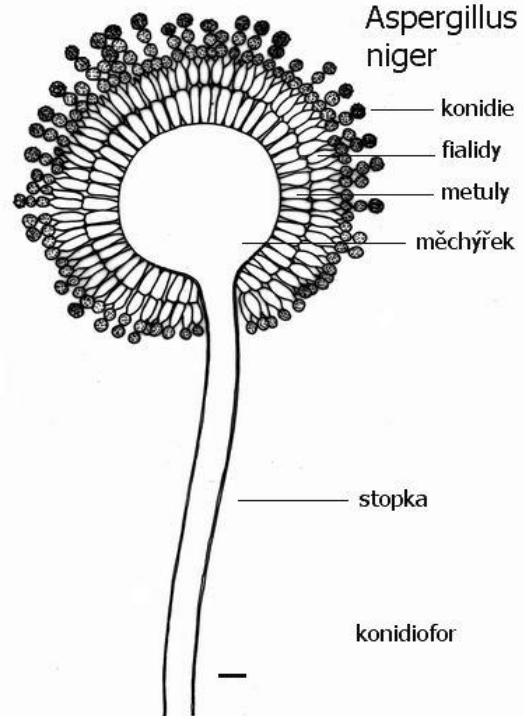
Zástupci tohoto rodu jsou známými producenty celé řady sekundárních metabolitů, z nichž zejména mykotoxiny jsou často karcinogenní. Některé druhy jsou pro svou zvýšenou produkci organických kyselin prakticky využívány v moderních biotechnologických provozech.

Příklady morfologie konidiálních hub:

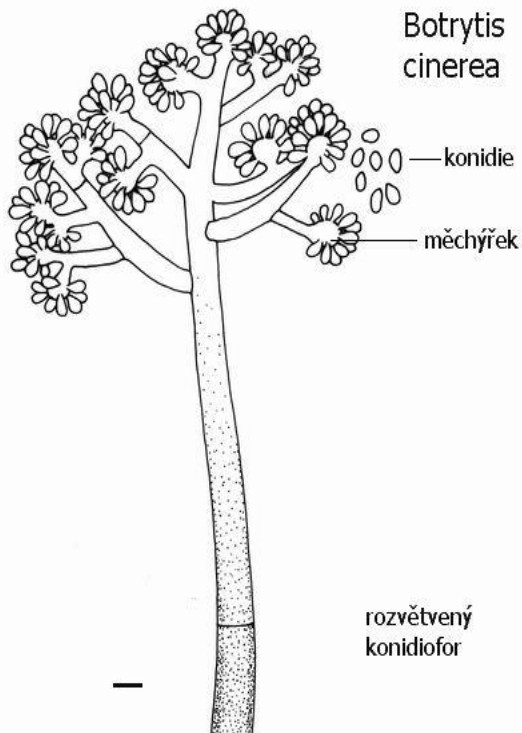
*Penicillium chrysogenum*



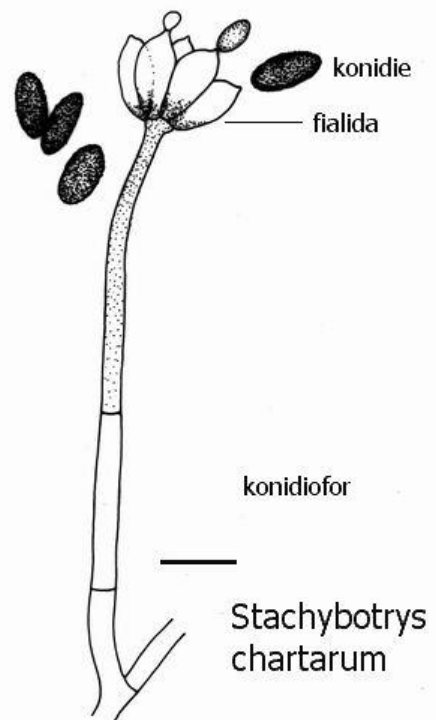
*Aspergillus niger*



*Botrytis cinerea*



*Stachybotrys chartarum*



Stélku konidiálních hub tvoří mycelium, ze kterého vyrůstají rozvětvené konidiofory (hyfy), na jejichž větvích (sporokladiu) vyrůstají sporogenní buňky (fialidy), ze kterých se odškrucují spory - konidie.



## Téma: MIKROSKOPICKÉ HOUBY

Pracovní list 7

Jméno: Skupina:		Akademický rok: Datum:	
<b>Úkol: Pozorování mikroskopických hub</b>			
Materiál: Mikroskopické houby různých rodů, ZPM			
Pracovní postup: 1. Připravte si nativní preparát z mikroskopických vláknitých hub a kvasinek a pozorujte. 2. Zakreslete stavbu stélky mikroskopických hub a popište ji.			

Vypracování:



## Otázky k opakování

Pracovní list 7

1. Vysvětlete následující pojmy: (<https://www.natur.cuni.cz/biologie/botanika/veda-a-vyzkum/atlas-zygomycetu/terminologicky-slovnicek>)

substrátové mycelium	.....
vzdušné mycelium	.....
teleomorfa	.....
anamorfa	.....
endospory	.....
hyfa	.....
kolumela	.....
konidie	.....
konjugace	.....
spora	.....
sporangiofor	.....
sporangium	.....
stolon	.....
dimorfie	.....
karyogamie	.....
vezikula	.....
zygospora	.....

2. Uved'te příklady médií, které se používají ke kultivaci mikroskopických hub:

.....  
.....

3. Seznamte se s mikroorganismy, které jsou uchovávány ve Sběrce kultur hub (CCF) Katedry botaniky PřF Univerzity Karlovy v Praze. Kolik kmenů mikroskopických hub sbírka uchovává? O jaké skupiny hub se jedná?

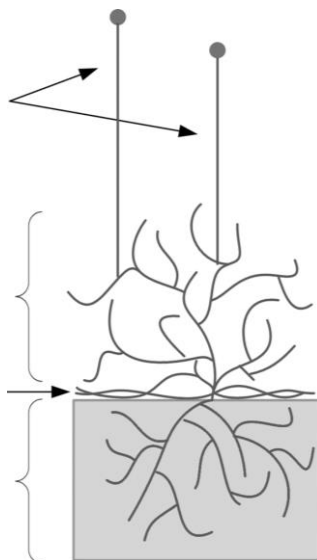
<https://edit.natur.cuni.cz/biologie/botanika/struktura/sbirka-kultur-hub-ccf>

.....  
.....  
.....

4. Popište podmínky, za jakých se uchovávají kmeny mikromycet ve sbírce. Jak často je nutné provádět jejich přeočkování?

.....  
.....  
.....

5. Popište obecnou stavbu stélky mikroskopické houby:



6. Seznamte se se základními typy mykotoxinů mikromycet. Které z mykotoxinů produkují mikroskopické houby rodu *Aspergillus*?

<http://www.biotox.cz/toxikon/mikromycety/obsah.php>

.....  
.....  
.....  
.....

7. Kvasné procesy jsou vyvolány enzymatickou činností mikroskopických hub - kvasinek. Popište základní typy kvašení a uveďte příklady kvasných mikroorganismů:

- Octové kvašení .....  
Mléčné kvašení .....  
Alkoholové kvašení .....  
Máslé kvašení .....

8. Uveďte příklady mikroskopických hub využívaných v potravinářském průmyslu:

- užitečné .....  
.....  
kontaminující .....  
.....

9. Mikromycety mohou vyvolávat alergické reakce i oportunní onemocnění. Uveďte příklady patogenních hub vyvolávajících onemocnění kůže člověka:

.....  
.....  
.....  
.....

10. Vysvětlete úlohu mikroskopických hub v procesech biokoroze a biodeteriorace:

.....  
.....  
.....  
.....



## SINICE A ŘASY

### Téma 8

Sinice a řasy jsou převážně mikroskopické, autotrofní a kosmopolitní organismy. Sinice mají prokaryotickou stavbu buňky a neobsahují žádné buněčné organely ohraničené membránami, řasy se vyznačují eukaryotickou stavbou buňky.

Řasy a sinice jsou fotoautotrofní, jsou vybaveny fotosyntetickými barvivy, která jim umožňují vytvářet organické látky a kyslík z látek anorganických za využití fotonů. Z pohledu ekologie jsou primárními producenty zejména vodních a mokřadních ekosystémů. Některé druhy řas jsou schopny také smíšené (mixotrofní) výživy, kromě anorganických zdrojů dovedou za určitých okolností také přijímat organické látky z okolního prostředí. Příkladem jsou někteří bičíkovci (krásnoočka, obrněnky), kteří mohou pohlcovat drobné bakterie (fagocytóza) a živit se heterotrofně, proto bývají často řazeni do rostlinného i živočišného systému organismů.

Většina sladkovodních sinic a řas má mikroskopické rozměry, jsou viditelné pouze v seskupení kolonií. Stejně jako velikostí, liší se jednotlivé typy těchto organismů také svým zbarvením. Kromě chlorofylů - základních fotosyntetických barviv, bývá charakteristickým barvivem sinic fykocyanin, a proto má většina sinic modrozelenou barvu. Řasy obsahují celou škálu dalších barviv - např. fykoerytrin, fukoxantin, diatoxantin, karotenoidy, xantofyly; tato doplňková fotosyntetická barviva způsobují výsledná zbarvení řas od žlutých odstínů až po červené, modré, fialové či hnědé.

Základní charakteristiky hlavních skupin sinic a řas:

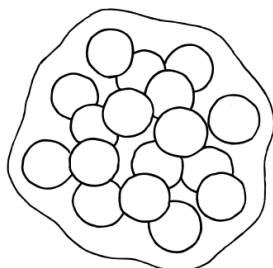
Taxonomická skupina	Důležitá barviva	Zásobní látky	Organizační stupeň stélky
<i>Cyanophyta</i>	chlorofyly a, b, c, d fykocyanin, fykoerytrin	sinicový škrob volutin	monadoidní, kokální, trichální
<i>Rhodophyta</i>	chlorofyly a, d fykoerytrin, fykocyanin	florideový škrob oleje	trichální pletivná
<i>Dinophyta</i>	chlorofyly a, c karotenoidy, xantofyly	škrob volutin	kokální, rhizopodální, trichální
<i>Cryptophyta</i>	chlorofyly a, c fykocyanin, fykoerytrin	škrob	monadoidní
<i>Chromophyta</i>	chlorofyly a, c fukoxantin, xantofyly	chryzolaminarin oleje	monadoidní, rhizopodální, trichální
<i>Chlorophyta</i>	chlorofyly a, b	škrob	všechny typy
<i>Euglenophyta</i>	chlorofyly a, b	paramylon	monadoidní

Sinice tvoří nejčastěji kokální, kapsální nebo trichální (vláknitý) organizační stupeň stélky. Kokální sinice se vyskytují buď samostatně nebo se seskupují v pravidelných nebo nepravidelných koloniích. Trichální sinice tvoří jednoduchá nerozvětvená vlákna nebo vlákna rozvětvená.

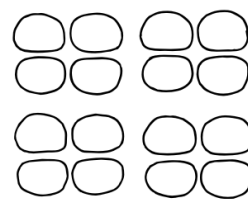
Příklady stélek sinic:



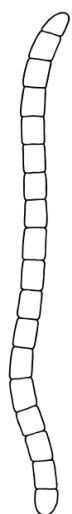
kokální  
(*Synechocystis*)



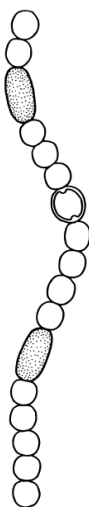
nepravidelné  
kolonie  
(*Apahanocapsa*)



pravidelné  
kolonie  
(*Merismopedia*)



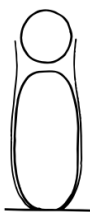
jednoduché  
vlákno  
(*Phormidium*)



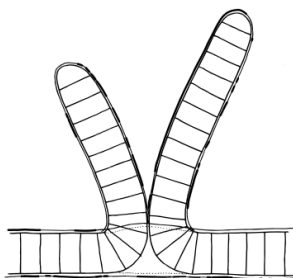
izopolární  
vlákno  
(*Anabaena*)



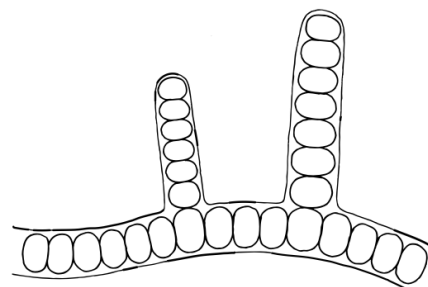
heteropolární  
vlákno  
(*Rivularia*)



přisedlá  
(*Chamaesiphon*)



nepravě větvené  
vlákno  
(*Scytonema*)



pravě větvené  
vlákno  
(*Stigonema*)



Základní vývojové stupně stélky sinic a řas:

- **Monadoidní stélka (bičíkatá)**
  - jednobuněčná, jednojaderná stélka, zpravidla kapkovitého tvaru, se zúženým předním koncem s bičíky a zaobleným zadním koncem. Dalšími znaky této stélky jsou: světločivá skvrna (stigma) a pulzující vakuoly, které vyrovnávají koncentrační spád mezi buňkou a prostředím. Vyskytuje se především u krásnooček a zelenivek.
- **Rhizopodová stélka (měňavkovitá)**
  - jednobuněčná, jednojaderná stélka proměnlivého tvaru, která se pohybuje pomocí panožek (pseudopodií).
- **Kapsální stélka**
  - jednobuněčná stélka ve slizu, která může mít zachovány některé znaky bičíkovců, např. pulzující vakuoly, stigma a bičíkům podobné, ale nepohyblivé útvary (pseudocilie).
- **Kokální stélka (kulovitá)**
  - jednobuněčná, nejčastěji jednojaderná, nepohyblivá stélka, která se pohybuje zpravidla pouze pasivně. Její jednotlivé buňky se mohou seskupovat v kolonie nebo cenobia. Tento typ stélky je charakteristický např. pro rozsivky či zelenivky.
- **Trichální stélka (vláknitá)**
  - mnohobuněčná stélka, tvořená většinou z jednojaderných buněk, které jsou spojeny v nevětvená nebo jednoduše větvená vlákna.
- **Sifonokladální stélka (heterotrichální)**
  - mnohobuněčná, vláknitá a větvená stélka, tvořená mnohojadernými buňkami. Uvedený typ stélky se vyskytuje u některých zelených řas (zelenivky).
- **Sifonální stélka (trubicovitá)**
  - stélka trubicovitého typu, tvořená jedinou velkou mnohojadernou buňkou, funkčně rozlišenou na část, kterou je přichycená k podkladu a rozvětvenou vrcholovou část.
- **Pletivná stélka**
  - mnohobuněčná stélka představující vývojově nejvyšší typ stélky řas. Je odvozená od heterotrichální stélky, připomíná primitivní pletiva, je známa u některých ruduch a chaluh.

## Výskyt sinic a řas

Sinice a řasy jsou kosmopolitními organismy a vyskytují se téměř ve všech ekologických prostředích, včetně extrémních lokalit.

Ve vodách se kromě bentických (přisedlých) a epifitických (přisedlých na rostlinách) vyskytují také planktonní řasy a sinice, které se volně vznášejí ve vodním sloupci.

Některé sinice a řasy se vyskytují také mimo vodní prostředí - na sněhu a ledu (kryoseston), v půdě (fytoedafon), na kůře stromů (vzdušné, aerofytické organismy); sinice a řasy byly nalezeny také v termálních pramenech, minerálních pramenech, dočasně mohou přežívat v podzemních vodách a vykazují také symbiotické interakce - např. s houbami tvoří lišejníky.

## Morfologie sinic

Sinice mohou mít různý tvar. Některé druhy jsou jednobuněčné, jiné jsou složeny z buněk tvořících kolonie, případně mohou mít tvar vláken složených z jednotlivých buněk.

Vícebuněčné sinice tvoří buňky několika základních typů:

- **Vegetativní buňky**

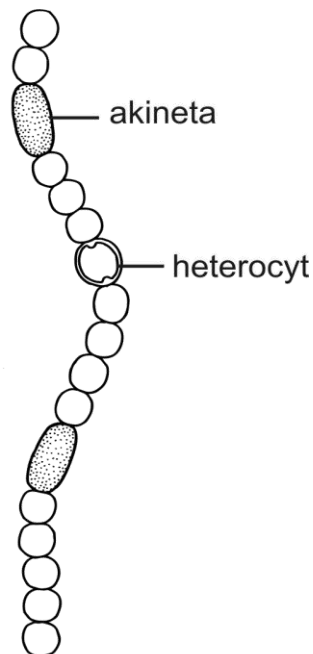
jsou základní buňky sinic, charakteristické svou prokaryontní stavbou. Jejich tvar a velikost, případně uspořádání v koloniích je významným diagnostickým znakem; u vláknitých kolonií se navíc zjišťuje také přítomnost povrchové slizové pochvy, způsob propojení buněk, tvar vlákna a typ jeho větvení.

- **Heterocyty**

jsou tlustostěnné buňky větší velikosti než buňky vegetativní. Vznikají z vegetativních buněk a v optickém mikroskopu se jejich obsah jeví jako prázdný, neboť jsou vyplněny plynem. Za účasti enzymu nitrogenázy se v nich fixuje vzdušný dusík, který je následně redukován do sloučeniny amoniaku, který pak v podobě aminokyselin přechází do sousedních buněk.

- **Akinety**

vznikají z jedné nebo více vegetativních buněk a bývají ještě větší než heterocyty. Tyto buňky obsahují velké zásoby živin a slouží k přečkávání nepříznivých (zimních) podmínek. Na jaře z akinet opět vyrůstá nová kolonie vegetativních buněk.



Sinice se na naší planetě objevily přibližně před 2,5 miliardami let a zaznamenaly velký evoluční rozvoj. V prekambričtém období byly schopny tolerovat nízký obsah kyslíku, vysokou intenzitu UV záření a zvýšené koncentrace sirovodíku, jejich fotosyntetickou činností tedy došlo k nasycení praatmosféry Země kyslíkem. Sinice mají v přírodě i další významné role. Některé druhy (např. druhy rodu *Nostoc*, *Anabaena*) mají schopnost diazotrofie, což je základní proces pro biologickou fixaci a koloběh dusíku v přírodě a současně jim tato schopnost poskytuje značnou výhodu v prostředí, kde je dusíku nedostatek. Ze sinic byla také izolována celá řada bioaktivních látek, z nichž některé jsou testovány pro výrobu léků. Např. *Arthrospira* (známá také pod obchodním názvem „*spirulina*“) se dnes komerčně pěstuje a užívá se jako potravinový doplněk.

Některé sinice (např. *Microcystis*) při přemnožení ve vodních nádržích vytváří tzv. vodní květ, který je tvořen biomasou sinic a řas plovoucích na vodní hladině. Mikroorganismy vodního květu často produkují velmi nebezpečné toxiny a látky způsobující kožní alergie. Zvýšený výskyt vodních květů na našich přehradách je výsledkem vzrůstajícího znečištění povrchových vod.



EVROPSKÁ UNIE  
Evropské strukturální a investiční fondy  
Operační program Výzkum, vývoj a vzdělávání



## Téma: SINICE A ŘASY

Pracovní list 8

Jméno: Skupina:		Akademický rok: Datum:	
<b>Úkol: Pozorování morfologie sinic a řas</b>			
Materiál: jednorázový sterilní materiál, kultury sinic, ZPM			
Pracovní postup: 1. Sterilní bakteriologickou kličkou odeberte malé množství kultury sinic a řas a zhotovte nativní preparát, pozorované mikroorganismy zakreslete a popište. 2. Podle morfologických znaků přiřadte jednotlivým druhům správný typ stélky.			

Vypracování:



## Otázky k opakování

Pracovní list 8

1. Nakreslete vegetativní buňku sinic a popište její základní orgány. Vysvětlete jejich funkci:

2. Co jsou cyanofágy?

.....

3. Zapište, jakou barvu buněk sinic a řas způsobují:

xantofyly .....  
karotenoidy .....  
fykoeritriny .....  
fykocyany .....  
chlorofyl .....  
fukoxantiny .....

Které z nich patří mezi tzv. fykobiliny?

4. Co je eutrofizace a jaké jsou její příčiny? Jak se projevuje v životním prostředí?

.....  
.....  
.....  
.....

5. Uveďte alespoň 3 druhy toxických sinic. Které toxiny produkují?

.....  
.....  
.....

6. Uveďte základní účinky toxinů sinic:

.....  
.....  
.....

7. Uveďte příklady sinic, které se často vyskytují v našich vodách:

.....  
.....  
.....  
.....

8. Vysvětlete, proč jsou sinice evolučně významné. Proč se označují jako recentní organismy?

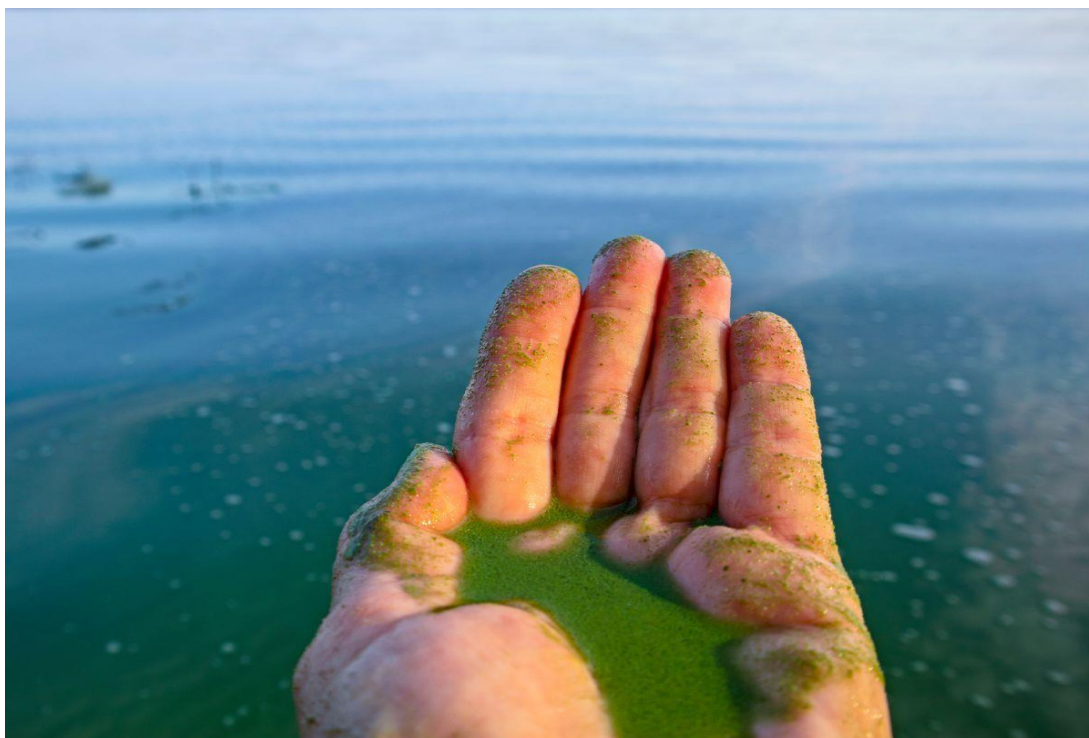
.....  
.....  
.....

9. Některé sinice jsou produkovány biotechnologickým způsobem. Jaké jsou možnosti jejich moderního využití v praxi?

.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....

10. Jak poznáte, zda tato voda obsahuje sinice? Proč je to důležité vědět?

.....  
.....  
.....  
.....  
.....





## Použitá literatura

AMBROŽOVÁ, J. *Mikroskopické praktikum z hydrobiologie*. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2002. 183 s. ISBN 80-7080-496-3

*Centrum pro cyanobakterie a jejich toxiny* [online]. 2010 [2010-07-22]. Dostupné z: <http://www.sinice.cz/>

ČSN 75 7713 (757713) *Kvalita vod - Biologický rozbor - Stanovení abiosestonu*. Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, 2015

ČSN 75 7712 (757712) *Kvalita vod - Biologický rozbor - Stanovení biosestonu*. Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, 2013

GOLDMAN, E. a L. H. GREEN. *Practical Handbook of Microbiology*. CRC Press, 2015. ISBN 978-1-4665-8739-7

KAŠTOVSKÝ, J., T. HAUER, R. GERIŠ, B. CHATTOVÁ, J. JURÁŇ, O. LEPŠOVÁ-SKÁCELOVÁ, P. PITELKOVÁ, M. PUSZTAI, P. ŠKALOUD, J. ŠŤASTNÝ, K. ČAPKOVÁ, M. BOHUNICKÁ a R. MÜHLSTEINOVÁ. *Atlas sinic a řas ČR 1* [online]. Praha: Powerprint, 2018 [2022-08-03]. Dostupné z: <https://drive.google.com/file/d/1hC2qmRC2ybncyBG31S5EFWuCiaUC7NR/view>

KUBÁTOVÁ, A. *Miniatlas mikroorganismů* [online]. Praha: Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra botaniky, 2001 [2022-07-26]. Dostupné z: <http://old.vscht.cz/main/soucasti/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/>

KUBÁTOVÁ, A. a M. VÁŇOVÁ. *Atlas zygomycetů* [online]. Praha: Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra botaniky, 2009 [2022-07-26]. Dostupné z: <https://www.natur.cuni.cz/biologie/botanika/veda-a-vyzkum/atlas-zygomycetu>

MALACHOVÁ, K. *Praktikum z mikrobiologie I*. Ostrava: Ostravská univerzita, Přírodovědecká fakulta, 2002. 109 s. ISBN 80-7042-831-7

MORELLO, J. A., P. A. GRANATO a H. ECKEL MIZER. *Laboratory Manual and Workbook in Microbiology*. McGraw-Hill Science, 2003. ISBN 972-0-0724-6354-6

ŘÍHOVÁ AMBROŽOVÁ, J. *Encyklopedie hydrobiologie* [online], verze 1.0, 2006. Praha: VŠCHT Praha, 2006 [cit. 2022-07-26]. Dostupné z: [http://147.33.74.135/knihy/uid\\_es-006/](http://147.33.74.135/knihy/uid_es-006/)

ŘÍHOVÁ AMBROŽOVÁ, J. *Mikrobiologie v technologii vod*. Praha: VŠCHT Praha, 252 s. ISBN 978-80-7080-676-0

ŠIMONOVICHOVÁ, A., E. PIECKOVÁ, P. FERIANC, P. HANAJÍK a R. HORVÁTH. *Environmentálna mikrobiológia*. Bratislava: Univerzita Komenského v Bratislave, 2013. 276 s. ISBN 978-80-223-3382-5

ŠIMONVIČOVÁ, A., M. MACHARIKOVÁ, Z. PELECHOVÁ DRONGOVA, A. TAKÁČOVÁ, K. MIŠÍKOVÁ a A. GUTTOVÁ A. *Biodiverzita půdních mikroskopických hub a nižších rostlin*. Ostrava: VŠB - TU Ostrava, 2016. 194 s. ISBN 978-80-248-3926-4

VOJTKOVÁ, H. *Atlas mikroorganismů Katedry environmentálního inženýrství* [online]. Ostrava: VŠB-TU Ostrava, 2021 [cit. 2022-07-26]. Dostupné z: <http://hgf10.vsb.cz/546/mikro/index.html>

VOJTKOVÁ, H. *Návody k cvičení ze základů cytologie*. Ostrava: VŠB-TUO, 2014. 55 s. ISBN 978-80-248-3392-7

Základy hydrobiologie a mikrobiologie: Studijní opory k praktickým cvičením

© doc. Mgr. Hana Vojtková, Ph.D.  
Katedra environmentálního inženýrství, Hornicko-geologická fakulta, Vysoká škola báňská -  
Technická univerzita Ostrava, 2022  
Rozsah 70 stran



Toto dílo podléhá licenci [Creative Commons Uved'te původ-Zachovejte licenci 4.0 Mezinárodní License](https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/)