



EVROPSKÁ UNIE  
Evropské strukturální a investiční fondy  
Operační program Výzkum, vývoj a vzdělávání



# Potravinářská mikrobiologie

---

*doc. RNDr. Leona Buňková, Ph.D.*  
*Mgr. Magda Janalíková, Ph.D.*

*„Tento výstup lze užít v souladu s licenčními podmínkami Creative Commons BY 4.0 International  
(<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode>).“*



## Obsah

<b>Obsah</b>	<b>2</b>
<b>Úvod</b>	<b>3</b>
<b>1 Práce s eukaryotickými mikroorganismy</b>	<b>4</b>
1.1 Morfologické a cytologické znaky mikroskopických hub	4
1.1.1 Makroskopické morfologické znaky mikroskopických hub	4
1.1.2 Mikroskopické a cytologické znaky mikroskopických hub	8
1.2 Vitalita a viabilita kvasinek	13
1.2.1 Použité pomůcky a mikroorganismy	13
1.2.2 Vitální test kvasinek	13
1.2.3 Test acidifikační schopnosti kvasinek	15
<b>2 Citlivost mikroorganismů významných v potravinářství k teplotě</b>	<b>17</b>
2.1 Vliv teploty na potravinářsky významné mikroorganismy	17
2.1.1 Použité pomůcky a mikroorganismy	18
2.1.2 Stanovení vlivu teploty na vybrané mikroorganismy pomocí záznamníku růstu buněk (osobního bioreaktoru)	18
<b>3 Rostoky a živná média</b>	<b>20</b>
<b>4 Anaerobní a mikroaerofilní kultivace</b>	<b>22</b>
4.1 Stanovení anaerobních sporotvorných bakterií	23
4.1.1 Princip metody	23
4.1.2 Použitý materiál, pomůcky a přístroje	24
4.1.3 Postup	24
4.1.4 Vyhodnocení	25
<b>5 Probiotické bakterie</b>	<b>26</b>
5.1 Stanovení probiotických bakterií <i>Lactobacillus rhamnosus</i> v jogurtu	27
5.1.1 Použitý materiál, pomůcky a přístroje	27
5.1.2 Postup	27
5.1.3 Vyhodnocení	28
5.2 Selektivní stanovení probiotických bakterií rodu <i>Bifidobacterium</i> sp. v mléčném výrobku	28
5.2.1 Použitý materiál, pomůcky a přístroje	28
5.2.2 Postup	28
5.2.3 Vyhodnocení	29
<b>Literatura</b>	<b>30</b>
<b>Symboly a zkratky</b>	<b>32</b>
<b>Seznam obrázků</b>	<b>33</b>
<b>Seznam tabulek</b>	<b>34</b>

## Úvod

Mikrobiologická analýza potravin je nedílnou součástí hodnocení jakosti a zdravotní nezávadnosti potravin. Právě problematika bezpečnosti potravin se v poslední době dostává stále častěji do popředí zájmu. Na druhou stranu v případě fermentovaných potravin, při nichž se cíleně využívají mikroorganismy, tzv. startérové kultury, je třeba znát jejich úlohu při výrobě potravin a také jejich životaschopnost a další technologicky významné vlastnosti.

Laboratorní úlohy v předmětu Potravinářská mikrobiologie navazují na přednášky, na kterých se studenti seznámí s principy mikrobiologické analýzy potravin, osvojí si znalosti o výskytu mikroorganismů v potravinách, vztazích mezi nimi a také o faktorech, které mohou ovlivňovat růst a množení mikroorganismů v potravinách.

V laboratorních cvičeních z Potravinářské mikrobiologie se studenti seznámí s oběma skupinami mikroorganismů, které se mohou v potravinách vyskytovat – s technologicky žádoucími mikroorganismy i s nežádoucími mikroorganismy (potenciálně patogenními nebo potraviny znehodnocujícími). Předkládané laboratorní úlohy se věnují anaerobním či mikroaerofilním bakteriím, způsobu jejich stanovení a zejména podmínkám anaerobní kultivace. Výskyt anaerobních sporulujících mikroorganismů v potravinách může způsobit kažení zejména v konzervářských výrobcích, avšak mohou také produkovat životu nebezpečné toxiny.

## 1 Práce s eukaryotickými mikroorganismy

V potravinách se mohou nacházet prokaryotické i eukaryotické mikroorganismy. Mezi prokaryotické mikroorganismy řadíme bakterie, mezi eukaryotické mikroskopické houby – kvasinky a mikroskopické vláknité houby (plísně). I když jsou mnohé postupy práce s prokaryotickými i eukaryotickými mikroorganismy shodné, je možné nalézt určitá specifika práce s eukaryotickými mikroorganismy.

### 1.1 Morfologické a cytologické znaky mikroskopických hub

Při kontrole čistoty kultury, při identifikaci mikroorganismů nebo při posouzení fyziologického stavu mikroorganismů v kultuře zjišťujeme jejich morfologické a cytologické znaky.

**Makroskopické morfologické znaky** jsou patrné okem a ukazují na způsob růstu mikroorganismů v živných půdách. **Mikroskopické morfologické znaky** můžeme pozorovat jen mikroskopem, popř. lupou. **Cytologické znaky**, tj. vnitřní strukturu jednotlivých buněk, můžeme pozorovat jen mikroskopem a často si pomáháme speciálními úpravami pozorovaného materiálu, např. různými typy fixace nebo barvení. Makroskopické a mikroskopické znaky se hodnotí vždy současně (Demnerová a kol., 2001; Jandová a Kotoučková, 1996; Kopecká a Rotková, 2017).

#### 1.1.1 Makroskopické morfologické znaky mikroskopických hub

##### **Cíle:**

1. Popsat základní znaky kolonií mikroskopických hub
2. Definovat rozdíly mezi koloniemi kvasinek a mikroskopických vláknitých hub

Makroskopické morfologické znaky jsou často ovlivněny použitou kultivační půdou, přesto však přinášejí důležité informace o povaze mikroorganismu a čistotě kultury. V případě mikroskopických hub mohou pomoci při identifikaci rodů zejména u plísni produkujících charakteristické barvivo. U mikroskopických hub hodnotíme charakter růstu po kultivaci v tekuté půdě, jednotlivých buněk na agarové půdě, případně suspenze buněk nebo spor v jednom místě agarové půdy (tzv. obrovské kolonie) (Demnerová a kol., 2001).

Pro sledování morfologických znaků kvasinek se používá **Sabouraudův agar** nebo **sladinový agar** (Malt extract agar), pro sledování morfologických znaků plísni **Czapek-Dox agar**, případně sladinový agar (Demnerová a kol., 2001; Jandová a Kotoučková, 1996).

**1.1.1.1 Použité pomůcky a mikroorganizmy**

**Mikroorganizmy:** *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces pastorianus*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Rhodotorula* sp., *Torulaspora delbrueckii*, *Candida* sp., *Debaryomyces hansenii*, *Hanseniaspora uvarum*, *Zygosaccharomyces bailli*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Penicillium funiculosum*, *Penicillium camemberti*, *Penicillium candidum*, *Penicillium nalgiovense*, *Penicillium roqueforti*, *Geotrichum candidum*, *Alternaria* sp., *Mucor* sp., *Rhizopus* sp., *Cladosporium* sp., *Monilia* sp., *Trichothecium roseum*, *Trichoderma viride*

**Pomůcky:** očkovací klička, očkovací jehla, pipety, zkumavky se Sabouraudovým a bujónem, Petriho misky se Sabouraudovým agarem a Czapek-Dox agarem, fyziologický roztok

**1.1.1.2 Morfologie kolonií kvasinek**

Při očkování kvasinek je třeba dodržovat zásady aseptické práce. Každý student zaočkuje 2 kvasinky. Postup upraven podle Jandová a Kotoučková (1996).

1. Sabouraudův bujón slabě zaočkovat kulturou kvasinek – suspenzi kvasinek na očkovací kličce rozetřít do bujónu.
2. Kapku kultury ředěné fyziologickým roztokem očkovat do středu Petriho misky se Sabouraudovým agarem.
3. Inkubovat v termostatu při teplotě 28 °C po dobu 3 dnů.
4. Po uplynutí doby potřebné pro nárůst vyhodnotit morfologii kolonií.

**Hodnocení:**

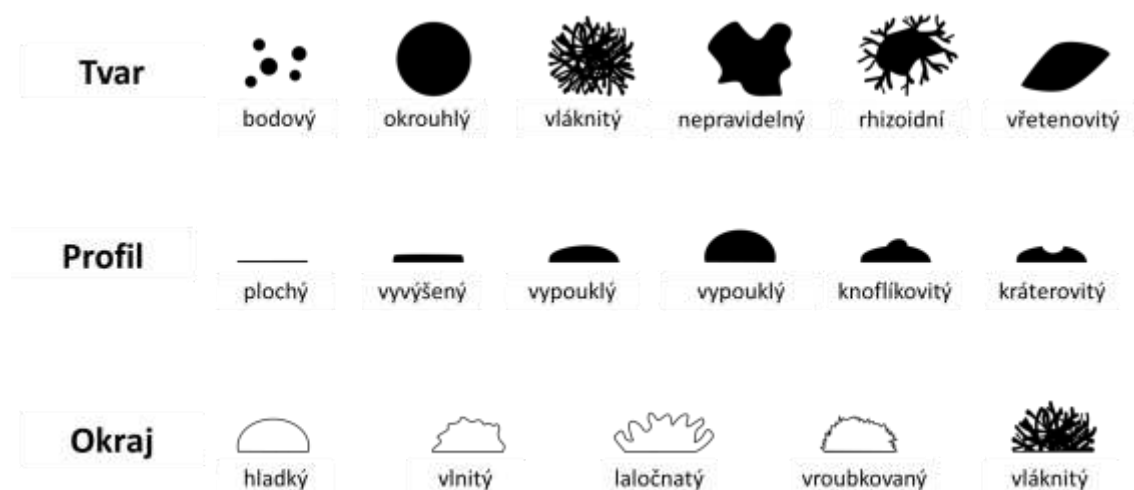
V protokolu do přehledné tabulky (tabulka 1) každý student uvede vyhodnocení morfologie kolonií 5 kvasinek – dvě, které očkoval, a další 3 vyžádané od jiných studentů. Nezapomenout uvést číslo (označení) kultury.

	<b>Růst v bujónu</b>	<b>Velikost (Ø mm)</b>	<b>Barva</b>	<b>Tvar</b>	<b>Profil</b>	<b>Okraje</b>	<b>Povrch</b>
<i>Kvasinka 1</i>							
<i>Kvasinka 2</i>							
<i>Kvasinka 3</i>							
<i>Kvasinka 4</i>							
<i>Kvasinka 5</i>							

**Tabulka 1: Hodnocení makroskopických znaků kvasinek**

Růst kultury v tekutém médiu – tvorba sedimentu, zákalu, prstence, křísu.

Růst kultury na Sabouraudově agaru – velikost kolonií, morfologie (tvar, profil, okraj – obr. 1), tvorba pigmentu, vzhled povrchu kolonií (hladký, drsný, sliznatý).



Obrázek 1: Morfologie kolonií bakterií a kvasinek (upraveno podle „Kultura mikroorganizmów“, 2019)

### 1.1.1.3 Morfologie kolonií mikroskopických vláknitých hub

Při očkování mikroskopických vláknitých hub (plísňí) je třeba přísně dodržovat zásady aseptické práce, abychom zabránili rozšiřování spor plísňí do okolí. Každý student zaočkuje 3 plísně. Postup upraven podle Demnerová a kol. (2001) a Jandová a Kotoučková (1996).

#### 1. Zásady aseptické práce s plísněmi:

- Zkumavky s plísněmi otevírat co nejkratší dobu, před a po přenesení inokula pečlivě ožíhat hrdlo i zátku.
- Při manipulaci na Petriho miskách otevírat co nejkratší dobu, víčko nadzvednout jen nepatrně.
- K přeočkování mycelia z misky na misku použít sterilní očkovací jehlu. Suspenzi očkovat sterilní očkovací kličkou nebo pipetou.

#### 2. Kapku sporové suspenze ředěné fyziologickým roztokem očkovat do tří bodů odpovídajících vrcholům rovnostranného trojúhelníka vzdálených cca 3 cm od kraje Petriho misky s Czapek-Dox agarem. Každou misku očkovat paralelně (2x).

*Poznámka:* Kvůli zabránění rozptýlení spor na povrch živné půdy se doporučuje očkovat plotny zesponu (Petriho misku držet dnem vzhůru).

3. Inkubovat paralelně v termostatu (v temnu) a na světle při teplotě 25 °C po dobu 2 – 5 dnů dnem vzhůru.
4. Po uplynutí doby potřebné pro nárůst vyhodnotit morfologii kolonií.

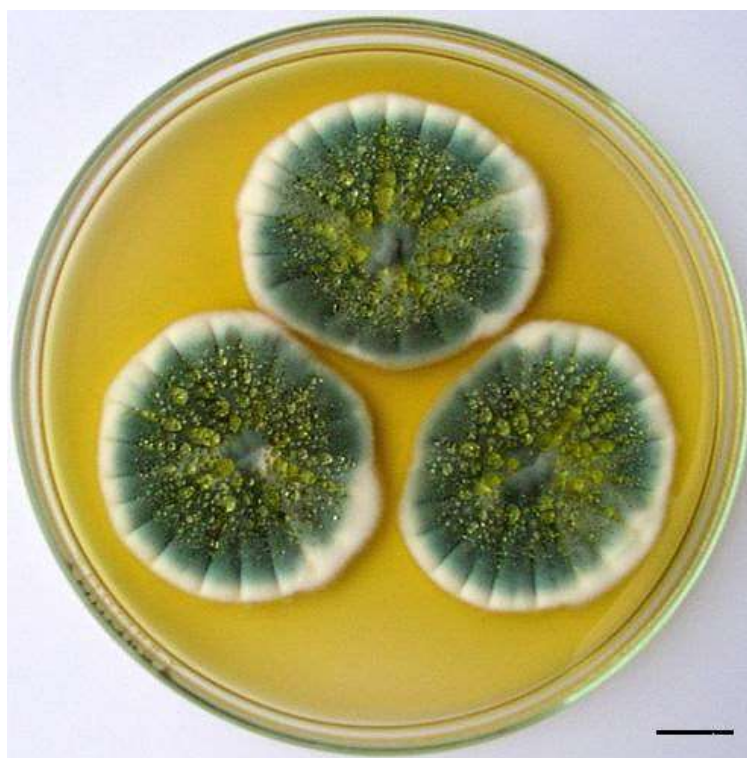
**Hodnocení:**

V protokolu do přehledné tabulky (tabulka 2) každý student uvede vyhodnocení morfologie kolonií 5 plísní – tři, které očkoval, a další 2 vyžádané od jiných studentů. Nezapomenout uvést číslo (označení) kultury.

Růst kultury na Czapek-Dox agaru (obrovské kolonie, obr. 2) – kolonie je tvořena povrchovým a substrátovým mycelium, přičemž zastoupení obou forem se může lišit na různých substrátech. Hodnotit následující znaky:

- velikost kolonií, případně rychlost růstu (vyjadřuje se jako průměr kolonie v mm za časovou jednotku),
- charakter růstu – volný, kompaktní, kožovitý,
- povrch nárůstu – sametový, mechovitý, krátce nebo dlouze vláknitý, svazkovitý, provazcovitý, chomáčkovitý,
- výšku a hustotu vzdušného mycelia,
- pigmentaci vrchní a spodní strany kolonie, vylučování pigmentu do prostředí,
- přítomnost kapiček transpirované kapaliny (exudátu) na povrchu nárůstu a jejich zbarvení,
- pach kultury.

V protokolu srovnat uvedené znaky kolonií kultivovaných na světle a v termostatu.



Obrázek 2: Kolonie *Penicillium chrysogenum* tvořící exudát („*Penicillium chrysogenum*“, 2019)



	Velikost (Ø mm)	Růst	Povrch	Tvar	Barva	Pigment do prostředí	Exudát	Pach
Plíseň 1								
Plíseň 2								
Plíseň 3								
Plíseň 4								
Plíseň 5								

Tabulka 2: Hodnocení makroskopických znaků plísní

### 1.1.2 Mikroskopické a cytologické znaky mikroskopických hub

#### Cíle:

1. Popsat základní morfologické struktury mikroskopických hub
2. Odlišit kvasinky od mikroskopických vláknitých hub
3. Seznámit se s přípravou sklíčkových kultur

Při sledování mikroskopických znaků kvasinek a plísní se připravují nativní, barvené nebo polotrvalé preparáty (Jandová a Kotoučková, 1996).

Při mikroskopování **kvasinek** se zaměřujeme na **morfologii buněk** (tvar a velikost), způsob vegetativního rozmnožování (dělení, pučení, pučení na široké základně), přítomnost **pseudomycelia** nebo pravého **mycelia s blastosporami**, tvorbu **askospor** (a jejich tvar, počet a uspořádání ve vřecku, tvar vřeka), tvorbu dalších typů **specializovaných buněk** (balistospor, artrospor, chlamydospor, teliospor, sporidií) nebo typ spájení. Tyto znaky napomáhají při určování rodů kvasinek (Demnerová a kol., 2001; Kocková-Kratochvílová, 1990).

Morfologické znaky **plísní** jsou důležitým diagnostickým kritériem při určování rodů a druhů. Kromě mikroskopu se často využívá i binokulární lupa, pomocí které pozorujeme větší struktury. U plísní, podobně jako u kvasinek, sledujeme např. **typ mycelia**, **morfologii buněk**, přítomnost **fruktifikačních struktur** (konidiofor, sporangiofor, sporangia, kolumely, vřeka, askospor, zygospor a dalších), **zvláštních útvarů** (stolonů, rhizoidů, chlamydyospor, sklerocií, sporodochií, pyknid a dalších) nebo způsob rozmnožování (Demnerová a kol., 2001; Jandová a Kotoučková, 1996; Kocková-Kratochvílová, 1990).

#### 1.1.2.1 Použité pomůcky a mikroorganizmy

**Mikroorganizmy:** stejné jako v předchozí úloze (viz kapitola 1.1.1.1)

**Pomůcky:** mikroskop, binokulární lupa, Petriho misky s narostenými kulturami kvasinek a plísní na Sabouraudově a Czapek-Dox agaru, preparační jehla, pinzeta, odmaštěná podložní a krycí



skla, sterilní Petriho misky, se skleněnými kuličkami, skleněná tyčinka, sterilní voda, sterilní fyziologický roztok, Sabouraudův agar, laktofenol, glycerol, kvasnice, plísňové sýry, tempeh, plesnivé potraviny

#### 1.1.2.2 Nativní preparát kvasinek

Nativní preparát kvasinek se připravuje za účelem pozorování **skutečného tvaru a struktury buněk**. Preparát se nefixuje a nebarví, tvar a struktura buněk tak zůstávají neporušeny. Připravuje se ve vodě nebo fyziologickém roztoku (Demnerová a kol., 2001, Kopecká a Rotková, 2017).

Při přípravě a pozorování mikroskopického preparátu kvasinek je třeba dodržovat zásady práce v mikrobiologické laboratoři a správného mikroskopování. Každý student připraví preparát *Saccharomyces cerevisiae*, další zvolené kvasinkové kultury a kvasnic.

Postup upraven podle Demnerová a kol. (2001), Jandová a Kotoučková (1996), Kopecká a Rotková (2017).

1. Očištěné a odmaštěné podložní sklíčko označit číslem kultury.
2. Na sklíčko nanést kapku sterilní destilované vody nebo sterilního fyziologického roztoku.
3. Očkovací kličkou vnést do kapky malé množství 24–48 hodinové kultury a důkladně resuspendovat.

*Poznámka:* Očkovací klička musí být vyžehána v plameni a ochlazena. Kultury postačuje malé množství, aby preparát nebyl příliš hustý.

4. Kapku neroztírat, překrýt krycím sklíčkem tak, aby v preparátu nevznikly vzduchové bubliny. Přebytkovou kapalinu odsát filtračním papírem.

*Poznámka:* Buňky z tekutého média lze pozorovat přímo v médiu bez ředění.

5. Pozorovat při zvětšení 10x45 nebo 10x60 do 5 minut od přípravy preparátu z důvodu jeho vysychání a zakreslit buňky.

#### Hodnocení:

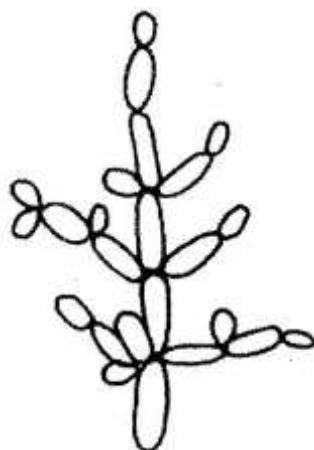
V protokolu zakreslit dostatečně velký mikroskopický preparát obou kmenů kvasinek a kvasnic. Uvést zvětšení mikroskopu. Nezapomenout uvést číslo (označení) kultury. Hodnotit následující znaky:

- tvar buněk, jejich velikost, případně jejich vnitřní strukturu,
- přítomnost pseudomycelia nebo mycelia, blastospor.

#### 1.1.2.3 Tvorba pseudomycelia kvasinek

Tvorba pseudomycelia je charakteristická pro některé kvasinky. **Pseudomycelium** (nebo také tzv. nepravé mycelium; obr. 3) je tvořeno řetízky

buněk, které vznikly postupným vypučením kvasinkových buněk, které se neoddělily a zůstaly spojeny. Vývoj pseudomycelia je podporován přítomností vzdušného kyslíku, nepřítomností zkvasitelných sacharidů v živném médiu, přítomností škrobu a některých dusíkatých látek. Pro diagnostické účely je důležitý tvar a uspořádání **blastospor**, svazků buněk pučících z pseudomycelia nebo mycelia, které se vyskytují v chomáčcích, přeslenech nebo nepravidelných větvích (Demnerová a kol., 2001; Kocková-Kratochvílová, 1990).



**Obrázek 3: Pseudomycelium kvasinek s blastosporami (Šilhánková, 2008)**

Při pozorování pseudomycelia a blastospor kvasinek se často používají tzv. **sklíčkové kultury**. Opět je při přípravě preparátu třeba dodržovat zásady práce v mikrobiologické laboratoři. Každý student připraví jednu sklíčkovou kulturu zvolené kvasinky. Postup upraven podle Demnerová a kol. (2001).

1. Podložní sklo pomocí vyžíhané pinzety asepticky umístit na kuličky ve sterilních Petriho miskách.
2. Na sterilní podložní sklo přenést kapku rozpuštěného Sabouraudova agaru a pomocí sterilní skleněné tyčinky rozetřít do tenké vrstvy (0,5–1 mm).
3. Ve sterilním fyziologickém roztoku připravit řídkou suspenzi kultury kvasinek. Pomocí vyžíhané kličky udělat na ztuhlé půdě na sklíčku několik teček.
4. Pod podložní sklo na kuličky pipetovat cca 5 ml sterilní destilované vody.
5. Misku se zaočkovaným agarem na podložním skle kultivovat při 28 °C po dobu 5 dnů.
6. Každý den na povrchu agaru pozorovat (okem) tvorbu kolonií a výběžků pseudomycelia.
7. V pozitivním případě (zpravidla po 4–5 dnech) vyjmout sklíčkovou kulturu z Petriho misky a pozorovat pod mikroskopem bez krycího sklíčka. Zakreslit do protokolu.

**Hodnocení:**

Popsat tvorbu kolonií a pseudomycelia v průběhu 5 dnů.

V protokolu zakreslit dostatečně velký mikroskopický preparát a zaznamenat charakter pseudomycelia a blastospor. Uvést zvětšení mikroskopu a číslo kultury.

**1.1.2.4 Nativní preparát plísní**

Nativní preparát plísní se připravuje za účelem pozorování struktur, které nejsou změněny vlivem fixace. Jako pozorovací médium se zpravidla používá destilovaná voda nebo glycerol. Při pozorování hub vytvářejících vřeska nebo konidie je možné použít také laktofenol nebo kyselinu mléčnou obarvenou metylenovou modří. Při pozorování a diagnostice struktur mikroskopických vláknitých hub lze rovněž využít sklíčkové kultury (Demnerová a kol., 2001).

Při přípravě a pozorování preparátu plísní je třeba dodržovat zásady aseptické práce, aby plísňové spory nedostaly do prostředí, a správného mikroskopování. Každý student připraví 2 preparáty kultur neznámé plísně a 2 preparáty plísní z potravin. Postup upraven podle Demnerová a kol. (2001), Jandová a Kotoučková (1996).

1. Na odmaštěné a označené sklíčko nanést kapku sterilní destilované vody nebo jiného uzavíracího média (např. glycerolu, laktofenolu).
2. Sterilní preparační jehlou asepticky odebrat část mycelia neznámé kultury a plísně z potravin a přenést do kapky na podložním skle.

*Poznámka:* Nejde-li odebrat pouze mycelium, odebrat kulturu i s částí agaru nebo potravin a potom je na sklíčku opatrně odpreparovat.

3. Pomocí jehly rozprostřít preparát na co největší plochu. Překrýt krycím sklíčkem tak, aby v preparátu nevznikly vzduchové bubliny. Mycelium neroztlačovat ani neroztírat, aby nedošlo k porušení fruktifikačních orgánů. Přebytkovou kapalinu odsát filtračním papírem.

*Poznámka:* U obtížně smáčitelných kultur je vhodné připravit preparát do 70% etanolu a po zakrytí krycím sklíčkem jej nahradit jiným médiem.

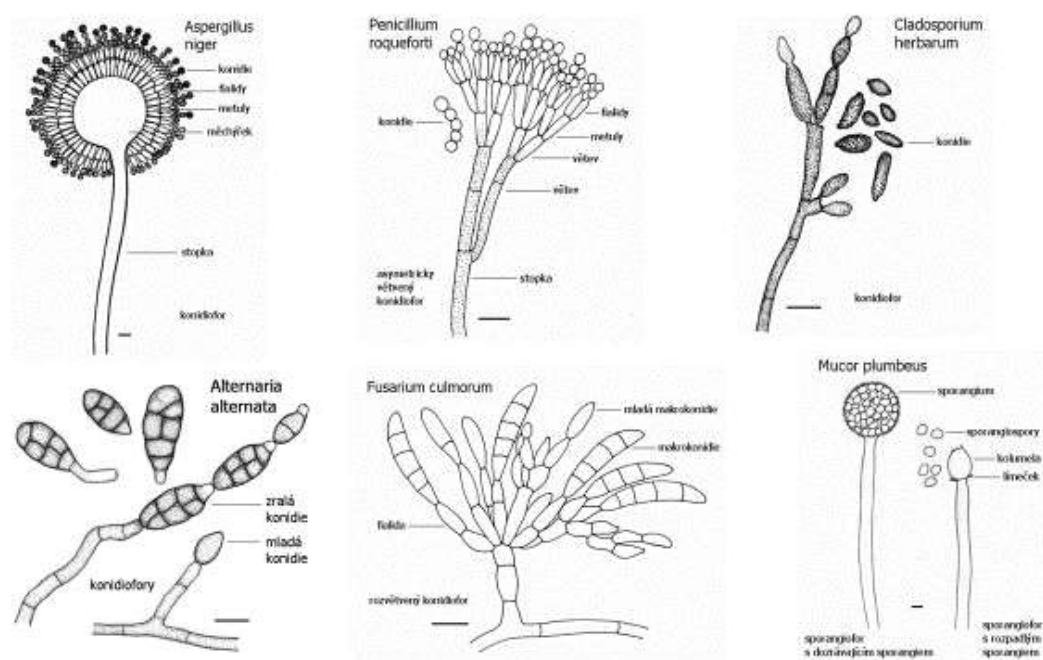
4. Pozorovat nejprve při malém zvětšení, poté použít větší zvětšení. Zakreslit pozorované útvary.

**Hodnocení:**

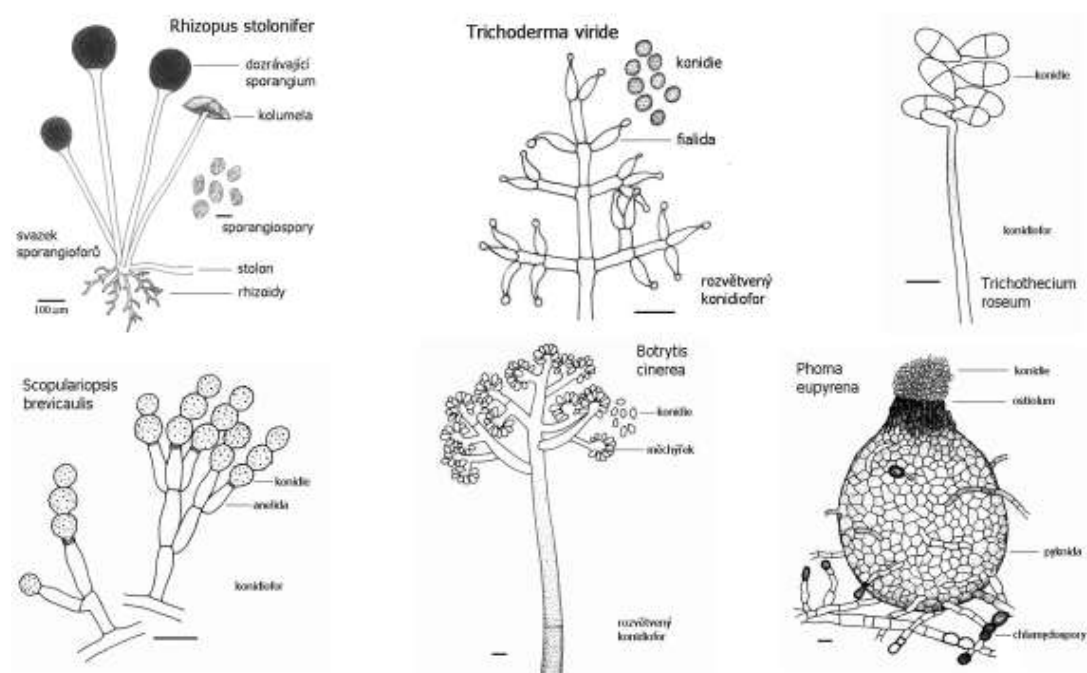
V protokolu zakreslit dostatečně velký mikroskopický preparát všech 4 kultur plísní a na základě obrázků 4 a 5 se je pokusit identifikovat do rodů. Uvést zvětšení mikroskopu a číslo (označení) kultury. Hodnotit následující znaky:

- tloušťka a barva hyf, typ mycelia – septované, neseptované,
- způsob větvení mycelia,

- nepohlavní fruktifikační struktury – konidiofor (větvený, nevětvený), konidie, sporangiofor, sporangium, kolumela, sporangiospory, sterigmata, jejich délka, tloušťka, větvení, zakončení, apod.,
- pohlavní fruktifikační struktury – vřecko, askospory, zygospor, zygospory,
- zvláštní struktury – přítomnost a umístění chlamydyospor, sklerocií, koremií, sporodochií, pyknid, stolonů, rhizoidů.



Obrázek 4: Vybraní zástupci mikroskopických vláknitých hub (Chumchalová a kol., 2006)



Obrázek 5: Vybraní zástupci mikroskopických vláknitých hub (Chumchalová a kol., 2006)

## 1.2 Vitalita a viabilita kvasinek

Jedním z faktorů, které významně ovlivňují kvalitu konečného produktu s využitím kvasinek, je fyziologický stav a metabolická aktivita použitých kvasinek. **Viabilita**, neboli životaschopnost, se vyjadřuje jako poměr živých buněk v kultuře k jejich celkovému počtu v kultuře. **Vitalita** pak ukazuje na fermentační a obecně metabolickou schopnost buněk. Obě tyto vlastnosti hrají významnou roli např. při výrobě piva. U stárnoucích buněk nebo buněk vystaveným stresu se jejich vitalita snižuje (Kopecká a Rotková, 2017).

### **Cíle:**

1. Rozlišit živé a mrtvé kvasinkové buňky vitálním barvením
2. Stanovit vitalitu kvasinek při zvýšené teplotě
3. Stanovit fyziologický stav kvasinek pomocí AP-testu

### 1.2.1 Použité pomůcky a mikroorganizmy

Mikroorganizmy: vybrané definované kultury kvasinek, kvasnice – pekařské droždí, pivovarské kvasinky

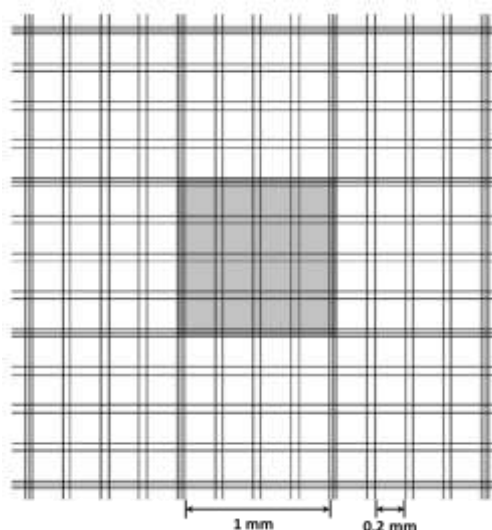
Pomůcky: mikroskop, Bürkerova komůrka, zkumavky, Ehrlenmeyerova baňka, pipety, kapátko, vodní lázeň, teploměr, centrifuga, pH metr, elektromagnetické míchadlo, sterilní destilovaná voda, sterilní fyziologický roztok, metylenová modř, roztok glukózy (50 %)

### 1.2.2 Vitální test kvasinek

**Vitální test** se využívá pro zjišťování poměru živých a mrtvých buněk v pekařském droždí, pivovarských kvasnicích nebo během technologického procesu. Pomocí vitálního testu lze sledovat např. působení zvýšené teploty na přežívání buněk v čase.

Test spočívá v barvení nativního preparátu, při kterém se zbarví pouze mrtvé buňky, živé zůstávají nezbarveny, a následném přímém počítání buněk pod mikroskopem v počítací komůrce. Princip testu je založen na **propustnosti cytoplazmatické membrány** mrtvých buněk, která není semipermeabilní a barvivo se tak dostává dovnitř do cytoplazmy buněk. **Živé buňky** barvivo dovnitř nepropouštějí. K barvení mrtvých buněk v prostředí buněk živých se využívá málo toxických barviv, např. roztok **metylenové modři** zředěný a pufovaný fosfátem o pH 4,6. Nicméně i přes nízkou toxicitu je třeba preparát ihned mikroskopovat, zvláště v přítomnosti kyslíku, který toxicitu metylenové modři podporuje (Demnerová a kol., 2001; Kopecká a Rotková, 2017).

Pro počítání buněk v preparátu je třeba mít suspenzi s vhodnou hustotou buněk. Je možné použít různé typy **počítacích komůrek** (např. Thomova nebo Bürkerova). Všechny se skládají ze silného podložního skla s vyrytou sítí čtverečků (obr. 6) a krycího skla, které se pokládá na boční lišty, čímž vzniká mezi sklíčky prostor o přesně definované hloubce. Pracuje se s určitým objemem vzorku, ze známého objemu se dopočítává objem vzorku pro 1 ml (Frébortová, 2017; Jandová a Kotoučková, 1996; Kopecká a Rotková, 2017).



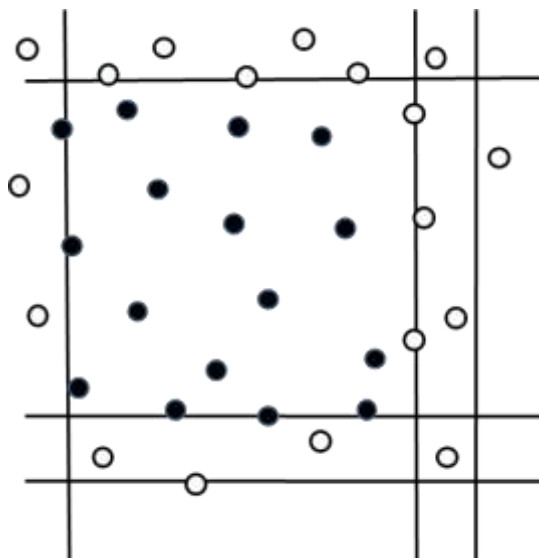
Obrázek 6: Bürkerova počítací komůrka (upraveno podle Frébortová, 2017)

### **Postup:**

Postup upraven dle Jandová a Kotoučková (1996) a Kopecká a Rotková (2017).

1. Kousek pekařského droždí nebo kulturu kvasinek z Petriho misky rozmíchat ve fyziologickém roztoku v baňce tak, aby vznikla slabě opaleskující směs.
2. Pipetovat po 3 ml suspenze do 4 zkumavek. První zkumavku zpracovat jako kontrolní vzorek pro zjištění počtu živých buněk při pokojové teplotě na začátku pokusu (0 minut). Zbylé zkumavky umístit do vodní lázně o teplotě 60 °C.
3. Do středu podložního skla Bürkerovy komůrky přenést kapku připravené suspenze kultury a překrýt krycím sklem. K hraně krycího skla přikápnout kapku metylenové modři, na opačné straně ji odsát filtračním papírem, až je celý preparát zbarven modře.
4. Po usazení buněk (1-2 minuty) pozorovat buňky při zvětšení 10×40.
5. V 10 čtvercích počítat zbarvené (mrtvé) a nezbarvené (živé) buňky. Do součtu zahrnout i buňky dotýkající se 2 hran pole (obr. 7) – na levé a spodní hraně (znázorněno černou barvou). Buňky ležící na zbývajících dvou stranách se nepočítají (označeny bílou barvou).





Obrázek 7: Pravidlo pro počítání buněk v počítací komůrce (archiv autorky)

6. Stanovit počet živých a mrtvých buněk inkubovaných při 60 °C po 5, 10 a 20 minutách postupem popsaným výše.

#### **Hodnocení:**

- V protokolu zakreslit dostatečně velký obraz pozorovaný v 1 zorném poli. Nezapomenout uvést mikroskopické zvětšení.
- Ve všech čtyřech případech vypočítat % mrtvých kvasinek v kultuře.
- V MS Excel sestavit graf závislosti přežívajících buněk na délce vystavení zvýšené teplotě (osa x – čas; osa y – % přežívajících buněk).

#### **1.2.3 Test acidifikační schopnosti kvasinek**

Test acidifikační schopnosti kvasinek (**AP-test**) se používá ke stanovení **metabolické kompetence pivovarských kvasinek** opakovaně nasazovaných v provozu. Vychází ze znalostí membránových pochodů probíhajících v kvasinkách metabolizujících endogenní i exogenní substráty. Na acidifikační schopnosti kvasinek se podílí enzym  $H^+$ -ATPáza, jejíž činnost závisí na stavu buněk (čerstvé buňky, buňky po skladování, apod.) a rovněž i na růstové fázi buněk. Při průchodu živin přes membránu vzniká činností tohoto enzymu **elektrochemický gradient** protonů, který způsobí **pokles pH**. Kromě ATPázy změny pH prostředí ovlivňuje i vylučování metabolických produktů, převážně slabých kyselin. Při nedostatku metabolizovatelného sacharidu (např. glukózy) využívá kvasinka pro udržení poměru extracelulárního a intracelulárního pH energii zásobních polysacharidů, glykogenu a trehalózy (Kopecká a Rotková, 2017).



AP-test je založen na měření změny pH prostředí vyvolané kvasinkami. Při testu se určitou dobu měří změna pH extracelulárního prostředí, poté se k suspenzi buněk přidá glukóza a měří se opět určitou dobu. Po přidání sacharidu dochází k poklesu pH kvasničné suspenze. Změna pH během 10 minut po přidání kvasinek do vody (nepřítomnost vnějšího zdroje glukózy) se označuje jako **spontánní acidifikační schopnost** a vyjadřuje růstovou schopnost kvasinek související s obsahem zásobních polysacharidů v buňce. Po přidání sacharidu do roztoku se měří další pokles pH. Glukózou **indukovaná acidifikační schopnost** ukazuje na aktivitu kvasinek při kvašení a rychlost glykolýzy (Kopecká a Rotková, 2017).

**Postup:** (převzato dle Kopecká a Rotková, 2017)

1. Navážít  $9 \pm 0,1$  g pekařských nebo pivovarských kvasnic, přidat je do 50 ml vychlazené destilované vody a důkladně promýt.
2. Centrifugovat suspenzi ( $3000 \times g/10$  minut), důkladně promýt. Opakovat 2×.
3. Kvasnice resuspendovat v 50 ml destilované vody o pokojové teplotě.
4. Začít měřit pH (ponořit pH metr do roztoku) – čas 0 ( $pH_0$ ). Vzorek míchat pomocí elektromagnetického míchadla.
5. Po 10 minutách přidat 5 ml 50% (w/v) glukózy a zapsat hodnotu pH ( $pH_{10}$ ).
6. Odečíst hodnotu pH ve 20. minutě ( $pH_{20}$ ). Vypočítat hodnotu AP.

### **Hodnocení:**

*Výpočet hodnoty AP:*

Veličina  $AP_{10}$  odpovídá výsledku spontánní acidifikace před přidáním glukózy, vypočítá se z hodnoty pH v 10. minutě měření ( $pH_{10}$ ):

$$AP_{10} = 6,3 - pH_{10}$$

kde 6,3 je hodnota  $pK$  systému  $CO_2/HCO_3^-$ , přibližně rovna vnitrobuněčnému pH. Veličina  $AP_{20}$  odpovídá výsledku glukózou indukované acidifikace. Vypočítá se z hodnoty pH ve 20. minutě ( $pH_{20}$ ):

$$AP_{20} = 6,3 - pH_{20}$$

Výsledná hodnota  $AP_{20}$  odráží **fyziologický stav buněk**:

<i>Hodnota <math>AP_{20}</math></i>	<i>Stav buněk</i>
$AP_{20} > 2,5$	vysoce aktivní kvasinky se silnou fermentační schopností
$AP_{20} = 2,5-2,0$	aktivní kvasinky s dobrou fermentační schopností
$AP_{20} = 2,0-1,5$	kvasinky částečně poškozeny, se sníženou metabolickou aktivitou
$AP_{20} < 1,5$	kvasinky značně poškozené, nevhodné pro další použití
<ul style="list-style-type: none"><li>• V protokolu zhodnotit fyziologický stav testovaných kvasnic.</li><li>• Srovnat výsledky AP-testu s výsledky vitálního testu (úloha 1.2.2).</li></ul>	

## 2 Citlivost mikroorganismů významných v potravinářství k teplotě

V potravinách působí na mikroorganismy celá řada faktorů, které mohou ovlivňovat jejich růst, množení a také metabolismus. Faktory působící na mikroorganismy v potravinách můžeme rozdělit do následujících skupin:

- **fyzikální faktory** – teplota skladování, relativní vlhkost vzduchu, tlak, ultrafialové a  $\gamma$  záření,
- **chemické faktory** – složení potravin a suroviny (zdroje uhlíku, dusíku a ostatní živiny), pH, přítomnost antimikrobních látek, včetně konzervačních,
- **biologické faktory** – působení ostatních mikroorganismů (Demnerová a kol., 2001; Görner a Valík, 2004).

### 2.1 Vliv teploty na potravinářsky významné mikroorganismy

**Cíle:**

1. Popsat růst potravinářsky významných mikroorganismů v závislosti na teplotě
2. Nefelometrickou metodou stanovit charakteristické fáze růstové křivky vybraných mikroorganismů

Teplota vnějšího prostředí je jedním z nejvýznamnějších faktorů ovlivňujících růst mikroorganismů v potravinách. Většina mikroorganismů je v potravinách schopna růst v **rozmezí teplot 2 – 50 °C**, i když jsou známy mikroorganismy (zejména termofilní sporulující bakterie) schopny růstu v potravinách i při vyšších teplotách. Při **optimální teplotě** probíhají fyziologické pochody v buňkách nejrychleji a mikrobiální kultura tak dosahuje nejvyšší růstové rychlosti ( $\mu_{\max}$ ) (Görner a Valík, 2004; Montville a kol., 2012; Šilhánková, 2008).

Růst mikroorganismů při dané teplotě lze popsat pomocí **růstové křivky** s charakteristickými fázemi. Růst buněk a tím i růstovou křivku můžeme stanovit výsevem mikroorganismů na agarové plotny s následným počítáním vyrostlých kolonií nebo **nefelometricky**, případně užitím dalších vhodných fyziologických metod. Nefelometrie je založena na rozptylu světla drobnými částicemi suspendovanými v kapalině. Růst mikrobiální biomasy lze tak sledovat přímo v tekuté živné půdě měřením **zákalu** (optické denzity, turbidity) mikrobiální kultury. Při této metodě zjišťujeme, kolik světla bylo pohlceno (absorbováno) zakaleným roztokem. Pomocí této metody není možné přímo stanovit počet buněk ve vzorku, lze však pozorovat růst mikroorganismů na základě zvyšující se turbidity. Turbiditu vzorku lze měřit např. na spektrofotometru jako absorbanci (optickou denzitu, OD) při určité vlnové délce. Výhodou nefelometrického

stanovení, zejména s využitím automatických systémů, je relativně rychlé a technicky málo náročné vyhodnocení, poskytující získání poměrně přesných hodnot. Na druhé straně je však tato metoda zatížena chybou vyplývající ze skutečnosti, že na zákalu buněčné suspenze se podílejí i mrtvé buňky (Frébortová, 2017; Demnerová a kol., 2001).

Přístroj záznamník růstu buněk (osobní bioreaktor) měří hustotu buněčné suspenze při vlnové délce 850 nm ( $OD_{850}$ ).

### 2.1.1 Použité pomůcky a mikroorganismy

Mikroorganismy: *Escherichia coli*, *Lactococcus lactis*, *Saccharomyces cerevisiae*

Pomůcky: sterilní MPB-médium, M17 bujón, Sabouraudův bujón, fyziologický roztok, záznamník růstu buněk, denzimetr, sterilní zkumavky typu Falcon s perforovanými víčky a sterilním filtrem, sterilní zkumavky, pipety

### 2.1.2 Stanovení vlivu teploty na vybrané mikroorganismy pomocí záznamníku růstu buněk (osobního bioreaktoru)

Bude sledován růst potravinářsky významných mikroorganismů při optimální teplotě (30 °C) a teplotě nižší blíží se chladírenské teplotě (15 °C). V průběhu přípravy a realizace úlohy je třeba pracovat za aseptických podmínek.

1. Z přes noc narostené kultury mikroorganismů pomocí denzimetru připravit ve fyziologickém roztoku suspenzi buněk o hustotě 0,5 (dle McFarlandovy stupnice).
2. Zkumavky typu Falcon (zkumavky pro záznamník růstu buněk) naplnit po 30 ml sterilními bujóny – 2x MPB-médium, 2x M17 bujón a 2x Sabouraudův bujón.
3. Bujóny zaočkovat 100  $\mu$ l suspenze mikroorganismů – MPB-médium zaočkovat *Escherichia coli*, M17 bujón *Lactococcus lactis* a Sabouraudův bujón *Saccharomyces cerevisiae*. Víčka zkumavek pečlivě utáhnout, zkumavky řádně označit a připravit ke kultivaci v daném přístroji.
4. Zapnout přístroje (záznamníky růstu buněk) a na počítači příslušný software. Na přístrojích přes počítačový software nastavit následující parametry:

	<i>E. coli</i> , <i>S. cerevisiae</i>	<i>L. lactis</i>
Rychlost otáček	500 rpm	0 rpm
RSF (frekvence reverzních otáček)	1 s <sup>-1</sup>	0 s <sup>-1</sup>
Teplota	30/15 °C	30/15 °C
Objem vzorku	30 ml	30 ml
Frekvence měření (MF)	30 min	30 min

5. Poté přístroje zapnout a začít kultivaci mikroorganismů. Po cca 120 – 150 minutách zkontrolovat grafický průběh kultivace (OD) a rychlosti růstu.
6. Po uplynutí 48 hodin přístroje vypnout, data uložit a vyhodnotit.

***Hodnocení:***

- V protokolu vyhodnotit vliv teploty na růst mikroorganismů.
- Při obou teplotách u všech tří testovaných mikroorganismů vynést do grafu závislosti optické hustoty kultury ( $OD_{850}$ ) na čase (t). Na růstové křivce popsat charakteristické fáze růstu.
- Srovnat růstové křivky všech mikroorganismů při obou testovaných teplotách. Zdůvodnit rozdíly v růstových křivkách.

### 3 Roztoky a živná média

#### ***Fyziologický roztok***

NaCl	8,5 g
Destilovaná voda	1000,0 ml

Sterilizovat v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut.

#### ***Laktofenol***

Fenol krystalický	10,0 g
Kyselina mléčná	20,0 g
Glycerol	20,0 g
Destilovaná voda	10,0 g

Fenol s vodou zahřát do rozpuštění, přidat kyselinu mléčnou a glycerol.

#### ***Metylenová modř (vitální test)***

Vodný roztok metylenové modři (1:500)	100,0 ml
0,2M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 4,6)	100,0 ml

pH upravit pomocí 1M NaOH

#### ***Roztok glukózy (50%; w/v)***

Glukóza	50,0 g
Destilovaná voda	100,0 ml

#### ***Czapek-Dox agar (HiMedia)***

Czapek-Dox agar	49,0 g
Destilovaná voda	1000,0 ml

Konečné pH 7,3 ± 0,2  
Sterilizovat v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut.

#### ***MPB-médium (masopeptonový bujón)***

Masový výtažek (meat extract)	3,0 g
Pepton	5,0 g
NaCl	3,0 g

pH upravit na 6,9 ± 0,1  
Sterilizovat v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut.

#### ***M17 bujón (HiMedia)***

M17 bujón	42,25 g
Destilovaná voda	1000,0 ml

Konečné pH 7,1 ± 0,1  
Sterilizovat v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut.

***Sabouraudův bujón*** (*Sabouraud Dextrose Broth; HiMedia*)

Sabouraud broth                      30,0 g  
Destilovaná voda                      1000,0 ml

Konečné pH  $5,6 \pm 0,2$

Sterilizovat v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut.

***Sabouraudův agar*** (*Sabouraud Dextrose Agar; HiMedia*)

Sabouraud broth                      30,0 g  
Agar                                        15,0 g  
Destilovaná voda                      1000,0 ml

Konečné pH  $5,6 \pm 0,2$

Sterilizovat v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut.

## 4 Anaerobní a mikroaerofilní kultivace

### Cíle:

- 1) Stanovení anaerobních sporotvorných bakterií
- 2) Stanovení bakterií rodu *Clostridium*

Anaerobní mikroorganismy jsou takové organismy, které jsou schopné růst v anoxických podmínkách a dle stupně tolerance k molekulárnímu kyslíku je lze klasifikovat na:

- 1) striktně anaerobní mikroorganismy – kyslík přes 0,5 % na ně působí toxicky;
- 2) obligátně anaerobní mikroorganismy – netolerují více než 2-3 % O<sub>2</sub> v prostředí;
- 3) aerotolerantní mikroorganismy – tolerují malou koncentraci kyslíku;
- 4) fakultativně anaerobní mikroorganismy – rostou dobře v aerobních i anaerobních podmínkách;
- 5) obligátně aerobní mikroorganismy – bez O<sub>2</sub> v prostředí nejsou schopny metabolizovat a růst (Demnerová a kol., 2001).

Mikroorganismy (bakterie, kvasinky, mikromycety) se v mikrobiologických laboratořích kultivují na živných půdách. Kultivace mikroorganismů je základním postupem sloužícím k jejich přímému průkazu. Kultivace může být statická (misky, zkumavky) nebo kontinuální submerzní, která je obvyklá při produkci biomasy, antibiotik jako produktů metabolismu bakterií atp. (Julák, 2003). Živná média musí splňovat všechny podmínky pro optimální výživu, pH, osmotický tlak, redoxpotenciál a dostatek vody. Každá živná půda musí obsahovat **zdroj energie** (organotrof – organická látka; fototrof – světlo; litotrof – anorganická látka), **uhlíku** (heterotrof – organická látka; autotrof – CO<sub>2</sub>), **dusíku** (amonné ionty, dusičnanové ionty, aminokyseliny, bílkoviny nebo jejich hydrolyzáty) a ostatních **biogenních prvků** (anorganické soli). Hodnoty uvedených podmínek musí zůstat optimální po celou dobu kultivace (Kopecká a Rotková, 2017). Živná média mohou být tuhá – agary nebo tekutá – bujóny, které se připravují ve zkumavkách, kdežto agary zejména na Petriho miskách, ale též ve zkumavkách pro vpich či šikmý agar. Na pevných půdách v Petriho miskách lze pozorovat jednotlivé kolonie, přesněji kolonie tvořící jednotku (CFU – colony forming unit), což je potomstvo jedné bakterie či několika bakterií v hloučku. Charakter růstu je důležitým diagnostickým znakem (Demnerová a kol., 2001; Kopecká a Rotková, 2017).

Anaerobní nebo mikroaerofilní kultivace se může provádět hlubokým vpichem do agaru ve zkumavce nebo očkováním do vysoké vrstvy tekutého média. Oxidoredukční potenciál se dále snižuje přidáním redukujících látek (kyselina



askorbová, thioglykolát, thiosíran) (Kopecká a Rotková, 2017). Klasickým a nejjednodušším způsobem vytvoření anaerobního prostředí je umístění zapálené svíčky do uzavřené nádoby – atmosféra se sice obohatí o CO<sub>2</sub>, ale zůstatek koncentrace kyslíku je pořád značný (Julák, 2003). Pro vytvoření anaerobního prostředí lze využít anaerobní komory či **anaerostatu** (vzduchotěsně uzavřená nádoba s řízenou atmosférou), do kterého se vkládá směs chemikálií (železný prášek, kyseliny vinná, citronová), která po ovlhčení uvolňuje vodík, který v přítomnosti katalyzátoru (Pt, Pd) reaguje s přítomným vzdušným kyslíkem za jeho vytěsnění a vzniku molekul vody (Kopecká a Rotková, 2017). Takovéto soupravy jsou komerčně dostupné.

Mikroaerofilní mikroorganismy rostou za snížené tenze vzdušného kyslíku. Toho lze docílit různými způsoby:

- očkováním mikroorganismů vpichem do svislých agarů nebo do vysokých vrstev kapalin o malém povrchu;
- odstraněním kyslíku povařením (tzv. regenerace půdy), půda se těsně před použitím zahřívá 20 min. ve vroucí vodní lázni, ochladí se a zaočkuje.

Pro omezení dalšího přístupu vzduchu se půda převrství sterilním parafinovým olejem (Bursová, Karpíšková, Dušková, Necidová, 2014).

#### 4.1 Stanovení anaerobních sporotvorných bakterií

Stanovení sporotvorných bakterií se nejčastěji uplatňuje u tepelně opracovaných výrobků v konzervárenství. V nedostatečně chlazených pasterovaných výrobcích se převážně vyskytují aerobní sporuláty (zástupci rodu *Bacillus* a dalších), na druhou stranu anaerobní sporuláty (*Clostridium*, *Clostridioides*, *Desulfotomaculum*) jsou nacházeny jako nežádoucí kontaminanty konzervářského průmyslu či zrajících sýrů (Cupáková et al., 2010; Demnerová a kol., 2001, Lawson, Citron, Tyrrell, Finegold, 2016; Watanabe, Kojima and Fukui, 2013). V teplem sterilovaných konzervách (tzv. nekyselých s pH ≥ 4,0) nesmí přežívat mezofilní sporotvorné anaerobní bakterie, které slouží jako **indikátorové mikroorganizmy** pro přítomnost patogenního druhu *Clostridium botulinum* (Demnerová a kol., 2001).

##### 4.1.1 Princip metody

Před vlastním očkováním je nutné odstranit vegetativní formy sporotvorných bakterií a ostatních mikroorganismů tepelnou inaktivací (80 °C/10-30 minut u mezofilů, vroucí lázeň/30 min u termofilů), následuje rychlé zchlazení vodou. Spory některých zástupců bakterií rodu *Clostridium* bez tohoto tepelného šoku velmi těžko klíčí a nebylo by možné je tedy stanovit (Demnerová a kol., 2001).

Určený objem tekutého vzorku či výchozí suspenze u ostatních vzorků se roztírá na neselektivní živnou půdou v Petriho miskách. Inokulovanéisky se kultivují anaerobně při teplotě 37 °C po dobu 72 hodin. Po inkubaci se stanoví počet anaerobních sporotvorných bakterií v 1 ml nebo v 1 g vzorku z počtu kolonií vyrostlých na vybraných plotnách (Cupáková et al., 2010).

#### 4.1.2 Použitý materiál, pomůcky a přístroje

vzorek mletého koření, sáčky, kádinky, váhy, homogenizátor Stomacher, sterilní vysoké zkumavky (objem 15 ml), stojánek na zkumavky, sterilní destilovaná voda, vodní lázeň s teplotou na 80 °C, stopky, temperovaný Anaerobic Agar (AA, Himedia Laboratories, Indie), prázdné sterilní Petrihoisky, anaerostat – nádoba, vyvíječ (Anaerocult® A, Merck Millipore, Německo), termostat

#### 4.1.3 Postup

Pro stanovení anaerobních sporotvorných bakterií se postupuje následovně (Cupáková et al., 2010):

1. Do sáčku se naváže 5 g mletého koření, doplní se 45 ml sterilní vody a homogenizuje po dobu 1 minuty.
2. Do vysoké zkumavky se odpipetuje 10 ml vzniklé suspenze.
3. Připravená zkumavka se vloží do stojánku ve vodní lázni (80 °C) na dobu 10 minut. Po vytažení z lázně se ihned ochladí pod proudem studené vody.
4. Do dvou Petriho misek se paralelně napipetuje po 1 ml zchlazené suspenze a přelije se temperovanou půdou AA (cca 45 °C). Po přelití se okamžitě miskou opatrně krouží, a to 5x doleva, 5x doprava, potom 5x nahoru a dolů a 5x doleva a doprava. Nechá se na lavici utuhnout.
5. Všechnyisky se vloží do anaerostatu (kultivační hrnec, obr. 8), do nějž se ihned vloží vyvíječ zalitý 25 ml vody a okamžitě se celý hrnec uzavře.
6. Kultivace probíhá v termostatu při 37 °C po dobu 72 hodin.



Obrázek 8: Kultivační hrnec, sada anaerobních vyvíječů a sada testů Anaerocult® A Merck Millipore (Merck KGaA, 2020)

#### 4.1.4 Vyhodnocení

Po inkubaci se počítají kolonie na miskách a počet sporotvorných anaerobních bakterií se vyjádří jako CFU/g koření.

## 5 Probiotické bakterie

### Cíle:

- 1) Stanovení bakterií rodu *Lactobacillus*
- 2) Stanovení bakterií rodu *Bifidobacterium*

**Probiotické bakterie** jsou bakterie s probiotickými vlastnostmi. V potravinových doplncích či potravinách se vyskytují ve formě životaschopných buněk. Tyto kmeny musí mít humánní původ, dále musí být schopné přežít průchod zažívacím ústrojím, zejména musí být vysoce odolné velmi nízkému pH v žaludku, musí být schopné se pomnožit ve střevě, nesmí být patogenní a toxické. Vybírají se zejména takové kmeny, které vhodně ovlivňují organoleptické vlastnosti dané potraviny (Burdychová, 2007). Většina z nich také vykazuje produkci metabolitů antibakteriální povahy, projevující se silným antagonistickým vztahem k některým jiným bakteriálním druhům (Čížek, 2004), čímž může docházet k likvidaci nežádoucí mikroflóry ve střevě.

Nejčastějšími probiotickými bakteriemi jsou laktobacily (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus brevis*), bifidobakterie (*Bifidobacterium bifidum*) či grampozitivní koky (*Enterococcus faecium*). K probiotickým mikroorganismům se dále řadí některé kvasinky (*Saccharomyces boulardii*) nebo mikromycety (*Aspergillus oryzae*) (Vrtná, 2016). Využití nachází probiotika zejména v mlékárenském průmyslu, kde se využívá přídatku zejména bakterií rodů *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* do jogurtů a jogurtových nápojů, keřirového mléka či sýrů (Burdychová, 2007).

Bakterie rodu *Lactobacillus* jsou grampozitivní, fakultativně anaerobní až mikroaerofilní tyčinky, jejichž tvar závisí na stáří kultury, složení média a obsahu kyslíku v médiu. Většinou jde o rovné, různě dlouhé a ohnuté tyčinky. Široce jsou rozšířené v přírodě, dále jsou součástí běžné mikroflóry střeva člověka a zvířat, u žen jsou laktobacily součástí vaginální mikroflóry. Nejsou mezi nimi žádné patogenní druhy (Čížek, 2004).

Rod *Bifidobacterium* jsou anaerobní grampozitivní bakterie tvaru tyčinek, které tvoří převážnou část mikroflóry tlustého střeva kojených dětí. S věkem a změnou stravy se bifidobakterie ze střeva vytrácejí (Vrtná, 2016).

Pro stanovení probiotických bakterií v mléčných výrobcích je nutné použít metodu pro selektivní stanovení těchto kultur, jelikož jsou zde totiž přítomny i jogurtové bakterie či bakterie mléčného kvašení (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*). Přítomnost těchto startovacích kultur znesnadňuje detekci přidaných kultur sloužících jako probiotické. Následující

metodika je jednou z možností, jak určit množství probiotických kultur ve fermentovaných mléčných výrobcích (Burdychová, 2007).

## 5.1 Stanovení probiotických bakterií *Lactobacillus rhamnosus* v jogurtu

### 5.1.1 Použitý materiál, pomůcky a přístroje

jogurt s probiotickou kulturou *Lactobacillus rhamnosus* (např. Selský jogurt Olma), sáčky, lžičky v lihu, kádinky, zkumavky, odměrný válec, pipety, špičky, váhy, sterilní fyziologický roztok (0,9% NaCl), homogenizátor Stomacher, MRS (deMan, Rogosa a Sharpe agar, Himedia Laboratories, Indie) s upraveným  $\text{pH}=5,2\pm0,1$ , přístroj pro spirální nanášení vzorku na misky a stanovení CFU - spiral plater Eddy Jet spiral plater (IUL, Španělsko), anaerostat – nádoba, vyvíječ (Anaerocult® A, Merck Millipore, Německo), termostat, software Sphereflash pro počítání kolonií

### 5.1.2 Postup

Stanovení počtu bakterií *Lactobacillus rhamnosus* v probiotickém jogurtu se provede dle následujícího návodu (Burdychová, 2007):

1. Nejprve se asepticky provede odběr 5 g jogurtu do připraveného sáčku v kádince. Do sáčku se též asepticky přidá 9x množství fyziologického roztoku (45 ml), sáček tedy představuje první ředění vzorku ( $10^{-1}$ ).
2. Sáček se vloží do homogenizátoru a nechá se homogenizovat v laboratorní teplotě po dobu 1 min.
3. Z výchozí suspenze v sáčku se připraví desítkové ředění – ředí se fyziologickým roztokem (4,5 ml) ve zkumavkách, kam se přidá 0,5 ml ředěného vzorku ze sáčku (druhé ředění= $10^{-2}$ ). Takto se pokračuje dál až do  $10^{-5}$ . Při ředění se pečlivě dodržuje výměna špiček (z nižšího ředění se špička nikdy nesmí použít do více ředěné zkumavky) tak, aby nedošlo ke zkreslení výsledků.
4. Ředění  $10^{-1}$ ,  $10^{-3}$  a  $10^{-5}$  se použije jako výchozí roztok do kalíšku pro stanovení CFU ve spiral plateru. Program se nastaví na Log mode (50  $\mu\text{l}$ ), který zajistí přesný odběr 50  $\mu\text{l}$  vzorku z kalíšku a jeho precizní rozprostření ve spirále na vloženou MRS misku. Pro každé ze 3 zvolených ředění se použijí 2 misky, celkem je potřeba 6 misek. Inokulum by mělo být do několika minut vsáklé a je možné misky převrátit dnem vzhůru.
5. Celý sloupec misek se vloží do anaerostatu (kultivační hrnec, Obrázek 1). Připraví se 25 ml vody, která se naleje na vyvíječ a ihned se vloží do daného prostoru v kultivačním hrnci a okamžitě se celý hrnec uzavře.
6. Kultivace probíhá v termostatu při 43 °C po dobu 72 hodin.

### 5.1.3 Vyhodnocení

Po uplynutí kultivační doby se vizuálně zhodnotí nárůst kolonií – *Lactobacillus rhamnosus* roste ve 2 mm velkých bílých vypouklých koloniích. Počet kolonií se vyhodnotí pomocí softwaru SpereFlash, kam se zadá správné ředění, které bylo v kalíšku. Software rovnou vypočítá CFU/ml, resp. CFU/g v našem případě.

Za tzv. terapeutické minimum se považuje spotřeba alespoň 100 g mléčného výrobku s  $10^6$  CFU/g probiotických bakterií denně (Burdychová, 2007), porovnejte tedy získaný výsledek s touto hodnotou.

## 5.2 Selektivní stanovení probiotických bakterií rodu *Bifidobacterium* sp. v mléčném výrobku

### 5.2.1 Použitý materiál, pomůcky a přístroje

mléčný výrobek s probiotickou kulturou *Bifidobacterium* sp., sáčky, lžičky v lihu, kádinky, zkumavky, odměrný válec, sterilní Petriho misky, pipety, špičky, váhy, sterilní fyziologický roztok (0,9% NaCl), homogenizátor Stomacher, temperovaný BSM agar se suplementem pro selektivní kultivaci bakterií rodu *Bifidobacterium* (Fluka, USA) v láhvi, anaerostat – nádoba, vyvíječ (Anaerocult® A, Merck Millipore, Německo), termostat

### 5.2.2 Postup

Selektivní stanovení počtu bakterií rodu *Bifidobacterium* v mléčném výrobku s probiotickou kulturou se provede dle následujícího postupu (Burdychová, 2007):

1. Nejprve se asepticky provede odběr 5 g mléčného výrobku do připraveného homogenizačního sáčku v kádince a asepticky se přidá 9x množství fyziologického roztoku (45 ml). Sáček tudíž představuje první ředění vzorku ( $10^{-1}$ ).
2. Sáček se vloží do homogenizátoru a nechá se homogenizovat v laboratorní teplotě po dobu 1 min.
3. Ze sáčku se připraví desítkové ředění – ředí se fyziologickým roztokem (4,5 ml) ve zkumavkách, kam se přidá 0,5 ml ředěného vzorku ze sáčku (druhé ředění= $10^{-2}$ ). Takto se pokračuje dál až do  $10^{-5}$ . Při ředění se pečlivě dodržuje výměna špiček (z nižšího ředění se špička nikdy nesmí použít do více ředěné zkumavky) tak, aby nedošlo ke zkreslení výsledků.
4. Ředění  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  a  $10^{-5}$  se použije pro stanovení CFU/ml metodou přelivu. Do dvou sterilních misek se paralelně napipetuje po 1 ml a přelije temperovanou půdou BSM (cca 45 °C). Toto se provede z každého vybraného ředění. Po zalití se okamžitě miskou opatrně krouží, a to 5x

doleva, 5x doprava, potom 5x nahoru a dolů a 5x doleva a doprava. Nechá se na lavici utuhnout.

5. Celý sloupec misek se vloží do anaerostatu (kultivační hrnec, Obrázek 1), do nějž se ihned vloží vyvíječ zalitý 25 ml vody a okamžitě se celý hrnec uzavře.
6. Kultivace probíhá v termostatu při 37 °C po dobu 72 hodin.

### 5.2.3 Vyhodnocení

Po uplynutí kultivační doby se vizuálně zhodnotí nárůst kolonií – *Bifidobacterium* roste ve 2 mm velkých nafialovělých vypouklých koloniích. Kolonie se počítají na miskách, kde narostlo zhruba 15-300 kolonií a provede se výpočet CFU/g. Vypočtenou hodnotu porovnejte s doporučovanou hodnotou  $10^6$  CFU/g počtu konzumovaných probiotických bakterií.



## Literatura

- Burdychová, R. (2007). Microbiological detection of probiotic microorganisms in fermented milk products. *Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun. LV*, 15–20.
- Bursová, Š., Karpíšková, R., Dušková, M., Necidová, L. (2014). *Mikrobiologie potravin. Praktická cvičení I. Obecná mikrobiologie*. Brno: VFU Brno.
- Cupáková, Š., Karpíšková, R., Necidová, L. (2010). *Mikrobiologie potravin. Praktická cvičení II. Metody stanovení mikroorganismů v potravinách*. Brno: VFU Brno.
- Čížek, A. (2004). *Praktika z veterinární bakteriologie a mykologie*. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno.
- Demnerová, K. a kol. (2001). *Laboratorní cvičení z mikrobiologie*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická.
- Frébortová, J. (2017). *Laboratorní cvičení z mikrobiologie*. [online]. Dostupné z: [http://www.rustreg.upol.cz/materials/microbiology/skripta\\_Laboratorni-cviceni-z-mikrobiologie\\_2017.pdf](http://www.rustreg.upol.cz/materials/microbiology/skripta_Laboratorni-cviceni-z-mikrobiologie_2017.pdf)
- Görner, F., Valík, L. (2004). *Aplikovaná mikrobiológia požívatín*. Bratislava: Malé centrum.
- Chumchalová, J. a kol. (2006). *Miniatlas mikroorganismů*. [online]. Dostupné z: <https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/ps06/mikroorg/web/index.html>
- Jandová, B., Kotoučková, L. (1996). *Praktikum z mikrobiologie*. Brno: Masarykova univerzita.
- Julák, J. (2003). *Praktická cvičení a semináře z lékařské mikrobiologie*. Praha: Karolinum.
- Kocková-Kratochvílová, A. (1990). *Taxonómia kvasiniek a kvasinkovitých mikroorganizmov*. Bratislava: ALFA.
- Kopecká, J., Rotková, G. (2017). *Skripta ke cvičení z obecné mikrobiologie, cytologie a morfologie bakterií*. [online]. Dostupné z: [https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/js17/cviceni\\_mikrobiologie/web/index.html](https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/js17/cviceni_mikrobiologie/web/index.html)
- Kultura mikroorganizmów [online]. (2019). In: *WIKIPEDIA The Free Encyclopedia* [Polsko]. Dostupné z: [https://pl.wikipedia.org/wiki/Kultura\\_mikroorganizm%C3%B3w](https://pl.wikipedia.org/wiki/Kultura_mikroorganizm%C3%B3w)

- Lawson, P. A., Citron, D. M., Tyrrell, K. L., & Finegold, S. M. (2016). Reclassification of *Clostridium difficile* as *Clostridioides difficile* (Hall and O'Toole 1935) Prévot 1938. *Anaerobe*, 40, 95-99. DOI: 10.1016/j.anaerobe.2016.06.008
- Merck KGaA. (2020). Anaerocult® A pro mikrobiologii (čínidlo pro vytvoření anaerobní atmosféry v kultivačním hrnci). Dostupné z: [https://www.merckmillipore.com/CZ/cs/product/Anaerocult-A\\_MDA\\_CHEM-113829](https://www.merckmillipore.com/CZ/cs/product/Anaerocult-A_MDA_CHEM-113829)
- Montville, T.J., Matthews, K.R., Kniel, K.E. (2012). *Food Microbiology. An Introduction*. 3rd ed. Washington, DC: ASM Press
- *Penicillium chrysogenum* [online]. (2019). In: *Miniatlas mikroorganismů*. [ČR]. Dostupné z: <https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/ps06/mikroorg/web/pen-chr.htm>
- Šilhánková, L. (2008). *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 3. vyd. Praha: Academia.
- Vrtná, M. (2016). *Probiotika a prebiotika – studium účinků, interakcí a možností koenkapsulace*. (diplomová práce). Brno, Vysoké učení technické v Brně.
- Watanabe, M, Kojima, H., Fukui, M. (2013). *Desulfotomaculum intricatum* sp. nov., a sulfate reducer isolated from freshwater lake sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63, 3574-3578. DOI: 10.1099/ijs.0.051854-0

## Symboly a zkratky

AA	Anaerobic agar
AP-test	test acidifikační schopnosti kvasinek
BSM	Bifidus selective medium agar
CFU	colony forming unit
KTJ	kolonie tvořící jednotku
MPB	masopeptonový bujón
MRS	deMan, Rogosa a Sharpe agar
NaCl	chlorid sodný
OD	optická denzita (hustota buněčné suspenze)
rpm	rychlost otáček za minutu

## Seznam obrázků

Obrázek 1: Morfologie kolonií bakterií a kvasinek (upraveno podle „Kultura mikroorganizmów“, 2019)	6
Obrázek 2: Kolonie <i>Penicillium chrysogenum</i> tvořící exudát („ <i>Penicillium chrysogenum</i> “, 2019)	7
Obrázek 3: Pseudomycelium kvasinek s blastosporami (Šilhánková, 2008)	10
Obrázek 4: Vybraní zástupci mikroskopických vláknitých hub (Chumchalová a kol., 2006)	12
Obrázek 5: Vybraní zástupci mikroskopických vláknitých hub (Chumchalová a kol., 2006)	12
Obrázek 6: Bürkerova počítací komůrka (upraveno podle Frébortová, 2017)	14
Obrázek 7: Pravidlo pro počítání buněk v počítací komůrce (archiv autorky)	15
Obrázek 8: Kultivační hrnec, sada anaerobních vyvíječů a sada testů Anaerocult® A Merck Millipore (Merck KGaA, 2020)	25

## Seznam tabulek

<i>Tabulka 1: Hodnocení makroskopických znaků kvasinek</i>	5
<i>Tabulka 2: Hodnocení makroskopických znaků plísní</i>	8