

20. OBSAH

Úvod	3
1. Zásady bezpečnosti práce	5
1.1. Pravidla práce v biologické laboratoři	5
1.2. Všeobecné zásady úspěšné práce v mikrobiologické laboratoři	6
1.2.1. Hlavní zásady aseptické práce	6
1.2.2. Organizace mikrobiologické práce	7
1.3. Základní terminologie	7
2. Vybavení mikrobiologické laboratoře	9
2.1. Základní laboratorní pomůcky	9
2.2. Laboratorní sklo	10
2.3. Další pomůcky	14
2.4. Přístrojové vybavení	15
2.5. Sterilizační zařízení	17
3. Mikroskopy	19
3.1. Popis zařízení	19
3.2. Osvětlení a seřízení mikroskopu	21
3.3. Práce s mikroskopem	22
3.4. Udržování a čištění mikroskopu	22
3.5. Speciální způsoby mikroskopování	23
3.5.1. Fluorescenční mikroskopie	23
3.5.2. Mikroskopie v temném poli (v zástinu)	24
3.5.3. Fázová kontrastní mikroskopie	25
3.6. Měření velikosti buněk	26
4. Mikroskopické preparáty	28
4.1. Zhotovení nativního preparátu	28
4.2. Pozorování mikroorganismů ve vlhké komůrce a ve visuté kapce	29
4.3. Fixace a barvení preparátu	29
4.3.1. Jednoduché barvení	30
4.4. Barvení podle Grama	30
4.5. Negativní barvení	31
4.6. Barvení spor	32
4.6.1. Metoda dle Wirtze-Conklina	33
4.6.2. Metoda Möllerova	33
4.6.3. Barvení spor kvasinek dle Möllera	33
4.7. Barvení pouzder	34
4.7.1. Metoda podle Burriho	34
4.7.2. Barvení podle Hisse	34
4.8. Acidorezistentní barvení	35
4.8.1. Metoda Ziehl-Neelsenova	35
4.9. Barvení glykogenu a bílkovin	36
4.10. Barvení volutinu	36
4.10.1. Barvení podle Giemsy	36
4.10.2. Metoda Neisserova	37

4.10.3. Metoda podle Alberta	37
4.10.4. Barvení volutinu u kvasinek	37
4.11. Barvení jader kvasinek	38
4.12. Barvení podle Giemsy	38
4.13. Vitální barvení	39
4.14. Barvení tuku u plísní a kvasinek	39
5. Kultivační média	41
5.1. Složení kultivačních půd	41
5.2. Nejpoužívanější ingredience pro přípravu médií	41
5.3. Druhy živných půd	44
5.4. Příprava živných půd	45
5.5. Rozlévání půd	48
5.6. Kontrola sterility živných půd	50
5.7. Uchovávání živných půd	50
6. Uchovávání a ožiování mikrobiálních kultur	51
7. Očkování mikroorganismů	52
7.1. Způsoby očkování	52
8. Izolace mikroorganismů - příprava čisté kultury	55
8.1. Nejčastěji používané metody izolace mikroorganismů	55
9. Kultivace mikroorganismů	59
9.1. Aerobní kultivace - nácvik různých způsobů očkování, izolace čisté kultury	60
10. Růst mikroorganismů na kultivačních půdách	61
10.1. Růst v tekutých půdách	61
10.2. Růst na pevných půdách	61
11. Kultivace anaerobních a mikroaerofilních mikroorganismů	64
11.1. Kultivace anaerobních mikroorganismů v anaerostatu	64
11.2. Povrchová kultivace anaerobů na Fortnerově půdě	64
12. Kultivace a identifikace plísní	66
12.1. Příprava obrovských kolonií plísní	66
12.2. Mikroskopický preparát plísní	66
12.3. Příprava sklíčkových kultur	67
12.4. Charakteristické znaky nejběžnějších plísní	68
13. Identifikace mikroorganismů pomocí biochemických testů	72
13.1. Testy založené na přeměnách sacharidů	72
13.1.1. Schopnost zkvašovat různé sacharidy za tvorby kyselin příp. plynu	72
13.1.2. Oxidačně fermentační test (OFT)	73
13.1.3. Hydrolýza škrobu (důkaz amylas)	73

13.1.4. Test na tvorbu kyselin (MRT)	74
13.1.5. Test na tvorbu acetoinu	74
13.2. Testy založené na přeměnách dusíkatých látek	75
13.2.1. Důkaz ureasy (hydrolýza močoviny)	75
13.2.2. Deaminace fenylalaninu (test na stanovení aktivity fenylalanindeaminasy	75
13.2.3. Dekarboxylace aminokyselin (test na stanovení aktivity dekarboxylasy)	76
13.2.4. Důkaz tvorby indolu (test na aktivitu tryptophanasy)	77
13.2.5. Test na ztekucení želatiny (důkaz proteolytické činnosti bakterií)	77
13.2.6. Schopnost redukce dusičnanů na dusitany (test na stanovení aktivity nitratasy)	78
13.3. Ostatní biochemické testy	79
13.3.1. Produkce sulfanu	79
13.3.2. Test na tvorbu katalasy	81
13.3.3. Stanovení aktivity cytochromoxidasy	81
13.3.4. Stanovení aktivity β -D-galaktosidasy (ONPG test, test na fermentaci laktosy)	83
13.3.5. Důkaz produkce hemolysinů (hemolytická činnost bakterií)	84
13.3.6. Aktivita plasmakoagulasy	85
13.3.7. Schopnost mikroorganismu asimilovat anorganický uhlík (test na stanovení utilizace citrátu)	85
13.3.8. Sledování pohyblivosti buněk	85
13.3.9. Biochemický klín (Švejcarova plotna)	86
13.4. Identifikace pomocí diagnostických testů - Mikrotestů	88
13.5. Identifikační testy kvasinek	90
13.5.1. Metody určování kvasinek	90
13.5.2. Zjišťování tvorby pseudomycelia a blastospor	91
13.5.3. Biochemická vyšetření	92
13.5.3.1. Zkvašování sacharidů (zymogramy)	92
13.5.3.2. Asimilační testy na využívání různých zdrojů uhlíku	93
13.5.3.3. Asimilační testy na využívání různých zdrojů dusíku	94
13.5.3.4. Štěpení arbutinu (průkaz aktivity β -glukosidasy)	94
13.5.3.5. Štěpení močoviny	94
13.5.3.6. Tvorba amyloidních látek	95
14. Vliv vnějších podmínek na růst mikroorganismů	96
14.1. Vliv teploty na růst mikroorganismů	96
14.1.1. Stanovení smrtící (letální) teploty	96
14.1.2. Stanovení doby potřebné k usmrcení mikroorganismů	97
14.2. Vliv pH na růst mikroorganismů	97
14.3. Vliv osmotického tlaku na růst mikroorganismů	98

14.4.	Vliv UV-záření na růst mikroorganismů	99
14.4.1.	Kontrola účinnosti germicidních zářičů	100
14.5.	Vliv konzervačních a desinfekčních prostředků	100
14.5.1.	Stanovení fenolového koeficientu suspenzní metodou	101
14.5.2.	Závislost účinnosti desinfekčních prostředků na koncentraci	101
14.5.3.	Stanovení účinnosti konzervačních chemických prostředků difúzní metodou	102
14.6.	Citlivost mikroorganismů k dalším antimikrobiálním látkám	103
14.6.1.	Bakteriostatické působení některých barviv	103
14.6.2.	Citlivost mikroorganismů k antibiotikům	103
14.6.2.1.	Kvalitativní stanovení citlivosti mikroorganismů na antibiotika difúzní metodou	104
15.	Zjišťování počtu mikrobiálních buněk v prostředí	107
15.1.	Mikroskopické počítání buněk	107
15.1.1.	Zjišťování počtu buněk v počítacích komůrkách	107
15.1.2.	Počítání buněk ve fixovaném nátěru na podložním sklíčku	109
15.2.	Kultivační stanovení počtu mikroorganismů	109
15.2.1.	Stanovení koncentrace živých buněk výsevem na plotny	110
15.2.2.	Filtrační metoda stanovení počtu mikroorganismů	111
15.2.2.1.	Stanovení koliformních mikroorganismů v pitné vodě metodou membránových filtrů	111
15.3.	Stanovení počtu mikroorganismů na povrchu předmětů	112
15.3.3.	Metoda výplachová (smývací)	113
15.3.3.2.	Stěrová metoda	113
16.	Vybrané sérologické vyšetřovací metody v mikrobiologii	115
16.1.	Aglutinační reakce	116
16.1.1.	Sklíčková metoda provedení aglutinačního testu	117
16.2.	Precipitační reakce	118
16.2.1.	Prstěncový test	118
16.2.2.	Ouchterlonyho imunodifúzní test	119
17.	Seznam roztoků	121
18.	Seznam půd	127
19.	Literatura	136
20.	Obsah	137