

	Úvod	6
	Pravidla práce v mikrobiologické laboratoři	7
1	Principy mikrobiologické práce (L. Šilhánková)	7
1.1	Plánování mikrobiologické práce, její organizace, vedení protokolů o práci	8
1.2	Získávání mikrobiálních kultur	9
1.3	Práce s odbornou literaturou	11
	Kontrolní otázky ke kap. 1	14
2	Pracovní pomůcky (K. Demnerová)	15
2.1	Sklo	15
2.2	Preparační a očkovací pomůcky	17
2.3	Kultivační zařízení	18
2.3.1	Termostaty	18
2.3.2	Třepací stroje	18
2.4	Mikroskop a jeho použití	18
2.4.1	Popis mikroskopu	19
2.4.2	Základní postup při mikroskopování	20
2.4.3	Závady při mikroskopování	21
2.4.4	Péče o mikroskop	21
2.4.5	Speciální způsoby mikroskopování	21
2.4.5.1	Fluorescenční mikroskopie	21
2.4.5.2	Fázová kontrastní mikroskopie	22
2.4.6	Elektronový mikroskop a jeho použití v mikrobiologii	23
2.4.7	Zobrazování pozorovaných objektů	24
3	Kultivace mikroorganismů (L. Šilhánková)	24
3.1	Živné půdy	24
3.1.1	Příprava živných půd	25
3.1.2	Rozlévání půd a jejich uchovávání	26
3.2	Sterilizace nádobí, živných půd a ostatních pomůcek	27
3.2.1	Fyzikální prostředky sterilace	28
3.2.1.1	Sterilizace ožeháváním	28
3.2.1.2	Sterilizace suchým teplem v horkovzdušném sterilátoru	28
3.2.1.3	Sterilizace vlhkým teplem	28
3.2.1.4	Sterilizace ultrafialovým zářením	30
3.2.1.5	Sterilizace filtrací	31
3.2.2	Sterilizace chemickými prostředky	31
3.3	Očkování mikroorganismů	32
3.3.1	Očkování z kultury ve zkumavce na šikmý agar	33
3.3.2	Očkování ze zkumavky do zkumavky tekuté nebo ztekucené živné půdy	33
3.3.3	Očkování z Petriho misky do zkumavky a naopak	33
3.3.4	Očkování vpichem	34
3.3.5	Očkování pomocí pipety	34
3.4	Inkubace	34
3.4.1	Aerobní kultivace ve větších objemech	35
3.4.2	Anaerobní kultivace	35

3.4.2.1	Odstranění kyslíku vyvařením a omezení dalšího přístupu vzduchu ke kultuře	36
3.4.2.2	Vzduchotěsné uzavření nádob a odstranění kyslíku	36
3.5	Uchovávání a oživování mikrobiálních kultur	38
3.6	Práce s bakteriofágem	39
	Kontrolní otázky ke kapitole 3	40
	Kontrolní otázky ke kapitole 2	41
4.	Morfologie a cytologie mikroorganismů (L. Šilhánková)	42
4.1	Makroskopické morfologické znaky mikroorganismů	42
4.1.1	Charakter růstu v tekuté půdě	42
4.1.2	Charakter růstu na šikmém agaru	43
4.1.3	Kolonie vyrostlé z jednotlivých buněk	44
4.1.4	Obrovské kolonie	45
4.1.5	Růst podél vpichu do agarové půdy	46
4.2	Mikroskopické morfologické a cytologické znaky mikroorganismů	46
4.2.1	Typy mikroskopických preparátů	46
4.2.2	Fixace preparátu	47
4.2.3	Barvení mikroorganismů	47
4.2.4	Aseptický postup při přípravě mikroskopického preparátu	47
4.2.5	Světelná mikroskopie bakterií	48
4.2.5.1	Jednoduché barvení bakterií po fixaci a jeho hodnocení	49
4.2.5.2	Nativní preparát pro důkaz pohybu buněk	49
4.2.5.3	Negativní barvení bakterií	50
4.2.5.4	Barvení spor rodů Bacillus a Clostridium	51
4.2.5.5	Barvení pouzder (kapsulí)	52
4.2.5.6	Gramovo barvení	53
4.2.5.7	Příprava trvalých preparátů bakterií	54
4.2.6	Světelná mikroskopie kvasinek	54
4.2.6.1	Nativní preparát kvasinek	54
4.2.6.2	Sledování tvorby pseudomycelia, mycelia a blastospor ve sklíčkové kultuře	55
4.2.6.3	Sledování askospor	56
4.2.6.4	Zjišťování teliospor a sporidií	57
4.2.6.5	Rozlišování živých a mrtvých buněk kvasinek vitálním barvením	57
4.2.6.6	Barvení glykogenu a bílkovin	58
4.2.6.7	Barvení tuku	58
4.2.6.8	Barvení jádra kvasinek	59
4.2.7	Mikroskopie plísní	59
4.2.7.1	Mikroskopické a makroskopické morfologické znaky plísní	59
4.2.7.2	Příprava mikroskopického preparátu plísní	63
4.2.7.3	Charakteristické mikroskopické znaky nejběžnějších plísní	64
4.2.7.4	Příprava sklíčkových kultur plísní a jejich mikroskopie	65
4.2.7.5	Barvení jader plísní	65
4.2.8	Měření velikosti buněk mikroorganismů	66
4.2.9	Elektronová mikroskopie mikroorganismů	67
	Kontrolní otázky ke kapitole 4	68

5	Sledování vlivu vnějších podmínek na mikroorganismy (K. Demmerová)	70
5.1	Vliv teploty na mikroorganismy	70
5.1.1	Vliv teploty na růst mikroorganismů	70
5.1.2	Stanovení smrtící teploty	70
5.1.2.1	Orientační stanovení smrtící teploty kvasinek, plísní a bakterií	71
5.1.2.2	Stanovení letaltní křivky	71
5.2	Vliv pH prostředí na růst mikroorganismů	72
5.3	Vliv osmotického tlaku na růst mikroorganismů	73
5.4	Vliv ultrafialového světla na mikroorganismy	74
5.5	Bakteriostatické působení některých barviv	74
5.6	Citlivost mikroorganismů k antimikrobiálním látkám	74
5.6.1	Zjištění citlivosti mikroorganismů k antibiotikům	75
5.6.2	Stanovení účinnosti konzervačních prostředků difuzní metodou	76
5.6.3	Stanovení fenolového koeficientu mikrobicidních látek	76
	Kontrolní otázky ke kapitole 5	78
6	Izolace mikroorganismů (L. Šilhánková)	79
6.1	Nahromaďovací kultury	79
6.2	Základní izolační techniky	82
6.2.1	Makroskopicky kontrolovatelné metody	82
6.2.1.1	Izolace kvasinek litím desek	82
6.2.1.2	Izolace roztěrem	83
6.2.1.3	Izolace čárkováním na desky	84
6.2.2	Mikroskopicky kontrolovatelné metody	85
6.2.2.1	Lindnerova kapičková metoda	85
6.2.2.2	Izolace buněk nebo spor pomocí mikromanipulátoru	86
	Kontrolní otázky ke kapitole 6	88
7	Zjišťování počtu mikrobiálních buněk v prostředí (L. Šilhánková)	90
7.1	Přehled metod zjišťování počtu mikrobiálních buněk	90
7.1.1	Počítání buněk	90
7.1.2	Stanovení buněčné hmoty mikroorganismů	92
7.1.2.1	Přímé metody	92
7.1.2.2	Nepřímé metody	93
7.1.3	Zjištění přibližného množství mikroorganismů na základě jejich biochemické činnosti	93
7.2	Jednotlivé metody stanovení počtu mikroorganismů	94
7.2.1	Mikroskopické počítání buněk	94
7.2.1.1	Stanovení počtu buněk počítací komůrkou	94
7.2.1.2	Stanovení počtu buněk ve fixovaném obarveném preparátu	96
7.2.2	Nefelometrické stanovení počtu buněk	96
7.2.3	Kultivační stanovení počtu buněk	98
7.2.3.1	Stanovení nejpravděpodobnějšího počtu mikroorganismů (MPN)	98
7.2.3.2	Deskové (plotnové) kultivační metody počítání buněk	99
7.2.3.2.1	Zalévání do pevných půd	101
7.2.3.2.2	Roztěr na povrchu pevných půd	101
7.2.3.2.3	Rozlišení jednotlivých skupin mikroorganismů	102

2.3.2.3.1	Stanovení koliformních bakterií	103	
2.3.2.3.2	Zjišťování sporotvorných bakterií	105	
2.3.2.4	Filtrační metoda stanovení počtu mikroorganismů	106	
2.3.2.5	Stanovení počtu mikroorganismů v látkách tuhé konzistence	108	
2.3.2.6	<u>Stanovení počtu mikroorganismů na povrchu předmětů</u>	109	ovce
2.3.2.6.1	Smývací metoda	109	
2.3.2.6.2	Otisková metoda	109	
2.3.2.6.3	Tamponová metoda	110	
2.3.2.7	Zjišťování počtu mikroorganismů v potravinách a potravinářských surovinách	110	
2.3.3	Stanovení počtu mikroorganismů mikrobitestem (stripem)	111	
2.4	Stanovení buněčné hmoty mikroorganismů	112	
2.4.1	Stanovení buněčné sušiny vážkovou metodou	112	
2.4.2	Stanovení buněčné sušiny z objemu buněčné hmoty	113	
2.4.3	Turbidimetrické stanovení buněčné sušiny	113	
	Kontrolní otázky ke kapitole 7	114	
	Sledování růstu mikroorganismů (K. Demnerová)	116	
1	Stanovení růstové křivky u kvasinek přímým počítáním buněk	117	
2	Stanovení růstové křivky u bakterií spektrofotometricky	118	
	Kontrolní otázky ke kapitole 8	118	
	Imunologické metody (K. Demnerová)	119	
1	Fagocytóza	120	
2	Aglutinační reakce	120	
3	Precipitační reakce	121	
4	Komplement-fixační reakce	122	
5	Imunofluorescence	123	
6	Speciální metody	124	
7	Využití imunologických metod v potravinářské mikrobiologii	124	
	Kontrolní otázky ke kapitole 9	125	
	Genetické práce	126	
.1	Zjišťování mutantů v mikrobiální populaci	126	
.1.1	Zjišťování auxotrofních mutantů	127	
.1.1.1	Zjišťování auxotrofů u bakterií	127	
.1.1.2	Zjišťování auxotrofů u kvasinek selektivním pomnožením a replikacemi	129	
.1.1.3	Zjišťování auxotrofů u kvasinek na půdě s magdalskou červení (floxinem B)	130	
.1.1.4	Zjištění respiračně deficitních mutantů v kultuře S. cerevisiae	130	
.2	Mutageneze mikroorganismů	131	
.2.1	Stanovení spontánní mutační rychlosti	132	
.2.2	Indukce mutací	134	
.2.2.1	Indukce mutantů pomocí ultrafialového záření (UV)	136	
.2.2.2	Indukce mutantů pomocí dusité kyseliny	137	
.2.2.3	Indukce mutantů pomocí alkylačních činidel	138	
.2.2.4	Indukce mitochondriálních mutací u S. cerevisiae	139	
.2.3	Testování mutagenity chemických látek pomocí mikroorganismů	140	
.2.3.1	Amesův test	140	
.2.3.2	Použití kvasinek pro testování mutagenity chemických látek	141	

	strana
10.3	Křížení a rekombinace 142
10.3.1	Křížení kvasinek a analýza produktů křížení 142
10.3.1.1	Stanovení kopulačního typu u <i>S. cerevisiae</i> 143
10.3.1.1.1	Jednoduchý postup pro jeden testovaný kmen 143
10.3.1.1.2	Obtiskový replikační postup pro prototrofní kmeny 144
10.3.1.1.3	Replikační postup využívající komplementaci 145
10.3.1.2	Postup při získávání hybridů kvasinek 146
10.3.1.3	Hybridizační postup získávání polyploidních kmenů <i>S. cerevisiae</i> 147
10.3.1.4	Sporulace diploidních kmenů a analýza spor 147
10.3.1.4.1	Tetrádová analýza 147
10.3.1.4.2	Mapování genů u <i>S. cerevisiae</i> 150
10.3.1.4.3	Hromadná analýza spor 151
10.3.2	Fúze protoplastů 153
10.3.2.1	Příprava protoplastů u <i>S. cerevisiae</i> 154
10.3.2.2	Fúze protoplastů u <i>S. cerevisiae</i> , jejich regenerace a izolace hybridů 155
	Kontrolní otázky ke kapitole 10 155
11	Identifikace mikroorganismů (L. Šilhánková, K. Demnerová) 157
11.1	Biochemické identifikační testy bakterií (K. Demnerová) 158
11.1.1	Zkvašování cukrů 158
11.1.2	Tvorba acetlylmethylkarbinolu (Voges-Proskauerův test) a test na tvorbu kyselin s methylčervení (MR-test) 160
11.1.3	Hydrolyza škrobu 160
11.1.4	Ztekucování želatiny (test na proteolytickou činnost bakterií) 161
11.1.5	Hydrolyza kaseinu 162
11.1.6	Tvorba indolu 162
11.1.7	Tvorba sirovodíku 163
11.1.8	Redukce peroxidu vodíku (test na přítomnost katalázy) 163
11.1.9	Dekarboxylace aminokyselin 163
11.1.10	Hydrolyza močoviny 164
11.1.11	Hemolytická činnost bakterií 164
11.1.12	Identifikační soupravy 165
11.1.12.1	API systém 165
11.1.12.2	Enterctube II Roche 166
11.2	Identifikační testy kvasinek (L. Šilhánková) 167
11.2.1	Zkvašování cukrů 168
11.2.2	Asimilace různých zdrojů uhlíku 169
11.2.3	Asimilace nitrátů 170
11.2.4	Štěpení arbutinu 171
11.2.5	Štěpení močoviny 171
11.2.6	Růst na půdě bez vitaminů 172
11.2.7	Tvorba látek podobných škrobu 172
	Kontrolní otázky ke kapitole 11 173
	Seznam roztoků 174
	Seznam půd 176