

Obsah

Č.kap.	Název kapitoly	strana
	Úvod	3
	Obsah	5
	Seznam cvičení	9
	Pravidla práce v mikrobiologické laboratoři	11
1.	PRINCIPY MIKROBIOLOGICKÉ PRÁCE	13
1.1	Plánování mikrobiologické práce, její organizace, vedení protokolů	13
1.2	Získávání mikrobiálních kultur	14
1.3	Zařízení, přístrojové vybavení a pracovní pomůcky na mikrobiologickém pracovišti	15
1.4	Popis mikroskopu	19
1.4.1	Mechanická část mikroskopu	19
1.4.2	Optická část mikroskopu	20
1.4.3	Základní postup při mikroskopování	21
1.4.4	Péče o mikroskop	21
1.4.5	Fázová kontrastní mikroskopie	22
2.	KULTIVACE MIKROORGANISMŮ	24
2.1	Živné půdy	24
2.1.1	Příprava živných půd	25
2.1.2	Rozlévání půd a jejich uchovávání	25
2.2	Sterilizace nádobí, živných půd a ostatních pomůcek	26
2.2.1	Fyzikální prostředky sterilace	27
2.2.2	Sterilizace chemickými prostředky	28
2.3	Očkování mikroorganismů	29
2.3.1	Očkování kultury ve zkumavce na šikmý agar	29
2.3.2	Očkování ze zkumavky do zkumavky tekuté nebo ztekucené živné půdy	30
2.3.3	Očkování z Petriho misky do zkumavek a naopak	30
2.3.4	Očkování vpichem	31
2.3.5	Očkování pomocí pipety	31
2.4	Inkubace	31
2.4.1	Aerobní kultivace ve větším objemu	32
2.4.2	Anaerobní kultivace	33
2.4.2.1	Příprava anoxického prostředí	33
2.5	Uchovávání a ožívání mikrobiálních kultur	35
3.	MORFOLOGIE A CYTOLOGIE MIKROORGANISMŮ	37
3.1	Makroskopické znaky mikroorganismů	37
3.1.1	Charakter růstu v tekuté půdě	37
3.1.2	Charakter růstuna šikmém agaru	38
3.1.3	Kolonie vyrostlé z jednotlivých buněk	39
3.1.4	Obrovské kolonie	40
3.1.5	Růst podél vpichu do agarové půdy	41
3.2	Mikroskopické morfologické a cytologické znaky mikroorganismů	42
3.2.1	Typy mikroskopických preparátů	42
3.2.2	Fixace preparátu	42
3.2.3	Barvení mikroorganismů	42
3.2.4	Aseptický postup při přípravě mikroskopického preparátu	43
3.2.5	Nativní preparát pro důkaz pohybu buněk	44
3.2.6	Negativní barvení bakterií	45
3.2.7	Barvení spor rodů <i>Bacillus</i> a <i>Clostridium</i>	47

Č.kap.	Název kapitoly	strana
3.2.8	Gramovo barvení	47
3.2.9	Příprava trvalých preparátů bakterií	48
3.2.10	Světelná mikroskopie kvasinek	48
3.2.10.1	Sledování tvorby pseudomycellia, mycelia a blastopor kvasinek ve skličkové kultuře	50
3.2.10.2	Sledování askospor kvasinek	50
3.2.10.3	Rozlišování živých a mrtvých kvasinek vitálním barvením	51
3.3	Mikroskopické vláknité houby významné z potravinářského hlediska	52
3.3.1	Živné půdy pro izolaci mikroskopických hub z potravin	52
3.3.2	Metody determinace	53
3.3.3	Preparáty mikroskopických vláknitých hub	53
3.3.4	Proměňování mikromorfologických struktur vláknitých hub	54
3.3.5	Pododdělení <i>Zygomycotina</i>	54
3.3.5.1	Klíč k určení nejčastějších rodů <i>Zygomycetů</i> kontaminujících potraviny	56
3.3.6	Pododdělení <i>Ascomycotina</i> a <i>Deuteromycotina</i>	57
3.3.6.1	Klíč k určení nejčastějších rodů <i>Deuteromycotina</i> kontaminujících potraviny	62
3.3.6.2	Klíč k určení nejčastějších rodů <i>Ascomycotina</i> kontaminujících potraviny	65
3.3.7	Pododdělení <i>Bazidiomycotina</i>	66
3.4	Slovník hlavních pojmů	66
4.	SLEDOVÁNÍ VLIVU VNĚJŠÍCH PODMÍNEK NA MIKROORGANISMY	69
4.1	Vliv teploty na mikroorganismy	69
4.1.1	Stanovení smrtící teploty	70
4.2	Vliv pH prostředí na růst mikroorganismů	71
4.3	Vliv osmotického tlaku na růst mikroorganismů	72
4.4	Vliv ultrafialového světla na mikroorganismy	73
4.5	Bakteriostatické působení některých barviv	73
4.6	Citlivost mikroorganismů k antimikrobiálním látkám	74
4.6.1	Fenolový koeficient mikrobicidních látek	74
4.6.2	Citlivost mikroorganismů k antibiotikům	76
5.	IZOLACE MIKROORGANISMŮ	79
5.1	Nahromaďovací kultury	79
5.2	Základní izolační techniky	81
5.2.1	Makroskopicky kontrolovatelné metody	81
5.2.2	Mikroskopicky kontrolovatelné metody	84
6.	ZJIŠŤOVÁNÍ POČTU MIKROBIÁLNÍCH BUNĚK V PROSTŘEDÍ	87
6.1	Přehled metod zjišťování počtu mikrobiálních buněk	87
6.1.1	Počítání buněk	87
6.1.2	Stanovení buněčné hmoty mikroorganismů	89
6.1.3	Zjištění přibližného množství mikroorganismů na základě jejich biochemické činnosti	90
6.2	Jednotlivé metody stanovení počtu mikroorganismů	92
6.2.1	Mikroskopické počítání buněk	92
6.2.2	Nefelometrické stanovení počtu buněk	93
6.2.3	Kultivační stanovení počtu buněk	94
6.2.4	Stanovení buněčné hmoty mikroorganismů	105
7.	SLEDOVÁNÍ RŮSTU MIKROORGANISMŮ	109
8.	ZÁKLADNÍ GENETICKÉ PRÁCE	114
8.1	Mutace	114
8.1.1	Stanovení rychlosti spontánních mutací	114
8.1.2	Zjišťování auxotrofních mutantů	115

Č.kap.	Název kapitoly	strana
8.1.2.1	Zjištění průměrného počtu mutantů hledaného typu	117
8.1.2.2	Zjištění počtu mutantů hledaného typu v jediné kultuře	118
8.1.3	Indukce mutací	118
8.1.3.1	Indukce mutantů pomocí ultrafialového záření (UV-světla)	120
8.1.3.2	Indukce mutantů pomocí dusité kyseliny	121
8.1.3.3	Indukce mutantů pomocí alkylačních činidel za růstových podmínek	122
8.1.3.4	Indukce mitochondriálních mutací se <i>S.cerevisiae</i>	123
8.1.4	Testování mutagenity chemických látek mikroorganismy	124
8.1.4.1	Amesův test	124
8.1.4.2	Použití kvasinek pro testování mutagenity chemických látek	125
8.2	Křížení a rekombinace	125
8.2.1	Křížení kvasinek a analýza produktů křížení	126
8.2.1.1	Stanovení kopulačního typu a izolace zygot u <i>S.cerevisiae</i>	127
8.2.1.2	Postup při získávání hybridů kvasinek	129
8.2.1.3	Hybridizační postup získávání polyploidních kmenů <i>S.cerevisiae</i>	129
8.2.1.4	Sporulace diploidních kmenů a analýza spor	129
8.2.1.5	Tetrádová analýza	130
8.2.1.6	Mapování genů u <i>S.cerevisiae</i>	131
8.2.1.7	Hromadná analýza spor	133
8.2.2	Fúze protoplastů	135
9.	HOSTITELSKÉ KMENY <i>ESCHERICHIA COLI</i>	138
9.1	Některé běžně užívané kmeny <i>E.coli</i>	138
9.1.1	Fenotypový projev některých mutací	139
9.2	Uchovávání bakteriálních kultur pro genetické studie	139
9.3	Bakteriální plasmidové a fágové vektory	140
9.3.1	Bakteriální plasmidy	141
9.3.2	Plasmidová inkompatibilita	141
9.3.3	Běžně používané plasmidové vektory	142
9.4	Izolace plasmidové DNA	143
9.4.1	Lyze bakteriálních buněk	143
9.4.2	Vnesení plasmidové DNA do bakteriálních buněk	148
9.4.3	Identifikace kolonií obsahujících rekombinantní plasmid	149
9.5	Bakteriofágové vektory	149
9.5.1	Bakteriofág λ	149
9.5.2	hfl ⁻ selekce	150
9.5.3	sp ⁺ selekce	151
9.5.4	λ ZAP – bluescript M13	151
9.5.5	Tvorba bakteriofágových plaků	151
9.6	Analýza a manipulace s DNA	153
9.6.1	Elektroforéza v agarosovém gelu	153
9.7	Amplifikace DNA <i>in vitro</i> pomocí polymerase chain reaction	155
10.	IDENTIFIKACE MIKROORGANISMŮ	158
10.1	Biochemické identifikační testy bakterií	159
10.1.1	Přehled hlavních testovaných vlastností	159
10.1.2	Další biochemické testy	161
10.1.3	Identifikační soupravy	164
10.2	Amplifikace DNA <i>in vitro</i> pomocí polymerase chain reaction (PCR)	164
10.3	Imunologické metody	166
10.3.1	Aglutinační reakce	167

Č.kap.	Název kapitoly	strana
10.3.2	Precipitační reakce	168
10.3.3	Imunoelektroforeza	169
10.3.4	Komplement – fixační reakce	169
10.3.5	Imunofluorescence	170
10.3.6	Speciální metody	171
10.3.7	Využití imunologických metod v potravinářské mikrobiologii	171
10.4	Identifikační testy kvasinek	172
10.4.1	Zkvašování cukrů	172
10.4.2	Asimilace různých zdrojů uhlíku	173
10.4.3	Asimilace nitrátů	174
10.4.4	Štěpení močoviny	174
	Seznam půd	175
	Seznam roztoků	178