

Obsah

1. ZÁSADY BEZPEČNOSTI PRÁCE V MIKROBIOLOGICKÉ LABORATOŘI	
1.1. Pracovníci	9
1.2. Hygiena práce v laboratoři	9
2. MIKROBIOLOGICKÁ LABORATOŘ	10
2.1. Provozní místnosti	10
2.2. Přístrojové vybavení	11
2.3. Laboratorní pomůcky	13
3. KULTIVAČNÍ MÉDIA	15
3.1. <i>Druhy kultivačních pūd</i>	15
3.1.1. Dělení kultivačních pūd podle konzistence	15
3.1.2. Dělení kultivačních pūd podle složení	15
3.1.3. Dělení kultivačních pūd podle účelu použití	16
3.2. <i>Příprava živných pūd</i>	17
3.2.1. Postup přípravy živných pūd	17
3.2.1.1. Sterilizace pūd	18
3.2.2. Rozlévání pūd a jejich uchovávání	18
4. KULTIVACE MIKROORGANISMŮ	20
4.1. <i>Očkování</i>	20
4.1.1. Kvantitativní metody	20
4.1.1.1. Očkování zaléváním do tuhých agarových pūd – metoda zalití	20
4.1.1.2. Očkování roztěrem na povrch tuhých agarových pūd – metoda roztěru	21
4.1.1.3. Očkování do tekutých pūd – metoda MPN	21
4.1.2. Kvalitativní metody	21
4.1.2.1. Jednostupňová kultivace	22
4.1.2.2. Dvoustupňová kultivace	22
4.1.2.3. Rozočkování	22
4.2. <i>Inkubace</i>	23
4.2.1. Teplota	23
4.2.2. Vztah ke kyslíku	23
4.2.2.1. Aerobní kultivace	23
4.2.2.2. Anaerobní a mikroaerofilní kultivace	24
4.2.3. Relativní vlhkost	24
4.2.4. Doba kultivace	24
4.3. <i>Uchovávání a ožívování mikrobiálních kultur</i>	24
4.3.1. Uchovávání na šikmých agarech	24
4.3.2. Lyofilizace	25
4.3.3. Uchovávání v zmrazeném stavu	25
5. MORFOLOGIE MIKROORGANISMŮ	27
5.1. <i>Makroskopické metody</i>	27
5.1.1. Vzhled kolonií na pevné pūdě	27
5.2. <i>Mikroskopické metody</i>	28
5.2.1. Kvantitativní stanovení bakterií	28

5.2.1.1.	Zhotovení preparátu	28
5.2.1.2.	Barvení	28
5.2.1.3.	Odečítání výsledků	28
5.2.1.4.	Výpočet konstanty mikroskopu	28
5.2.1.5.	Výpočet počtu mikroorganismů	29
5.2.1.6.	Spolehlivost zkoušky	29
5.2.2.	Kvalitativní stanovení bakterií	29
5.2.2.1.	Morfologie bakteriálních buněk	30
5.2.2.2.	Zhotovení preparátu	31
5.2.2.3.	Barvení podle Grama	31
5.2.2.4.	Další techniky barvení	32
6.	BIOLOGICKÉ VLASTNOSTI MIKROORGANISMŮ	34
6.1.	Fyziologické vlastnosti mikroorganismů	34
6.1.1.	Stanovení pohyblivosti mikroorganismů	34
6.1.2.	Vztah mikroorganismů k volnému O ₂	35
6.1.2.1.	Kultivace v anaerobním agaru s rezazurinem	35
6.1.2.2.	Oxidačně-fermentační test (O-F test)	35
6.1.3.	Růstové schopnosti mikroorganismů	35
6.2.	Biochemické identifikační testy	36
6.2.1.	Základní testované vlastnosti	36
6.2.1.1.	Průkaz tvorby sirovodíku	36
6.2.1.2.	Voges-Proskauerův test (VP test)	36
6.2.1.3.	Průkaz tvorby indolu	36
6.2.1.4.	Průkaz dekarboxylace lyzinu a ornitinu	37
6.2.1.5.	Test na přítomnost ureázy	37
6.2.1.6.	Testy zkvašování různých druhů cukrů – průkaz glykosidás	37
6.2.1.7.	TSI agar (Triple Sugar Iron agar, Hajnův agar)	37
6.2.1.8.	ONPG-test - průkaz β-galaktosidázy	38
6.2.1.9.	Test na redukci nitrátů	38
6.2.1.10.	Průkaz oxidázy a cytochromoxidázy	38
6.2.1.11.	Test na průkaz katalázy	38
6.2.2.	Průkaz hemolýzínů - hemolytická činnost mikroorganismů	38
6.2.3.	Průkaz volné a vázané koagulázy	39
6.2.3.1.	Průkaz přítomnosti vázané koagulázy	39
6.2.3.2.	Průkaz přítomnosti volné koagulázy	39
6.3.	Imunologické a imunochemické metody	40
6.3.1.	Serologické metody	40
6.3.1.1.	Aglutinační reakce	40
6.3.1.2.	Precipitační reakce	41
6.3.2.	Imunochemické metody	41
6.3.2.1.	Imunochromatografie	41
6.3.2.2.	ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)	42
6.3.2.3.	ELFA (Enzyme-linked fluorescent assay)	42
6.3.2.4.	Imunomagnetická separace	42
7.	STANOVENÍ CITLIVOSTI MIKROORGANISMŮ K ANTIMIKROBIÁLNÍM LÁTKÁM	44
7.1.	Metody stanovení	44
7.1.1.	Semikvantitativní metody	44

7.1.2.	Kvantitativní metody	44
7.1.3.	Kultivační půdy pro stanovení citlivosti	44
7.1.4.	Inokulum	45
7.2.	Disková difúzní metoda	45
7.2.1.	Provedení diskové difúzní metody	46
7.3.	Agarová diluční metoda	46
7.4.	Diluční mikrometoda	47
7.4.1.	Vizuální hodnocení	47
7.5.	Etest	48
8.	POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE	50
8.1.	Princip metody PCR	50
8.1.1.	Základní pojmy	51
8.2.	Provedení metody PCR	51
8.2.1.	Izolace templátové DNA	51
8.2.1.1.	Lýza bakteriálních buněk varem	51
8.2.1.2.	Extrakce DNA chelexem	52
8.2.1.3.	Izolace chromozomální DNA fenolovou extrakcí	52
8.2.1.4.	Izolace DNA pomocí purifikačních kolonek	52
8.2.2.	Příprava PCR reakční směsi	52
8.2.3.	Systém kontrol PCR reakce	52
8.3.	Horizontální gelová elektroforéza	53
8.3.1.	Příprava agarózového gelu	53
8.3.2.	Elektroforéza	53
8.4.	Vyhodnocení PCR	54
8.5.	Využití metody PCR v mikrobiologii potravin	55