UNIVERZITA PAVLA JOZEFA ŠAFÁRIKA V KOŠICIACH

Prírodovedecká fakulta

ÚSTAV CHEMICKÝCH VIED

Cvičenia z biochémie mikroorganizmov

Mária KOŽURKOVÁ

Vysokoškolské učebné texty

Košice, 2011

© 2011 doc. RNDr. Mária Kožurková, CSc..

Recenzenti: MVDr. Radomíra Nemcová, PhD.
MVDr. Alojz Bomba, DrSc.

Rozsah strán: 102

Elektronický vysokoškolský učebný text pre Prírodovedeckú fakultu UPJŠ v Košiciach.
Za odbornú a jazykovú stránku tohoto vysokoškolského učebného textu zodpovedá autor.
Rukopis neprešiel redakčnou ani jazykovou úpravou.

Vydavateľ: Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach

Umiestnenie: http://www.upjs.sk/pracoviska/univerzitna-kniznica/e-publikacia/#pf

Dostupné od: 17. 10. 2011

ISBN 978-80-7097-896-2

Obsah **5**

1 Mikrobiologické pracovisko **7**
1.1 Základné členenie mikrobiologického pracoviska ***7***

1.1.1 Mikrobiologické laboratórium 7
1.1.2 Umyváreň a prípravovňa skla 8
1.1.3 Prípravovňa kultivačných pôd a chemických reagencií 9
1.1.4 Kultivačná miestnosť s termostatmi 9
1.1.5 Očkovacia miestnosť (očkovací box) 9
1.1.6 Samostatný očkovací box 9
1.1.7 Sklady materiálov 9
1.1.8 Príručný zverinec 10
1.1.9 Pitevňa 10
1.1.10 Pracovne, šatne, hygienické zariadenia 10

1.2 Hlavné zásady bezpečnosti práce v mikrobiologickom laboratóriu ***11***

1.2.1 Všeobecné zásady odberu infekčného materiálu na mikrobiologické vyšetrenie . **13**
1.2.2 Zásady bezpečnej práce na praktických cvičeniach z mikrobiológie **17**

1.3 Pomôcky a prístroje používané v mikrobiologickom laboratóriu ***18***

1.3.1 Misky 18
1.3.2 Skúmavky 18
1.3.3 Erlenmayerove banky 19
1.3.4 Rouxova, Frenbachova, Kolleho a Vinogradského nádoby 19
1.3.5 Premývacie fľaše 20
1.3.6 Podložné a krycie sklíčka 20
1.3.7 Pipety 20
1.3.8 Vlhké komôrky 21
1.3.9 Počítacie komôrky 21
1.3.10 Sklenené a porcelánové filtre 22
1.3.11 Sklenené tyčinky 22
1.3.12 Bakteriologická očkovacia kľučka 22
1.3.13 Mikroskop 23
1.3.14 Využitie mikroskopov v mikrobiológii 25

2 Sterilizácia a dezinfekcia **35**
2.1 Sterilizácia ***35***

2.1.1 Sterilizácia suchým teplom 36
2.1.2 Sterilizácia horúcim vzduchom 36
2.1.3 Sterilizácia vlhkým vzduchom 36
2.1.4 Sterilizácia varom 36
2.1.5 Frakcionovaná sterilizácia (tyndalizácia) 36
2.1.6 Sterilizácia v autokláve 37
2.1.7 Sterilizácia filtráciou 37
2.1.8 Sterilizácia žiarením 38
2.1.9 Sterilizácia ultrazvukom 38
2.1.10 Sterilizácia chemickými prostriedkami 39

2.2 Dezinfekcia *39*

3 Mikrobiálna taxonómia **41**

4 Príprava preparátov na mikroskopické pozorovanie **45**

5 Farbenie mikroorganizmov **50**

6 Meranie veľkosti mikroorganizmov **53**

7 Stanovenie počtu mikroorganizmov **55**

8 Príprava a charakterizácia kultivačných médií **59**

8.1 Zloženie kultivačných médií *61*

8.2 Rozdelenie živných médií *63*

8.3 Príprava živných pôd *64*

9 Očkovanie mikroorganizmov **66**

9.1 Očkovanie tekutých pôd *66*

9.1.1 Očkovanie bakteriologickou kľučkou 66

9.1.2 Očkovanie pipetou 67

9.2 Očkovanie tuhých pôd *67*

9.2.1 Očkovanie tuhých pôd v Petriho miske 67

10 Kultivácia mikroorganizmov **69**

10.1 Jednorazová kultivácia *69*

10.3 Kontinuálna (prietoková) kultivácia. *70*

10.4 Rastová krivka *70*

11 Určovanie citlivosti mikroorganizmov **74**

11.1 Určovanie citlivosti mikroorganizmov na antimikrobiálne látky *74*

11. 2 Určovanie citlivosti mikroorganizmov na UV a γ-žiarenie *78*

11. 3 Vplyv teploty na mikroorganizmy *80*

11.3.1 Rozdelenie mikroorganizmov podľa vzťahu k teplote 80

11.3.2 Vplyv vysokých a nízkych teplôt na mikroorganizmy 81

11.4 Vplyv pH prostredia na mikroorganizmy *84*

11.4.1 Rozdelenie mikroorganizmov podľa vzťahu k pH 84

12 Biochemické metódy na testovanie mikroorganizmov **86**

12.1 Katabolizmus sacharidov *86*

12.2 Fermentácia *88*
12.3 Katabolizmus proteínov *90*
Literatúra **92**

Obsah

Tieto vysokoškolské učebné texty sú určené poslucháčom prvého ročníka magisterského štúdia na Prírodovedeckej fakulte UPJŠ v Košiciach.

Rozsah a náplň prác zahrnutých v týchto skriptách vychádza hlavne z časových a priestorových možností s prihliadnutím na materiálovú náročnosť prác.

Cieľom týchto skrípt je naučiť študentov základné mikrobiologické techniky a ukázať im význam mikroorganizmov v bežnom živote a ich dôležitú úlohu v prírode.

Cvičenia sú zamerané tak, aby si študenti zvýšili svoju technickú zručnosť, naučili sa pracovať podľa bezpečnostných zásad.

Text je rozdelený do 13 častí. V úvode každej z nich je uvedená teória k precvičovanej téme.

V prílohe je návrh na vypracovanie protokolov k jednotlivým cvičeniam.

1 Mikrobiologické pracovisko

Mikrobiologické laboratória sa zriaďujú na rozličné účely. Môžu to byť špecializované laboratória, alebo samostatné mikrobiologické inštitúcie. V špecializovaných laboratóriách mikrobiologické práce patria medzi základné služby, napr. v zdravotníctve, v potravinárstve a pod. Medzi samostatné mikrobiologické inštitúcie, v ktorých práca s mikroorganizmami je hlavnou náplňou ich činnosti sú vedeckovýskumné ústavy a pracoviská.

Mikrobiologické pracoviská sú samostatné organizačné jednotky, ktoré tvoria komplex priestorov, členených na viaceré časti podľa špecifickej povahy vykonávaných prác. Zriaďované sú pri hygienicko-epidemiologických staniciach, veterinárnych ústavoch, priemyselných podnikoch (potravinárskych, konzervárenských a pod.) na výskumných a špecializovaných ústavoch, pracoviskách akadémie vied, na univerzitách, kde sa teoreticky a prakticky vyučuje mikrobiológia.

1.1 Základné členenie mikrobiologického pracoviska

Mikrobiologické pracovisko tvoria viaceré špeciálne a pomocné miestnosti. K základným patria: mikrobiologické laboratória pre jednotlivé druhy prác, umyváreň a prípravovňa skla, prípravovňa kultivačných pôd a chemických reagencií, kultivačná miestnosť s termostatmi, očkovací box, alebo miestnosť určená pre tento cieľ, sklady materiálov, príručný zverinec, pracovne, šatne, hygienické zariadenia.

Podľa zamerania a náplne pracoviska tento komplex môže byť doplnený o ďalšie prevádzkové miestnosti: prípravné laboratórium pre manipuláciu so vzorkami, váhovňa, miestnosť pre meracie prístroje, miestnosť pre uloženie zbierky mikroorganizmov, dekontaminačná miestnosť, tmavá komora, miestnosť pre mikroskopy, biochemické laboratórium a pod.

1.1.1 Mikrobiologické laboratórium

Patrí medzi rizikové pracoviská. Pracovníci, ktorí v ňom pracujú sú vystavení riziku nákazy pretože pracujú s infekčným materiálom a kultúrami živých mikroorganizmov. Nebezpečenstvo nákazy závisí od virulencie mikroorganizmov, s ktorými sa pracuje.

Mikrobiologické laboratórium má byť čistá, vzdušná, vetrateľná, prirodzene osvetlená miestnosť (alebo miestnosti), orientovaná na severnú, alebo severovýchodnú stranu, čím je chránená pred väčším kolísaním teplôt, hlavne denných a nočných.

V laboratóriu má byť oddelený očkovací box, alebo Hansenova očkovacia skriňa. Hansenove skrine sú vzduchotesné, vybavené plynovým kahanom, elektrickým prúdom, germicídnou lampou pre dezinfekciu vnútorného prostredia. V stenách skrine sú otvory pre ruky jedného, najviac dvoch pracovníkov opatrené s nepriedušne pripevnenými manžetami a gumenými rukavicami, ktoré chránia pracovníkov pred priamym stykom s mikroorganizmami a zabraňujú ich prenikaniu mimo skrine. Predmety potrebné pre priamu prácu sú pred vložením do skrine sterilizované alebo dezinfikované. Priestor sa čistí dezinfekčnými roztokmi.

Veľkosť a zariadenie laboratória závisí od ich zamerania. Mikrobiologické laboratórium sa musí ľahko čistiť, dezinfikovať. Dlážka má byť z materiálu ako napr. xylolit, terazzo, alebo môže byť kamenná, steny obložené kachličkami alebo natreté olejovou farbou najmenej do výšky 1,5 m. V miestnosti má byť dostatočný počet elektrických zásuviek, plynových vývodov a voda.

Laboratórny nábytok musí byť pokrytý hladkým materiálom, ktorý možno ľahko čistiť, umývať a dezinfikovať. Povrch manipulačných a laboratórnych stolov má byť z materiálu, ktorý je odolný voči účinku dezinfekčných prostriedkov, chemikáliám a teplu. Laboratórium nesmie byť spojovacou miestnosťou s inými miestnosťami pracoviska, aby vírením prachu nedochádzalo zbytočne ku kontaminácii vyšetrovaných vzoriek, mikrobiologických kultúr, pomôcok, prístrojov a pod.

1.1.2 Umyváreň a prípravovňa skla

Je miestnosť zariadená na umývanie, mechanické čistenie použitého laboratórneho skla a na prípravu chemicky čistého a sterilného skla. Veľkosť umyvárne sa riadi potrebami a druhom vykonávaných prác v laboratóriu. Má byť vybavená: manipulačnými stolmi, ohrievačom vody, kameninovými umývadlami s drevenými roštami, autoklávom, horucovzdušnými sterilizátormi, elektrickými varičmi, smaltovanými nádobami, košíkmi na skúmavky a Petriho misky a ďalšími pomôckami, ktoré sú určené na čistenie skla.

1.1.3 Prípravovňa kultivačných pôd a chemických reagencií

V tejto miestnosti sa pripravujú živné pôdy potrebné na kultiváciu mikroorganizmov a niektoré roztoky. Miestnosť má byť dobre osvetlená s možnosťou vetrania, vybavená rôznymi prístrojmi, pomôckami, náradím a germicídnymi UV žiarivkami, steny a podlaha má byť z materiálu, ktorý sa ľahko čistí a dezinfikuje.

1.1.4 Kultivačná miestnosť s termostatmi

V miestnosti sú umiestnené viaceré termostaty, ktoré slúžia na kultiváciu mikroorganizmov. Po určitých úpravách možno miestnosť využiť ako samostatný termobox pre kultiváciu rôznych druhov aerobných mikroorganizmov.

1.1.5 Očkovacia miestnosť (očkovací box)

Zabezpečuje sterilné prostredie pre prácu s mikroorganizmami. Na mikrobiologických pracoviskách sú rôzne typy očkovacích boxov. Sú to buď samostatné miestnosti, alebo ohradené miesta v laboratóriu. Očkovací box v laboratóriu môže byť zhotovený z kovovej konštrukcie v kombinácii so sklom. V očkovacom boxe je pracovný stôl s prívodom elektriny a plynu. Nad stolom je umiestnená germicídna UV žiarivka. Box sa umýva dezinfekčnými prostriedkami a sterilizuje germicídnou lampou.

1.1.6 Samostatný očkovací box

Je uzatvorená miestnosť bez okien, umiestnená pri mikrobiologickom laboratóriu. Steny sú obložené kachličkami alebo natreté hladkým olejovým náterom. Podlaha musí byť z materiálu, ktorý sa ľahko čistí a dezinfikuje. Dvere sú posuvné a vetranie je zabezpečené cez vatový filter. Vybavenie boxu je také isté ako v očkovacom boxe, umiestnenom v laboratóriu. Naviac môžu v ňom byť kovové skrinky so sterilnými pomôckami.

1.1.7 Sklady materiálov

Sú miestnosti pre uskladnenie chemikálií, skla, živných pôd, dezinfekčných látok, ochranných pracovných odevov a iných materiálov. Majú byť suché a vzdušné, bez priameho osvetlenia, orientované na severnú stranu.

1.1.8 Príručný zverinec

Slúži pre chov pokusných zvierat, ktoré možno použiť (v mikrobiologickom, sérologickom a imunologickom laboratóriu) na dôkaz infekčného agensu z infekčného materiálu ak nie je možný spoľahlivý dôkaz týchto mikroorganizmov bežnými metódami, na dôkaz toxínov v biologickom materiáli, dôkaz toxicity a patogenity izolovaných kultúr, k príprave špecifických zvieracích sér a pod. Laboratórne zvieratá sa chovajú aj za účelom odberu rôzneho materiálu potrebného pre bakteriologickú, sérologickú, imunologickú a virologickú diagnostiku (napr. krv do živných pôd).

Zverinec musí byť oddelený od ostatných prevádzkových priestorov, má byť osvetlený, s teplotou 15-20 ˚C, vybavený ventilačným zariadením, okná chránené sieťkami. Väčšie zvieratá sa chovajú v drôtených klietkach, menšie v sklenených akváriách, vo fľašiach so širokým hrdlom, alebo v smaltovaných nádobách.

Zdravé zvieratá sa musia izolovať od zvierat chorých a od zvierat infikovaných nákazou. Usmrtené a uhynuté zvieratá sa pitvú na pitevných stolíkoch. Kadávery sa musia odstrániť a zničiť. Prepravujú sa v nepriepustných obaloch do spaľovne. Vedľa zverinca má byť príručná miestnosť pre uskladnenie a prípravu krmiva.

1.1.9 Pitevňa

Je určená na práce s pokusnými zvieratami.

1.1.10 Pracovne, šatne, hygienické zariadenia

Tieto priestory sú oddelené od laboratórií a pomocných miestností. Šatne slúžia laboratórnym pracovníkom na prezlečenie sa z civilného do ochranného odevu, ktorý musí byť ľahko dezinfikovateľný a ľahko sa perie pri vyšších teplotách. Pre vylúčenie kontaminácie civilného odevu musí mať pracovník dve skrinky. Použité a znečistené ochranné odevy sa dezinfikujú (uložia sa do dezinfekčného roztoku na určitý čas) a potom sa odovzdávajú do práčovne na vypratie.

Odpočinkové miestnosti sú vyhradené priestory, určené pre konzumovanie a uskladnenie jedla a nápojov. Mikrobiologické pracovisko má osobitne vyčlenené hygienické zariadenie.

1.2 Hlavné zásady bezpečnosti práce v mikrobiologickom laboratóriu

Laboratórny pracovník v mikrobiologickom laboratóriu je vystavený mnohým rizikám, ktoré môžu mať až smrteľné následky. Medzi najčastejšie riziká práce patria poranenia a infekcie. Infekcie môžu nastať dýchacími cestami, tráviacim ústrojenstvom, kožou, alebo spojivkami.

Pri práci v mikrobiologickom laboratóriu treba mať vždy na zreteli, že predmetom práce sú živé mikroorganizmy. Pracovníci laboratórií sú vystavení zvýšenému riziku z nákazy a ohrozenia zdravia, čo vyplýva z charakteru práce (práca s čistými kultúrami patogénnych a podmienečne patogénnych mikroorganizmov, infikovanými zvieratami a pod.). Závažnosť rizika závisí predovšetkým od virulencie mikroorganizmov, s ktorými sa v laboratóriu pracuje.

V mikrobiologickom laboratóriu sa musí dodržiavať čistota. Dlážka, steny, nábytok, pracovné stoly, chladničky, stoly a iné zariadenia sa umývajú účinnými dezinfekčnými roztokmi (napr. 1-2 % chloramínom, 1% Orthosanom BF), ovzdušie sa dezinfikuje germicidnými lampami. Dôležitou zásadou je udržiavanie poriadku na pracovnom stole a na celom pracovisku (presné označenie kultúr mikroorganizmov, preparátov, živných pôd, reagencií, chemikálií, odkladanie použitých predmetov po predchádzajúcom vyčistení a vydezinfikovaní na určené miesto a pod.).

Pracovníci mikrobiologických laboratórií sú povinný používať na pracovisku ochranný odev a obuv (biely plášť, nohavice, košeľu, ochrannú masku na krytie úst a nosa, bielu pracovnú obuv). Pri práci s infekčným aerosólom, toxínmi, leptavými látkami je potrebné ochranný odev doplniť gumenými rukavicami, ochrannými okuliarmi, bielou čiapkou alebo šatkou, respirátorom, igelitovou zásterou, gumenými čižmami, prípadne ďalšími prostriedkami. Na izolovanom pracovisku, kde sa nepracuje s patogénnymi mikroorganizmami (napr. laboratória určené na praktické cvičenie) je prípustné používať iba ochranný plášť.

V príručke bezpečnostných opatrení pre mikrobiologické laboratóriá Laboratory Biosafety Manual, ktorú vydala Svetová zdravotnícka organizácia (WHO) je uvedená klasifikácia mikroorganizmov podľa rizikových skupín:

Riziková skupina I: (malé individuálne a kolektívne riziko). Mikroorganizmus nemôže zapríčiniť ochorenie ľudí, alebo veterinárne dôležité ochorenie zvierat.

Riziková skupina II: (stredné individuálne a obmedzené kolektívne riziko). Patogén môže zapríčiniť ochorenie ľudí, alebo zvierat ale nemôže byť vážnym rizikom pre laboratórnych pracovníkov, obyvateľov, zvieratá, alebo životné prostredie.

Riziková skupina III: (veľké individuálne, ale malé kolektívne riziko). Patogén spôsobí vážne ochorenie u ľudí, alebo zvierat, ale nešíri sa od infikovaného jedinca k druhému.

Riziková skupina IV: (veľké individuálne a kolektívne riziko). Patogén zapríčiňuje vážne ochorenie ľudí, alebo zvierat a ľahko sa môže prenášať z jedného jedinca na druhého a to priamo, alebo nepriamo.

Rizikové pracovisko (riziko vplyvu chemikálii a ohňa)

Biologické nebezpečenstvo

Práca s infekčným materiálom vyžaduje od pracovníkov mikrobiologických laboratórií opatrnosť, dokonalé ovládanie pracovných postupov a pracovnej techniky, striktné dodržiavanie bezpečnostných predpisov a podmienok sterilizácie. Všetky práce s infekčným materiálom sa musia vykonávať v uzavretých miestnostiach (očkovacích boxoch, Hansenových skriniach), kde je vylúčené, resp. obmedzené prúdenie vzduchu na minimum (predchádzanie aerogénnej infekcii).

Miestnosti, v ktorých sa pracovalo s infekčným materiálom sa musia po ukončení práce náležite dezinfikovať. Pracovníci sú povinní pracovať s infekčným materiálom tak, aby v maximálnej miere zabránili jeho rozprašovaniu, rozliatiu, alebo kontaminácii pracovného prostredia.

Nepovolené osoby a návštevy nesmú vstupovať do laboratória bez ochranného odevu a sprievodu pracovníka laboratória. Do laboratória, kde sa pracuje s vysokovirulentnými nákazami a do zverincov je zákaz vstupu všetkým osobám, ktoré tam nepracujú.

Ak dôjde ku kontaminácií mikroorganizmami, musí sa urobiť dekontaminácia. Postup pri zneškodnení infekčného materiálu je závislý od stupňa nebezpečenstva infekcie. Kontaminovaná plocha sa prikryje na 1-2 hodiny (alebo podľa potreby) filtračným papierom, prípadne buničitou vatou, ktorá je nasiaknutá dezinfekčným roztokom v účinnej koncentrácii. Ak sa kontaminujú väčšie plochy je potrebné dezinfikovať celé laboratórium.

1.2.1 Všeobecné zásady odberu infekčného materiálu na mikrobiologické vyšetrenie

Odberový materiál:

Sterilný vatový tampón detoxikovaný v transportnom médiu: výter z tonzíl, výter z nazofaryngu, výter z laryngu, výter z nosa, ster z jazyka, výter z ucha, výter zo spojovkového vaku, ster z kože, výter z rany, tampón z výpotku, a pod.

Sterilná odberová nádobka, sterilná skúmavka: aspirát z prínosových dutín, spútum, bronchoalveolárna laváž, tkanivo, výpotok, mozgomiechový mok, a pod.

Kultivačné nádobky aeróbne, anaeróbne, pediatrické, mykotické kultivačné nádobky, kultivačné nádobky aeróbne, anaeróbne, kultivačné nádobky - krv na hemokultiváciu.

Sterilná skúmavka s 2 ml 20 % roztoku glukózy - biopsia zo žalúdočnej sliznice.

Sterilná odberová nádobka, sterilná skúmavka - moč (stredný prúd moču, cievkovaný moč, moč odobratý suprapubickou punkciou, s inokulovanými kultivačnými pôdami).

Sterilná skúmavka, hemokultivačná nádobka, sterilný vatový tampón detoxikovaný v transportnom médiu - plodová voda, plodové obaly, operačný materiál (tkanivo, tekutina, výter), pitevný materiál (tkanivo, tekutina, výter).

Odber vzoriek

Výter z tonzíl: detoxikovaným sterilným vatovým tampónom čo najdôkladnejšie otrieme povrch jednej a potom druhej mandle. Tampón sa nesmie dotknúť koreňa jazyka. Po odbere tampón vložíme do transportného média.

Výter z nazofaryngu: odber vykonávame detoxikovaným sterilným vatovým tampónom na drôte, ktorého koniec po vytiahnutí ohneme o okraj skúmavky v dĺžke 2 - 4 cm do 90 - 110° uhla. Po stlačení jazyka tampón zavedieme za zadný okraj mäkkého podnebia. Po vytiahnutí tampón opatrne zasunieme do skúmavky.

Výter z laryngu: odber vykonávame detoxikovaným sterilným vatovým tampónom na drôte, ktorého koniec po vytiahnutí ohneme o okraj skúmavky v dĺžke 3 - 5 cm do 120 - 140° uhla. Po vytiahnutí tampón opatrne zasunieme do skúmavky.

Výter z nosa: detoxikovaný tampón zavedieme skrutkovitým pohybom do dolného nosového priechodu po spodine nosovej dutiny. Po povytiahnutí zavedieme tampón smerom hore do prednej časti nosovej dutiny. Po odbere tampón vložíme do transportného média.

Výter z dutiny ústnej, ster z jazyka, ster z bukálnej sliznice líca, z paradentálneho vačku: detoxikovaným sterilným vatovým tampónom vykonáme ster alebo výter z postihnutého miesta. Po odbere tampón vložíme do transportného média.

Výter z ucha: ťahom ušného lalôčika vyrovnáme vonkajší zvukovod, do ktorého opatrným skrutkovitým pohybom zavedieme tenký sterilný tampón. Po odbere tampón vložíme do transportného média.

Výter zo spojovkového vaku: detoxikovaným sterilným vatovým tampónom určeným pre oftalmológiu vytrieme skrutkovitým pohybom spojovkový vak po odtiahnutí viečka od očnej gule.

Spútum: spútum odoberáme ráno pri prvej expektorácii. Vykašľané spútum zachytí do sterilnej polyetylénovej nádobky. Tento spôsob odberu je potrebné výrazne vyznačiť na žiadanke o vyšetrenie.

Transtracheálny aspirát, aspirát z prínosových dutín: sekrét sa odsaje a zasiela na vyšetrenie v sterilnej nádobke alebo skúmavke.

Ster z kože, výter z rany: detoxikovaným sterilným vatovým tampónom otrieme miesto zápalom zmeneného tkaniva (najviac životaschopných mikroorganizmov je na rozhraní zdravého a zápalom postihnutého tkaniva). Pri rozsiahlejších ranách vykonáme niekoľko odberov súčasne na rôznych miestach.

Punktát z abscesu, tampón z výpotku alebo výpotok: odber robíme punkčnou ihlou do sterilnej skúmavky alebo hemokultivačnej nádobky. Odber hnisu a exsudátov odoberáme nasledovne: prvú časť hnisu necháme odtiecť alebo odoberieme injekčnou striekačkou. Na

vyšetrenie posielame až ďalšiu časť hnisu, buď na tampóne v transportnom médiu alebo v sterilnej skúmavke.

Mozgomiechový mok: lumbálnou punkciou prísne asepticky napichneme miechový kanál a z punkčnej ihly necháme likvor samovoľne odkvapkať do sterilnej skúmavky v množstve minimálne 1 ml. Po odbere sterilnú skúmavku s materiálom okamžite doručíme do laboratória. V prípade, že nemôžeme likvor doručiť okamžite, uskladníme ho pri izbovej teplote na tmavom mieste. Odobratý likvor možno dať do chladničky.

Ster z miesta vpichu: detoxikovaným sterilným vatovým tampónom vykonáme ster po dezinfekcii kože pred odberom hemokultúry. Po odbere tampón vložíme do transportného média.

Krv na hemokultiváciu: mikroorganizmy sa z ložiska vyplavujú asi hodinu pred začiatkom vzniku triašky a zvyšovaním teploty. Kontinuálna fungémia je nepretržité vyplavovanie mikroskopických húb do krvného riečiska. Na odbery sú k dispozícii rôzne odberové nádobky podľa predpokladaného pôvodcu infekcie. Kožu v mieste vpichu dezinfikujeme dezinfekčným prostriedkom. Detoxikovaným tampónom urobíme ster z kože v mieste vpichu, ktorý zasielame spolu s hemokultúrou do laboratória. Vzorky krvi v laboratóriu kultivujeme minimálne 5 dní, pri podozrení na infekciu 14 dní. Pozitívny výsledok ako aj izoláciu a identifikáciu kmeňa a hlási laboratórium telefonicky odosielateľovi okamžite po získaní výsledkov.

Biopsia zo žalúdočnej sliznice: odobratú biopsiu žalúdočnej sliznice v sterilnej skúmavke s roztokom glukózy je potrebné do laboratória dodať do 2 hod. (odber robí lekár pomocou endoskopu na špecializovanom pracovisku). Ak to nie je možné, skúmavku do odoslania udržujeme pri teplote + 4 ºC.

Moč: v súčasnosti sa dáva prednosť odberu ***necievkovaného moču*** do sterilných skúmaviek alebo kontajnerov. Moč sa vyšetruje kvantitatívnymi metódami. Zisťuje sa počet mikroorganizmov v 1 ml nezriedeného moču zo stredného prúdu moču. Odoberá sa prvý ranný moč. Do sterilnej nádobky so širokým hrdlom sa zachytí ***stredný prúd*** moču. Takto získaný moč urýchlene transportujeme do laboratória v sterilnej skúmavke.

Plodová voda, plodové obaly: materiál v sterilných skúmavkách alebo sterilných odberových nádobkách spolu s požadovanou dokumentáciou je potrebné čo najrýchlejšie doručiť do

laboratória. V mimopracovnom čase mikrobiologického laboratória sa vzorky uschovávajú pri izbovej teplote (+22 ºC). Materiál na sterilnom vatovom detoxikovanom tampóne v transportnom médiu s aktívnym uhlím i s požadovanou dokumentáciou je potrebné čo najrýchlejšie doručiť do laboratória (3 hod.). V mimopracovnom čase sa vzorky uskladňujú pri + 4 ºC.

Výter z konečníka: po vyprázdnení stolice tampón zavedieme skrutkovitým pohybom do konečníka tak ďaleko, aby sa povrch tampónu znečistil stolicou. Tampón z konečníka opatrne vytiahneme opäť skrutkovitým pohybom. Po odbere tampón vložíme do transportného média.

Stolica: do sterilnej odberovej nádobky sa na to určenou lyžičkou odoberá vzorka veľkosti hrachu alebo asi 1 ml tekutej stolice.

1.2.2 Zásady bezpečnej práce na praktických cvičeniach z mikrobiológie

- Na praktických cvičeniach používajte ochranný odev – plášť počas celého cvičenia, zopnite si dlhé vlasy.
- Do laboratória noste iba najnutnejšie a určené pomôcky pre vlastnú prácu.
- Pracovný stôl pred začiatkom cvičenia dezinfikujte a udržiavajte v poriadku počas cvičenia, pracujte rozvážne a neponáhľajte sa.
- Dodržiavajte pracovné postupy a riaďte sa pokynmi učiteľa, ktorý vedie cvičenia.
- Pred/po každom cvičení si umyte ruky. Pretože pevné mydlo môže obsahovať kontaminanty, používajte tekuté alebo práškové mydlo. Pred odchodom z laboratória si dezinfikujte ruky aj vhodným dezinfekčným roztokom. Na utieranie rúk používajte papierové utierky.
- Nezúčastňujte sa praktických cvičení v prípade poranenia rúk, alebo nekrytých častí tela (po dohode s vyučujúcim).
- Počas práce je zakázané jesť, piť, fajčiť a dotýkať sa rukami sliznice úst, očí, prípadne iných častí tela.
- Použité laboratórne sklo, nástroje odkladajte do pripravených nádob, určených na dezinfekciu alebo do nádob s dezinfekčným roztokom.
- Pracujte s vyšetrovaným materiálom tak, aby nedošlo k jeho rozliatiu a kontaminácii pracovného prostredia.
- Pri práci s organickými rozpúšťadlami nepracujte v blízkosti otvoreného plameňa.
- Úraz, poranenie, kontaminovanie sa materiálom počas práce na cvičení ihneď oznámte učiteľovi, ktorý vedie cvičenie.
- Nepoužívajte laboratórne zariadenia bez inštrukcií vyučujúcim.
- Pred odchodom z cvičenia všetok materiál a odpad uložte do určených nádob, pracovný stôl umyte dezinfekčným roztokom.
- Nevynášajte z laboratória kultúry živých mikroorganizmov, pokusné zvieratá a pomôcky, s ktorými sa pracovalo.

1.3 Pomôcky a prístroje používané v mikrobiologickom laboratóriu

Pre prácu v mikrobiologickom laboratóriu sa používa špeciálne laboratórne sklo, rôzne pomôcky a nástroje. V dnešnej dobe sa sklo ak je to možné nahrádza materiálmi z plastov, ktoré sú určené na jednorazové použitie.

1.3.1 Misky

Používajú sa na prípravu živných pôd pre kultiváciu mikroorganizmov. Najčastejšie používané sú tzv. Petriho misky (obrázok 1). Sú to dve sklenené misky s rozličným priemerom. Vrchnák je o niekoľko mm nižší ako spodná časť. Petriho misky sú vhodné len pre krátkodobú kultiváciu mikroorganizmov, pretože v nich relatívne rýchle dochádza k vysýchaniu kultivačného prostredia. Dnes sa vyrábajú i sterilné Petriho misky do ktorých sa pôdy rozlievajú na jednorazové použitie. Sú zo syntetického materiálu. Petriho misky s deleným dnom, umožňujú jednoduchšie odčítanie kolónií mikroorganizmov. Petriho misky z plastu sa dodávajú sterilné v obaloch.

Obrázok 1 Petriho misky s rôznym priemerom a Petriho misky s deleným dnom

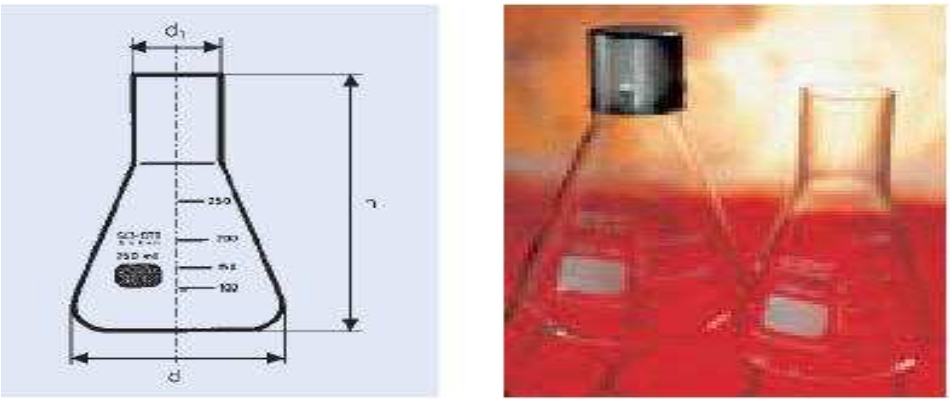
1.3.2 Skúmavky

Sú sklenené nádobky, približne 160 mm dlhé a 16 mm široké. Používajú sa na kultivácie. Biologické skúmavky sa líšia od chemických silnejšími stenami a rovným okrajom. Skúmavky môžu byť pôdové, aglutinačné a precipitačné. Na sledovanie tvorby plynov sa používajú Durhamové plynovky. Slúžia na zisťovanie tvorby plynu pri sacharolytických reakciách. Vkladajú sa v prevrátenej polohe do bežných skúmaviek s kultivačnými roztokmi, ktoré sa potom naočkujú skúmanými kultúrami.

Skúmavky zátkujeme zátkami, ktoré môžu byť vatové, gumené, korkové, alebo patentované kovové uzávery, tzv. Kapsenbergove uzávery.

1.3.3 Erlenmayerove banky

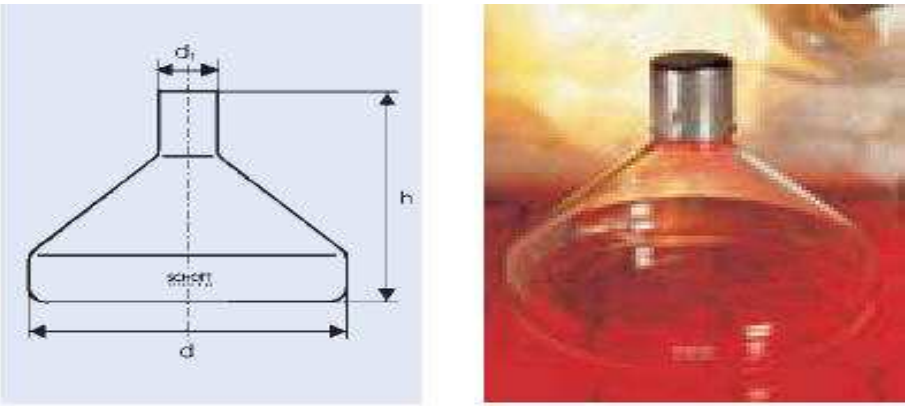
Erlenmayerove banky (obrázok 2) sú sklenené nádoby s dlhým, úzkym hrdlom a širokým dnom. Sú vhodné na kultiváciu mikroorganizmov za aerobných podmienok a tiež pre prípravu zásobných kultivačných médií a iných roztokov. Pred použitím sa zátkujú ako skúmavky.



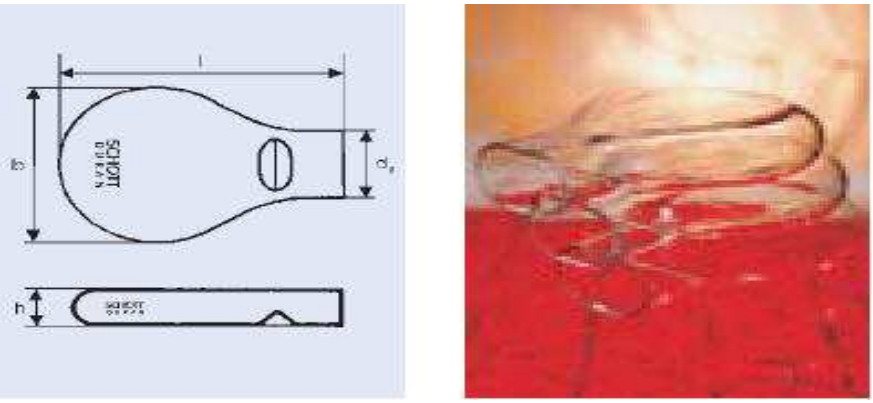
Obrázok 2 Erlenmayerova banka

1.3.4 Rouxova, Frenbachova, Kolleho a Vinogradského nádoby

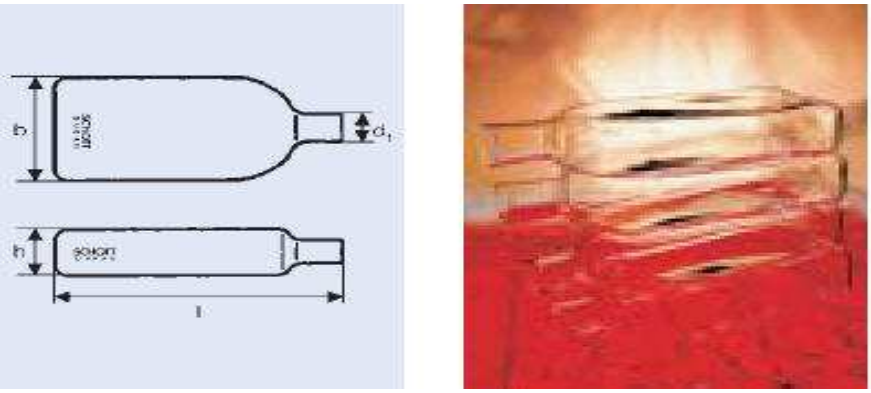
Rouxova, Frenbachova, Kolleho a Vinogradského nádoby (obrázok 3-5) slúžia k nahromadeniu väčšieho množstva čistej kultúry, pestovanej za aerobných podmienok, alebo na kultiváciu tkanivových kultúr. V týchto nádobách sa veľmi dobre kultivujú mikroorganizmy rastúce na povrchu živných pôd.



Obrázok 3 Frenbachova nádoba



Obrázok 4 Kolleho nádoba



Obrázok 5 Rouxova nádoba

1.3.5 Premývacie fľaše

Sú modifikované chemické nádoby, určené na premývanie plynov. Najčastejšie sa používajú na submerznú kultiváciu.

1.3.6 Podložné a krycie sklíčka

Slúžia na prípravu preparátov na mikroskopovanie. Podložné sklíčka sú najčastejšie veľkosti 76x26 a krycie sklíčko 20x20.

1.3.7 Pipety

Pasteurove pipety (obrázok 6A) sa pripravujú v laboratóriu zo sklenených rúrok vyťahovaním nad plameňom, alebo sa dajú kúpiť plastové Pasteurove pipety (obrázok 6B). Nie sú kalibrované, používajú sa na odsávanie malého množstva tekutín.

V súčasnosti sa pre rutinnú prácu v mikrobiologickom laboratóriu používajú automatické pipety (obrázok 6C) s fixným, alebo nastaviteľným objemom. Výhodou je, že

kvapalina sa nasáva do špičky, čo je oddeliteľný plastový kónus pripevnený na koniec pipety. Špičky sa dodávajú ako sterilné alebo nesterilné, bez filtra (štandardne) aj s filtrom. Sterilné špičky sa dodávajú v uzavretom zásobníku, sterilizácia sa uskutočňuje pomocou ß-žiarenia, špičky sú bez endotoxínov, DNA a RNázy a bez ATP. Filter obmedzuje prenikanie pár, resp. aerosolu pipetovanej látky do tela pipety a zamedzuje tak kontaminácii pipety. Niektoré druhy špičiek sú autoklávovateľné pri 121°C.

Obrázok 6A Pasteurova pipeta, 6B plastové Pasteurove pipety 6C automatické pipety

1.3.8 Vlhké komôrky

Slúžia na priame pozorovanie buniek mikroorganizmov v tekutom prostredí. Böttcherova komôrka má sklenený, alebo nerezový prstenec. Kochova komôrka je podložné sklíčko s jamkou, ktoré slúži na prípravu visiacej kvapky.

1.3.9 Počítacie komôrky

Počítacie komôrky (obrázok 7) sú špeciálne upravené sklíčka pre počítanie mikroorganizmov. Najznámejšie sú Bürkerova a Thomova.

Obrázok 7 Počítacie komôrky

1.3.10 Sklenené a porcelánové filtre

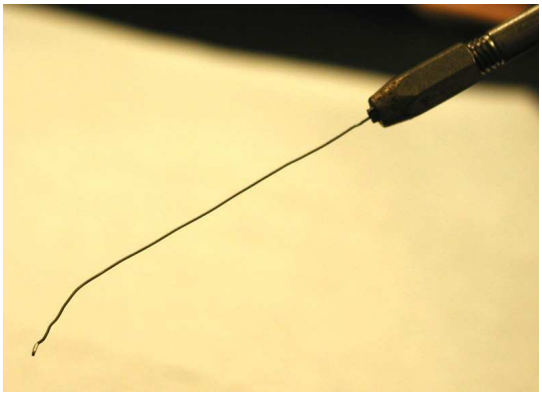
Majú póry rôznej veľkosti. Bakteriologické filtre sa používajú podobne ako Seitzove filtre na sterilizáciu rôznych roztokov, živných médií, plynov a pod.

1.3.11 Sklenené tyčinky

Pripravujú sa z nich rôzne pomôcky, používané pri kultivácii mikroorganizmov. Môžu mať tvar hokejky, trojuholníka, alebo písmena L. Rozotiera sa nimi naočkovaná kultúra mikroorganizmov na povrch živnej pôdy v Petriho miskách.

1.3.12 Bakteriologická očkovacia kľučka

Bakteriologická očkovacia kľučka (obrázok 8) sa skladá z držiaka, do ktorého je zasunutý dlhší platinový, niklový alebo chrómový drôtik. Drôtik je približne 5,5-6 cm dlhý a 0,6-0,8 mm hrubý, na konci s očkom o priemere 2-3 mm. Držiak je zhotovený z kovu, obaleného gumou, alebo umelou hmotou. Je to Kolleho držiak. Bakteriologická očkovacia kľučka slúži na odber a roztieranie mikrobiologického materiálu. Pred použitím, aj po použití musí byť vždy dôkladne vysterilizovaná. Sterilizuje sa vypaľovaním do žerava nad nesvietivým plameňom kahana.



Obrázok 8 Bakteriologická kľučka

1.3.13 Mikroskop

Prvý mikroskop, ktorého základom boli šošovky, zostrojili v roku 1590 otec a syn Jensenovi, brusiči skla a diamantov. Kvôli svojej nepatrnej zväčšovacej a rozlišovacej schopnosti nebolo možné takýto prístroj používať na vedeckú prácu.

V r. 1676 objavil **Antonius van Leeuwenhoek** baktérie. Sú o tom písomné záznamy, ktoré zasielal Kráľovskej spoločnosti v Londýne. Pozoroval ich vo vode a v náleve čierneho korenia a popísal tiež ich tvar. K tomuto účelu si zostavil sám veľmi jednoduchý mikroskop (obrázok 10), ktorý zväčšoval 275 krát a mal rozlišovaciu schopnosť 1,4 μm. Pomocou tohto mikroskopu pozoroval, ako sám píše, štyri druhy malých zvieratiek (*animalcula*). Väčšinou to boli prvoky.

Obrázok 10 Antonius van Leeuwenhoek a jeho prvý mikroskop

Leeuwenhoekov objav, podobne ako u iných objaviteľov vzbudzoval najprv nedôveru. Aj napriek tomu Friedrich Müller (1730-1781) vydáva spis *Animalcula infusoria fluviatilia et terrestria,* v ktorom sa prvýkrát objavujú názvy *bacillus, spirillum a vibrio.*

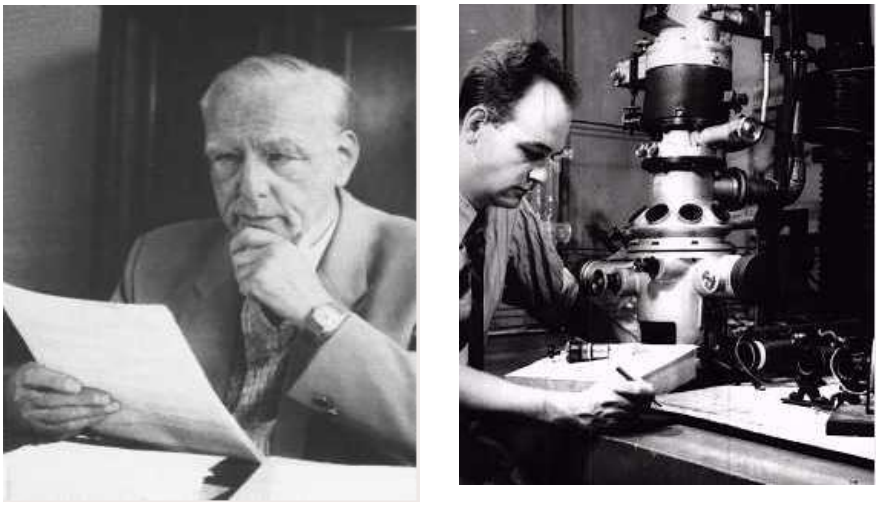
V medicíne využil neskôr mikroskop napr. francúz Luis Pasteur pri objave kvasiniek, alebo Róbert Koch pri objave pôvodcov tuberkulózy a cholery.

V 19. storočí nastal vo vývoji mikroskopu dramatický zvrat. Prispeli k tomu predovšetkým **Carl Zeiss**, ktorý venoval významné úsilie výrobe mikroskopom. Carl Zeiss vyrobil svoj prvý mikroskop (obrázok 11) v r. 1857.

Obrázok 11 Carl Zeiss a jeho mikroskop z roku 1934

Významne k týmto objavom prispeli aj **Ernst Abbe**, ktorý sa zaoberal teoretickými štúdiami optických princípov a **Otto Schott**, ktorý viedol výskum optického skla.

Optický mikroskop dosiahol v 30. rokoch svoje teoretické hranice. Tie sú limitované 500 alebo 1000-násobným (2000-násobným) zväčšením a rozlíšením 0,2 mikrometra. Vedci však potrebovali vidieť detaily buniek. To vyžadovalo zväčšenie rádovo až 10 000-násobné. Bolo teda nutné skonštruovať mikroskop na inom princípe. Namiesto svetelného lúča sa využil elektrónový lúč (tok rýchlych elektrónov), namiesto sklenenej šošovky magnetická. Prvý mikroskop na tomto princípe bol vyvinutý v Nemecku v roku 1931 a zaslúžili sa o to predovšetkým **Max Knoll** a **Ernst Ruska**. Bol to tzv. „prežarovací“ elektrónový mikroskop (TEM – Transmission Electron Microscope), kde elektrónové lúče prechádzali skúmaným predmetom (urýchľovacie napätie až 20 kV) a vytvorili tieňový obraz (obrázok 12).



Obrázok 12 Ernst Ruska a elektrónový mikroskop z roku 1938

Druhý typ elektrónového mikroskopu, tzv. skenovací (SEM – Scanning Electron Microscope) sa objavil v roku 1942, komerčne bol používaný až v roku 1965. U tohto typu mikroskopu je nutné urýchľovacie napätie pre elektróny 60 až 80 kV, jeho zväčšenie je 30 000-násobné a v kombinácii s optickým mikroskopom až 100 000násobné.

V roku 1966 **Petráň** a **Hadravský** patentovali prvý optický rastrovací mikroskop (TSM – Tandem Scanning Microscope). Ich mikroskop bol prvý komerčne použitý rastrovací mikroskop na svete.

1.3.14 Využitie mikroskopov v mikrobiológii

Mikroskop je optický prístroj, ktorý umožňuje pozorovanie objektov, ktoré sú menšie než je rozlišovacia schopnosť ľudského oka. Patrí medzi najdôležitejšie pomôcky pri skúmaní morfológie, ale aj štruktúr subcelulárnych útvarov mikroorganizmov. Optický mikroskop v mikrobiologickom laboratóriu je štandardný prístroj, v špecializovaných mikrobiologických laboratóriách sa používajú aj iné typy mikroskopov, napr. elektrónový mikroskop.

Mikroskop je veľmi jemné zariadenie, ktoré vyžaduje odborné zaobchádzanie a starostlivú údržbu.

Podľa technického zostrojenia a spôsobu zobrazovania sledovaného objektu rozoznávame tieto mikroskopy:

- **svetelný (pozorovanie vo svetelnom poli),**
- **stereoskopický,**
- **fázovo-kontrastný,**

- **pozorovanie v tmavom poli,**
- **fluorescenčný,**
- **elektrónový,**
- **mikroskop atomárnych síl (AFM),**
- **iné.**

Svetelný mikroskop (pozorovanie vo svetelnom poli)

Svetelný mikroskop je zložený z optickej a mechanickej časti.

K optickej časti mikroskopu teda patria: objektívy, okuláre a kondenzor. Ako pomocné zariadenia sa k nim počítajú filtre, zrkadielko a lampa, resp. osvetľovacie zariadenie, ktoré je vmontované v statíve mikroskopu.

Objektív, vytvára zväčšený, prevrátený obraz skúmaného predmetu a **okulár**, ktorým tento obraz pozorujeme. Je najdôležitejšou súčasťou mikroskopu. Je tvorený sústavou šošoviek, ktoré sú umiestnené vo valcovitej objímke. Na hornom konci má závit na upevnenie objektívu do revolverového meniča. Všetky objektívy sú na revolverovej hlavici umiestnené tak, že pretočením hlavice pri zámene jedného objektívu iným zostáva mikroskop zaostrený, prípadne sa doostruje mikrometrickou skrutkou. Okuláre aj objektívy sú vymeniteľné.

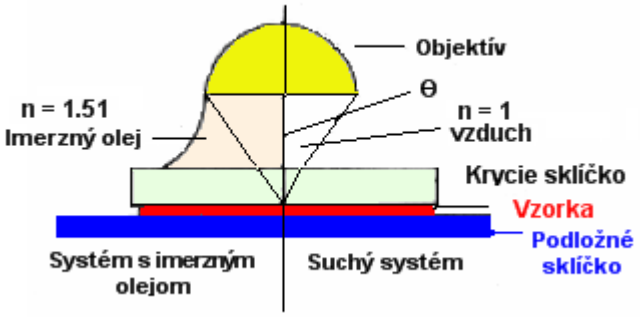
Objektív má tieto charakteristické vlastnosti: ***ohniskovú vzdialenosť***, ktorá je v nepriamom pomere ku zväčšeniu (čím je ohnisková vzdialenosť kratšia, tým je zväčšenie ostrejšie) a ***zväčšovaciu schopnosť***.

Schopnosť rozlíšiť čo najväčšie detaily závisí na schopnosti objektívu zachytiť čo najširší kužeľ lúčov, ktoré prechádzajú objektívom. Túto vlastnosť vyjadruje tzv. **numerická apretúra** (NA, obrázok 13). Vzťah medzi numerickou apretúrou a indexom lomu je vyjadrený:

$$\mathbf{A = n \,.\, \sin \theta}$$

n - index lomu prostredia

θ - polovica uhla ktorý je tvorený lúčmi, ktoré vychádzajú z objektu a vstupujú do objektívu.



Obrázok 13 Vysvetlenie numerickej apertúry

Okuláre mikroskopov nie sú také zložité ako objektívy mikroskopov, často sa skladajú len z dvoch šošoviek (Huygensov okulár). Najčastejšie používané zväčšenie okulárov je 10 násobné. Okuláre majú rôzne priemery, normalizované sú priemery 12 mm pre stereoskopické mikroskopy, alebo 18 mm pre biologické mikroskopy.

Podľa počtu okulárov sa mikroskopy delia na monokulárne (s jedným okulárom), a binokulárne (s dvoma okulármi) (obrázok 14,15). Modernejším optickým mikroskopom je tzv. trinokulárny mikroskop, ktorý je variantom binokulárneho mikroskopu s tým rozdielom, že tretia optická cesta slúži na pripojenie kamery.

Obrázok 14 Monokulárny a binokulárny mikroskop

K mechanickej časti mikroskopu patria: statív (podstavec), stolík, nosič tubusu, revolverový menič objektívov, makro- a mikrometrická skrutka, mechanická časť osvetlenia s irisovou clonou, skrutka na posun kondenzora a okulárový tubus.

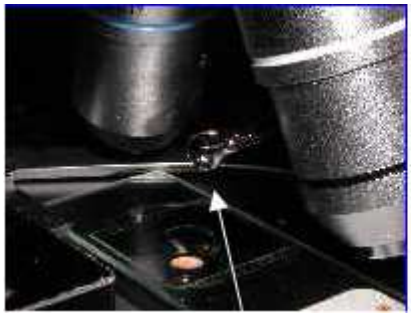
Základ mikroskopu tvorí **stojan (statív),** na ňom sú upevnené jednotlivé časti mikroskopu: **stolík so svorkami** (kam upevňujeme mikroskopický preparát), ktorý má uprostred otvor, ktorým prechádza svetlo z osvetľovacej časti mikroskopu. Na stolčeku sú svorky, do ktorých sa vloží pripravený preparát. Stolček s posuvným mechanizmom umožňuje posun preparátov v dvoch na seba kolmých smeroch. Nad stolíkom je umiestnený **tubus** (tubusom sú od seba oddelené okulár a objektív**,** ktoré sú v konštantnej vzdialenosti). Na spodnej časti tubusu sa nachádza **revolverový menič objektívov** (obrázok 16), v ktorom sú upevnené v kruhu za sebou štyri, prípadne päť objektívov. Otáčaním revolverového zariadenia v ľubovoľnom smere na doraz (zúbok na pružine musí zapadnúť do jamky na otáčavej časti) dostane sa vždy jeden z objektívov presne do spoločnej osi s okulárom, ktorý je zasunutý do otvoru na hornom konci tubusu.

Obrázok 15 Rôzne typy okulárov

Obrázok 16 Rôzne typy objektívov a objektívy umiestnené v revolverovom meniči objektívov

Tubus sa môže posúvať smerom hore a dole pomocou **makro- a mikrometrickej skrutky**. Makrometrická skrutka slúži na zaostrenie objektov a mikrometrická skrutka na doostrenie štruktúry pozorovaného objektu. U nových mikroskopov sa **stolík** posúva smerom hore a dolu, tubus je stabilný nepohyblivý.

Na svetelných mikroskopoch je umiestnených 3-5 objektívov. Na svojej vonkajšej strane majú označenie zväčšenia a parameter **numerickú apretúru**. NA určuje rozlišovaciu schopnosť objektívu. Príklady označenia objektívov: 4X/0,1; 10X/0,25; 40X/0,65; 100X/1,25. Prvé číslo je zväčšenie 4 – 100-násobné, druhé je numerická apertúra. Čím väčšie zväčšenie, tým väčšia je NA. Objektívy 4 – 40-násobné sa nazývajú aj ako "suché". Vyjadruje to skutočnosť, že medzi objektívom a pozorovaným preparátom je vzduch. Preparát je na podložnom sklíčku prekrytý tenkým krycím sklíčkom. Objektív 100-násobný sa nazýva aj "imerzný" objektív, pretože medzi objektívom a preparátom je imerzný olej (obrázok 17).



imerzný olej

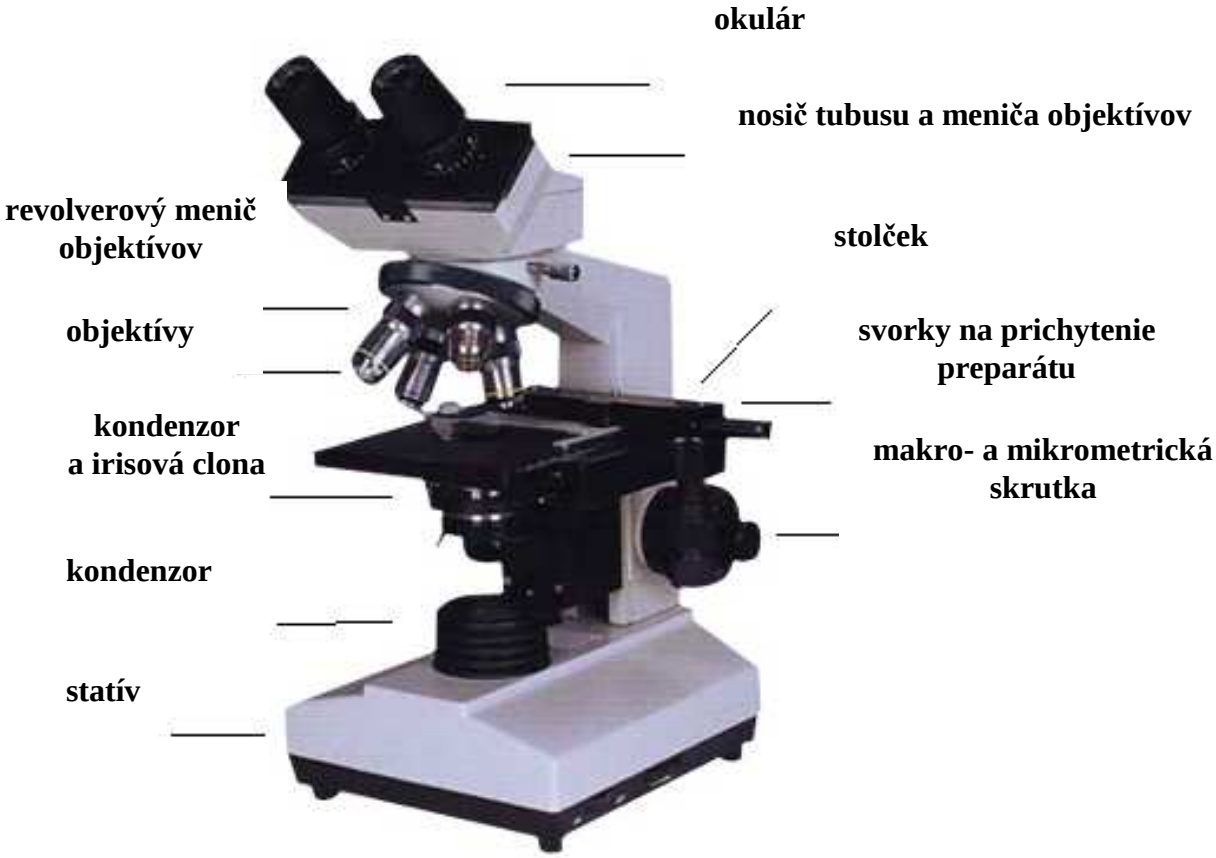
objektív na imerzné mikroskopovanie

Obrázok 17 Mikroskopovanie s imerzným olejom

Postup pri imerznom mikroskopovaní je nasledujci: na preparát aj na šošovku sa kvapne kvapka imerzného oleja a obe kvapky sa spoja (medzi šošovkou objektívu a preparátom je len imerzný olej). Olej sa používa na mikroskopovanie preto, aby sa zväčšila apertúra objektívu a tým sa umožnilo lepšie rozlíšenie. Keď je medzi preparátom a objektívom vzduch, je maximálna numerická apertúra do 1 (maximálne zväčšenie 1000násobné), pri olejovej imerzii je to až 1,3-1,6 (maximálne zväčšenie 1300-1600 násobné).

Prirodzené, alebo umelé svetlo žiarovky sa odráža v spodnej časti mikroskopu zrkadielkom, rovinným, alebo plankonkávnym. U novších mikroskopov v spodnej časti mikroskopu je len žiarovkový zdroj svetla. Toto svetlo má mať správny pomer intenzity a množstva dopadajúceho svetla (regulujeme ju clonou). Samozrejme, osvetlenie má byť čo

najrovnomernejšie. Zariadenie, ktoré nám umožní dosiahnuť správne osvetlenie sa nazýva kondenzor. Kvalitný kondenzor sa konštrukčne skladá zo sústavy štyroch šošoviek podobne ako objektívy. Pod kondenzorom sú umiestnené aj nosiče na filtre (obrázok 18).



Obrázok 18 Svetelný mikroskop

Stereoskopický preparačný mikroskop

Anglicky nazývaný aj "low power microscope" (slabý mikroskop) sa používa na pozorovanie väčších objektov, pretože v zornom poli pozorovaný objekt vidíme stereoskopicky, plasticky čo je veľmi výhodné pri pozorovaní veľkých predmetov. Môžeme ním pozorovať napr. kolónie baktérií a mikromycét, vyrastených na rôznych živných pôdach, ale aj kryštálov hornín, mincí, archeologických nálezov, šperkov, technických súčiastok, atď. Dôležitý je priestorový obraz (3-D) oboma očami súčasne. Zväčšenia stereomikroskopov sú 4násobné až maximálne 100 násobné. Okuláre sú vymeniteľné. Objektívy sú párované, často s meniteľným zväčšením. Vzdialenosť objektívov od pozorovaného predmetu je niekoľko centimetrov.

Fázovo-kontrastný mikroskop

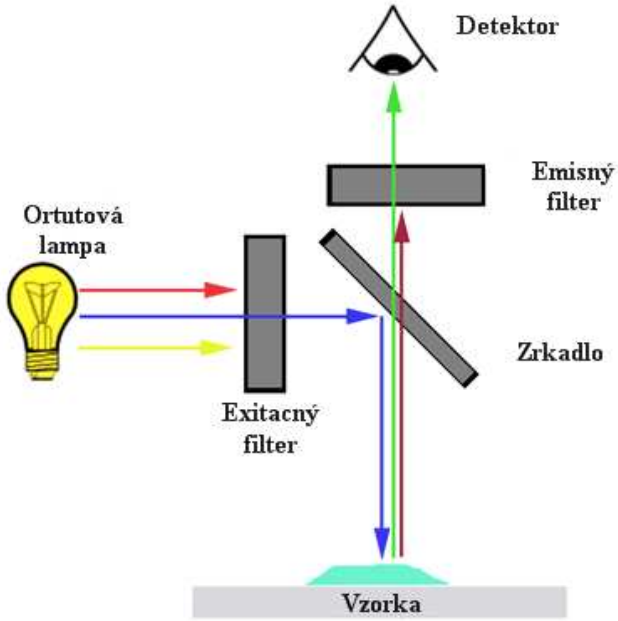
Podstata fázového kontrastu spočíva na nerovnakej priepustnosti a lámavosti svetelných lúčov, prichádzajúcich cez nezafarbené štruktúry živých mikroskopických objektov. Fázovo-kontrastný mikroskop pomocou špeciálne upravenej optiky a tzv. fázových doštičiek premieňa fázové rozdiely v intenzite svetelných lúčov. Fázový kontrast umožňuje pozorovať detailnú štruktúru živej hmoty.

Pozorovanie v tmavom poli

Táto metóda sa využíva na zobrazenie objektu bočným osvetlením, pri ktorom sa odclonia centrálne lúče. Objektom prechádzajú len okrajové lúče pod takým šikmým uhlom, že nemôžu vstúpiť do objektívu. Do objektívu a do oka pozorovateľa sa dostanú len lúče, ktoré objekt odrazil, a objekt svieti v tmavom poli. Bočné osvetlenie sa dosiahne veľkým vychýlením zrkadla, alebo irisovej clony kondenzora z centrálnej polohy. Najjednoduchším zariadením na zaclonenie centrálnych lúčov je plná disková clonka, ktorá sa vkladá do kondenzora. Na dokonalé osvetlenie v tmavom poli sa používajú špeciálne zrkadlové kondenzory. V tmavom poli sa pozorujú malé objekty, ktoré nemožno rozlíšiť v svetelnom poli, objekty s malým indexom lomu vzhľadom na vodu, alebo objekty, ktoré sa nedajú farbiť.

Fluorescenčný mikroskop

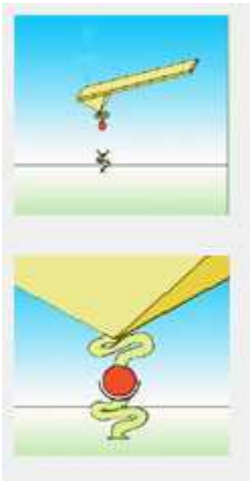
Princíp fluorescenčnej mikroskópie (obrázok 19) sa zakladá na tom, že ultrafialové žiarenie vyvoláva v mnohých organických aj anorganických látkach fluorescenciu, pričom vzbudené svetlo má podstatne väčšiu vlnovú dĺžku a tým sa stáva viditeľným. Pri osvetlení preparátu blízkym ultrafialovým, alebo modrofialovým svetlom (prípadne oboma súčasne) sa prejaví buď pôvodná fluorescencia látok, alebo sekundárna fluorescencia zapríčinená zafarbením fluoreskujúcimi činidlami – fluorochrómami, napr. akridínovou oranžou. Fluorescenčné farbivá sa používajú veľmi často pri vitálnom farbení, keďže nízke koncentrácie farbív živým bunkám neškodia. Akridínová oranžová je využívaná hlavne pri sledovaní nukleových kyselín pretože zapríčiňuje sekundárnu červenú fluorescenciu RNA a zelenú fluorescenciu DNA. Fluorescenčná mikroskópia sa využíva na mikroskopickú lokalizáciu fluoreskujúcich látok v biologických materiáloch.



Obrázok 19 Princíp fluorescenčného mikroskopu a fluorescenčný mikroskop

AFM mikroskop (mikroskop atomárnych síl)

Významnou technikou pri štúdiu štruktúr molekúl DNA stáva metóda AFM (Atomic Force Microscopy, obrázok 20). Princíp je založený na detekcii lokálnych atomárnych síl medzi vzorkou a ostrým hrotom, ktorý je umiestnený na ohybnom nosníku.

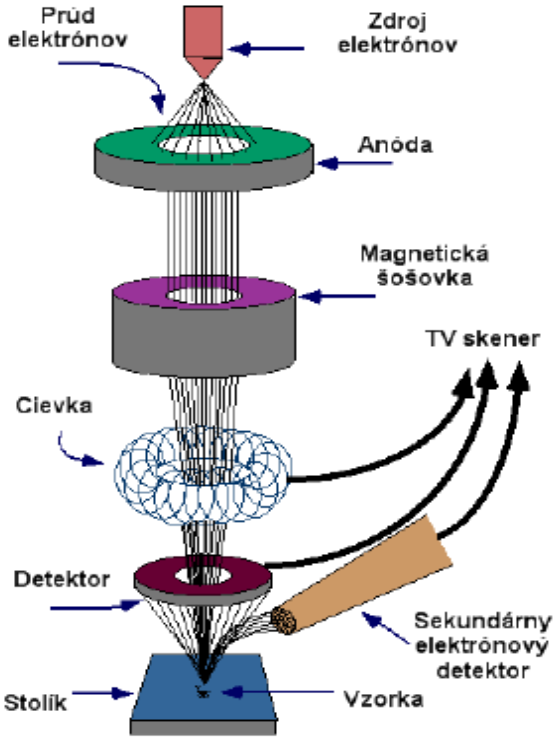


Obrázok 20 Princíp AFM mikroskopu a AFM mikroskop

Zmena vzájomného silového pôsobenia týchto objektov má za následok zmenu ohybu nosníka. Zmena ohybu je úmerná pohybu stopy laserového zväzku odrazeného od nosníka a vyhodnotí sa pomocou fotodetektora. Merania môžu byť uskutočnené nielen na vzduchu pri laboratórnej teplote, ale aj v roztoku, čo umožňuje študovať molekuly DNA takmer pri fyziologických podmienkach. Pomocou tejto metódy je možné detegovať prítomnosť alternatívnych sekundárnych motívov DNA, ako je krížová štruktúra, interakcie proteínov s DNA, ale aj vplyv rôznych ligandov na štruktúru DNA.

Skenovací elektrónový mikroskop

Skenovací elektrónový mikroskop (SEM, Scanning Electron Microscope, obrázok 21) je prístroj určený na pozorovanie povrchov najrôznejších objektov. Je to v podstate analógia svetelného mikroskopu s dopadajúcim svetlom, na rozdiel od neho je výsledný obraz tvorený pomocou sekundárneho signálu – odrazených, alebo sekundárnych elektrónov.



Obrázok 21 Princíp skenovacieho elektrónového mikroskopu a skenovací elektrónový mikroskop

Kôli tomu je zobrazenie v SEM považované za nepriamu metódu. Veľkou prednosťou SEM v porovnaní so svetelným mikroskopom je jeho veľká hĺbka ostrosti, v dôsledku ktorej

môže z dvojrozmerných fotografií zo SEM nájsť istý trojrozmerný aspekt. Ďalšou prednosťou týchto mikroskopov je, že v komore preparátov vznikajú pri interakcií urýchlených elektrónov so vzorkou ešte ďalšie, napr. rtg. žiarenie, Augerove elektróny, katódoluminiscencia, ktoré dávajú mnoho ďalších informácii o vzorke. Pri ich detekcii je možné určiť napr. prvkové zloženie preparátu v danej oblasti a pri porovnaní s vhodným štandardom určiť i kvantitatívne zastúpenie jednotlivých prvkov. V literatúre sa okrem názvu skenovací používa i označení rastrovací, alebo český názov riadkovací elektrónový mikroskop, ktorý naznačuje, že pri práci s mikroskopom sa primárny zväzok pohybuje po určitej ploche preparátu.

2 Sterilizácia a dezinfekcia

Pri dezinfekcii a sterilizácii sa používa niekoľko termínov.

Antimikrobiálny – pôsobiaci proti mikroorganizmom; činidlo, ktoré zabíja, alebo potláča rast a delenie mikroorganizmov.

Antiseptický – zamedzujúci nákaze mikróbami; látka ktorá inhibuje rast a vývoj mikroorganizmov bez toho, aby bol mikroorganizmus usmrtený.

Biocídny – všeobecný názov pre látky, ktoré usmrtia organizmus.

Chemický germicíd – chemikália, resp. zmes chemikálií, ktoré sa používajú na usmrtenie mikroorganizmov.

Dekontaminácia – akýkoľvek proces na odstránenie a /alebo usmrtenie mikroorganizmov. Rovnakým termínom sa označuje proces na odstránenie, alebo neutralizovanie nebezpečných chemikálii a rádioaktívnych materiálov.

Dezinfektant – chemikália, resp. zmes chemikálií, ktoré sa používajú na usmrtenie mikroorganizmov ktoré nevytvárajú spóry. Dezinfektanty sa používajú na čistenie povrchov, alebo objektov.

Dezinfekcia – fyzikálny, alebo chemický proces určený na usmrcovanie mikroorganizmov ktoré nevytvárajú spóry.

Mikrobiocíd – chemikália, resp. zmes chemikálií, ktoré sa používajú na usmrtenie mikroorganizmov. Tento termín sa často používa namiesto „biocíd, resp. chemický alebo antimikrobiálny germicíd“.

Sporocíd – chemikália, resp. zmes chemikálií, ktoré sa používajú na usmrtenie mikroorganizmov a spór.

Sterilizácia – proces, pri ktorom sa usmrcujú, alebo odstraňujú všetky druhy mikroorganizmov a spór.

2.1 Sterilizácia

Sterilizácia je akýkoľvek postup, ktorý deštruuje, alebo inaktivuje všetky živé formy mikroorganizmov. Medzi metódy sterilizácie patrí:

- sterilizácia suchým teplom
- sterilizácia vlhkým teplom
- filtráciou
- žiarením
- ultrazvukom a chemickými prostriedkami

2.1.1 Sterilizácia suchým teplom

Sterilizácia plameňom. Predstavuje najradikálnejší spôsob sterilizácie suchým teplom. Týmto spôsobom sa v mikrobiologickom laboratóriu sterilizujú hlavne bakteriologické kľučky. Bežne používané opaľovanie patrí tiež k sterilizácii plameňom. Opaľujú sa najmä hrdlá kultivačných nádob. Opaľovanie je ale menej účinné, vzhľadom na krátkodobé pôsobenie plameňa, ako i na možnosť kontaminácie z prostredia.

2.1.2 Sterilizácia horúcim vzduchom

Horúcim vzduchom sa sterilizuje v špeciálnych prístrojoch – v horúcovzdušných sterilizátoroch (sušiarňach), ktoré sú po autoklávoch najdôležitejším sterilizačným zariadením mikrobiologického laboratória. V horúcovzdušných sterilizátoroch sa najčastejšie sterilizuje sklo buď balené v alobale, alebo uzatvorené v kovových puzdrách (napr. pipety).

2.1.3 Sterilizácia vlhkým vzduchom

Pri sterilizácii živného média a kultivačného zariadenia je potrebné mať na zreteli skutočnosť, že prítomné, kontaminujúce mikroorganizmy vykazujú rôzny stupeň rezistencie. Podľa toho sa volí spôsob sterilizácie vlhkým teplom.

2.1.4 Sterilizácia varom

Vlhké teplo sa vo svojej najjednoduchšej podobe t.j. ako var najčastejšie využíva na dezinfekciu. Var nesterilizuje v pravom slova zmysle, lebo mnoho mikroorganizmov môže prežiť vo forme spór teplotu 100 ˚C. Preto sa táto metóda sterilizácie používa v mikrobiologickom laboratóriu zriedkavo.

Pasterizácia je čiastočná, jednorazová sterilizácia, pri ktorej sa ničia len vegetatívne formy mikróbov. Používa sa väčšinou na sterilizáciu potravín, napr. mlieka, smotany, vína a pod. Je to jednorazové zohriatie na teplotu 63-85 ˚C, ktorým sa usmrtia patogénne, alebo iné mikroorganizmy, ktoré znehodnocujú substrát.

2.1.5 Frakcionovaná sterilizácia (tyndalizácia)

Táto metóda sa používa pri sterilizácii tých látok, ktoré sa vysokou teplotou rozkladajú, alebo menia (cukry, aminokyseliny, vitamíny). Postup pri takejto sterilizácii je nasledovný:

Materiál sa zahrieva najčastejšie v Kochovom sterilizátore na teplotu do 100 ˚C, 30 minút.

Pri tejto teplote sa usmrtia vegetatívne formy mikróbov, ale termorezistentné spóry prežívajú. Materiál sa ponechá pri izbovej teplote a spóry, ktoré sterilizáciu tepom prežili, vyklíčia. Zničia sa až druhou, prípadne ďalšími sterilizáciami v 24 hodinových intervaloch.

Táto metóda nie je taká spoľahlivá ako sterilizácia v autokláve.

2.1.6 Sterilizácia v autokláve

Sterilizácia horúcou parou pod tlakom (autoklávovanie, obrázok 9) je najúčinnejší a najčastejšie používaný spôsob sterilizácie laboratórnych materiálov. Všeobecne sa uznáva väčšia účinnosť vlhkého tepla ako suchého. Na sterilizáciu laboratórneho materiálu a menších objemov živných médií používame autoklávy, v ktorých sa dá dosiahnuť teplota vyššia ako 100 ˚C. Sterilizácia je vtedy účinná, ak všetok materiál je po celý čas v kontakte s nasýtenou parou príslušnej teploty. Všeobecne používaný sterilizačný postup je:

- 3 minúty pri 134 °C
- 10 minút pri 126 °C
- 15 minút pri 121 °C
- 25 minút pri 115 °C

Pri tomto spôsobe sterilizácie sa usmrtia všetky vegetatívne bunky, kým spóry sú voči vysokej teplote rezistentnejšie.

Obrázok 9 Autokláv

2.1.7 Sterilizácia filtráciou

Touto metódou sa dajú sterilizovať plyny, tekutiny, živné pôdy a ich zložky, v ktorých sú esenciálne látky inými spôsobmi sterilizácie (hlavne teplom) rozkladané. Pri filtrácii sa mikróby zachytávajú na filtri a takto sa oddelia od živného prostredia. Veľkosť pórov u jednotlivých filtrov je rozdielna. Prechod tekutiny filtrom je vždy zrýchľovaný buď pretlakom, alebo podtlakom. V súčasnosti sa v mikrobiologických laboratóriách používajú membránové filtre, vyrábané na báze celulózy a acetátu s rôznymi veľkosťami pórov, sintrové sklenené filtre, Seitzove filtre, Barkefeldove a Chamberlandove filtre.

Ďalšími cennými pomôckami v laboratóriách sú aj **plazmový filter** ktorý má trojitú funkciu - pohlcuje pachy, ničí baktérie a zachytáva prach, **elektrostatický filter** zachytáva prach, **polyfenolový filter** (výťažky zo semienok grepu) obmedzuje rast baktérií, **filter s aktívneho uhlia** - zachytáva pachy a dezodoruje vzduch.

Sterilizácia filtráciou slúži hlavne na odstraňovanie baktérií z tekutín tam, kde iný spôsob dekontaminácie nie je vhodný. Vírusy prechádzajú väčšinou bakteriálnych filtrov. Podľa konštrukcie a použitého materiálu delíme filtre na:

Azbestové Seitzové filtre, ktoré sú lisované z azbestu a celulózy. Tieto filtre zadržujú baktérie a sú označené ako EK (Entkeimung). Filtračné vložky sú jednorázové a sterilizujú sa v autokláve.

Sklenené jenské filtre, sú zhotovené z bórosilikatóveho skla vo forme poréznych doštičiek zatavených v nálevkách. Používajú sa opakovane. Po použití sa čistia kyselinou sírovou alebo chrómsírovou a premývajú sa dôkladne vodou. Sterilizujú sa horúcim vzduchom alebo v autokláve.

Membránové filtre, sú vyrobené z nitrocelulózy a majú rôznu veľkosť pórov a priemer. Vyrábajú sa pod názvom Synpor. Vkladajú sa do špeciálnych kovových náleviek a sterilizujú sa v autokláve alebo UV žiarením germicídnou lampou 20-30 minút zo vzdialenosti 50 cm.

2.1.8 Sterilizácia žiarením

Ultrafialové žiarenie (UV) – optimálny bakteriocídny účinok je pri vlnovej dĺžke približne 254 nm, keď je toto žiarenie maximálne absorbované nukleovými kyselinami. Ako žiariče sa používajú obvykle germicídne lampy. UV žiarenie slúži na sterilizáciu vzduchu a pracovných plôch (napr. očkovacích boxov) priamo vystaveným lúčom. Používa sa na sterilizáciu operačných sál, aseptických boxov, pitevní, odberových miestností v liečebňach (napr. tuberkolóznych) a pod. Ožiarenie nemôže nahradiť sterilizáciu pomocou dezinfekčnách prostriedkov. Účinnosť klesá so vzdialenosťou.

Ionizujúce žiarenie – je výhodné, pretože penetruje, ale nezahrieva sterilizovaný predmet a nemení vlastnosti väčšiny sterilizovaných látok. Zdrojom gama žiarenia v praxi je obvykle rádioaktívny kobalt (^{60}Co). Gama žiarenie sa používa pri priemyselnej sterilizácii (obväzový materiál, plasty). Medzinárodne stanovená sterilizačná dávka je 27 kGy.

2.1.9 Sterilizácia ultrazvukom

Jedným zo spôsobov likvidácie mikroorganizmov je sterilizácia ultrazvukom. Mikrobiocídny účinok na mikroorganizmy je podmienený ich morfologickými a

fyziologickými vlastnosťami a frekvenciou zvuku. Najcitlivejšie sú vláknité formy mikroorganizmov, menej citlivé sú niektoré tyčinkovité formy baktérií a najodolnejšie sú koky. Mladé bunky sú citlivejšie ako staré.

2.1.10 Sterilizácia chemickými prostriedkami

Podmienkou pre použitie chemických látok na sterilizáciu je stupeň ich biocídneho účinku pri nízkej koncentrácii, za normálnej teploty a tlaku a v relatívne krátkom čase. Vzhľadom k vysokej chemickej reaktivite týchto látok je potrebné brať do úvahy aj ich nebezpečnosť (toxicitu, výbušnosť, horľavosť, narušenie sterilizovaného materiálu). Chemické látky sa používajú hlavne na sterilizáciu prístrojov, zariadení a niekedy aj na sterilizáciu živných pôd.

2-Oxeacetón je kvapalina, často používaná k chemickej sterilizácii. Je silne biocídny, nevýhodou je jeho rýchla hydrolýza. Používa sa na sterilizáciu živných pôd a pri dlhotrvajúcej expozícii je možné 2-oxeacetón použiť na sterilizáciu alebo aspoň na výrazné zníženie počtu mikroorganizmov v laboratórnych miestnostiach, očkovacích boxoch a pod.

Oxiran je za normálnej teploty a tlaku bezfarebný plyn. V zmesi CO_2, N, alebo halogénnymi uhľovodíkmi (priemyselne Cryoxide) sa dá použiť na sterilizáciu napr. umelých hmôt.

Formaldehyd používa sa 1 % roztok pri 37 ˚C alebo 5 % pri laboratórnej teplote. Používa sa na sterilizáciu povrchových častí prístrojov a zariadení.

2.2 Dezinfekcia

Pod dezinfekciou sa rozumie ničenie patogénnych, choroboplodných ako aj ostatných zárodkov na predmetoch, alebo v prostredí najčastejšie chemickými prostriedkami. Je potrebné si uvedomiť, že dezinfekciou sa množstvo mikroorganizmov výrazne zníži, ale všetky sa nezničia.

Prípravky s obsahom **halogénov** patria sem deriváty chlóru, napr. chlórové vápno, ktoré sa používa na čiastočnú dezinfekciu, alebo chlóramín používaný na dezinfekciu rúk, dlážok, stolov. Chlórové prípravky sú prakticky nejedovaté. Nevýhodou je malá stabilita roztokov, výhodou je široké spektrum účinnosti.

Zlúčeniny jódu – jódová tinktúra je vynikajúcim antiseptikom, účinkujúcim do hĺbky.

Alkoholy – z alkoholov sa na dezinfekciu používajú predovšetkým etylalkohol a propylalkohol. Alkoholové preparáty vplývajú na koaguláciu proteínov bakteriálnych buniek. Majú široké spektrum účinku.

Oxidačné činidlá – peroxid vodíka sa používa na dezinfekciu materiálov, ktoré obsahujú vírusy a na dezinfekciu rán. Používa sa na dezinfekciu najrôznejšieho materiálu, pokožky, na čiastočnú dezinfekciu vo veterinárstve a pod.

Povrchovo aktívne látky – z našich prípravkov sem patria Ajatín, Septonex, ktoré sa používajú na dezinfekciu kože, bielizne, pracovných plôch. Ich účinok je inaktivovaný mydlami.

Aldehydy – formaldehyd má široké spektrum účinku. Inaktivuje vegetatívne bunky rýchle, spóry a vírusy pomalšie. Používa sa na dezinfekciu miestností, laboratórnych stolov a pod.

Fenolové deriváty – fenol-krezolové preparáty a ich rôzne kombinácie, prítomné ako bakterioseptikum v mydlách, sprejoch a rôznych dezodorantoch. Účinné sú proti vegetatívnym bunkám, menej proti vírusom a spóram.

Ammónne zlúčeniny – nachádzajú sa napr. v špeciálnych mydlách, ktoré na rozdiel od mydiel normálnych vytvárajú na rukách film, ktorý má dlhšie trvajúci dezinfekčný účinok proti G^+ aj G^- baktériám. Nie sú účinné proti mykobaktériám a proti spóram baktérií.

Alkálie – najčastejšie sa používa hydroxid vápnika, sodíka, uhličitan sodný (sóda bikarbóna). Sú to dezinfekčné prostriedky, ktoré pôsobia hlavne na hydroxylové ióny.

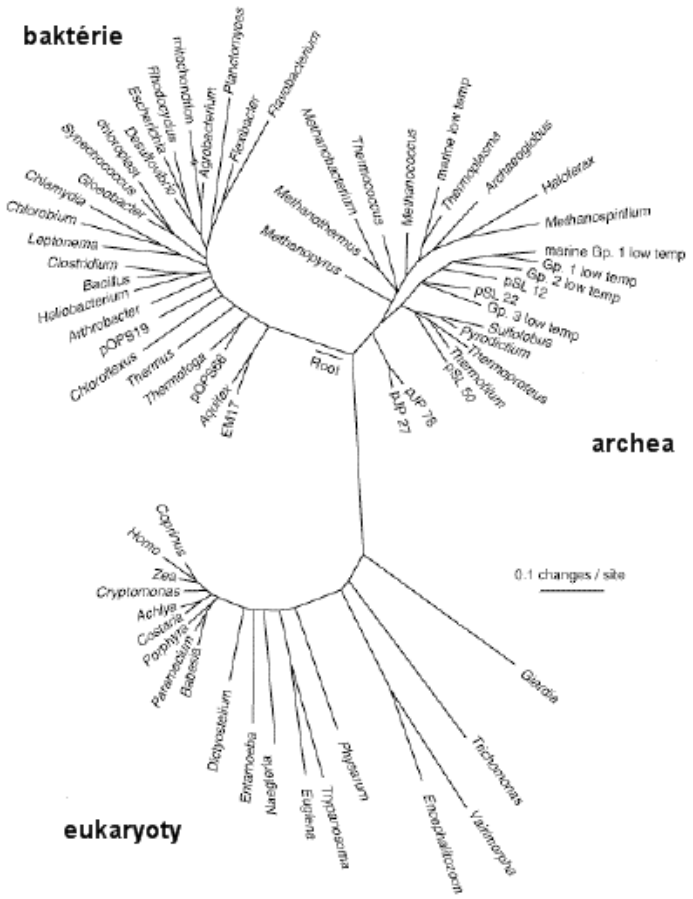
Soli ťažkých kovov – v súčasnosti sa už používajú veľmi málo, resp. sa prestávajú používať, lebo pri dlhodobom pôsobení sú toxické.

3 Mikrobiálna taxonómia

Systematické triedenie, čiže usporiadanie živých organizmov do skupín podľa charakteristických znakov, sa označuje termínom taxonómia. **Taxonómia** je vedecká klasifikácia, ktorá študuje prirodzenú príbuznosť súčasných ale, aj vyhynutých (fosílnych) rastlín, opisuje ich, ustanovuje ich vedecké pomenovanie – nomenklatúru a zaraďuje ich podľa príbuzných znakov a vývojových vzťahov do systému.

Klasifikácia mnohých baktérií je založená na fenotype. **Fenotyp** je súhrn všetkých (dedičných) vonkajších znakov a vlastností organizmu. **Genotyp** je súbor všetkých dedičných faktorov určitého organizmu, jedinec charakterizovaný dedičnými vlastnosťami. Farbenie podľa Gramma je najznámejším príkladom určovania fenotypu mikroorganizmov. Klasifikácia, ktorá je založená na fenotype/genotype sa volá **fenetická klasifikácia**. Slovo fenetický je zložené zo slova fenotyp a genetický.

Na klasifikáciu mikroorganizmov sú často používané aj **dendrogramy** (z gréckeho slova strom, (obrázok 22).



Obrázok 22 Dendogram

Oficiálna nomenklatúra mikroorganizmov je **binominálna**, čo znamená, že každé pomenovanie sa skladá z dvoch mien. Prvé meno sa píše veľkým písmenom a označuje rod (*genus*), kým druhé meno sa píše malým písmenom a označuje druh (*species*). Napr. *Pseudomonas aeruginosa* znamená, že *Pseudomonas* označuje názov rodu a *aeruginosa* označuje druh. Druhy sa môžu ďalej deliť na biovary, sérovary patovary, fagovary, morfovary, ktoré sa označujú aj ako biotypy, sérotypy a pod.
Binominálne pomenovanie platí aj pre vírusy, huby a prvoky. Binominálny systém bol vytvorený v 18. storočí Carolusom Linnaeausom, švédskym botanikom. Organizmy sú klasifikované do skupín v binominálnom systéme podľa svojich charakteristík.

Niektoré vysvetlenia pôvodu názvov mikroorganizmov

Mená mikroorganizmov vznikli:

1. podľa objaviteľov (*Escherichia* podľa Eschericha, *Listeria* podľa Listera, *Pasteurella* podľa Pasteura a pod.),
2. podľa miesta výskytu (*coli*-colon),
3. podľa morfológie (*Spirillum*-špirálovitý),
4. podľa tvaru a usporiadania (*Streptococcus*-guľovitý tvar v retiazkach, *Staphylococcus* - guľovitý tvar v skupinkách pripomínajúci tvar hrozna),
5. podľa ochorenia (*typhi*-týfus, *pneumoniae* – pneumónia),
6. podľa afinity k určitému miestu (*mesentericus* – mezentérium),
7. podľa vyvolania príznakov choroby (*monocytogenes* vyvolanie monocytózy, *icterohaemorrhagiae* – vyvoláva ikterus a hemorágiu).

Mikrobiológia sa prudko vyvíja a klasifikácia a nomenklatúra mikroorganizmov sa mení. V medicínskej praxi pretrvávajú niektoré staršie a modifikované názvy, ktoré si treba zapamätať, napr. pôvodca pneumónie *Diplococcus pneumoniae* sa teraz nazýva *Streptococcus pneumoniae* a na klinikách je známy len pod názvom *Pneumococcus*. Okrem triviálnych názvov sa používajú i skratky ako napr. BK – Bacil Kochov, čo je pôvodca tuberkulózy.

Z viacerých systémov vypracovaných v minulosti sa pri baktériách v súčasnosti uplatňuje jediný, nazvaný podľa amerického mikrobiológa Bergeyho. Založil a viedol v tridsiatych rokoch nášho storočia tzv. Manual Trust, skupinu systematikov, ktorí zhromažďovali a spracovávali v danom období dostupné poznatky o baktériách. Vydali r. 1923 dielo s názvom Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology, ktoré vychádza v opakovaných a

prepracovaných vydaniach a obsahuje najnovšie princípy klasifikácie s rešpektovaním výpočtovej techniky, genetických analýz, biochemických pokrokov a pod. Baktérie sú v ňom roztriedené do 33 sekcií.

Sekcia 1. Spirochéty.

Sekcia 2. Aeróbne/mikroaerofilné pohyblivé gramnegatívne baktérie špirálovitého, alebo vibriovitého tvaru.

Sekcia 3. Nepohyblivé (alebo málo pohyblivé) gramnegatívne zakrivené baktérie.

Sekcia 4. Gramnegatívne aeróbne tyčinky a koky.

Sekcia 5. Fakultatívne anaeróbne gramnegatívne tyčinky.

Sekcia 6. Anaeróbne gramnegatívne rovné, zakrivené a špirálovité tyčinky.

Sekcia 7. Baktérie s disimilačnou redukciou síranov, alebo síry.

Sekcia 8. Anaeróbne gramnegatívne koky.

Sekcia 9. Rikettsie a chlamýdie.

Sekcia 10. Mykoplazmy.

Sekcia 11. Endosymbionty.

Sekcia 12. Grampozitívne koky.

Sekcia 13. Sporulujúce grampozitívne tyčinky a koky.

Sekcia 14. Pravidelne nesporulujúce grampozitívne tyčinky.

Sekcia 15. Nepravidelne nesporulujúce grampozitívne tyčinky.

Sekcia 16. Mykobaktérie.

Sekcia 17. Nokardioformné baktérie.

Sekcia 18. Anoxygénne fototrofné baktérie.

Sekcia 19. Oxygénne fotosyntetické baktérie.

Sekcia 20. Aeróbne chemolitotrofné baktérie.

Sekcia 21. Baktérie pučiace a baktérie s výbežkami.

Sekcia 22. Opuzdrené baktérie.

Sekcia 23. Nefotosyntetické, nefruktifikujúce kĺzavé baktérie.

Sekcia 24. Fruktifikujúce kĺzavé baktérie (myxobaktérie).

Sekcia 25. Archaeobaktérie.

Sekcia 26. Nokardioformné aktinomycéty.

Sekcia 27. Aktinomycéty s multilokulárnymi sporangiami.

Sekcia 28. Aktinoplanety.

Sekcia 29. Streptomycéty a príbuzné rody.

Sekcia 30. Maduromycéty.

Sekcia 31. Termomonospóry a príbuzné rody.

Sekcia 32. Termoaktinomycéty.

Sekcia 33. Iné rody – organizmy v tejto sekcii nepatria do žiadnej z predchádzajúcich sekcií, napr. rody, *Glycomycetes*, *Kibdelosporangium*, *Kitasatospiria*, *Saccharothris* a *Pasteuria*.

Názvy rodov a druhov sú prevažne latinské a vyslovujú sa podľa výslovnosti stredovekej latinčiny

- **c** pred a, o, u samohláskou a na konci slova sa číta ako **k**, napr. *Leuconostoc dextranicum,*
- **c** pred e, ae, oe, i, y sa vyslovuje ako **c**, napr. *Bacillus cereus,*
- **s** pred samohláskou uprostred slova a uprostred kmeňa) sa číta ako **z**, napr. *L. casei,* v ostatných prípadoch sa číta ako **s** *(Saccharomyces, Desulfotomaculum),*
- **ae, oe** sa číta ako **é**, **ti** po ktorom nasleduje samohláska, číta sa ako **ci**, napr. *Dematium pullulans, Spirochaetales,*
- **di, ti ni, li** sa číta ako **dy, ty, ny, ly**,
- **ph** sa číta ako **f**, napr. *Phialofora*.

Tieto vedecké názvy sú nesklonné.

Používajú sa aj triviálne názvy – môžu sa skloňovať, píšu sa malými písmenami napr. mikrokoky.

Niektoré názvy sú odvodené – podľa zvyklostí slovenskéko jazyka, napr. „escherichie“- ešerichie, „shigely“ – šigely a pod.

4 Príprava preparátov na mikroskopické pozorovanie

Preparáty so živými mikróbmi (natívne, nefixované preparáty) slúžia na pozorovanie pohybu mikroorganizmov, na meranie veľkosti buniek, na sledovanie klíčenia výtrusov húb, spór anaeróbnych baktérií, pučanie kvasiniek, pozorovanie aktinomycét a prípadne štúdiu bunkového obsahu. Preparáty sa pripravujú v kvapke sterilnej vody, prípadne iného izotonického roztoku. Pre dlhšie a súvislejšie pozorovanie niektorých vlastností mikroorganizmov sú vhodné vlhké komôrky.

Bakteriálne bunky majú rôzny tvar, čo je dôležité pre ich klasifikáciu:

- Guľovité baktérie.
- Baktérie tyčinkovitého tvaru.
- Zakrivené baktérie.
- Vláknité baktérie.
- Vetviace sa baktérie.

Guľovité baktérie

Sú usporiadané rôzne v závislosti na tom v akých rovinách sa delia a ako ostanú po rozdelení spojené:

- diplokoky - dvojice,
- streptokoky - retiazky,
- tetrakoky - štvorice,
- koky usporiadané do kociek,
- stafylokoky - strapcovito usporiadané.

Baktérie tyčinkovitého tvaru

Tvoria charakteristické zoskupenia ako koky a rozoznávame u nich:

- diplobaktérie – dvojice baktérií,
- streptobaktérie – retiazky baktérií,
- palisádové zoskupenia baktérií.

Zakrivené baktérie

- Vibria – ľahko (rohlíkovité) zakrivené tyčinky,
- spirily – ľahko zvlnené tyčinky,
- spirochéty – tyčinky šrubovitého tvaru.

Vláknité baktérie

Sú bakteriálne bunky, ktoré vytvárajú dlhé tenké vlákna.

Vetviace sa bakteriálne bunky

Niektoré bakteriálne bunky sa vetvia buď úplne, alebo prejavujú náznaky vetvenia.

Úloha 1: Príprava natívneho preparátu

Pozorujeme živé, nezafarbené mikroorganizmy, ich pasívny, resp. aktívny pohyb.

Pozorovaný objekt: Baktérie rodu *Bacillus* patria podľa Bergey´s Manual of systematic Bacteriology (1984) do ríše *Prokaryotae* a triedy *Firmibacteria.* Príslušníci tohto rodu patria k bežne sa vyskytujúcim druhom v prírode, hlavne v pôde. Väčšina druhov je nepatogénnych, výnimku tvorí *Bacillus anthracis*, čiastočne *Bacillus cereus* a skupina druhov patogénnych pre hmyz (*Bacillus thuringiensis, Bacillus pupillae*). Niektoré druhy sú využívané priemyselne ako producenti antibiotík, pretože produkujú látku antibakteriálneho charakteru - bacitracín (*Bacillus licheniformis, Bacillus subtilis, Bacillus polymyxa, Bacilljus brevis*).
Bacillus subtilis je pozorovaný v sennom náleve. V prírode sa vyskytuje bežne, za nepriaznivých podmienok sporuluje. Jeho spóry, sú veľmi termorezistentné.

Pomôcky: podložné a krycie sklíčko, destilovaná voda, senný nálev, bakteriologická kľučka, filtračný papier, pinzeta, pipety.

Pracovný postup: Na čisté podložné sklíčko sa prenesie vypálenou a ochladenou bakteriologickou kľučkou malé množstvo zo senného nálevu. Pozorujeme pohyb (pomalý, rýchly, žiaden) a zakresľujeme tvar. Nevýhodou natívneho preparátu je, že z neho rýchlo vysýcha voda.

Ak použijeme krycie sklíčko, ak je potrebné, doplňuje sa voda tzv. presakovacou technikou. K jednému okraju krycieho sklíčka sa prikvapne voda, resp. nový roztok, k protiľahlému okraju sa priloží prúžok filtračného papiera, s ktorým sa odsaje pôvodná

tekutina z preparátu. Súčasne s tým sa nasáva nová tekutina z protiľahlej strany pod krycie sklíčko.

Preparát zakreslíme a zapíšeme zväčšenie (pozri prílohu).

Úloha 2: Príprava fixovaného preparátu

Pozorujeme fixované, zafarbené mikroorganizmy.

Preparáty s mŕtvymi mikróbmi (fixované preparáty) sa pripravujú najmä pre pozorovanie morfologických znakov, na rozlíšenie bunkových štruktúr a zoskupenie buniek. Aby zreteľne vynikli ich kontúry a vnútorná stavba buniek, musia sa farbiť. Pretože mŕtve bunky lepšie prijímajú farbivo, ktoré rovnomerne prenikne do celého obsahu bunky, farbeniu predchádza fixácia.

Úlohou fixácie je usmrtenie a prichytenie buniek na podložné sklíčko, ale i zachovanie nezmenenej štruktúry buniek. Baktérie sa najčastejšie fixujú teplom nad plameňom kahana, alebo rôznymi chemickými činidlami (metanolom, acetónom, formaldehydom atď.).

Pozorovaný objekt: Baktérie mliečneho kvasenia predstavujú veľkú skupinu „užitočných“ baktérií s podobnými vlastnosťami. Ako konečný produkt pri fermentácii tvoria všetky kyselinu mliečnu. V prírode sú veľmi rozšírené a nachádzajú sa taktiež v ľudskom tráviacom trakte. Najznámejšie je ich využívanie pri výrobe fermentovaných mliečnych výrobkoch, používajú sa však tiež pri nakladaní zeleniny, v pekárstve, pri výrobe vína, pri nakladaní rýb, ako aj pri výrobe mäsa a mäsových výrobkov.

Acidofilné mlieko vzniká kysnutím pomocou *Lactobacillus acidophilus*. V porovnaní s mliekom má viaceré priaznivé účinky. Je ľahšie stráviteľnejšie a má vyšší obsah niektorých vitamínov. Pôsobí aj proti prítomnosti škodlivých baktérií v čreve, čím upravuje ich funkciu. Ničí choroboplodné mikroorganizmy v žalúdku a v črevách, okrem toho povzbudzuje náš imunitný systém a podporuje trávenie. Acidofilné mlieko napomáha udržiavať zdravú črevnú mikroflóru a podporuje tvorbu protilátok. Je ľahko stráviteľné, pretože obsahuje mliečne kultúry, ktoré premieňajú mliečny cukor na kyselinu mliečnu.

Samovoľné skysnutie mlieka vzniká zo surového, alebo šetrne pasterizovaného mlieka obyčajne pôsobením baktérií *Streptococcus lactis*. Z pasterizovaného mlieka sa kysnuté mlieko pripravuje zaočkovaním čistou masliarskou kultúrou, ktorá obsahuje *S. lactis*, *S. cremoris*, *Leuconostoc cremoris* a *L. dextranicum*.

Predstavitelia rodu *Lactobacillus* sa vyskytujú v mlieku, v ústach a tráviacom trakte cicavcov, obilninách a iných rastlinách a v pôde. V mlieku spôsobujú prirodzené skvasovanie laktózy na kyselinu mliečnu. Pretože kyselina mliečna zastavuje rozmnožovanie hnilobných baktérii a stafylokokov, mliečne baktérie majú svoje uplatnenie pri konzervovaní zeleniny a niektorých krmív. Podľa produktov katabolického metabolizmu rozdeľujeme rod *Lactobacillus* na homofermentatívne mliečne baktérie, ktoré pri skvasovaní sacharidov produkujú len kyselinu mliečnu (napr. druhy *Lactobacillus delbrueckii, Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus plantarum*) a na heterofermentatívne mliečne baktérie, ktoré produkujú okrem kyseliny mliečnej ešte značné množstvo etanolu a CO_2, (*Lactobacillus fermentum, Lactobacillus brevis, Lactobacillus buchneri*). *Lactobacillus sp.* zohrávajú dôležitú úlohu v obmedzení ochorenia žalúdočno - črevného systému zvierat a človeka. Ich antibakteriálny efekt je daný predovšetkým tým, že mliečne baktérie produkujú a vylučujú do prostredia organické kyseliny, ktoré svojim kyslým pH zastavujú rast patogénnych baktérií.

Baktérie mliečneho kvasenia sa používajú aj v pekárenskom priemysle. Zmes baktérií *Lactobacillus casei* a *Lactococcus diacetylactis* sa používa pri výrobe mliečnych chlebov, a briošiek. *Lactobacillus plantarum* je ideálnym pre výrobu silne aromatických chlebov (syrové, korenisté atď.) ako aj pre pizzu, focacciu a krekery.

Známe medicínske účinky baktérií mliečneho kvasenia:

Úprava imunitného systému: *L. acidophilus, L. casei, L. plantarum, L. delbrueckii, L. rhamnosus*

Rovnováha črevnej mikroflóry: *L. acidophilus, L. casei, B. bifidum*

Protinádorový vplyv: *L. acidophilus, L. casei, L. gaserri, L.delbruecki, L. plantarum, B. infantis, B. adolescentis, B. bifidum, B. longum*

Prevencia cestovnej koliky: *Saccharomyces spp., zmes L. acidophilus, B. bifidum, Streptococcus thermophilus, L. bulgaricus,*

Prevencia rotavírusovej koliky: *L. rhamnosus, B. bifidum*

Prevencia hnačky zapríčinenej C. difficile: *L. rhamnosus, S. spp.*

Prevencia inej koliky: *L. acidophillus, L. rhamnosus, B. bifidum*

Pomôcky: podložné a krycie sklíčko, suspenzia baktérii mliečneho kvasenia, bakteriologická kľučka, filtračný papier, pinzeta, pipety, kahan.

Pracovný postup: Na čisté podložné sklíčko sa prenesie vypálenou a ochladenou bakteriologickou kľučkou malé množstvo suspenzie baktérii mliečneho kvasenia. Druhým podložným sklíčkom ju dôkladne rozotrieme a necháme voľne vysušiť. Po zaschnutí sa preparát fixuje teplom tak, že sklíčkom (s rozterom hore) niekoľkokrát prejdeme nad plameňom. Podložné sklíčko po fixácii nesmie byť veľmi horúce, pretože by sa narušila štruktúra buniek. Nedostatočná fixácia spôsobí to, že nanesením farbiva môžeme preparát zmyť.

Preparát zakreslíme a zapíšeme zväčšenie (pozri prílohu).

5 Farbenie mikroorganizmov

Morfológiu mikroorganizmov možno skúmať po ich fixácii a farbení. Farbenými preparátmi sa umožní lepšia rozlíšiteľnosť medzi viacerými druhmi mikroorganizmov, medzi jednotlivými bunkovými štruktúrami a pod.

Mikroorganizmy sa farbia najčastejšie syntetickými anilínovými farbivami. Molekuly týchto farbív majú chromofórové skupiny, ktoré sú nositeľmi farbiaceho účinku a auxochrómové skupiny, ktoré zabezpečujú disociovateľnosť farbiva a tým zosilňujú väzbu farbiva na bunkovú štruktúru.

Podľa auxochrómnych skupín sa rozdeľujú na:

1. Kyslé farbivá – (chromofór je anión) chovajú sa ako kyseliny a so zásadami tvoria soli (eozín, kongočevená a pod.).
2. Zásadité farbivá – (chromofór je katión) pôsobia najmä na zásadofilné čiastočky bunky – viažu sa na mastné a nukleové kyseliny v bunkách (metylénová modrá, genciánová violeť, safranín a pod.).
3. Neutrálne farbivá – sú soľami farebných zásad a farebných kyselín, alebo neutrálne zmesy zásaditých a kyslých farbív (Azúrová II-eozín).

Farbiace metódy, ktoré sa používajú v mikrobiológii rozdeľujeme na dve skupiny:

1. Monochromatické, orientačné farbenie, na ktoré sa používa jeden druh farbiva, pomocou ktorého sa znázornia charakteristické morfologické znaky mikroorganizmov – tvar buniek, alebo chemických zložiek buniek (škrob, glykogén, chromatín a pod.).
2. Diagnostické farbenie, pri ktorom sa mikroorganizmy farbia zmesou roztokov, pričom sa rôzne typy mikroorganizmov nefarbia rovnako. Táto rozdielna afinita k jednotlivým farbivám umožňuje rozpoznať niektoré diagnosticky podstatné vlastnosti mikroorganizmov.

Úloha 3: Monochromatické farbenie

Pozorovaný objekt: kultúry grampozitívnych a gramnegatívnych baktérií

Escherichia coli (*E. coli*) je fakultatívne anaerobná gramnegatívna bičíkatá tyčinkovitá baktéria. Bunky majú tvar tyčiniek, vyskytujú sa jednotlivo, alebo v pároch. Veľkosť kolíše od 1-1,5 μm. Pohybujú sa peritrichálnymi bičíkmi, ale sú známe aj nepohyblivé kmene. Kmene, ktoré sú izolované z patogénneho materiálu sú opúzdrené. Rastú za aeróbnych podmienok na bežných živných pôdach na ktorých tvoria malé a nepravidelné kolónie

s hladkým okrajom. V tekutých pôdach vytvárajú zákal. Rastú v rozmedzí teplôt 10 – 46 ºC, optimálna teplota pre rast je 37 ºC.

Je to baktéria, ktorá žije v hrubom čreve teplokrvných živočíchov, kde je užitočným komenzálom. Je jedným s najdôležitejších zástupcov črevnej mikroflóry a jej prítomnosť je potrebná pre správny priebeh tráviacich procesov v čreve. Za určitých okolností môže byť nebezpečný patogén, ktorý môže napadnúť apendix, močové cesty a brušnú dutinu a spôsobiť akútne aj chronické zápalové procesy.

Jej prítomnosť vo vode indikuje čerstvé znečistenie výkalmi a vylučuje použitie vody ako pitnej vody.

E. coli sa používa ako dôležitý modelový organizmus v genetike a mikrobiológii, ktorý je významný hlavne pre všeobecnú modelovú štúdiu baktérii. Ďalej je významná ako nástroj používaný kvôli svojej relatívnej jednoduchosti v biotechnológiach napr. pri prenose rekombinantých DNA pomocou konjugácie do iných organizmov a pod.

Pomôcky: bakteriologická kľučka, genciánová violeť, alebo zriedený karbolfuksín, podložné a krycie sklíčko, destilovaná voda, filtračný papier, pinzeta, pipety.

Pracovný postup: Pripravíme si dve čisté sterilné podložné sklíčka. Na ľavú stranu sklíčka kvapneme destilovanú vodu a vedľa kvapku kultúry baktérií. Hranou druhého podložného sklíčka kvapky zmiešame a urobíme rozter. Vysušíme ho nad plameňom, čím ho zafixujeme (šesťkrát prejdeme sklíčkom nad plameňom a nanesieme farbivo). Farbivo necháme pôsobiť 5 minút, opláchneme ho pod tečúcou vodou a necháme vysušiť.

Pozorujeme pod mikroskopom, objekt zakreslíme.

Gramovo farbenie

Metóda Gramovho farbenia, je pomenovaná podľa dánskeho bakteriológa Hansa Christiana Grama, ktorý túto metódu objavil v roku 1882 (publikovaná v roku 1884) a patrí k jednej z najdôležitejších techník v mikrobiológii. Bol to prvý test na identifikáciu baktérii. Pôvodné stanovenie v Gramovej metóde bolo s kryštálovou violeťou, tá je v niektorých modifikáciách metódy nahradená napr. metylénovou modrou, genciánovou violeťou a pod.

Nazýva sa aj diferenciálne stanovenie, pretože sa ňou odlišujú gramnegatívne a grampozitívne baktérie. Termín pozitívny a negatívny nemá nič spoločné s elektrickým nábojom, jednoducho opisuje dve odlišné morfologické skupiny baktérii.

Princíp metódy spočíva v tom, že farbivo – genciánová, alebo kryštáľová violeť tvorí s jódom komplex u gramnegatívnych aj grampozitívnych baktérií. Pôsobením organického

rozpúšťadla (alkoholu, alebo acetónu) gramnegatívne baktérie strácajú komplex farbiva a jódu, odfarbujú sa (ružovočervené), kým grampozitívne baktérie zostanú aj po tomto úkone sfarbené do modrofialova, teda zachovávajú si komplex farbiva a jódu v cytoplazme.

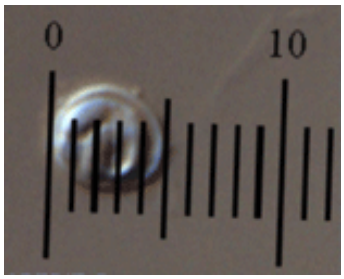
Tento rozdiel sa vysvetľuje tým, že gramnegatívne baktérie majú v bunkovej stene viac lipidov, ktoré sa rozpúšťajú v etanole, alebo acetóne, čím sa umožní vyplavenie komplexu z buniek. Grampozitívne baktérie majú v bunkovej stene podstatne viac peptidoglykánov a tvoria aj pomerne hrubšiu vrstvu. Polysacharidy bunkovej steny sú horšie priepustné pre alkohol a komplex farbiva a jódu sa nemôže vyplaviť z bunky.

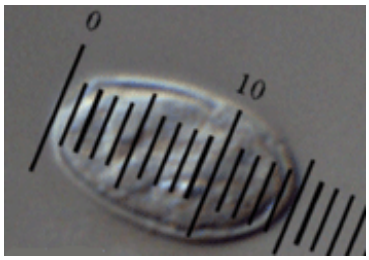
Úloha 4: Gramovo farbenie modifikované Huckerom

Pozorovaný objekt: kultúry grampozitívnych a gramnegatívnych baktérií
Pomôcky: genciánová violeť, Lugolov roztok, etylalkohol, zriedený karbolfuksín, podložné a krycie sklíčko, destilovaná voda, filtračný papier, pinzeta, pipety.
Pracovný postup: Na teplom fixovaný preparát na podložnom sklíčku navrstvíme roztok genciánovej violeti na 2 minúty. Farbivo zlejeme a preparát opláchneme pod tečúcou vodou. Potom na preparát navrstvíme na 2 minúty Lugolov roztok, zlejeme, opláchneme pod tečúcou vodou. Preparát preplachujeme etanolom dovtedy, kým neodteká zo sklíčka bezfarebný alkohol. Znova opláchneme vodou a dofarbíme zriedených karbolfuchsínom 1 minútu. Po opláchnutí farbiva preparát osušíme a pozorujeme imerzným objektívom.
Farbivo z preparátu sa musí zlievať aj oplachovať vodou vždy v jednom smere.

6 Meranie veľkosti mikroorganizmov

Veľkosť buniek sa zisťuje priamym meraním ich dĺžky a šírky (obrázok 23). Na meranie veľkosti sa používa okulárový mikrometer, okrúhle sklíčko, na ktorom sú dieliky s ľubovoľnou hodnotou. Sklíčko sa vkladá do okulára zhora stupnicou nadol. Hodnota dielika okulárového mikrometra v mikrometroch sa zistí objektívovým mikrometrom, brúseným podložným sklíčkom, na ktorom je vyryté delenie 10 mm na 100 dielov, po 10 mikrometroch. Ním možno zistiť skutočnú hodnotu dielika okulárového mikrometra. Je to ***mikrometrický koeficient*** príslušného objektívu a dĺžky tubusu. Namiesto objektívového mikrometra sa zasunie preparát, zmeria sa dĺžka a šírka objektu v dielikoch okulárového mikrometra a dieliky sa násobia mikrometrickým koeficientom. Získa sa skutočný rozmer objektu v mikrometroch. Hrúbka objektu sa meria mikrometrickou skrutkou mikroskopu zaostrením na dolný a horný povrch objektu a odčítaním posunu na skrutke. Počet objektov v zornom poli sa určuje sieťovým okulárovým mikrometrom, alebo štvorcovou okulárovou clonou.





Obrázok 23 Meranie pomocou okulárového mikrometra *Cryptosporidium* (vľavo) a *Giardia* (vpravo)

Úloha 5: Meranie veľkosti mikroorganizmov

Pomôcky: okulárový mikrometer, okrúhle sklíčko, suspenzia baktérii, bakteriologická kľučka, filtračný papier, mikroskop.

Pracovný postup: Okulárový mikrometer, okrúhle sklíčko, na ktorom sú dieliky s ľubovoľnou hodnotou vsunieme do okulára zhora stupnicou nadol. Hodnotu 1 dielika okulárového mikrometra zistíme objektívovým mikrometrom, na ktorom je vyryté delenie 10 mm na 100 dielov, po 10 mikrometroch. Ním možno zistiť skutočnú hodnotu dielika okulárového mikrometra.

V zornom poli stupnica okulárového mikrometra sa po zaostrení nastaví tak, aby sa počiatočné hodnoty mikrometrov (nulové) kryli. Potom je potrebné zistiť, ktoré nasledujúce dieliky oboch stupníc sa kryje, t.j. koľko dielikov objektívového mikrometra(o) prislúcha na určitý počet dielikov okulárového mikrometra (d).
Hodnota 1 dielika okulárového mikrometra sa vypočíta podľa vzorca:

$$\mathbf{H = \frac{o}{d} .10 \ [\mu m]}$$

H – hodnota 1 dielika
o – počet dielikov objektívového mikrometra
d – počet dielikov okulárového mikrometra

Príklad: 6 dielikov okulárového mikrometra sa rovná trom dielikom objektívového mikrometra, potom H = 3: 6 . 10 = 2 μm. Je to tzv. mikrometrický koeficient, ktorý je platný pre príslušný objektív pri danej dĺžke.

Namiesto objektívového mikrometra zasunieme preparát, zmeriame dĺžku a šírku objektu v dielikoch okulárového mikrometra a dieliky násobíme mikrometrickým koeficientom. Získame tak skutočný rozmer objektu v mikrometroch.

7 Stanovenie počtu mikroorganizmov

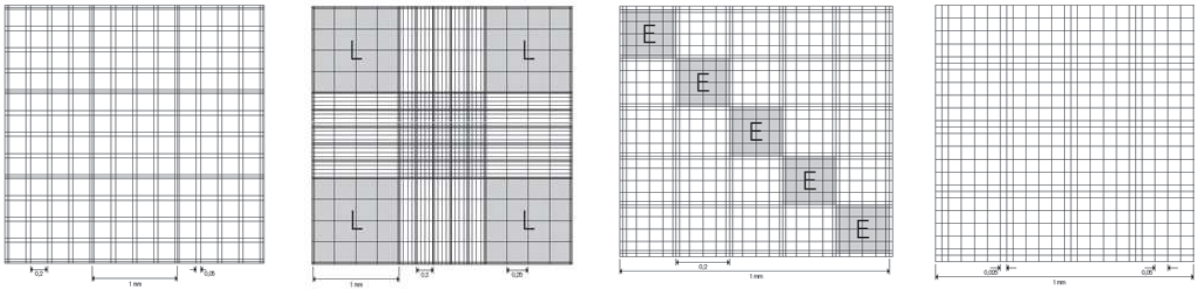
Metódy na stanovenie počtu mikroorganizmov delíme na priame a nepriame. Priamymi metódami sa počítajú bunky mikróbov v základnej alebo zriedenej suspenzii skúmaného substrátu prostredníctvom mikroskopu v počítacích komôrkach alebo pomocou fluorescenčnej mikroskópie.

Pri nepriamych metódach sa počítajú kolónie mikróbov, ktoré vyrástli na tuhých živných médiách po naočkovaní známeho objemu suspenzie, pričom sa vychádza z predpokladu, že každá kolónia pochádza z jednej bunky.

Pri zisťovaní počtu buniek sú ešte stále často používané počítacie komôrky. Využívajú sa hlavne v zdravotníctve (pri určovaní počtu bielych a červených krviniek a krvných doštičiek), ale svoje uplatnenie našli aj v mikrobiologických laboratóriách.

Pomocou komôrok sa môžu stanoviť napr. počty kvasinkových buniek, čo je veľmi dôležité na posúdenie rozmnožovania kvasníc, alebo stanovenia násadných kvasníc v potravinárskom priemysle.

V suspenzii o známom objeme sa počítajú bunky mikroorganizmov mikroskopicky vo vymedzenom priestore komôrky.



A **B** **C** **D**

Obrázok 24 Počítacie siete komôrok: **A** – podľa Bürkera, **B, C** – podľa Neubauera (priestor L je vyhradený na počítanie bielych krviniek, priestor E na počítanie červených krviniek a krvných doštičiek) a **D** – podľa Thoma

Počítaciu komôrku (obrázok 24) tvorí špeciálne silné podložné sklíčko, ktorého stredná časť je rozdelená na tri priečne obdĺžnikové polia. Stredné pole je o 0,1 mm nižšie ako dve postranné, takže po prikrytí krycím sklíčkom sa vytvorí nad stredným poľom komôrka o hĺbke 0,1 mm. Dno komôrky je rozdelené na štvorčeky, ktoré sú u jednotlivých typov

komôrok rozdielne. Medzi najznámejšie a v praxi najčastejšie používané patria Bürkerova, Thomova a Neubauerova komôrka..

Počítacia komôrka podľa Neubauera (zdokonalená) s dvoma počítacími sieťami. Hĺbka komôrky: 0,1 ± 0,002 mm, plocha počítacej siete: 9 mm^2. Počítacia sieť je tvorená 9 veľkými štvorcami. Štyri veľké krajné štvorce označované písmenom L a sú určené na počítanie bielych krviniek. Každý tento štvorec je rozdelený na 16 malých štvorčekov (plocha jedného štvorčeka je 0,0625 mm^2). Veľký prostredný štvorec v prostriedku počítacej siete je rozdelený do skupiny 245 štvorčekov (plocha jedného štvorčeka je 0,04mm^2). Každý štvorček z tejto 25 člennej skupiny sa skladá zo 16 malých štvorčekov (plocha jedného štvorčeka je 0,0025 mm^2). Päť skupín štvorčekov z veľkého prostredného štvorca uprostred počítacej siete sú označované písmenom E. Týchto päť skupín štvorčekov je určených na počítanie krvných doštičiek a červených krviniek.

Počítacia komôrka podľa Thoma s dvoma počítacími sieťami. Výška počítacieho priestoru (hĺbka komôrky): 0,1 ± 0,002 mm. Prostredný štvorec počítacej siete Thomovej komôrky odpovedá prostrednému veľkému štvorcu v komôrke podľa Neubauera. Komôrka sa používa na určovanie počtu červených krviniek a krvných doštičiek, stanovenie počtu kvasnicových buniek a pod.

Úloha 4: Počítanie buniek v Bürkerovej komôrke

Bürkerova komôrka

Má dve oddelené počítacie siete. Každá štvorcová sieť o ploche 9 mm sa delí na veľké štvorčeky o ploche 0,04 mm^2 , malé štvorčeky o ploche 0,0025 mm^2 a obdĺžniky o ploche 0,01 mm^2 , ktoré slúžia na počítanie. Prikrytím komôrky krycím sklíčkom sa vytvorí nad veľkým štvorčekom priestor o objeme 0,004 mm^3 ,nad malým štvorčekom 0,00025 mm^3 a nad obdĺžnikom 0,001 mm^3 to znamená že nad veľkým štvorčekom je to objem 1/250mm^3, nad malým 1/4000 mm^3 a nad obdĺžnikom 1/1000 mm^3.

Keď počet buniek je vo štvorčeku vyšší ako 20-30, treba pripraviť väčšie riedenie a celý postup opakovať. Pri správnom riedení sa postupne počítajú bunky v 80 až 100 štvorčekoch a to tak, že bunky, ktoré ležia alebo sa dotýkajú čiar štvorca, sa počítajú vždy len na dvoch zvolených stranách.

Celkový počet buniek v 1 cm^3 sa vypočíta podľa vzorca:

$$P = \frac{T.\ Z.\ 250}{X}$$

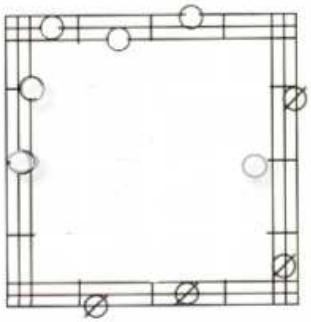
kde P = počet mikroorganizmov v 1 cm^3,

T = počet spočítaných buniek,

Z = číslo zriedenia,

X = počet štvorcov, v ktorých sa bunky počítali.

Metóda priameho počítania buniek pomocou mikroskopu sa používa najmä pri stanovení počtu mikroorganizmov väčších rozmerov, napr. kvasiniek, pretože pre veľkú hrúbku komôrky možno kultúry pozorovať len menším zväčšením. Na získanie presných výsledkov je potrebné pracovať s homogénnou suspenziou mikróbov. Táto metóda do celkového počtu zahŕňa aj neživé (mŕtve bunky), čím sú výsledky relatívne vyššie.



Počítame bunky na vrchnej a ľavej strane, nepočítame na pravej a spodnej strane.

Pomôcky: Bürkerova komôrka, krycie sklíčko, pipety, pinzety, filtračný papier, suspenzia mikroorganizmov (kvasiniek).

Pozorovaný objekt: Kvasinkové mikroorganizmy sú grampozitívne, aeróbne, nenáročné na kultivácie, skvasujú cukry. Nachádzajú sa v gastrointestinálnom trakte u zdravých ľudí.. Mikroorganizmy rodu *Candida* sú pôvodcami mykóz – kandidóz. Kandidózy sa môžu prejaviť ako mykóza kože a sliznice, ťažšie formy sú orgánové, postihujú púľca a bronchy, GIT, obličky atď.

Pracovný postup: Na vyvýšené plochy čistej počítacej komôrky sa položí pomocou pinzety v plameni opálené krycie sklíčko a pripevní držiakmi. Suspenzia mikroorganizmov sa pridáva

do komôrky nasledovným spôsobom: k okraju krycieho sklíčka nad počítacou komôrkou sa priloží pipeta a suspenzia sa opatrne vypúšťa tak, aby jeho povrch ostal suchý a aby sa pod sklíčkom kde suspenzia nasiakla nevytvorili bubliny. Takto pripravenú komôrku treba nechať v kľude 3-5 minút, aby bunky sedimentovali ku dnu. Bunky sa potom počítajú v mikroskope vo veľkom štvorčeku (0,04 mm^2) pri menšom zväčšení.

Test vitality

Pre rýchlu orientáciu o počte živých a mŕtvych buniek v suspenzii mikroorganizmov, je možné použiť test vitality. Tento test je založený na semipermeabilite – polopriepustnosti cytoplazmatickej membrány. Cytoplazmatická membrána sa uplatňuje ako osmotická bariéra, ktorá reguluje transport látok medzi živou bunkou a vonkajším prostredím. Táto funkcia je daná jej semipermeabilitou a prítomnosťou substrátovo špecifických enzýmov permeáz, ktoré umožňujú aktívny transport látok cez membránu, mŕtve bunky majú cytoplazmatickú membránu úplne priepustnú.

Pomôcky: kvasnice alebo suspenzia iných mikroorganizmov, Bürkerova komôrka, metylénová modrá, bakteriologická kľučka, pipeta, filtračný papier a mikroskop.

Pracovný postup: Najprv sa pripraví v skúmavke suspenzia kvasiniek v destilovanej vode. Kvapka suspenzie sa prenesie na podložné sklíčko a prikryje sa krycím sklíčkom. Potom sa preparát farbí tzv. presávacou technikou. Na jednej strane krycieho sklíčka sa prikvapkáva metylénová modrá a na druhej strane sa odsáva filtračným papierom tak dlho, kým nie je celý preparát zafarbený na modro.

Po 2-5 minútach farbenia sa počítajú živé a mŕtve bunky v 10 štvorčekoch Bürkerovej komôrky. Počet buniek sa prepočíta na 1 cm^3 pôvodnej suspenzie, resp. naváži sa určité množstvo kvasníc, ktoré sa suspenduje v určitom objeme vody a získané výsledky je možné hodnotiť ako percento živých a mŕtvych buniek na 1 g kvasníc.

Vitálnym testom je možno demonštrovať semipermeabilitu membrány živých buniek. V mikroskopickom obraze majú živé bunky zafarbenú len bunkovú stenu, mŕtve bunky sú zafarbené celé na modro.

Čas farbenia je potrebné dodržať, pretože po dlhšej dobe pôsobenia metylénovej modrej sa všetky bunky zafarbia na modro (metylénová modrá je pre baktérie toxická).

Vitálny test je jedným z laboratórnych testov napr. v pivovarníctve, kde platí, že kvasinky používané pre zákvas nesmú obsahovať viac ako 5 % mŕtvych buniek.

8 Príprava a charakterizácia kultivačných médií

Pod pojmom kultivačné médium (živné prostredie, živná pôda) rozumieme prostredie, v ktorom žijú alebo pôsobia mikroorganizmy, čerpajú z neho látky na syntézu potrebných bunkových zložiek a energiu na uskutočnenie biochemických procesov. Podmienkou úspešnej kultivácie je znalosť ich nárokov na prítomnosť nevyhnutných živín a podmienok kultivácie (pH, teplota, kyslík, CO_2 a pod.).

Kultivačné médium musí obsahovať všetky živiny, vhodný zdroj uhlíka, dusíka, minerálne látky, rastové faktory a pod., podľa druhu kultivovaných mikroorganizmov. Živiny sa majú vyskytovať vo forme, v ktorej sú najlepšie prístupné pre určitý druh mikroorganizmov. Najvhodnejšia je kvapalná forma, v ktorej sú najlepšie prístupné. Jednotlivé druhy mikroorganizmov sa veľmi odlišujú v nárokoch na výživu, kyslík, a v spôsobe získavania energie.

Podľa nárokov na výživu sa mikroorganizmy rozdeľujú na ***autotrofné*** a ***heterotrofné***. Autotrofné mikroorganizmy syntetizujú všetky zložky bunky z anorganických zlúčenín. Energiu získavajú oxidáciou anorganických zlúčenín, alebo premenou slnečnej energie na chemickú energiu, ako zdroj uhlíka využívajú CO_2 (riasy, cyanobaktérie, chemosyntetizujúce a fotosyntetizujúce baktérie). Heterotrofné mikroorganizmy využívajú ako zdroj uhlíka, vodíka alebo energie organické látky (väčšina baktérií, huby a prvoky). Heterotrofné mikroorganiz-my, ktorým na výživu stačia jednoduché organické zlúčeniny a anorganické soli sa označujú ako ***prototrofné***. Heterotrofy, ktoré si vyžadujú rastové faktory (vitamíny, aminokyseliny, dusíkaté zásady) sa nazývajú ***auxotrofné***.

Podľa spôsobu získavania energie sa mikroorganizmy rozdeľujú na ***fototrofné*** a ***chemotrofné***. Fototrofné mikroorganizmy získavajú energiu zo slnečného žiarenia a menia ju na energiu makroergických väzieb typu ATP, ktorú možno využiť na životné procesy v bunke. Obsahujú chlorofyl, alebo karoténové farbivá, ktoré využívajú na absorpciu svetla. Bunkovú hmotu syntetizujú z anorganických živín a z CO_2. Na redukciu CO_2 využívajú anorganické alebo organické zlúčeniny.

Podľa spôsobu redukcie CO_2 rozoznávame:

1. ***fotolitotrofné (fotoautotrofné)*** mikroorganizmy, ktoré na redukciu CO_2 využívajú vodík z anorganických zlúčenín. Napríklad sulfán a tiosíran sú zdrojmi vodíka pre sírne fototrofné baktérie. Zdrojom vodíka pre cyanobaktérie a riasy je voda.

2. ***fotoogranotrofné (fotoheterotrofné)*** mikroorganizmy využívajú jednoduché organické látky ako zdroj vodíka na redukciu CO_2 alebo ako zdroj uhlíka (niektoré riasy a nesírne purpurové baktérie). Chemotrofné mikroorganizmy získavajú energiu oxidáciou anorganických alebo organických látok a menia ju na energiu makroergických väzieb. Chemotrofné mikroorganizmy rozdeľujeme takto:

   1. ***chemolitotrofné (chemoautotrofné)*** mikroorganizmy získavajú energiu oxidáciou anorganických zlúčenín (H_2S, S, $H_2S_2O_3$, NH_3, HNO_3, Fe^{2+}, CH_3OH). Ako zdroj uhlíka využívajú CO_2. Patria sem skupiny sírnych, nitrifikačných, železitých a metánových baktérií.
   2. ***chemoorganotrofné (chemoheterothofné)*** mikroorganizmy získavajú energiu oxidáciou organických zlúčenín, ktoré využívajú zároveň ako zdroje uhlíka, vodíka a čiastočne aj kyslíka. Patrí sem väčšina baktérií, kvasinky, vláknité huby, prvoky. Podľa vzťahu chemoheterotrofných mikroorganizmov k molekulovému kyslíku ich rozdeľujeme takto:

      1. Obligátne (striktne) aeróbne – rastú len za prítomnosti kyslíka, energiu získavajú aeróbnou respiráciou (organické zlúčeniny sa oxidujú celkom na CO_2 a H_2O). Do tejto skupiny patria vláknité huby, octové baktérie, niektoré hnilobné baktérie a kvasinky.

      2. Obligátne (striktne) anaeróbne – rastú len bez prítomnosti voľného kyslíka, energiu získavajú redukciou dusičnanov alebo síranov, majú fermentatívny, alebo anaeróbny respiračný metabolizmus. Vzdušný O_2 na ne pôsobí inhibične až toxicky (baktérie rodov *Clostridium*, *Desulfotomaculum*).

      3. Fakultatívne anaeróbne – môžu rásť v prítomnosti aj bez prístupu vzdušného kyslíka. Prítomnosť kyslíka indukuje zmenu metabolizmu z kvasenia na dýchanie. V aeróbnych podmienkach sa rýchlejšie rozmnožujú, pretože aeróbny metabolizmus účinnejšie mení substrát na energiu a poskytuje viac energie na rast.

      4. Mikroaerofilné – majú anaeróbny metabolizmus, vyžadujú si nízke koncentrácie kyslíka, prípadne lepšie rastú pri zvýšenej tenzii CO_2 (mliečne baktérie rodu *Lactobacillus*).

Podľa nárokov jednotlivých typov mikroorganizmov na zdroje energie a na živiny sa zostavujú pre ne kultivačné médiá.

8.1 Zloženie kultivačných médií

1. ***Uhlík*** – je zložkou organických látok v bunke. Zdrojom uhlíka aj zdrojom energie pre heterotrofné mikroorganizmy sú sacharidy, lipidy, aminokyseliny, peptóny, bielkoviny, organické kyseliny, alkoholy. Do živných pôd sa pridávajú v rozličných koncentráciách. Zdrojom uhlíka pre autotrofné mikroorganizmy je CO_2.

2. ***Dusík*** – ako zdroje dusíka môžu mikroorganizmy využívať vzdušný dusík, dusitany, dusičnany, amónne soli, alebo organicky viazaný dusík v aminokyselinách, peptidoch, peptónoch až natívnych bielkovinách. Vzdušný dusík využívajú niektoré baktérie v procese fixácie dusíka (rod *Azotobacter*, *Rhizobium* a niektorí zástupcovia rodu *Clostrídium*). Plynný dusík je podobne ako dusičnanový dusík bunkami mikroorganizmov zmenený na amoniak a až v tejto forme slúži na syntézu dusíkatých zlúčenín v bunke.

3. ***Vodík a kyslík*** – ovplyvňujú metabolizmus mikroorganizmov a podmieňujú neutralizačné pochody. Ich zdrojom je predovšetkým voda. Sú zložkami väčšiny anorganických a organických látok.

4. ***Biogénne prvky*** – sú dôležitou zložkou výživy mikroorganizmov. **Fosfor** – je súčasťou nukleových kyselín, fosfolipidov a mnohých koenzýmov bunky. Zdrojom fosforu sú hlavne soli kyseliny fosforečnej. Potreba fosforu kolíše podľa jednotlivých mikroorganizmov a mikrobiálnych procesov. Nedostatok fosforu spomaľuje kvasné procesy a rast mikroorganizmov. **Síra** – vhodným zdrojom síry sú soli kyseliny sírovej, hlavne síran amónny. Mikroorganizmy môžu využívať aj sírne aminokyseliny (metionín, cystín, cysteín) a to hlavne pri syntéze aminokyselín a bielkovín. Pri vyšších koncentráciách cysteínu alebo cystínu sírovodík, ktorý je z nich odštiepený, inhibuje rozmnožovanie aeróbnych mikroorganizmov, pretože pôsobí toxicky na dýchacie procesy. **Draslík, vápnik, železo, chlór, a stopové prvky, molybdén, zinok, meď, kobalt, bór, nikel, zlato, antimón** sa pridávajú do živného média niektorým mikroorganizmom vo forme solí v malých koncentráciách.

5. ***Rastové faktory*** – auxotrofné mikroorganizmy nie sú schopné sami syntetizovať špecifické organické zlúčeniny - rastové faktory, ktoré sú nevyhnutné pre bunkové procesy a preto ich musíme pridávať do kultivačného média. Rastovými faktormi sú: vitamíny, aminokyseliny, purínové a pyrimidínové zásady, vyššie mastné kyseliny a pod., vystupujú v úlohe prekurzorov biosyntézy makromolekulových zlúčenín, alebo koenzýmov, nevyhnutne potrebných pre rast bunky. Napr. *Saccharomyces cerevisiae* vyžaduje pantoténovú kyselinu a biotín, rod *Rhodotorula* potrebuje ešte aj tiamín. Najnáročnejšie sú na vitamíny mliečne

baktérie (rod *Lactobacillus*) z ktorých niektoré si pre svoj rast vyžadujú až 6 rôznych vitamínov. Najnáročnejšie na prítomnosť aminokyselín je *Leuconostoc mesenteroides*, ktorý pre svoj rast potrebuje až 17 aminokyselín, niektoré mliečne baktérie potrebujú 2 až 3 aminokyseliny.

6. *Voda* – tvorí najväčší podiel živných médií a má rozličnú akosť. Je prostredím, v ktorom sú rozpustené živiny prístupné bunkám. Na prípravu pôd sa používa hlavne destilovaná voda. Čistá vodovodná voda sa používa na prípravu pôd z prirodzených materiálov. Nesmie však byť príliš tvrdá a nesmie obsahovať látky, ktoré potláčajú rast mikroorganizmov (železo, vápnik, chloridy, chlór).

7. *Aditíva pridávané do kultivačných médií* – pri príprave univerzálnych médií a živných pôd pre špeciálne účely sa pridávajú peptóny, rôzne extrakty, hydrolyzáty a pod. Médium sa tak obohatí o živiny, rastové faktory a tým sa zabezpečí optimálna výživa pre kultivované mikroorganizmy.

- **Extrakty** – získavajú sa varom substrátov vo vode, následným odstránením vody a úpravou do práškového stavu. Obohacujú pôdy o živiny a rastové faktory. ***Kvasničný extrakt*** – získava sa extrakciou autolyzovaných pekárskych, alebo pivných kvasníc. Obsahuje aminokyseliny, štiepne produkty plazmatických proteínov, biogénne prvky, vysoký obsah komplexu vitamínov B. ***Mäsový extrakt*** – získava sa z enzýmovo natrávenej svaloviny zvierat. Je bohatý na výživové látky ktoré sú nevyhnutné pre metabolizmus baktérií. ***Sladový extrakt*** – získava sa z jačmenného sladu. Má vysoký obsah sacharidov. Používa sa hlavne na kultiváciu kvasiniek a vláknitých húb.
- **Peptóny** – získavajú sa z proteínov pôsobením enzýmov. Ako substrát sa na ich prípravu používa mäso, pečeň, kazeín a pod. Sú zdrojom dusíka. Obsahujú peptidy, aminokyseliny, vitamíny, minerálne látky, peptóny a sacharidy.
- **Hydrolyzáty** – sú to zmesi peptidov aj aminokyselín, ktoré sa získavajú z proteínov hydrolýzou anorganickými kyselinami. Najčastejšie sa používajú hydrolyzáty kazeínu. Sú zdrojom peptidov, aminokyselín a rastových faktorov.
- **Selektívne pôsobiace látky** – zabezpečujú rastové podmienky len pre určité organizmy, ale znemožňujú, resp. spomaľujú rast iných mikroorganizmov. Patria tu: žlč, žlčové soli, azid sodný, farbivá, antibiotiká a pod.

8. *Stužovacie prostriedky* – používajú sa na stuženie živných pôd. – agar, želatína, kremičité gély.

• **Agar** – je to polysacharid, získaný z morských rias. Tvorí ho 95 % polysacharidov, ktoré sú čiastočne esterifikované kyselinou sírovou. Prevažnú časť tvorí agaróza a zvyšok agaropektín. Bod topenia agaru je 96 °C a bod tuhnutia 40 °C. Nie je zdrojom živín a mikroorganizmy ho prakticky nerozkladajú. V studenej vode sa nerozpúšťa až pri zahriatí. Agar po stuhnutí vylučuje kondenzačnú vodu, preto Petriho misky s vyliatou agarovou pôdou po stuhnutí uchovávame v chladničke dnom hore.

• **Želatína** – pripravuje sa zo šliach, koží, chrupaviek a kostí živočíchov. Dnes sa už používa veľmi málo, lebo niektoré mikroorganizmy želatínu rozkladajú čo sa prejavuje jej skvapalnením. V súčasnosti sa používa len na kultiváciu mikroorganizmov s nižším teplotným optimom a na dôkaz proteolytických vlastností mikroorganizmov.

• **Kremičité gély** – pripravuje sa z vodného skla. Používa sa na prípravu syntetických pôd, kde nie je vhodné použiť agar. Sú to pôdy pre kultiváciu autotrofných mikroorganizmov, ktoré vyžadujú prostredie bez organických zlúčenín.

8.2 Rozdelenie živných médií

Živné pôd sa môžu klasifikovať z rôznych hľadísk.

Podľa pôvodu a zloženia:

1. prirodzené – sú rastlinného, alebo živočíšneho pôvodu (mlieko, zemiakové rezy, mrkva, ovocné a zeleninové kaše, mäsový bujón, žlč a pod.). Sú vhodné na krátkodobú kultiváciu určitého mikroorganizmu a na izoláciu z prírodných zdrojov

2. umelé – chemicky definované, pripravené ako zmes organických a anorganických zlúčenín, môžeme ich ďalej rozdeliť na:

- **jednoduché (základné)** – sú bohaté na zdroj dusíka
- **obohatené (polosyntetické)** – okrem chemicky definovaných látok zlúčenín obsahujú aj odvary, maceráty, rastové faktory, nutričné a esenciálne látky
- **chemicky definované** (**syntetické)** – pripravujú sa z chemicky známych, presne definovaných zlúčenín (aminokyseliny, soli, vitamíny). Používajú sa pri štúdiu metabolických procesov mikroorganizmov.

Podľa konzistencie:

1. **tekuté** – vytvárajú najvhodnejšie podmienky pre rozmnožovanie mikroorganizmov (peptónová voda, bujóny). Nevýhodou je, že sa jednotlivé druhy mikroorganizmov nedajú izolovať.
2. **polotuhé** – sú spevnené agarom, alebo želatínou, sú to agarové, alebo želatínové gély. Používajú sa pri zisťovaní pohyblivosti a čistoty kultúry, tvorby kolónií a pod.
3. **tuhé** – sú prirodzené, alebo umelé, spevnené agarom. Umožňujú rast mikroorganizmov v izolovaných kolóniách.

Podľa použitia:

1. ***univerzálne*** – rastú na nich veľké skupiny fyziologicky odlišných mikroorganizmov, ale neumožňujú izoláciu jednotlivých druhov zo zmiešanej kultúry. Používajú sa aj na oživovanie metabolicky poškodených mikroorganizmov (mäsovo-peptónový bujón pre baktérie, sladina pre kvasinky a mikromycéty).
2. ***selektívne (elektívne)*** – svojím zložením podporujú rast len určitej skupiny mikroorganizmov a ostatné potláčajú. Medzi selektívne pôdy patrí napr. agar s briliantovou zeleňou, pre izoláciu a identifikáciu salmonel, MacConkey agar pre izoláciu gramnegatívnych červených paličiek a pod.
3. ***diagnostické*** – svojím zložením umožňujú rast určitých druhov mikroorganizmov, ktoré sú si blízke rastovými vlastnosťami, ale navzájom sa odlišujú biochemickou aktivitou. Sú to tekuté, alebo tuhé univerzálne pôdy, ku ktorým sa pridávajú rôzne látky. V dôsledku metabolickej činnosti mikroorganizmov sa pridané látky rozkladajú, redukujú, čo sa prejavuje charakteristickými makroskopicky viditeľnými zmenami pôdy (zmena farby, tvorba plynov a pod.). Medzi diagnostické pôdy patrí: krvný agar, Endova pôda a pod.
4. ***selektívno-diagnostické*** **–** obsahujú diagnostické a selektívne faktory, ktoré umožňujú vysoký záchyt a súčasne makroskopickú diferenciáciu niektorých druhov mikroorganizmov. Medzi selektívno-diagnostické pôdy patria: Willsonova - Blairova pôda na dôkaz salmonel, laktózová pôda pre diagnostiku enterobaktérií a pod.

8.3 Príprava živných pôd

Kultivačné pôdy sa dodávajú väčšinou komerčne, najčastejšie ako dehydratované, prípadne sa pripravujú podľa potreby v laboratóriu. Všetky komponenty pripravovaného živného média

sa navážia, rozpustia v destilovanej vode, v prípade potreby sa upraví pH, nádoba sa uzatvorí alobalom, vysterilizuje, ochladí, pridá sa kultúra a nechá sa podľa potreby kultivovať.

9 Očkovanie mikroorganizmov

Očkovanie (inokulácia) je prenesenie kultúry mikroorganizmov z prostredia v ktorom rástli, alebo sa udržiavali do čerstvého sterilného prostredia (pôdy). Očkovanie sa robí na tuhé sterilné pôdy napr. na agar v Petriho miske, šikmý agar v skúmavke, a pod., alebo do tekutých pôd. Očkovanie na tuhé pôdy umožňuje povrchový rast mikroorganizmov v izolovaných kolóniách. Tekuté pôdy slúžia predovšetkým ako pôdy na rozmnožovanie, tzn. na získanie väčšieho množstva mikroorganizmov.

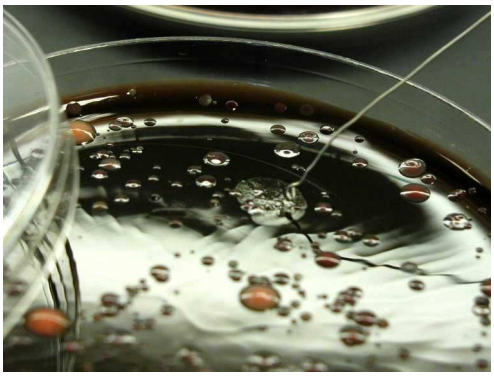
Naočkované pôdy sa inkubujú v termostate pri optimálnej teplote ich rastu. Pri očkovaní kultúr mikroorganizmov, alebo vyšetrovaného materiálu je nutné zachovávať prísnu sterilitu, aby nedošlo k sekundárnej infekcii pôd vzdušnou mikroflórou a tým k znehodnoteniu. Všetky pomôcky potrebné pri očkovaní mikroorganizmov musia byť umiestnené tak, aby sa mohlo pracovať rýchlo a nerušene. Bakteriologické kľučky, hrdlá baniek a fliaš, okraje skúmaviek a zátky sa pred a po každom úkone sterilizujú v plameni laboratórneho plynového, alebo liehového kahana. Bakteriologické kľučky sa opaľujú po celej dĺžke očkovacieho drôtika, najlepšie v zvislej polohe.

9.1 Očkovanie tekutých pôd

Tekuté pôdy sa očkujú bakteriologickou kľučkou, mikropipetou, resp. Pasteurovou pipetou. Bakteriologickou kľučkou sa očkuje kultúra mikroorganizmov, resp. vyšetrovaný materiál, takej konzistencie, ktorý sa môže ľahko nabrať očkom (obrázok 25).

9.1.1 Očkovanie bakteriologickou kľučkou

Je to najpoužívanejší spôsob očkovania živných pôd.



Obrázok 25 Odoberanie vzorky bakteriologickou kľučkou

9.1.2 Očkovanie pipetou

Rovnakým spôsobom ako pri očkovaní kultúr bakteriologickou kľučkou sa postupuje aj pri očkovaní mikropipetou, resp. Pasteurovou pipetou.

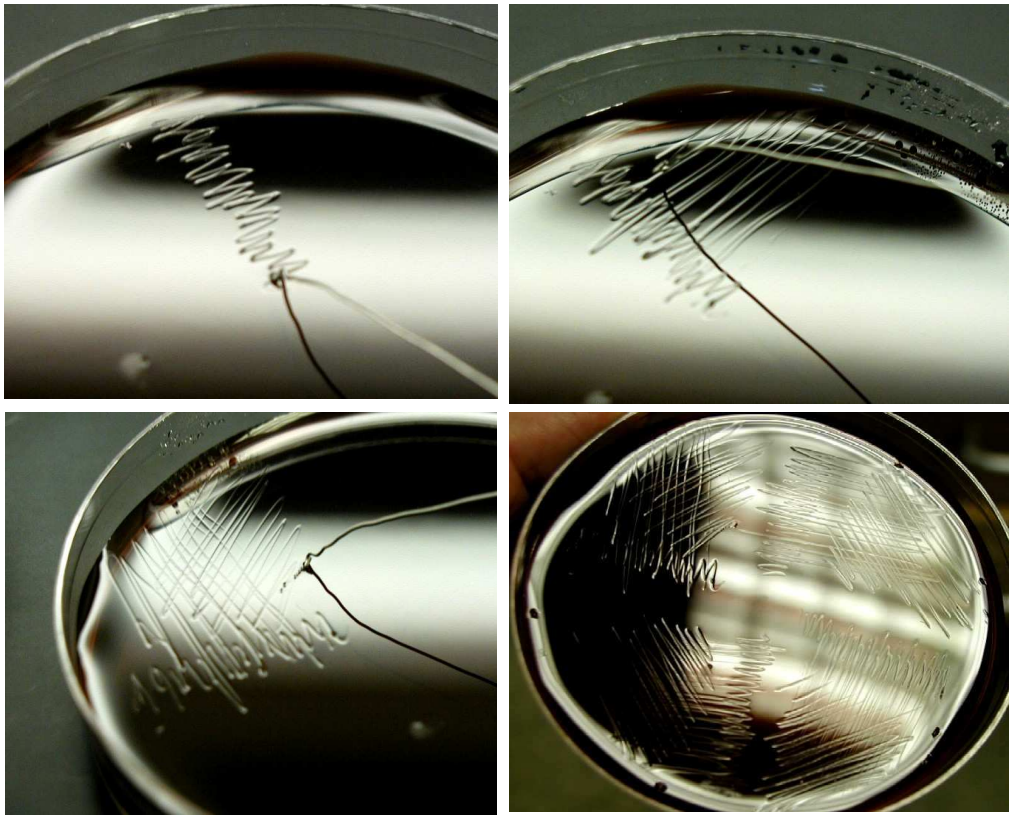
9.2 Očkovanie tuhých pôd

Suspenziu mikroorganizmov, čistú kultúru, alebo tuhý materiál možno očkovať na stužené pôdy v skúmavkách, alebo Petriho miskách rôznym spôsobom.

9.2.1 Očkovanie tuhých pôd v Petriho miske

Na tuhé pôdy sa očkujú čisté kultúry mikroorganizmov, zmiešané kultúry, alebo priamo vyšetrovaný materiál niekoľkými spôsobmi.

- ***Jednoduchý rozter*** bakteriologickou kľučkou. Používa sa vtedy, keď je potrebné získať čo najväčšie množstvo čistej kultúry mikroorganizmov. Pri očkovaní sa využíva celá plocha pôdy (obrázok 26).



Obrázok 26 Očkovanie tuhých živných pôd v Petriho miske

- ***Kruhový, rotačný rozter*** bakteriologickou kľučkou. Je vhodný na izoláciu jednotlivých druhov mikróbov zo zmiešanej kultúry. Suspenzia mikróbov, alebo vyšetrovaný materiál sa nanesie bakteriologickou kľučkou na malú časť tuhej pôdy vzdialenej od okraja 1 cm. Po opálení kľučky sa roztiera niekoľkými očkovacími čiarami po povrchu pôdy tak, aby sa dosiahlo čo najväčšie zriedenie inokula. Pre každý očkovací smer sa použije vždy vypálená a ochladená bakteriologická kľučka.
- ***Roztieranie*** mikróbnej suspenzie ***pomocou sterilných sklenených ohnutých tyčiniek***. Tento spôsob očkovania sa používa pri prenášaní čistej kultúry (väčšinou zriedenej) alebo mikróbnej suspenzie z tekutej pôdy na agarovú v Petriho miske. Napipetovanú kultúru prenesieme do stredu agarovej platne, pričom viečko misky je pootvorené iba na čas potrebný na očkovanie. Mierne ohnutou sterilnou tyčinkou v tvare hokejky, alebo trojuholníka roztierame kultúru rovnomerne po povrchu pôdy. Pri roztieraní kultúry sa dno Petriho misky otáča proti smeru hodinových ručičiek, zatiaľ čo tyčinka po smere.
- ***Očkovanie zaliatím do živnej pôdy.*** Touto metódou sa sleduje záchyt určitých mikróbnych druhov, alebo ich počet pri izolácii z prostredia. Suspenzia mikróbov sa prenesie do prázdnej, sterilnej Petriho misky a zaleje sa rozvarenou živnou pôdou, ochladenou na 45 °C. Krúživým pohybom misky na podložke sa pôda premieša s mikróbnou suspenziou a nechá sa stuhnúť.

10 Kultivácia mikroorganizmov

Pod pojmom kultivácia sa rozumie umelé rozmnožovanie mikroorganizmov na sterilných kultivačných pôdach, ktoré zabezpečujú ich optimálny rast a vývin. Kultivácia v kvapalnom médiu môže byť jednorazová, alebo kontinuálna.

10.1 Jednorazová kultivácia

Jednorazová kultivácia je charakterizovaná tým, že v uzatvorenom systéme sa mení koncentrácia buniek a súčasne aj ich fyziologický stav. Bunky rastú v prostredí, ktorého zloženie a vlastnosti sa menia v závislosti od životnej činnosti mikroorganizmov.
V každom prostredí sa mikroorganizmy rozmnožujú tak dlho, pokiaľ majú podmienky potrebné na delenie buniek, tzn. teplotu, tlak kyslíka, pH a redoxpotenciál. Rýchlosť, akou nové bunky pribúdajú, je teda adekvátna zmene podmienok príslušného prostredia. Rozmnožovanie teda prebieha vzostupne len po určité štádium, v ktorom po vyčerpaní živín a po nahromadení toxických produktov metabolizmu sa rast spomalí. V dôsledku zmien prostredia má rozmnožovanie mikroorganizmov fázový charakter. Sled jednotlivých fáz rozmnožovania v závislosti od času kultivácie vyjadruje rastová krivka mikroorganizmov. Niektoré mikroorganizmy počas jednorazovej kultivácie výrazne menia morfológiu buniek a rastú v tzv. rastových cykloch.

Spolu s prostredím, v ktorom rastú, tvoria mikroorganizmy ucelený systém. Tento systém môže byť buď uzavretý, alebo otvorený. Jednorazová kultivácia v kvapalnom médiu môže prebiehať v statických podmienkach, alebo submerzne.

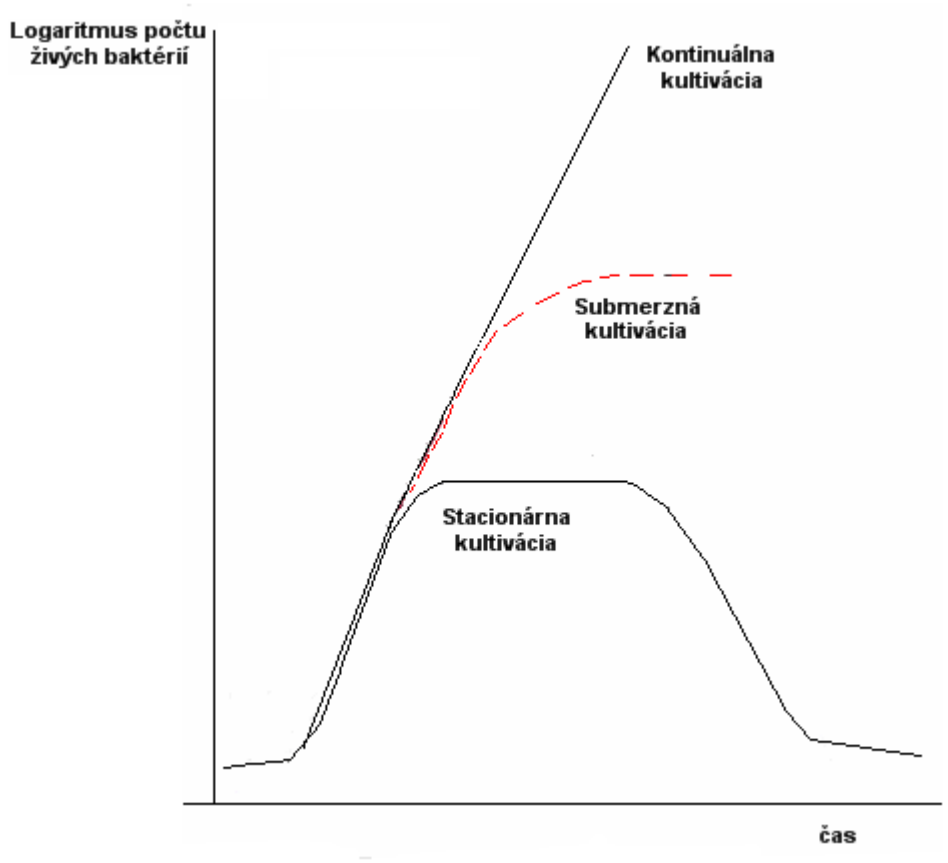
Pri ***statickej kultivácii*** rastú mikroorganizmy v prostredí, ktorého vlastnosti a zloženie sa mení v závislosti od životnej činnosti buniek. Rozmnožovanie nemá trvalo vzostupnú tendenciu, pretože prebieha v charakteristických fázach vzostupu a poklesu. Pretože všetky bunky, vrátane metabolických produktov, zostávajú celú dobu kultivácie v uzatvorenom priestore, je systém baktéria – prostredie charakterizovaný ako systém uzatvorený. Faktory, ktoré limitujú rast sú tu podmienené zmenami prostredia, ktoré sú vyvolané samotnými baktériami. Patria medzi ne predovšetkým vyčerpanie živín a nahromadenie odpadných produktov metabolizmu.

Aby sa dali živiny dokonalejšie využiť (tým dochádza aj k intenzívnejšiemu rozmnožovaniu) využíva sa pri statickej kultivácii premiešavanie, alebo prevzdušňovanie. Je

to tzv. ***submerzný spôsob kultivácie***. Využíva sa hlavne v oblasti priemyselnej mikrobiológie a je zamerané na získavanie napr. antibiotík produkovaných mikroorganizmami. Aj táto dokonalejšia metóda predstavuje uzatvorený systém (obrázok 27).

10.3 Kontinuálna (prietoková) kultivácia.

Pri tejto kultivácii sa mikroorganizmy kultivujú vo vhodných aparatúrach – zariadeniach, kde sa trvale (kontinuálne) privádzajú živiny – a odvádzajú sa produkty metabolickej činnosti mikroorganizmov.

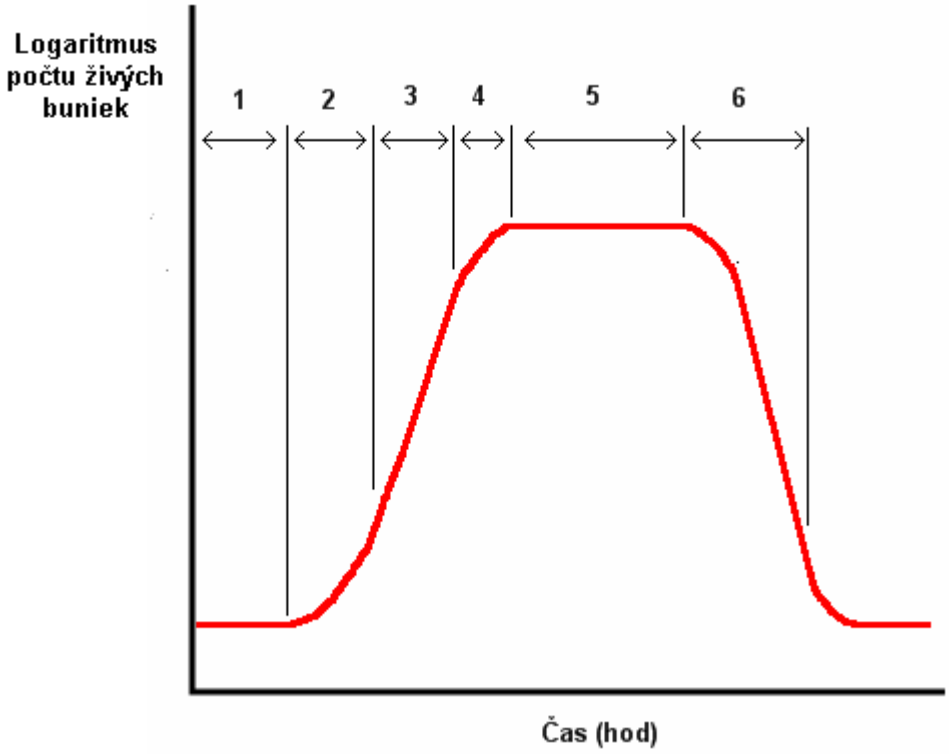


Obr. 27 Kontinuálna, submerzná a stacionárna kultivácia.

10.4 Rastová krivka

Odrazom zmien v prostredí statickej kultivácie je nepravidelný, fázovitý charakter rozmnožovania baktérií. Ak prenesieme bunky z kultúry, kde sa už nemôžu rozmnožovať, do optimálnych kultivačných podmienok, nedochádza ihneď k ich maximálnej rastovej rýchlosti. Ak si graficky znázornime narastanie počtu živých buniek za týchto podmienok tak,

že na os x si vynesieme čas (h) a na os y logaritmus počtu živých buniek v 1 cm^3, dostaneme tzv. rastovú krivku, ktorá má niekoľko úsekov (obrázok 28).



Obrázok 28 Rastová krivka

1. Lag fáza, **2.** fáza zrýchleného rastu, **3.** fáza logaritmická, alebo exponenciálna, **4.** fáza spomaleného rastu, **5**. fáza stacionárna, **6.** fáza poklesu, alebo zrýchleného odumierania.

Po prenose inokula do živného prostredia po počiatočnej stagnácii rozmnožovania buniek v statickej kultúre sa krivka zvyšuje a po vyvrcholení začína opäť klesať.

V niektorých časových úsekoch je rýchlejšia, v iných pomalšia. Na krivke tieto úseky tvoria tzv. rastové fázy. Pre väčšinu mikroorganizmov kultivovaných v statických podmienkach sú charakteristické tieto rastové fázy: lag fáza, fáza zrýchleného rastu, fáza logaritmická, alebo exponenciálna, fáza spomaleného rastu, fáza stacionárna, fáza poklesu, alebo zrýchleného odumierania.

1. Lag fáza

Je to obdobie, ktoré nasleduje po prenose mikroorganizmov do nového prostredia. Vyznačuje sa tým, že sa bunky prakticky nemnožia, naopak, ich počet sa často znižuje odumieraním buniek vývojovo starších a menej životaschopných. Prežívajúce bunky sa v tejto fáze prispôsobujú novým podmienkam, vytvárajú potrebné enzýmy a zväčšujú svoj objem hlavne

syntézou bunkových zložiek, nevyhnutných pre zahájenie procesov delenia, tzn. nukleových kyselín a proteínov. Trvanie lag fázy ovplyvňuje okrem povahy prostredia aj veľkosť a vek inokula. Dĺžka lag fázy závisí aj od druhu mikroorganizmu, fyziologickom stave buniek, napr. u *E. coli* sa môže doba lag fázy pohybovať v rozmedzí od 30 minút až 3 hodiny.

2. Fáza zrýchleného rastu

Predstavuje obdobie v ktorom je kultivovaná kultúra úplne prispôsobená podmienkam prostredia. Bunky sa začínajú rozmnožovať a zvyšuje sa ich rýchlosť delenia a intenzita ich metabolizmu. Vysoká fyziologická aktivita buniek je sprevádzaná ich zvýšenou citlivosťou k nepriaznivým faktorom prostredia.

3. Fáza logaritmická, alebo exponenciálna

Je charakteristická intenzívnym rozmnožovaním buniek, ich počet narastá geometrickým radom. Rýchlosť delenia je teda konštantná. Intenzívne delenia je sprevádzané aktívnym metabolizmom buniek, rýchlym využívaním substrátu a tvorbou metabolických produktov. Úbytok buniek, ktorý je spôsobený odumieraním je v pomere k prírastku nových jedincov minimálny. Medzi faktory, ktoré ovplyvňujú tieto fázy patria okrem druhových vlastností pestovanej kultúry predovšetkým povaha prostredia a teplota kultivácie.

4. Fáza spomaleného rastu

Vyznačuje sa postupným zabrzdením procesov rozmnožovania aj celkového metabolizmu. Rýchlosť delenia sa znižuje, pretože narastá počet odumierajúcich buniek. Uskutočňuje sa to hlavne v dôsledku zmien, ku ktorým dochádza v prostredí postupným vyčerpaním živín a hromadením metabolických produktov toxickej povahy. K nepriaznivo pôsobiacim faktorom prostredia, ktoré tieto pochody uskutočňujú , sú aj zmeny pH, redox potenciál a pod.

5. Fáza stacionárna

Je obdobím rastu, počas ktorého sa vplyvom pokračujúcich nepriaznivých zmien vyrovnáva počet odumierajúcich buniek v priebehu rozmnožovania kultúry. Rýchlosť delenia nadobúda nulovú hodnotu. Množstvo buniek nadobúda v tejto fáze maximum.

6. Fáza poklesu, alebo zrýchleného odumierania

Zodpovedá časovému úseku, ktorý je charakterizovaný narastajúcim úbytkom buniek, ktorý nadobúda stále väčšiu prevahu nad prírastkom. Rýchlosť delenia tu klesá pod nulovú hodnotu

a stáva sa negatívnou. Tento stav je podmienený zhoršujúcimi sa podmienkami prostredia. Zníženie koncentrácie živín pod kritickú hladinu má za následok zníženie aktivity metabolizmu, postupné odbúravanie rezervných látok a hromadné odumieranie buniek.

Úloha 5: Kultivácia *E. coli* v tekutom médiu

Pomôcky: Na l liter Luria-Bertrani (LB) roztoku budeme potrebovať: Bacto-tryptón (peptón) 10 g, Bacto-yeast extract 10 g, NaCl 5 g, doplníme do 1 litra destilovanou vodou, antibiotikum 100 μg/cm^3.

Postup: Navážime si Bacto-tryptón (peptón), Bacto-yeast extract, NaCl zmiešame ich v destilovanej vode a roztok dobre premiešame na miešačke magnetickým miešadlom (miešadlo necháme v banke). Banku s roztokom uzavrieme alobalom, vložíme do tlakovej nádoby a sterilizujeme 15-20 minút. Po vysterilizovaní ho ochladíme na izbovú teplotu, pridáme antibiotikum a kolóniu kmeňa, ktorú chceme kultivovať (pracujeme sterilne!).
Bakteriálne bunky kultivujeme v nádobe uzatvorenej alobalom v termostate pri 37 ºC. Ako inokulum použijeme nočnú bakteriálnu kultúru. Bunky necháme kultivovať cez noc.

Do Erlenmayerovej banky nalejeme 50 cm^3 bujónu a pridáme 100 mm^3 z bakteriálnej suspenzie E. coli. Z tejto zmesi budeme odoberať do 1 cm^3 kyvety a merať absorbanciu 5 hodín v 30 minútových intervaloch. Medzi jednotlivými meraniami kultúru udržiavame vo vodnom kúpeli s optimálnou teplotou pre rast E. coli (37 ºC). Ako slepý pokus použijeme bujón bez bakteriálnej suspenzie. Absorbanciu meriame pri vlnovej dĺžke 600 nm.

11 Určovanie citlivosti mikroorganizmov

11.1 Určovanie citlivosti mikroorganizmov na antimikrobiálne látky

Niektoré látky, ktoré sú prítomné v prostredí majú na mikroorganizmy nepriaznivý vplyv v dôsledku svojho špecifického chemického zloženia. Látky s nepriaznivými špecifickými účinkami na mikroorganizmy sa nazývajú antimikrobiálne, pretože len zastavujú rozmnožovanie mikroorganizmov (tzv. mikrobiostatické látky), alebo usmrcujú (mikrobiocídne látky). Ak pôsobia len na baktérie, nazývame ich bakteriostatické, resp. bakteriocídne látky, ak ovplyvňujú kvasinky a plesne, ide o látky fungistatické a fungicídne.

Po chemickej stránke sú antimikrobiálne látky veľmi rozmanité. Podľa mechanizmu účinku ich môžeme rozdeliť do troch základných skupín:

1. látky, ktoré poškodzujú určitú štruktúru bunky, alebo ich funkciu,
2. látky pôsobiace na mikrobiálne enzýmy,
3. látky, ktoré poškodzujú DNA.

K zlúčeninám, ktoré poškodzujú bunkovú stenu, alebo jej syntézu patrí u baktérií antibiotikum penicilín. Inhibuje syntézu peptidoglykánu a preto je účinný hlavne u grampozitívnych baktérií. K látkam, ktoré poškodzujú aktívne –SH skupiny enzýmov patria ióny ťažkých kovov, ich organické zlúčeniny, alkylačné činidlá a nenasýtené zlúčeniny. K látkam, ktoré pôsobia na DNA patria chemické mutagény, napr. silné alkylačné činidlá, deaminačné činidlá a niektoré protivírusové a protirakovinové (cytostatické) antibiotiká.
Syntézu DNA inhibuje napr. mitomycín C, iné antibiotiká svojou reakciou s DNA alebo s enzýmom RNA-polymeráza inhibujú transkripciu DNA.

Antimikrobiálne látky sú liečiva (antibiotika a chemoterapeutika), ktoré potláčajú rozmnožovanie, alebo inaktivujú patogénne mikroorganizmy (hlavne baktérie) v organizme hostiteľa.

Základnou vlastnosťou antibiotík (ktoré umožňujú ich liečebné použitie) je tzv. selektívna toxicita. Pre prax sú totiž významné také antibiotiká, ktoré pri svojom účinku na prokaryotické bunky nie sú toxické pre eukaryotické bunky hostiteľa. Spektrom účinnosti antibiotika sa rozumie účinok na určitú skupinu bakteriálnych druhov, rodov a pod. Termín **antibiotikum so širokým spektrom účinku** nevystihuje v súčasnosti postavenie jednotlivých druhov antibiotík, preto sa neodporúča jeho používanie. Antibiotika s úzkym spektrom účinku sú veľmi účinné na určité druhy baktérií. Výstižnejšie sa označujú ako **antibiotiká s cieleným účinkom.** Účinok antibiotík môžeme na základe jeho mechanizmu deliť na bakteriostaticky a

bakteriocídny. Antibiotika s bakteriostatickým účinkom zastavujú rozmnožovanie jednotlivých bakteriálnych buniek v organizme hostiteľa, pričom neničia baktérie. Antibiotika s baktericídnym účinkom ničia bakteriálne bunky *in vitro* a *in vivo*. Baktericídny efekt môžu mať aj bakteriostatické antibiotika vo väčších dávkach.

Bakteriálne bunky, na ktoré má antibiotikum baktericídny, alebo bakteriostaticky účinok, sa označujú ako citlivé, ostatné ako rezistentné. Kvantitatívne vyšetrenie citlivosti na rôzne dávky antibiotika určujú jeho najmenšiu účinnú koncentráciu, tzv. minimálnu inhibičnú koncentráciu. Minimálna inhibičná koncentrácia vyjadruje množstvo antibiotika (g x cm^{-3}, mg x l^{-1}), ktoré úplne potlačí rast kmeňa pestovaného *in vitro*. Za citlivý sa považuje kmeň, ktorého minimálna inhibičná koncentrácia je 2- 4x menšia než koncentrácia dosahovaná terapeuticky v krvi (klinický breakpoint). Za rezistentný sa považuje kmeň, keď sa rozmnožuje pri koncentrácii antibiotika výrazne vyššej než je priemerná minimálna inhibičná koncentrácia u kmeňov rovnakého druhu. V tomto prípade ide o získanú rezistenciu. Primárna rezistencia vyjadruje stav, keď antibiotikum je primárne neúčinné na daný mikrobiálny druh.

Citlivosť aerobných baktérií na antibiotiká sa v bežnej laboratórnej praxi najčastejšie určuje platňovým difúznym testom. Vykonanie testu citlivosti touto metódou je veľmi jednoduché.

Pri štandardnej metóde sa postupuje takto: ako kultivačná pôda sa používa DST agar (Oxford), Müllerova-Hintonova pôda, alebo 2 % živný agar s 5 % baranej krvi. Pôda má pH 7.2. Vylieva sa do normálnych Petriho misiek s rovným dnom v množstve 12-15 cm^3.
Ak na testovanie citlivosti sa namiesto subkultúry použije priamo infekčný materiál, je potrebné ho natrieť na povrch agaru kľučkou, alebo tampónom čo najbohatšie a opäť nechať zaschnúť.

Pri testovaní subkultúr gramnegatívnych baktérií sa používajú disky s týmito antibiotikami: ampicilínom, chloramfeniklom, tetracyklínom, kanamycínom, gentamycínom, kolimycínom a streptomycínom (prípadne aj sulfónamidmi a karbenicilínom).

Pri testovaní subkultúr grampozitívnych baktérií používame disky s týmito antibiotikami: penicilínom, ampicilínom, erytromycínom, tetracyklínom, chloramfeniklom, prípadne aj sulfónamidmi.

Platňové testy sú iba testy kvalitatívne. Umožňujú len určiť, či testovaný kmeň je, prípadne nie je citlivý na určitú koncentráciu antibiotika, zvyčajne zvolenú tak, aby citlivosť *in vitro* udávala ovplyvniteľnosť liečbou. Ak sa má určiť, na akú koncentráciu je testovaný kmeň citlivý, musia sa použiť testy kvantitatívne.

Príprava Müellerova-Hintonova pôdy: Müeller - Hintonov agar obsahuje mäsový extrakt a kyslý kazeínový hydrolyzát, ktoré sú zdrojom aminokyselín, dusíka, minerálov, vitamínov a iných rastových faktorov potrebných pre rast mnohých mikroorganizmov. Škrob podporuje rast paralyzovaním toxických faktorov prípadne prítomných v médiu. Výberom vhodných surovín sa zabraňuje prítomnosti rôznych antagonistov buď antibiotík alebo sulfónamidov. Mueller - Hinton je určený pre zisťovanie citlivosti mikroorganizmov na chemoterapeutiká, antibiotiká a sulfónamidy kvalitatívnym a kvantitatívnym spôsobom (metóda disková, MIC, MBC), prípadne na stanovenie hladiny týchto látok v sére a iných telových tekutinách.

Zloženie pôdy v 1000 cm^3 vody: hovädzí odvar (sušina) 10 g, kyslý kazeínový hydrolyzát 17.5 g, škrob 1.5 g, agar 15, pH 7.2 – 7.6.

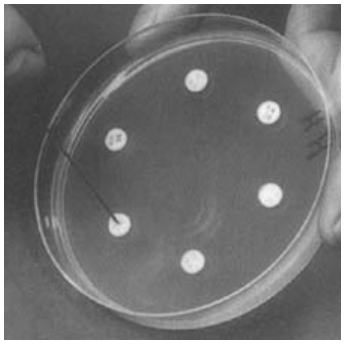
Postup: 44,0 g prípravku sa suspenduje v 1000 cm3 čistenej vody a nechá sa minimálne 30 minút napučiavať. Po rozvarení v prúdiacej pare počas 30 minút pri 100 °C sa autoklavuje 15 minút pri 115,0 °C. Po ochladení sa pôda vyleje do Petriho misiek s priemerom 10 cm po 15 - 20 cm3. Misky sa pred použitím sušia pri teplote 45°C až 50 °C, najdlhšie 30 minút.

Pridaním krvi do agarového média možno z neho pripraviť kvalitný krvný agar. Pridaním séra, hydrolyzátu albumínu, suplementu a cukrov sa pripravia kvalitné rozmnožovacie pôdy pre rad mikroorganizmov. Pri stanovovaní inhibičnej koncentrácie antibiotík sa spravidla inkubuje 24 - 48 hodín pri 37 °C.

Úloha 6: Určiť citlivosť *E. coli* na antibiotiká

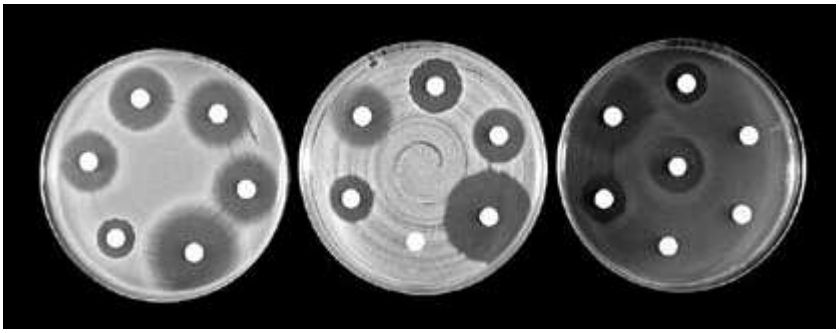
Pomôcky: Müeller - Hintonov agar, tetracyklín, ampicilín, Petriho misky, bakteriologická kľučka, disky z filtračného papiera, pipety, termostat

Postup: Testovaný kmeň sa naočkuje na pôdu tak, že povrch pôdy sa preleje približne 1 cm^3 suspenzie kultúry. Kolísaním Petriho miskou sa suspenzia rozleje po celom povrchu agaru, potom sa miska skloní na jednu stranu a tekajúca suspenzia sa odsaje Pasteurovou pipetou. Naočkované pôdy sa nechajú pootvorené asi 20 min zaschnúť. Ako zdroj antibiotika sa používajú papieriky (disky z filtračného papiera vhodnej kvality) v priemere 6 mm.



Obrázok 29 Prikladanie papierikov vypálenou ihlou na pôdu.

Tieto papieriky sa vypálenou pinzetou (obrázok 29), alebo ihlou prikladajú na povrch naočkovaných pôd tak, aby na jednej pôde bolo najviac 6-7 rozličných diskov, umiestnených vždy asi 2 cm od okraja misky v približne rovnakých vzdialenostiach od seba.
Naočkované pôdy sa inkubujú do druhého dňa pri 37 ºC a potom sa odčíta zóna zábranu rastu (inhibičná zóna) okolo zdroja antibiotika (obrázok 30). Ako citlivé kmene sa hodnotia kmene s inhibičnou zónou 12 mm. Paralelne s každou sériou testov samá určovať citlivosť štandardného kmeňa so známou citlivosťou na jednotlivé antibiotiká.



Obrázok 30 Príklad testu rezistencie baktérií (*Staphyloccocus aureus*) na antibiotiká. Na kultúru baktérií sú umiestnené disky s antibiotikami. Ak nie je baktéria voči príslušnému antibiotiku odolná, vytvorí sa okolo disku kruhová inhibičná zóna. Rezistentné baktérie rastú v prítomnosti antibiotík, teda aj v bezprostrednej blízkosti disku kde sa inhibičná zóna nevytvorí.

11. 2 Určovanie citlivosti mikroorganizmov na UV a γ-žiarenie

Elektromagnetické žiarenie rôznych vlnových dĺžok sa značne odlišuje svojim fyziologickým účinkom na mikroorganizmy.

Infračervené žiarenie a Hertzove vlny sami o sebe pravdepodobne nemajú smrtiaci účinok na mikroorganizmy a pôsobia len svojimi tepelnými účinkami.

Viditeľné svetlo (380-760 nm) a niekedy aj časť infračerveného žiarenia (800 – 900 nm) sa uplatňujú predovšetkým ako zdroj energie fototrofných mikroorganizmov. Viditeľné svetlo zrejme ovplyvňuje v pozitívnom aj negatívnom zmysle aktivitu mnohých ďalších mikroorganizmov, avšak mechanizmus týchto účinkov nebol doteraz objasnený. Napr. niektoré baktérie sa lepšie rozmnožujú za tmy, ale pre dobrú spoluráciu niektorých plesní je potrebné svetlo. Napr. sporangia niektorých plesní triedy *Zygomycetes* sa obracajú k zdroju svetla – tzv. fototropizmus.

Ultrafialové (UV) žiarenie má silné mutagénne a letálne účinky na mikroorganizmy. Najväčšie mutagénne a letálne účinky má UV žiarenie s vlnovou dĺžkou, ktoré je absorbované nukleovými kyselinami (260-265 nm). Vlnové dĺžky germicídnych UV lámp sa pohybujú v oblasti od 210 – 310 nm. Prenikavosť UV žiarenia je veľmi malá a preto sa toto žiarenie používa len na sterilizáciu vzduchu, povrchovú sterilizáciu predmetov, pracovných plôch a pod.

Hlavnou príčinou účinku UV svetla na mikroorganizmy je tvorba kovalentných väzieb medzi susednými pyrimidínmi (tymínmi, niekedy avšak veľmi málo aj medzi cytozínmi) nukleových kyselín, tak že vznikajú diméry. UV svetlo však pôsobí aj inými mechanizmami napr. tým, že vyvoláva v bunke i v prostredí tvorbu peroxidov (sú málo mutagénne), ozónov a tiež zlomy na chromozómoch.

Mikroorganizmy sa značne odlišujú svojou odolnosťou k účinkom UV žiarenia. Pomerne odolné sú spóry rodov *Bacillus*, *Clostridium* a *Desulfotomaculum*. Viac odolnejšie sú bunky baktérií, alebo kvasiniek, ktoré obsahujú karotenoidné farbivá. Tiež na čierno zafarbené spóry plesní absorbujú menej UV svetla a sú teda k nemu aj viac odolnejšie. Vyššia odolnosť týchto farebných mikroorganizmov voči UV žiareniu spôsobuje, že sú častým kontaminantom vzduchu.

Röntgenové žiarenie, γ-žiarenie a kozmické žiarenie (žiarenie s kratšou vlnovou dĺžkou ako 10 nm) majú silné mutagénne aj letálne účinky. Účinok týchto ionizačných zariadení je vyvolaný ich priamym pôsobením na citlivé molekuly bunky (predovšetkým DNA) a tiež prostredníctvom voľných radikálov a oxiranov, ktoré vznikajú v dôsledku týchto

žiarení na bunku a jej okolie. Účinnosť tohto žiarenia na genetický materiál spočíva predovšetkým v indukcii zlomov chromozómov.

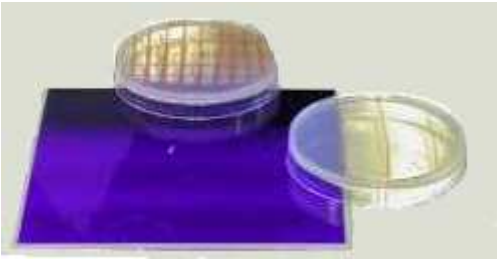
Jednotlivé mikroorganizmy sa značne líšia svojou citlivosťou voči ionizačnému žiareniu. Najcitlivejšie sú gramnegatívne baktérie, kvasinky a plesne sú odolnejšie. Mimoriadne vysokú odolnosť majú rody *Deinococcus*, napr. *D. radiodurans*, *D. radiophilus*, *D. proteolyticus.* Mikroorganizmy sú omnoho odolnejšie než vyššie organizmy. Účinnosť tohto žiarenia je veľmi ovplyvnená vonkajšími podmienkami, napr. prítomnosťou vzdušného kyslíka.

V potravinárskej praxi sa používajú nižšie dávky γ-žiarenia k potlačeniu klíčivosti skladovaných zemiakov a cibule a k predĺženiu skladovateľnosti jahôd (rádiopasterizácia).

Úloha 7: Určiť citlivosť *E. coli* na UV a γ-žiarenie

Pomôcky: UV lampa alebo transiluminátor, agarová platňa, bakteriálna kultúra, pipety, stopky, ochranný kryt na oči, inkubátor

Postup: Spodnú stranu Petriho misky rozdelíme fixou a označíme čas, za aký bude ožiarená. Pripravíme si agarovú platňu. Pipetou nanesieme bakteriálnu kultúru. Kolísaním Petriho misky sa suspenzia rozleje po celom povrchu agaru, potom sa miska skloní na jednu stranu a tekajúca suspenzia sa odsaje Pasteurovou pipetou. Naočkované pôdy sa nechajú pootvorené asi 20 min zaschnúť. Potom necháme platňu ožiariť pod UV lampou 1, 3 a 5 minút (obrázok 31). Necháme ju inkubovať v inkubátore 12 hodín. Po 12 hodinách vyhodnotíme senzitivitu mikroorganizmov (pozri prílohu).



Obrázok 31 Ožarovanie platne pod UV transiluminátorom.

11. 3 Vplyv teploty na mikroorganizmy

Teplota vonkajšieho prostredia je jedným z hlavných faktorov, ktoré ovplyvňujú rýchlosť rozmnožovania mikroorganizmov aj možnosť ich života. U každého mikroorganizmu rozoznávame tri základné teploty:

- ***minimálnu teplotu*** – najnižšiu teplotu pri ktorej sa daný druh rozmnožuje ešte zistiteľnou rýchlosťou,
- ***optimálnu teplotu*** – pri ktorej sa rozmnožuje najväčšou rýchlosťou a
- ***maximálnu teplotu*** – najvyššiu teplotu, pri ktorej je schopný sa rozmnožovať.

Optimálna teplota je približne o 30 °C vyššia než teplota minimálna, ale maximálna teplota môže byť len o 5 až 10 °C vyššia ako je optimálna teplota. Prudký pokles rastu pri vyššej teplote je spôsobený denaturáciou určitých enzýmov, ktoré sú pre rast nevyhnutné. Táto denaturácia je na začiatku reverzibilná, pri vyšších teplotách sa stáva ireverzibilná a vedie k usmrteniu bunky.

Krátkodobé zvýšenie teploty nad maximálnu teplotu vyvoláva ***teplotný šok,*** ktorý vedie k rôznym výkyvom metabolizmu. Pritom sa syntetizujú tzv. teplotné šokové proteíny (angl. heat shock proteins), ktoré patria medzi tzv. stresové proteíny.

Základné teplotné body rôznych mikroorganizmov sa podstatne líšia. Napr. optimálna teplota pre niektoré mikroorganizmy je 20 °C, pre iné 55 °C. Tieto rozdiely vznikli dôsledkom adaptácie mikroorganizmov, ktorá bola umožnená prirodzenou selekciou jedincov najrýchlejšie sa rozmnožujúcich v určitom prostredí. Základné teplotné body sa dajú zmeniť len vtedy, keď zmeníme ich genetický materiál. Tak boli pôsobením mutagénnych prostriedkov získané mutanty, ktoré sú citlivé k teplote (tzv. ts-mutanty), ktoré majú výrazne zníženú maximálnu, prípadne aj optimálnu teplotu. Tieto mutanty majú niektorý nevyhnutný enzým omnoho termolabilnejší, než majú nezmutované kmene.

11.3.1 Rozdelenie mikroorganizmov podľa vzťahu k teplote

Podľa vzťahu k teplote rozdeľujeme mikroorganizmy do troch hlavných skupín:

- ***psychrofilné mikroorganizmy*** – majú optimálnu teplotu nižšiu než je 20 °C a rastú ešte pomerne intenzívne pri teplote 0 – 5 °C, keď na tuhej pôde vytvárajú z jednej bunky počas dvoch týždňov kolóniu zistiteľnú voľným okom a ich generačná doba je

za týchto podmienok 48 hodín, alebo menej. Niektoré z týchto mikroorganizmov (napr. niektoré plesne) sú schopné pomaly rasť ešte pri -10 °C. Môžu sa pri týchto nízkych teplotách rozmnožovať preto, lebo ich vnútrobunková voda je za týchto podmienok v kvapalnom stave, čo je dané ich pomerne veľkým vnútrobunkovým osmotickým tlakom. K psychrofilným baktériám patria hlavne príslušníci rodov *Pseudomanas*, *Micrococcus*, *Flavobacterium* a pod. Vyskytujú sa často v pôde a vo vode a spôsobujú rozklad mäsa, mliečnych výrobkov a iných potravín, ktoré sú uchovávané pri nízkych teplotách.

- ***mezofilné mikroorganizmy*** – majú minimálnu teplotu vyššiu než 5 °C a optimálnu teplotu 45 °C, predstavujú väčšinu všetkých mikroorganizmov. U baktérií sa optimálna teplota pohybuje najčastejšie okolo 37 °C, u kvasiniek a plesní 30 °C.
- ***termofilné mikroorganizmy*** – majú optimálnu teplotu rastu 45 °C, alebo vyššiu. Pre rast väčšiny z nich je optimálna teplota 50 – 60 °C, pre niektoré dokonca aj vyššie. Niektoré môžu rásť výnimočne aj pri 80 °C (niektoré kmene druhu *Bacillus stearothermophilus*). Niektoré extrémne termofily z archeobaktérií rastú aj pri teplotách 100 °C. Termofilné baktérie majú svojich zástupcov z rodov *Bacillus* (*B. stearothermophilus*), *Clostridium* (*C. thermosaccharolyticum*), *Lactobacillus* (*L. delbrueckii*), medzi aktinomycétami (napr. rody *Thermoactinomyces*, *Thermomonospora*) ale aj v niektorých iných rodoch. Vyznačujú sa mimoriadne vysokou metabolickou aktivitou a rýchlosťou rastu za optimálnej teploty. Termofilné baktérie sa vyskytujú v pôde, kompostoch, v uskladnenom vlhkom materiále (rašeline, v kompostoch, obilí), v bahne, všade tam, kde činnosť mezofilných mikroorganizmov prispela k zvýšeniu teploty na 40-45 °C. Pri tejto teplote začína intenzívna činnosť termofilov, čo vedie k ďalšiemu zvyšovaniu teploty a niekedy až k samovznieteniu. Samovznietenie je spôsobené tvorbou ľahko zápalných splodín metabolizmu termofilných baktérií.

11.3.2 Vplyv vysokých a nízkych teplôt na mikroorganizmy

Smrtiace účinky **vysokých** teplôt sa kvantitatívne vyjadruje tzv. ***smrtiacou (letálnou) teplotou***, čo je najnižšia teplota, pri ktorej je organizmus usmrtený počas určitej doby a za prísne definovaných vonkajších podmienok. Smrtiaca účinnosť vysokých teplôt závisí od druhu mikroorganizmu, jeho fyziologickom stave a koncentrácii jeho buniek v prostredí ale aj

na zložení prostredia a jeho pH. Jednotlivé druhy sa veľmi líšia svojou termorezistenciou, avšak všeobecne môžeme povedať, že každá teplota, ktorá je vyššia než maximálna teplota rastu je pre vegetatívne bunky letálna, ak pôsobí dostatočne dlhú dobu.

Jedným z najdôležitejších faktorov, ktoré ovplyvňujú termorezistenciu mikroorganizmov je obsah vody v prostredí i v bunkách, pretože v suchom prostredí sú mikroorganizmy oveľa rezistentnejšie k vysokým teplotám ako vo vlhkom prostredí. K látkam, ktoré pôsobia ochranne patria predovšetkým lipidy, bielkoviny a vyššie koncentrácie sacharidov. Termorezistenciu vegetatívnych buniek aj spór veľmi ovplyvňuje aj pH prostredia, všeobecne môžeme povedať, že termorezistencia je najvyššia ak je pH optimálne pre rast daného mikroorganizmu.

Teplotu, ktorá je **nižšia** ako minimálna teplota rastu, prežíva väčšina mikroorganizmov pomerne dlhú dobu. Ak sa však intenzívne deliace bunky niektorých druhov baktérii prenesú z optimálnej teploty na teplotu blízku nule, dochádza k tzv. ***chladovému šoku***, ktorý sa prejavuje stratou životnosti veľkého podielu populácie. Citlivosť rôznych druhov baktérii k chladovému šoku je odlišná.

Pri pomalom zmrazovaní mikrobiálnych buniek na teploty pod 0°C sa z vnútrobunkovej aj mimobunkovej vody tvoria kryštály ľadu, ktoré poškodzujú bunku a usmrcujú ju. Rýchlym zmrazením na teploty -30 až -190 °C sa usmrtí len malý podiel populácie, pretože sa tvoria len mikrokryštáliky ľadu, ktoré nemajú také škodlivé účinky. Rýchle zmrazovanie buniek mikroorganizmov suspendovaných v roztoku peptónu, alebo bielkovín s následnou sublimáciou vody patria k osvedčeným konzervačným postupom, pretože takto pripravené tzv. ***lyofilizované kultúry*** majú životnosť niekoľko rokov. Podobne je aj tak aj pri uchovávaní mikroorganizmov pri teplote -190 °C. Zmrazením potravín dochádza len k zastaveniu činnosti mikroorganizmov a nie k ich usmrteniu.

Úloha 8: Kultivácia *E. coli* v tekutom médiu s rôznou teplotou

Pomôcky: Na l liter Luria-Bertrani (LB) roztoku budeme potrebovať: Bacto-tryptón (peptón) 10 g, Bacto-yeast extract 10 g, NaCl 5 g, doplníme do 1 litra destilovanou vodou, antibiotikum 100 $\mu g/cm^3$, termostat.

Postup: Pripravíme si LB médium. Navážime si Bacto-tryptón (peptón), Bacto-yeast extract, NaCl zmiešame ich v destilovanej vode a roztok dobre premiešame na miešačke magnetickým miešadlom. Toto médium rozlejeme od piatich kultivačných buniek. Banky s roztokmi uzavrieme alobalom, vložíme do tlakovej nádoby a sterilizujeme 15-20 minút. Po

vysterilizovaní ich ochladíme na izbovú teplotu, pridáme antibiotikum a kolóniu kmeňa *E.coli* (pracujeme sterilne!). Ako inokulum použijeme nočnú bakteriálnu kultúru. Bakteriálne bunky kultivujeme v termostate pri rôznych teplotách: 25, 30, 37, 45, 50 ºC, najlepšie cez noc.

Na druhý deň z týchto buniek budeme odoberať po 1 cm^3 a merať absorbanciu pri vlnovej dĺžke 600 nm (pozri prílohu).

11.4 Vplyv pH prostredia na mikroorganizmy

Rast mikroorganizmov a ich biochemická aktivita sú veľmi ovplyvnené koncentráciou vodíkových iónov v prostredí. Podobne ako to je v prípade teploty má aj pH prostredie pre každý mikrobiálny druh svoju minimálnu, optimálnu a maximálnu hodnotu, pri ktorej sa bunky rastú, rozmnožujú sa ale aj uskutočňujú iné životné pochody. Každý druh sa môže rozmnožovať len v určitom rozmedzí pH. Pre optimálny rast väčšiny baktérií a kvasiniek je toto rozmedzie veľmi malé, ale napr. u väčšiny plesní je oveľa väčšie.

Hodnoty pH odpovedajú približne hodnotám pH, ktoré sa vyžaduje pre činnosť dôležitých enzýmov a majú úzky vzťah k teplote daného prostredia.

Väčšina baktérií rastie v neutrálnom, alebo slabo alkalickom prostredí. Medzi baktérie, ktoré prežívajú extrémne pH patrí črevná baktéria, pretože musí prežívať pri veľmi nízkom pH žalúdočných štiav, ale aj alkalickom pH žlče. V kyslom prostredí prežívajú tiež druhy, ktoré tvoria kyseliny ako hlavné produkty metabolizmu (octové, mliečne, alebo propiónové baktérie), pri veľmi nízkom pH sa prestávajú rozmnožovať a zastavuje sa ich metabolická činnosť. Oproti tomu hnilobné baktérie sú veľmi citlivé na nízke pH, čo sa využíva pri konzervácii potravín (zelenina v kyslom náleve, marinované ryby a pod.).

11.4.1 Rozdelenie mikroorganizmov podľa vzťahu k pH

Medzné hodnoty pH prostredia pre baktérie sa pohybujú v rozmedzí pH 4-10.

Podľa vzťahu k pH rozdeľujeme mikroorganizmy do troch hlavných skupín:

- ***acidofilné mikroorganizmy*** - acidofily - organizmy s optimom pH 3 a nižšie – acidofilné mikroorganizmy rastú veľmi dobre aj v kyslom prostredí. Napr. *Thiobacillus thiooxidans,* baktéria ktorá oxiduje síru až na kyselinu sírovú rastie aj pri nižšom pH ako 1.
- Mikroorganizmy, ktoré si vyžadujú **neutrálne prostredie** - väčšina baktérií rastie najlepšie v neutrálnom prostredí, približne v rozmedzí pH 7,0. Neutrálne kultivačné prostredie vyžadujú predovšetkým patogénne baktérie, ktoré sa nachádzajú v krvi, alebo lymfe živočíšneho organizmu s pH približne 7,4.
- ***alkalifilné mikroorganizmy*** - alkalifily – organizmy s optimom pre rast pri pH 9 a viac – urobaktérie, denitrifikačné baktérie a proteolytické baktérie rastú najlepšie v alkalickom prostredí.

Pre reguláciu pH sú dôležité tlmivé roztoky. Pomáhajú udržať prostredie pre reakcie a zabraňujú náhlym zmenám pH počas rastu, ktoré by mohli ovplyvniť ich biochemickú aktivitu. V biologických systémoch sa ako tlmivé roztoky uplatňujú aminokyseliny, polypeptidy a bielkoviny.

Na začiatku kultivácie môže byť pH média vhodné na rast mikroorganizmov. Ďalším rastom populácie mikroorganizmov sa metabolizmom buniek môžu vytvoriť nepriaznivé podmienky (napr. prudká zmena pH), ktoré limitujú rast. Aby sa tomu zabránilo, pridávajú sa do kultivačných médii soli slabých kyselín, hlavne fosfáty, octany, nerozpustné uhličitany, proteíny a ich degradačné produkty.

Úloha 9: Kultivácia *E. coli* v tekutom médiu s rôznym pH

Pomôcky: Na l dm^3 Luria-Bertrani (LB) roztoku budeme potrebovať: Bacto-tryptón (peptón) 10 g, Bacto-yeast extract 10 g, NaCl 5 g, doplníme do l dm^3 destilovanou vodou, antibiotikum 100 $\mu g/cm^3$, pH meter, HCl.

Postup: Navážime si Bacto-tryptón (peptón), Bacto-yeast extract, NaCl zmiešame ich v destilovanej vode a roztok dobre premiešame na miešačke magnetickým miešadlom. Tento roztok rozlejeme do piatich kultivačných buniek, upravíme pH na 4,0; 6,0; 7,0; 9,0 a 12,0. Banky s roztokmi uzavrieme alobalom, vložíme do tlakovej nádoby a sterilizujeme 15-20 minút. Po vysterilizovaní ich ochladíme na izbovú teplotu, pridáme antibiotikum a kolóniu kmeňa, ktorú chceme kultivovať (pracujeme sterilne!).

Bakteriálne bunky kultivujeme v nádobe uzatvorenej alobalom v termostate pri 37 ºC. Ako inokulum použijeme nočnú bakteriálnu kultúru. Bunky necháme kultivovať cez noc.

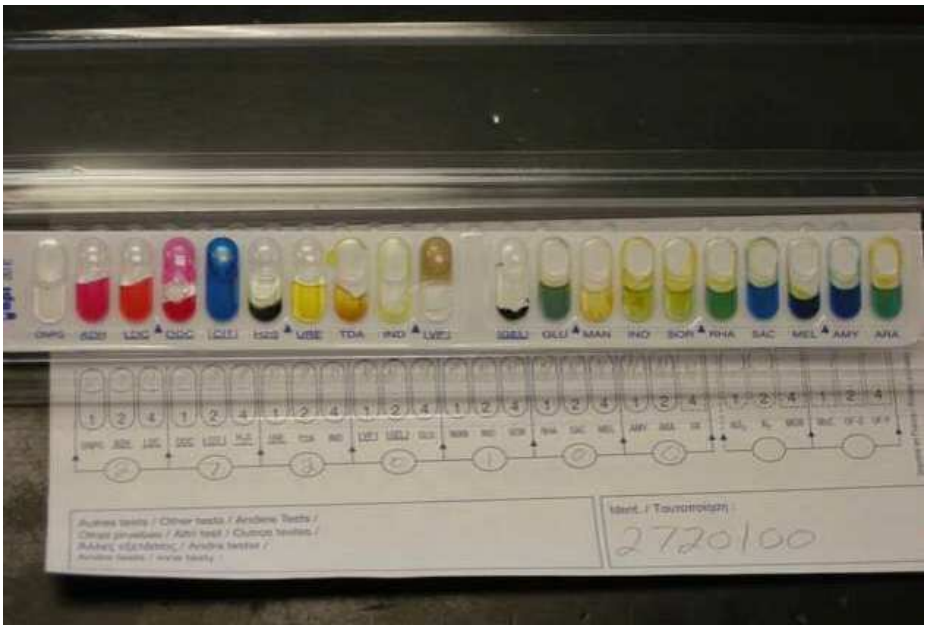
Na druhý deň z týchto buniek budeme odoberať po 1 cm^3 a merať absorbanciu pri vlnovej dĺžke 600 nm (pozri prílohu).

12 Biochemické metódy na testovanie mikroorganizmov

API testy

Diferenciálnym farbením baktérií sa môžu poskytnúť predbežné informácie o type baktérií. Táto metóda je len informatívna, vieme ňou určiť, či je organizmus napr. grampozitívny alebo gramnegatívny, aby sa mohlo rozhodnúť, ktorý diagnostický test, bude ďalej využitý na určenie rodu a druhu baktérie.

API 20E (**A**pplication **P**rogramming **I**nterface) systém je zložený z plastového prúžku s 20 individuálnymi miniatúrnymi testovacími skúmavkami, z ktorých každá obsahuje rôzne činidlá na stanovenie metabolických funkcií, rodov a druhov črevných baktérií rodu enterobaktérií (*Enterobacteraceae).*



Obrázok 32 API 20E test.

12.1 Katabolizmus sacharidov

Testy v O/F médiu

Živé baktérie produkujú metabolity a odpady v rámci svojej metabolickej činnosti. Reagencie v skúmavkách sú špeciálne navrhnuté na testovanie prítomnosti produktov bakteriálneho metabolizmu, ktoré sú špecifické pre niektoré druhy baktérií.

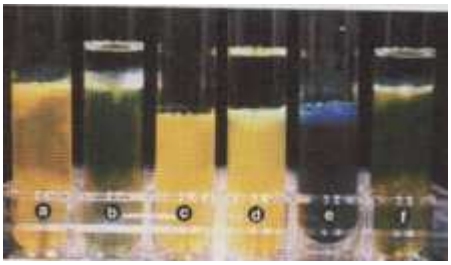
Po inkubácii (18-24 hodín, pri 37°C), je každá skúmavka (individuálny test) hodnotená podľa konkrétnej zmeny farby, ktorá signalizuje prítomnosť metabolických reakcií, a takto nám

pomáha identifikovať jednotlivé mikroorganizmy. Niektoré baktérie v skúmavkách menia farbu v dôsledku rozdielneho pH, iné kvôli obsahu konečných produktov (obrázok 33).

Či organizmus môže oxidovať (respirovať), alebo fermentovať glukózu môžeme určiť pomocou testu v O/F médium. Glukóza vstupuje do buniek kde je katabolizovaná. Niektoré baktérie, použitím endoenzýmov, katabolizujú glukózu oxidatívne za produkcie CO_2 a vody. Oxidatívny katabolizmus závisí na prítomnosti molekulového kyslíka (O_2). Mnohé baktérie môžu fermentovať glukózu aj bez prítomnosti kyslíka. Vo fermentatívnom katabolizme nie je nevyhnutný kyslík, ale tento proces môže prebiehať aj v jeho prítomnosti. Konečné produkty metabolizmu fermentácie sú malé organické molekuly, zvyčajne organické kyseliny. Tvorba malého množstva kyseliny môže byť spojená s glukózovou respiráciou ktoré možno rozlíšiť miestom vzniku - v hornej časti média. V prípade, že je organizmus fakultatívny anaerób, nie je miesto rozoznateľné kvôli veľkému množstvu kyseliny ktoré sa tvorí počas fermentácie, a preto sa nachádza v celom médiu. Niektoré baktérie počas fermentácie sacharidov produkujú plyny.

Či sú organizmy oxidatívne alebo fermentatívne môže byť určené pomocou Rudolph Hugh a Einar Leifsononovho O/F bazálneho média s pridaním požadovaného sacharidu.

O/F médium obsahuje vysokú koncentráciu sacharidu a nízku koncentráciu peptónu. Peptón podporuje rast baktérii, ktoré nevyužívajú sacharidy. V tomto teste sa používa dvojica skúmaviek: jedna je otvorená (prístup vzduchu), druhá uzatvorená (bez prístupu vzduchu, preliata minerálnym olejom). O/F médium obsahuje ako indikátor brómtymolovú modrú, ktorá sa mení v prítomnosti kyselín na žltú a indikuje tak katabolizmus sacharidov. Zásadité prostredie, vďaka peptónu je indikované tmavomodrou farbou, kvôli produkcii amoniaku. Ak sú sacharidy metabolizované v obidvoch skúmavkách, uskutočnila sa fermentácia. Organizmus ktorý vzužíva sacharidy len pri aeróbnych podmienkach bude produkovať kyselinu, len v otvorenej skúmavke. Kyseliny sú v respirácii utvorené len prechodne a indikátor sa bude meniť na žltú farbu len vo vrchnej časti otvorenej skúmavky. Tieto organizmy sa nazývajú oxidatívne v OF teste.

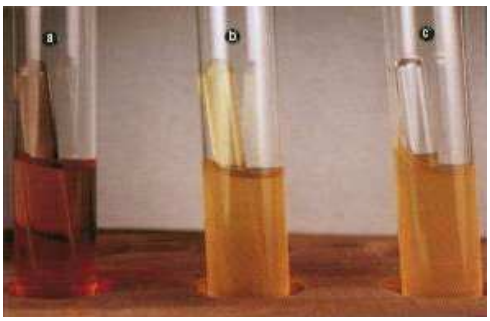


Obrázok 33 Reakcie v O/F glukózovom médiu. Druhy (*species*) v skúmavkách (a) a (b) sú oxidovadla. Organizmy v skúmavkách (c) a (d) sú fermentátory. Kultúry v skúmavkách (e) a (f) nevyužívajú glukózu.

12.2 Fermentácia

Fermentačné skúmavky

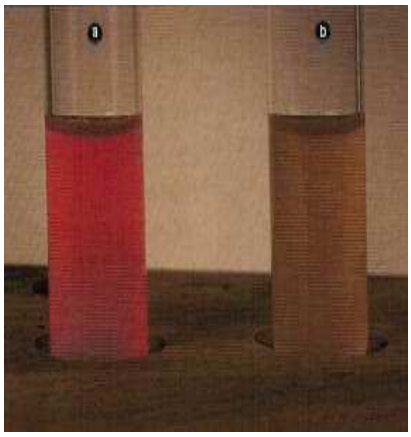
Fermentačné skúmavky sa používajú na detekciu kyselín a plynov ktoré sa produkujú zo sacharidov. Fermentačné médium obsahuje peptón, indikátor fenolovú červenú, obrátenú malú skúmavku na zachytávanie plynov a 0.5-1.0 % sacharid. Na obrázku 34 je indikátor fenolová červená červenej farby (neutrálna) bez naočkovanej kultúry; fermentácia ktorej výsledkom je produkcia kyseliny mení túto farbu na žltú (pH 6.8 alebo nižšie). Keď je počas fermentácie produkovaný plyn, je zachytávaný v obrátenej, alebo Durhamovej skúmavke. Fermentácia prebieha za, alebo bez prístupu kyslíka, avšak počas predĺženej inkubácie (viac než 24 hodín) mnoho baktérii začína rásť na peptóne po vyčerpaní sacharidových zásob, a spôsobuje neutralizáciu indikátora, ktorý sa mení znova na červenú farbu, pretože dochádza k produkcii amoniaku.



Obrázok 34 Skúmavky na fermentáciu sacharidov. (a) Indikátor fenolová červená v neutrálnom, alebo alkalickom roztoku. (b) Fenolová červená sa zmenila na žltú v prítomnosti kyseliny. (c) Plyny sú zachytené v obrátenej skúmavke, indikátor dokazuje prítomnosť kyseliny.

MRVP bujón

Fermentačnými procesmi môžu vznikať rôzne konečné produkty, v závislosti na substráte, inkubácii a organizme. V niektorých prípadoch môžu to byť veľké množstvá kyselín alebo neutrálne produkty. **MRVP** test sa používa na rozlíšenie organizmov, ktoré produkujú veľké množstvo kyselín z glukózy, a organizmy ktoré produkujú veľké množstvo neutrálneho produktu – acetoínu (acetylmetylkarbinol, 3-hydroxybutanol). MRVP médium je živný bujón doplnený o glukózu, ktoré sa používa na testovanie s metylovou červenou (**MR test**) a Voges-Proskauerov (**V-P**) test. Ak organizmus produkuje veľké množstvo organickým kyselín z glukózy, médium ostáva červené, po pridaní metylovej červenej, v pozitívnom MR teste, indikuje to že pH je menšie ako 4.4. Ak sú produkované neutrálne produkty, metylová červená sa zmení na žltú, indikuje to že pH je vyššie ako 6.0.
Produkcia acetoínu je detekovaná pridaním chloridu draselného a α-naftolu. Ak je acetoín prítomný, vrchná časť média sa zmení na červenú, v negatívnom V-P teste sa médium zmení na svetlo hnedú (obrázok 35). Produkcia acetoínu závisí aj od dĺžky inkubácie.

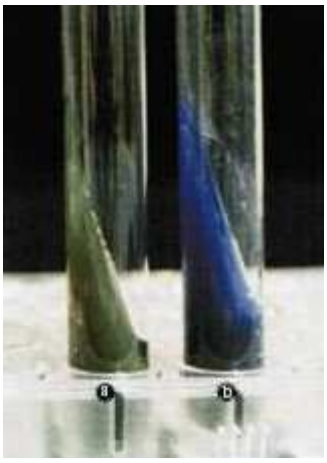


Obrázok 35 Výsledkom fermentácie môžu byť (a) organické kyseliny, napr. kyselina mliečna, alebo neutrálne produkty, ako napr. acetoín (b).

Citrátový agar

Na identifikáciu baktérii sa využíva schopnosť niektorých baktérii fermentovať citrát. Keď je kyselina citrónová alebo citrát sodný prítomný v roztoku, stráca protón alebo Na^+ a vytvára sa citrátový ión. Baktérie ktoré majú enzým citrát lyázu môžu štiepiť citrát a vytvárať pyruvát, ktorý môže byť redukovaný v procese fermentácie. Simmonsov citrátový agar sa používa na určenie baktérii ktoré využívajú citrát. Keď využívajú citrát a amoniak, médium je alkalizované, pretože NH_3 je produkovaný z amoniaku (NH_4^+). Keď je médium alkalizované

indikátor brómtymolová modrá sa mení na modrú farbu, čo indikuje pozitívne využitie citrátového testu.



Obrázok 36 Citrátový test. Využitie kyseliny citrónovej ako jediného zdroja uhlíka v Simmonsovom citrátovom agare, spôsobí zmenu farby indikátora na modrú (b). Skúmavka (a) je na citrát negatívna.

12.3 Katabolizmus proteínov

Hydrolýza želatíny

Veľké molekuly proteínov, napr. želatína, sú hydrolyzované pomocou exoenzýmov na malé produkty a potom sú transportované do bunky. Hydrolýza želatíny môže byť dokázaná rastúcimi baktériami v živnom médiu želatíny. Živné médium zložené zo želatíny sa rozpustí vo vode (50 ºC), nechá stuhnúť (gél) ochladením pri 25 ºC a skvapalnení sa pri zohriatí 25 ºC. Keď exoenzým hydrolyzuje želatínu, skvapalní ju a želatína už nedokáže stuhnúť aj keď sa ochladí na teplotu nižšiu ako 20 ºC.

Obrázok 37 Hydrolýza želatíny. Po hydrolýze (a), želatína ostáva kvapalná. V skúmavke (b) je nehydrolyzovaná želatína.

Močovina je odpadným produktom proteínového štiepenia u mnohých stavovcov a je vylučovaná močom. Veľmi užitočným diagnostickým testom na identifikáciu baktérii je prítomnosť enzýmu ureáza ktorá uvoľňuje amoniak z močoviny. Močovinový agar obsahuje peptón, glukózu, močovinu a fenolovú červenú. pH pripraveného média je 6.8 (fenolová červená sa zmení na žltú). Počas inkubácie baktérie ktoré majú ureázu budú produkovať amoniak, ktorý zvyšuje pH média, a zmenia indikátor na tmavočervený (fuchsia) pri pH 8.4.

Obrázok 38 Produkcia ureázy. Hydrolýzou močoviny sa uvoľňuje amoniak ktorý mení farbu indikátora na tmavočervenú.

Literatúra

Ambrožová, J.: Mikroskopické praktikum z hydrobiologie.- Skriptum VŠCHT Praha, 2002.

Betina V., Baráthová H., Fargašová, A., Frank, V., Horáková, K., Šturdík, E.: Mikrobiologické laboratórne metódy, Alfa, Bratislava, 1987.

Black, J. G.: Microbiology, Wiley & Sons, Inc., 2008.

Brock, T.: Thermophiles: General, Molecular and Applied Microbiology. J.Wiley and Sons, Chichester, 1984.

Ciganeková, V., Simon, L., Bergerová, E.: Návody na praktické cvičenia z mikrobiológie, Univerzita Komenského v Bratislave, Vysokoškolské učebné texty, 1990.

Fisher Slovaka: Počítacie komôrky, Laboratórna technika, 7, 3, 2005.

Johnson, T. R., Case, J.: Laboratory Experiments in Microbiology, 9th Edition, Pearson, 2010.

Kaprálek, F: Základy bakteriologie. Karolinum, Praha, 1999.

Kayser, F. H., Bienz, K. A., Eckert, J., Zinkernagel, R. M.: Medical Microbiology, Thieme, Stitgart-New York, 2001.

Laboratory biosafety manual, 3rd edition, World Health Organization, Geneva, 2004.

Levinson, W.: Review of Medical Microbiology and Immunology, McGraw-Hill International Edition, 2010.

Rosypal, S., Hoďák, K., Martinec, T., Kocur, M.: Obecná bakteriologie, Státní pedagogické nakladatelství Praha, 1981.

Urgeová, E, Marecová, M.: Probiotické kmene mikroorganizmov a ich účinok na hostiteľský organizmus, 145-157, 2009.

Šilhánková, L.: Mikrobiológie pro potravináře a biotechnology. 3. rev. vyd. Praha: Academia, 2002.

Willey, J. M., Sherwood, L. M., Woolverton, C. J.: Prescott, Harley, and Klein´s Microbiology, McGraw-Hill International Edition, 2008.

http://helios.physics.utoronto.ca/%7Einteract/microsco/microscopy.htm)

http://www.hpl.sk/main.php?go=odborna-zona/vysetrenia/mykologia/vys

http://lpmv.epfl.ch/research.html#current

http://micro.magnet.fsu.edu/optics/timeline/people/zeiss.html)

http://neon.chemistry.ox.ac.uk/icl/heyes/structure_of_solids/Lecture1/ruska.jpg)

http://neon.chemistry.ox.ac.uk/icl/heyes/structure_of_solids/Lecture1/leeuwenhoek.jpg)
http://www.ucm.sk/FPV/dokumenty/nb/nb_iii-2_2003/14_Urgeova.pdf,
http://www.ucmp.berkeley.edu/history/leeuwenhoek.html)
http://www.purdue.edu/REM/rs/sem.htm

PRÍLOHA

Protokol č.1

Názov práce: Príprava preparátov na mikroskopické pozorovanie

Meno: **Dátum:**

Úlohy:

1. Uveďte čo je natívny a čo je fixovaný preparát a aké je ich praktické využitie.

2. Zakreslite výsledky mikroskopického pozorovania natívnych a fixovaných preparátov:

názov:
zväčšenie:
tvar buniek:

názov:
zväčšenie:
tvar buniek:

názov:
zväčšenie:
tvar buniek:

3. Vysvetlite rozdiely medzi natívnym a fixovaným preparátom. Aký je najčastejší spôsob fixácie v mikrobiológii?

Protokol č.2

Názov práce: Farbenie mikroorganizmov

Meno: **Dátum:**

Úlohy:

1. Uveďte druhy diagnostických farbení, ich princípy a význam.

2. Opíšte monochromatické farbenie.

3. Opíšte princíp Gramovho farbenia.

4. Zakreslite výsledky mikroskopického pozorovania preparátov:

názov:
zväčšenie:

názov:
zväčšenie:

Protokol č.3

Názov práce: Meranie veľkosti mikroorganizmov

Meno: **Dátum:**

Úlohy:

1. Napíšte princíp merania mikroorganizmov.

2. Na čo nám slúži okulárový a načo objektívový mikrometer ?

Protokol č.4

Názov práce: Stanovenie počtu mikroorganizmov

Meno: **Dátum:**

Úlohy:

1. Uveďte základné metódy stanovenia počtu mikroorganizmov a ich princípy.

2. Napíšte postup a podmienky stanovenia počtu kvasiniek priamou mikroskopickou metódou (v Bürkerovej komôrke).

3. Zaznamenajte výsledky a napíšte spôsob výpočtu pri stanovení počtu kvasiniek v 1 cm^3 suspenzie.

4. Uveďte princíp testu vitality.

Protokol č.5

Názov práce: Príprava a charakterizácia kultivačných médií

Meno: **Dátum:**

Úlohy:

1. Napíšte, čo je kultivačné médium a aký je jeho význam.

2. Uveďte, čo je sterilizácia a jej význam.

3. Vymenujte a charakterizuje živné média.

4. Uveďte podmienky sterilizácie živných médií.

5. V bodoch popíšte postup prípravy agarových platní. Na aké účely slúžia?

Protokol č.6

Názov práce: Rastová krivka

Meno: **Dátum:**

Úlohy:

1. **Aký je rozdiel medzi statickou a kontinuálnou kultiváciou?**

2. **Čo je rastová krivka?**

3. **Popíšte fázy rastovej krivky.**

Protokol č.7

Názov práce: Určovanie citlivosti mikroorganizmov na antimikrobiálne látky

Meno: **Dátum:**

Úlohy:

1. **Ako rozdeľujeme antimikrobiálne látky podľa mechanizmu účinku?**

2. **V bodoch popíšte postup prípravy očkovania platní. Na aké účely slúžia?**

3. **Čo je zóna zábranu rastu (inhibičná zóna) mikroorganizmov?**

Protokol č.8

Názov práce: Určovanie citlivosti mikroorganizmov na žiarenie, teplotu a pH

Meno: **Dátum:**

Úlohy:

1. Ako rozdeľujeme elektromagnetické žiarenie vzhľadom k fyziologickým účinkom na mikroorganizmy?

2. Aká je senzitivita *E. coli* na UV a γ žiarenie?

3. Ako rozdeľujeme mikroorganizmy podľa vzťahu k teplote?

4. Ako rozdeľujeme mikroorganizmy podľa vzťahu k pH?