

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Praktická cvičení z mikrobiologie mléčných výrobků

**Návrh cvičení pro základní a střední
školy**

Dita Krumichová

**Vedoucí: RNDr. Lenka Pavlasová
Univerzita Karlova
Pedagogická fakulta
Katedra biologie a ekologické výchovy
Praha 2005**

Anotace

Práce obsahuje návody na praktická cvičení z mikrobiologie pro realizaci v běžné výuce na základních a středních školách nebo jako náplň volitelného předmětu. Dále práce obsahuje základní teoretické údaje z potravinářské mikrobiologie a v neposlední řadě i informace nezbytné pro přípravu a zařazení těchto cvičení do výuky.

Za odbornou konzultaci a společenství bych ráda poděkovala
přím. MUDr. Ústnalo Dornikové, vedoucí laboratorní oddělení Louny
a celému kolektivu Laboratoře klinické mikrobiologie NaP v České Lince,
Doc. RNDr. Jozefu Rebníčkovi, CSc. za pomoc při tvorbě fotografické
dokumentace a zaměstnancům firmy Daxo.

V neposlední řadě patří můj dík mámu, rodině a mému příteli. Hej má
všechno stále podporuj!

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla především poděkovat všem, kteří se mnou měli a mají trpělivost. Konkrétně vedoucí mé práce RNDr. Lence Pavlasové a původní vedoucí mé práce RNDr. Jaroslavě Pavelkové, CSc.

Z externích konzultantů a spolupracovníků bych ráda poděkovala prim. MUDr. Gabriele Dorníkové, vedoucí laborantce paní Iloně Lounové a celému kolektivu Laboratoře klinické mikrobiologie NsP v České Lípě, Doc. RNDr. Josefu Reischigovi, CSc. za pomoc při tvorbě fotografické dokumentace a zaměstnancům firmy Dioxo.

V neposlední řadě patří můj dík mé rodině a mému příteli, kteří mě v mé práci stále podporují.

Obsah

ABSTRAKT

PODĚKOVÁNÍ

Prohlášení

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně, a že jsem uvedla veškerou použitou literaturu. Souhlasím s použitím své práce nebo jejích částí, pokud budou vždy řádně citovány.

1. ÚVOD

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. VÝZNAM MIKROORGANISMŮ PRO ČLOVĚKA

2.2. MIKROBENSTVÍ - DŮLEŽITÉ SPZNKY V JENĚ VÝVOJ A HISTORIE

2.3. PŘEHLED POUŽÍVANÝCH ÚSTYCH A KVAČKYCH KŮLEBŮ A JEJICH VÝVOJ

2.4. MIKROORGANISMY V MIKROBENSTVÍ

2.4.1. BAKTERIE

KBC k rozlišení druhů rodu *Lactobacillus*

KBC k rozlišování druhů *Lactinostoc*

KBC k rozlišování druhů čeledi *Streptococcaceae*

KBC k rozlišování rodu *Peptococcus*

KBC k rozlišování rodu *Propionisaccharum*

2.4.2. PLEŠNĚNÁČI DŮVĚ BAKT. MIKROBENSTVÍ

2.4.3. KVAČKY

2.4.4. PLÍSEŇ

3. PRAKTIKÁLNÍ ČÁST

3.1. ÚVOD

3.2. PRAKTIKÁLNÍ ČÁST

3.2.1. ÚVOD

3.2.1.1. VÝVOJ MIKROBENSTVÍ

Obsah

ANOTACE	II
PODĚKOVÁNÍ	III
PROHLÁŠENÍ	IV
OBSAH	V
1. ÚVOD	1
2. TEORETICKÁ ČÁST	3
2.1. VÝZNAM MIKROORGANISMŮ PRO ČLOVĚKA	3
2.2. MLÉKÁRENSTVÍ - DŮLEŽITÉ MEZNÍKY V JEHO VÝVOJI A HISTORII	5
2.3. PŘEHLED POUŽÍVANÝCH ČISTÝCH MLÉKAŘSKÝCH KULTUR A JEJICH VYUŽITÍ	6
2.4. MIKROORGANISMY V MLÉKÁRENSTVÍ	10
2.4.1. BAKTERIE	10
Klíč k rozlišení druhů rodu <i>Lactobacillus</i>	13
Klíč k rozlišování rodu <i>Leuconostoc</i>	14
Klíč k rozlišení rodů čeledi <i>Streptococcaceae</i>	17
Klíč k rozlišení rodu <i>Pediococcus</i>	19
Klíč k rozlišení druhů rodů <i>Propionibacterium</i>	22
2.4.2. IDENTIFIKAČNÍ ZNAKY BAKTERIÁLNÍCH KULTUR	23
2.4.3. KVASINKY	26
2.4.4. PLÍSNĚ	29
3. PRAKTICKÁ ČÁST	33
3.1. VZORKY	34
3.2. SENZORICKÉ VLASTNOSTI	35
3.3. VÝSLEDKY	35
3.3.1. VÝSLEDKY KULTIVACE – SOUHRN	42

4. DIDAKTICKÁ ČÁST	43
4.1. PRAKTICKÁ CVIČENÍ JAKO AKTIVIZUJÍCÍ METODA VÝUKY?	43
4.2. ZAŘAZENÍ MIKROBIOLOGIE DO VÝUKY NA ZŠ A SŠ	44
4.3. ZASTOUPENÍ MIKROBIOLOGIE V NĚKTERÝCH POUŽÍVANÝCH TEXTECH PRO VÝUKU	46
4.4. NÁVRH PRAKTICKÝCH ÚLOH	47
4.4.1. KULTIVACE KOLIFORMNÍCH BAKTERIÍ	47
4.4.2. KULTIVACE MEZOFILNÍCH A FAKULTATIVNĚ ANAEROBNÍCH MIKROORGANISMŮ NA AGAROVÝCH PŮDÁCH	48
4.4.3. KULTIVACE PSYCHROTROFNÍCH MIKROORGANISMŮ	49
4.4.4. KULTIVACE KVASINEK	50
4.4.5. KULTIVACE PLÍSNÍ	51
4.4.6. SLEDOVÁNÍ RŮSTOVÉ KŘIVKY PLÍSNĚ V ZÁVISLOSTI NA TEPLOTĚ KULTIVACE 52	
4.4.7. SLEDOVÁNÍ ÚČINKU BAKTERIÍ V LAKMUSOVÉM MLÉČE	53
4.4.8. PŘÍPRAVA NATIVNÍHO PREPARÁTU BAKTERIÍ MLÉČNÉHO KVAŠENÍ	54
4.4.9. ZHOTOVENÍ FIXOVANÉHO PREPARÁTU BARVENÉHO LÖFFLEROVÝM ČINIDLEM	55
4.4.10. PŘÍPRAVA BARVENÉHO PREPARÁTU PODLE GRAMMA	55
4.5. MEZIPŘEDMĚTOVÉ VZTAHY VE VÝUCE MIKROBIOLOGIE	56
4.6. DALŠÍ MOŽNOSTI ZAŘAZENÍ MIKROBIOLOGIE DO VÝUKY	57
4.7. PŘÍPRAVA MATERIÁLU A POSTUPY PRÁCE	58
4.7.1. MANIPULACE A ODBĚR VZORKŮ	58
4.7.2. ŘEDĚNÍ VZORKŮ	59
4.7.3. PŘÍPRAVA A POUŽITÍ PŮD	60
4.7.4. RECEPTÁŘ ŽIVNÝCH PŮD	61
4.7.5. OČKOVÁNÍ	66
4.7.6. STERILIZACE	68
4.7.7. KULTIVACE	69
4.7.8. RECEPTÁŘ ROZTOKŮ A ČINIDEL	71
4.7.9. KDE OPATŘIT MATERIÁL	72
5. DISKUZE	73
6. ZÁVĚR	76
SLOVNÍČEK	77
BIBLIOGRAFIE	87
SEZNAM VYOBRAZENÍ	91
SEZNAM PŘÍLOH	91

1. Úvod

Ve škole mě vždy bavila praktická cvičení, ať už to byla biologie, chemie nebo pracovní výchova. Poznatky, které jsem si takto „osahala“ pro mě byly trvalejší a zajímavější. Když jsem se při studiu na vysoké škole setkala s mikrobiologií, zamrzelo mě, že se to stalo až takhle pozdě. Na gymnáziu jsme pozorovali kvasinky a prvoky v nativních preparátech, což mi po této zkušenosti přišlo příliš jednoduché a nudné.

Také oba moji rodiče jako mlékárenští technici se s mikrobiologií ve škole setkali velmi zblízka. Cítila jsem se trochu ochuzena. Proto jsem si toto téma zvolila pro svou diplomovou práci.

Hlavní myšlenkou bylo vytvořit návod na praktická cvičení, která budou moci žáci absolvovat i ve škole, která není na biologii a především mikrobiologii zaměřená. Při práci jsem zjistila, že skutečně není třeba vytvářet něco zcela nového. Je potřeba uspořádat informace, a vytvořit velmi podrobný návod pro učitele, jak taková cvičení připravit. Učitel např. na gymnáziu by totiž dnes musel mít velký zájem a vlastní erudici, aby mohl s dětmi taková cvičení absolvovat. Problémem je především dostupnost literatury. I při své práci jsem se setkala s obtížemi při jejím získávání.

Učebnice mikrobiologie s praktickými návody jsou určeny pouze pro střední školy se speciálním zaměřením (především potravinářským) a hlavně nebyly již mnoho let znova vydány. Na těchto školách se používají stále stejné učebnice jako před 20 lety, a to nejen proto, že jiné nejsou, ale i proto, že se jedná o učebnice skutečně kvalitní. Bohužel pro učitele např. na gymnáziu jsou těžko dostupné.

Při rozhovoru s učitelem z mého gymnázia jsem si potvrdila, že by pravděpodobně o takový návod byl zájem. Musel by však být velmi podrobný, nejen co se týká teoretických informací z mikrobiologie (což není v literatuře takový problém), ale především technické přípravy cvičení. To je tedy mým cílem.

Cvičení jsou koncipována pro studenty střední školy všeobecného zaměření. Předpokládám však, že si učitel může cvičení upravit pro různý stupeň (také pro druhý stupeň ZŠ) a také v rámci stupně vytvořit různou obtížnost, vyžadující různou míru poměru práce žáci – učitel.

Práce tedy nebude přesným návodem na jedna určitá praktická cvičení, ale konkrétním modelem, který lze kombinovat a rozšiřovat v závislosti na učitelově fantazii.

Právě potravinářská mikrobiologie se myslím k tomuto účelu výborně hodí a to z několika důvodů. Za prvé se zde pracuje s nepatogenními mikroorganismy, takže nehrozí porušení hygienických norem. Za druhé se jedná o mikroorganismy, se kterými se děti běžně setkávají a to častěji než s patogeny způsobujícími nemoci. Vždyť nemocní býváme

několikrát do roka, ale potraviny jako je jogurt, kysané zelí, sýry, kysaná mléka nebo i víno a pivo apod. konzumujeme prakticky denně.

V rámci rodinné tradice jsou cvičení v této práci zaměřena na mléčné výrobky – jogurty. Nejmenším přínosem pro studenty při těchto konkrétních cvičení má být alespoň minimální „spotřebitelská gramotnost“ – tedy umět si vybrat kvalitní kysaný mléčný výrobek a vědět, proč to tak je. Dnešní společnosti inzerují, že jejich výrobek obsahuje „živé kultury“ - je tomu skutečně tak? Podle kvalitativních znaků výrobku to tak v mnohých případech není. Hlavním úkolem pro žáka tedy je zjistit jak to s živými kulturami je a jak vypadá výrobek, který je skutečně obsahuje. Takže se při nákupu může řídit smyslovými vlastnostmi výrobku a nemusí vždy dělat mikrobiologickou analýzu. Takovýto poznatek je totiž praktický a dokázat se orientovat na trhu podle jiných kritérií než častost reklamy v televizi využijí i studenti, kteří neuvažují o dalším studiu nebo dokonce studiu v oboru potravinářské mikrobiologie.

Samozřejmě, že ve skupinách studentů se zájmem o problematiku (např. v biologickém kroužku) je možné cvičení znáročit. V první řadě maximální účastí studentů na veškeré přípravě a dodržování všech pravidel práce v mikrobiologické laboratoři. Studenti mohou řešit nejen úkol spotřebitelského testování, ale také základní diagnostiky jednotlivých mikroorganismů. Dále je pak jen na učiteli, zda cvičení použije např. i pro jiná potravinářská odvětví nebo kultivace z prostředí.

Přesná diagnostika mikroorganismů však vyžaduje především zkušenost. Tu nelze tak rychle získat. Přesto jsou součástí práce i základní klíče a obrazový materiál pro určování.

Diplomová práce by měla být něčím přínosná. Nejlépe něčím objevným. V této problematice však byla většina objevena. Přínosem této práce má tedy být shromáždění, utřídění a zpřístupnění informací, podpořené vlastní tvůrčí invencí, které má umožnit učiteli bez větších zkušeností v tomto oboru zpřístupnit žákům tuto problematiku i prakticky.

2. Teoretická část

2.1. Význam mikroorganismů pro člověka

Mikroorganismy jsou všudypřítomné. Setkáváme se s nimi na každém kroku, aniž bychom si to uvědomovali. Často také nedokážeme jejich pravý význam pro člověka správně ocenit. V mnoha případech převládá podvědomí o jejich negativních vlastnostech ve vztahu k člověku. Pro mnoho lidí to jsou ty „bacily“, kvůli kterým jsme nemocní. Přesto je jejich pozitivní význam daleko rozsáhlejší a důležitější než negativa s nimi spojovaná.

Prvními obyvateli a tedy představiteli prvního života na zemi byly právě mikroorganismy. Bez jejich činnosti by nevznikly podmínky, které dále umožnily vznik vyšších forem života, jako je např. naše atmosféra. Také byly základním materiálem, jehož seskupováním, vývojem a pozvolnou diferenciací ve složitých procesech vznikly všechny vícebuněčné formy života. Jsou tedy prapůvodním základem života, bez kterého bychom zde my dokonalí vůbec nebyli.

V dřívějších dobách lidé jejich existenci spíše tušili. Bez možnosti smyslového poznání byl jejich popis a důkazy existence odkázány jen na rovinu filozofického předpokladu, podloženého nepřímými empirickými důkazy.

Teprve s objevem optických metod, umožňující dostatečné zvětšení, bylo možno empirické zkušenosti podložit nezvratnými důkazy.

Již ve starověku měli lidé zkušenost s potravinářsky využívanými mikroorganismy. Naši předkové vařili pivo, zkvašovali víno, mléko i zeleninu, používali kvásku při pečení apod. Jejich práce s těmito bakteriemi byla však původně náhodná, později sice systematictější, založená však převážně na „technologické tradici“. Také používané kmeny vycházely téměř vždy pouze z přirozené mikroflóry prostředí, nepatogenní i patogenní. Tím také docházelo ke kontaminacím a vytvářením nevýhodných směsí.

Přesto jsou dnes na mnoha místech právě tyto původně náhodné a dlouhodobě typické kultury základem výroby mnoha tradičních a krajových specialit (sýrů, nápojů, apod.).

Dnešní technika umožnila výrazné zkvalitnění a kontrolu v potravinářství používaných mikroorganismů. Jejich šlechtění a selekci nevhodnějších druhů a variet.

Tím ale význam mikroorganismů pro člověka dnes nekončí. Díky dlouhodobým studiím byly odhaleny mnohé fyziologické vlastnosti mikroorganismů a těch člověk využívá. Mikroorganismy jsou dnes významným činitelem v biotechnologiích nejen potravinářských. Výroba

antibiotik, vakcinačních látek, vitamínů apod. jsou jedním z mnoha jejich využití (17).

Jejich všudypřítomnost má také pro člověka velký význam. Tvoří totiž tzv. přirozenou mikroflóru tělních povrchů i dutin (7), která má funkci především ochranou. V mnohých případech také podporují správnou funkci orgánů, tkání nebo orgánových systémů (např. střevní bakterie viz dále). A v neposlední řadě jsou významným imunizačním faktorem. Kontakt imunitního systému s patogeny ho díky jeho schopnosti „pamatovat si“ zefektivňuje, urychluje a zvýrazňuje jeho reakce a tím ho vlastně posiluje.

Dnes máme obrovské možnosti ve studiu mikroorganismů, přesto jich je ještě mnoho nepoznaných. A stále jsou vděčným tématem výzkumu.

Jejich negativní působení na člověka – jejich patogenní a toxikologické vlastnosti, jsou myslím bohatě vyváženy jejich pozitivním významem v životě.

Jejich společnosti se nikdy nemůžeme zbavit, protože by nás to stálo život, přesto nás někdy stojí život právě kontakt s nimi. Je tedy třeba si toto riziko uvědomovat a naučit se s ním žít.

Využitím účinku bakterií mléčného kvašení dochází ke zkvalitnění nutričních vlastností mléčných výrobků. Jak je to ale možné? Co je toho příčinou? Hlavní roli zde hrají fyziologické vlastnosti bakterií. Právě metabolické produkty štěpení cukrů, tuků a proteinů jsou pro výživu mnohem výhodnější. Ve své podstatě mají kysané mléčné výrobky stejnou energetickou hodnotu jako mléko, ze kterého byly vyrobeny (14). Přesto tím, že jsou základní složky již jakoby předtrávené, je jejich využitelnost daleko výhodnější. Dalším významným faktorem je antimikrobiální účinek těchto bakterií v trávicím traktu. Ten se uskutečňuje dvěma mechanismy. Jednak antimikrobiálně působí produkty metabolismu bakterií a to především kyselina mléčná i další organické kyseliny, peroxid vodíku, přirozená antibiotika a další látky. A také se uplatňuje přímá kompetice bakterií. Ty jsou schopné osidlovat trávicí trakt a tím vytlačit z tohoto místa bakterie nežádoucí. Tato vlastnost však není u všech bakterií stejná a také se mění s vitalitou dané bakterie. Jak říká Hylmar (14): Velmi důležitá je životaschopnost a aktivita bakterií mléčného kvašení v konzumovaných mléčných výrobcích co se týče adaptace v intestinálním traktu. Na tyto vlastnosti má vliv způsob a doba skladování fermentovaných mléčných výrobků, a to zvláště tam, kde se využívají směsné kultury.

Životaschopnost bakterií ve výrobku je tedy velice důležitá pro příznivý dietetický účinek. Hylmar (14) dále uvádí, že i mrtvé nebo poškozené bakterie mají dietetický účinek. Ten je zprostředkován zpracováním jejich vlastní hmoty a účinkem enzymů a dalších látek,

které se při destrukci z bakterie uvolní. Účinek živých bakterií je však nesporně větší a komplexnější.

Proto by si žáci z navrhovaných praktických cvičení měli odnést nejen biologické znalosti a zkušenosti s mikrobiologickou technikou práce, ale také základní poznatek o tom, že životaschopnost bakterií a tedy i kvalitu kysaného výrobku lze poznat i bez mikrobiologického vyšetření.

2.2. Mlékárenství - důležité mezníky v jeho vývoji a historii

Mléko bylo součástí stravy člověka od nepaměti (3). Nejen pro, že člověk sám patří mezi savce, takže se jeho mláďata živí mateřským mlékem. Člověk ve své vynalézavosti a schopnosti využívat své prostředí brzo obohatil svůj jídelníček i o mléko jiných savců. Mléko si nedopřávaly pouze děti, ale i dospělí. Rozhodujícím faktorem byly samozřejmě výhodné nutriční vlastnosti mléka.

Historické doklady o využití a snad i zpracování mléka máme již z neolitu. Potvrzují to archeologické nálezy, u nás především na Moravě, v nichž nalézáme nádoby na mléko a nástroje používané pravděpodobně k jeho zpracování (2).

Kromě konzumace mléka je nejstarším mléčným výrobkem sýr. Pouhé zkysnutí mléka dává vznik základní sýrové hmotě - tvarohu. Postupem času se výroba sýrů zdokonalovala a objevovaly se specifické krajové a kulturní receptury na výrobu nejrozmanitějších druhů sýrů.

V naší historii se poprvé o sýru dočteme v listině Břevnovského kláštera z roku 993, kde byly sýry použity jako poplatek (2). Neznamená to samozřejmě, že se u nás sýry dříve nevyráběly. V dalších kronikách a záznamech se o sýrech dočítáme poměrně často. Sýr byl podle všeho ceněnou součástí jídelníčku jak chudiny tak i bohatých vrstev (2).

Později se ze záznamů můžeme dozvědět o výrobě smetany a másla.

Již v roce 1739 bylo vydáno Gubernální nařízení proti prodeji nekvalitního mléka a mléčných výrobků. Stráž u brány měla ochutnávat všechny tyto produkty, které vesničané přiváželi na trh, jestli nejsou zkažené nebo jinak pozměněné. Nesmělo se také používat mléko od nakažených kusů dobytka. Jednalo se vlastně o první hygienickou normu na ochranu spotřebitele (2).

V 19. století s rozvojem technických a přírodních věd nastává i rozvoj mlékárenství. Nové poznatky z oborů jako je chemie, biologie a především technika, umožnily nové metody při zpracování mléka. Především poznatky Pasteura (1858) z oblasti bakteriologie a kvasné fyziologie znamenaly průlom v technologiích (2).

V roce 1887 použil poprvé pan Storch v Dánsku bakterie mléčného kysání k zakysání smetany (2). Tak vznikl jogurt. Bylo by naivní si myslet, že předtím se jogurt vyrobit nedal. Výroba však probíhala bez hlubší znalosti mechanismu a podobnou technikou, jakou se uchovával např. chlebový kvásek. Samozřejmě se tento mechanismus ve své podstatě - tedy použití uchovávaného zákysu - používá i dnes, ale se zřetelem ke specifickým požadavkům bakterií. Velmi důležitá je také kultivační kontrola zákysu a hygienické zásady při výrobě, které dnes zabraňují kontaminaci výrobku nežádoucím kmeny.

Od roku 1934 je u nás uzákoněna povinná pasterizace mléka (1). Tento předpis se týká nejen mléka k přímé konzumaci, ale i mléka jako suroviny pro další zpracování.

V padesátých letech byly u nás postupně formulovány a uzákoněny normy jakosti pro mléko a jednotlivých mléčných výrobků. Tyto normy samozřejmě udávají i přípustnou mikroflóru výrobků a její množství (1).

Mlékárenství samozřejmě s rozvojem techniky zaznamenalo obrovský rozvoj. Je to odvětví, které z hlediska svého zaměření je dosti perspektivní. Lidé totiž budou konzumovat mléka a mléčné výrobky, troufám si říct, pořád.

Bohužel se začleněním našeho státu do EU zde hrozí především to, že jednotlivé provozy, které dnes vyrábějí produkty s charakterem téměř krajových specialit, nevyhoví novým hygienickým normám a z nedostatku prostředků na úpravu provozu budou zavřeny a zrušeny. Tím bohužel dojde k ochuzení našeho trhu o bezesporu kvalitní výrobky a jejich místo bude naplněno výrobky dovezenými ze zahraničí. Tím se ovšem náklady na výrobek zvyšují a konečná cena u spotřebitele může být u stejně kvalitního výrobku ze zahraničí neporovnatelně vyšší.

2.3. Přehled používaných čistých mlékařských kultur a jejich využití

Objev čistých mlékařských kultur a veškeré poznatky, které to umožnily, znamenaly velký zvrat ve zpracování mléka. Jednoznačnou výhodou oproti přírodnímu zákysu bylo, že se ustálila kvalita konečného produktu na určité vyšší úrovni. Přírodní zákys byl osídlen pouze kmeny přirozené mléčné mikroflóry, která se v daném chovu či u dané dojnice vyskytovala (8). Další kmeny se v zákysu nevyskytovaly i kdyby byly z hlediska konečného produktu výhodnější. Navíc mohl být zákys kontaminován nejen mikroorganismy škodlivými z hlediska technologického, ale i zdravotně závadnými či dokonce patogeny.

V tomto ohledu přineslo používání čistých mlékařských kultur značný pokrok. Především byla umožněna pasterizace mléka, jako suroviny pro výrobu. Tím se odstranila většina nežádoucích bakterií apod. Poznatky mikrobiologie umožnily tedy nejen zkvalitnit vstupní surovinu (z hlediska

technologického), ale také zabezpečit lepší hygienické podmínky po celou dobu výrobního procesu a v neposlední řadě zkvalitnit jednu z hlavních složek technologického zpracování.

Co to tedy čistá mlékařská kultura vlastně je? U nás Teplý (19) definuje čisté mlékařské kultury jako klíčové výrobní prostředky, kterými se do suroviny (mléka, smetany, syrovátky), zbavené všech patogenních i pokud možno všech nežádoucích a technologicky škodlivých mikroorganismů vůbec, zavádějí vybrané účelově zaměřené druhy specifických mikroorganismů, aby byl jimi vyvolán a zajištěn správný průběh výrobního procesu a dosažena žádoucí jakost hotového výrobku.

Vedamuthu (1976, 19) definuje podobné zákysy jako vybrané a vyšlechtěné mikroorganismy, záměrně přidávané do mléka nebo smetany s cílem vyvolat určité specifické změny ve vzhledu, konzistenci, obsahu a chuti i dalších vlastnostech daného mléčného výrobku.

Jaké čisté mlékařské kultury se tedy v mlékárenství používají? V zásadě je můžeme rozdělit na kultury bakteriální, kvasinkové a plísňové.

Bakteriální kultury dále dělíme na kultury s omezenou trvanlivostí, kultury s prodlouženou trvanlivostí a kultury trvanlivé (19).

Kvasinkové kultury také dělíme na kultury máslařské, kultury pro výrobu sýru Niva, kultury tvořící součást mazové kultury pro výrobu měkkých sýrů a kvasinky jako součást kefirové kultury a jiných nápojových kultur (19).

V *plísňových kulturách* rozlišujeme tyto skupiny: Rokfórská kultura, Camambertská kultura, další kultury požívané k výrobě sýrů s plísní na povrchu a vedlejší plísňové kultury (19).

Mezi bakteriální kultury s omezenou trvanlivostí patří:

Základní (smetanová) kultura (ON 67 1701, sb.č. 2, 14, 16 a další) je kultura skutečně základní. Používá se při výrobě celého sortimentu kysaných mléčných výrobků, ať již nápojových nebo tvarohových a sýrových, a dále k výrobě másla (19). Jedná se o kulturu směsnou se zastoupením těchto diplokoků a streptokoků mléčného kvašení mezofilního charakteru: *Streptococcus lactis*, *Streptococcus lactis*, *subsp. diacetylactis*, *Streptococcus cremoris*, *Leuconostoc dextranicum* a *Leuconostoc cremoris* (19) (obr. viz CD).

Jogurtová kultura (ON 57 1702, sb.č. 21, 24, 763 a další) se v současné době vyrábí ve třech formách: kultura klasického jogurtu - tvořená kmeny *Lactobacillus bulgaricus* a *Streptococcus thermophilus* v poměru 2:1 až 1:2, Kultura jogurtu se zvýšenou odolností vůči inhibičním látkám je tvořena kmeny kultury klasického jogurtu a navíc ještě *Laktobacillus acidophilus* a *Pediococcus acidilactici* v poměru

tyčinek ke kokům 2:1 až 1:2 a bijogurtová kultura se skládá z kmenů *Lactobacillus acidophilus* a *Streptococcus lactis* a to v poměru 1:1. Jogurtové kultury se využívají k výrobě jogurtů (19) (obr. viz CD).

Sýrařské kultury vycházejí v podstatě z kultury základní. Obsahují tedy streptokoky mléčného kvašení v různém poměru podle požadavků technologa. Pro jednotlivé typy sýrů se při výrobě přidávají další kultury (čisté kmeny nebo směsné kultury) podle požadovaného charakteru sýru. Kmeny, se kterými se zde můžeme setkat, jsou *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus faecium*, aj. Dále sem můžeme přiřadit směsné kultury sýrařské. To jsou ementálská kultura (obr. viz CD), eidamská kultura, termofilní tvarohová kultura, základní kultura pro ovčí sýry a termofilní kultura pro ovčí sýry (19).

Propionová kultura (ON 57 1706) - tyto bakterie jsou v sýrařství důležité produkcí plynu, který je podmínkou tvorby pravidelných ok v sýru. Kmeny tvořící tuto kulturu jsou *Propionibacterium freudenreichii* a *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *Schermanii* (19).

Mazová kultura (ON 57 1707) se používá při dezinfekci provozu při výrobě některých omývaných sýrů zrajících od povrchu a pro zlepšení mazovatění. Kulturu tvoří kmeny *Brevibacterium linens*, *Micrococcus roseus*, *Micrococcus spaciosus*, *Torulopsis candida*, *Kluyveromyces lactis* a *Candida utilis* (19).

S kulturami nápojovými jsme se dříve mohli setkat nejen v mlékárenských provozech, ale i dietních laboratořích nemocnic, mléčných jídelnách nebo i domácnostech. Dnes díky širokému sortimentu kysaných mléčných nápojů ve spotřebitelské síti není použití těchto kultur v domácnostech běžné. Patří sem tyto nápoje: Kyška (použitá základní kultura), acidofilní kyška (základní kultura + *Lactobacillus acidophilus*), jogurtové mléko (jogurtové kultury), acidofilní mléko (*Lactobacillus acidophilus* + základní kultura), keřirové mléko a šumivý keřir (obr. viz CD) (originální keřirová zrna nebo směs těchto kmenů *Lactobacillus delbrückii*, *Streptococcus lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Kluyveromyces fragilis* a *Candida keřyr*) (19).

Bakteriální kultury s prodlouženou trvanlivostí (ON 57 1701) jsou kultury vycházející ze základní a obsahující bakterie jako kultury výše popsané. Jsou určeny k rozesílání do mlékárenských provozů. Jsou rozmnoženy ve vybraném kravském mléce obohaceném o různé látky, které zamezují překysání kultury a tím zvyšují její trvanlivost a účinnost. Aktivovaná kultura je taková, kterou lze ihned použít přímo k očkovaní provozního zákysu. Je typická nejen trvanlivostí, ale především zvýšenou účinností. Stabilizovaná kultura má pouze prodlouženou trvanlivost. Lze ji použít ještě 6. den k přímému očkovaní zákysu (19).

Trvanlivé kultury se připravují z výše popsaných nejčastěji sušením nebo zamrazováním. Nejvýhodnější přípravou je sušení tzv. lyofilizací

(kryodesikací). Zásada přípravy kultur touto metodou spočívá v jejich fixaci vysušením vody ve fázi jejich největšího pomnožení (19).

Kvasinkové kultury používané v mlékárenství jsou tyto:

Kvasinkové kultury máslařské se používají ke zkvalitnění vlastností másla. Kvasinky v másle udržují stálé a výhodné chemické prostředí, které máslo chrání před kontaminací a přispívá ke stálosti jeho vlastností. Používané kmeny jsou *Cryptococcus laurentii* a *Torulopsis candida* (19).

Kvasinkové kultury pro výrobu sýru Niva jsou významné především pro typické znaky sýra. Vytvářejí plyn, v jehož dutinkách pak roste plíseň. Zabezpečují rovnováhu mezi bakteriemi a plísněmi. A podílejí se významně na zrání sýra a jeho typické chuti. Používaným kmenem je *Kluyveromyces lactis* (19).

Kvasinkové kultury tvořící součást mazové kultury pro výrobu měkkých sýrů jsou nejdříveji používanými kvasinkovými kulturami. Používají se pro výrobu měkkých sýrů s povrchovou mazovou kulturou. Tvoří ji především *Torulopsis candida* (*Torula olomucensis*) a *Kluyveromyces lactis* (19).

Jak jsme již zmínili, kvasinky jsou také součástí kefírových a jiných nápojových kultur. Jsou to nejčastěji *Torulopsis lactis*, *Kluyveromyces fragilis* a *Candida kefyr* Beijerinck (19).

Používané plísňové kultury jsou tyto:

Rokfórská kultura (ON 57 1710) je kulturou *Penicillium roqueforti*. Je to typická plíseň sýrů rokfórského typu, které se prodávají pod nejrůznějšími označeními. Podle mezinárodní dohody může být názvem "Rokfór" označen pouze sýr z ovčího mléka zrající ve sklepech Roquefortu (19).

Camambertská kultura (ON 57 1711) se používá k výrobě sýrů s povrchovým plísňovým porostem. Kmeny této kultury jsou *Penicillium camamberti* nebo *Penicillium caseicolum*. Kmeny používané k přípravě těchto kultur jsou většinou originál francouzské kmeny (19).

Dále je k výrobě sýrů s plísní na povrchu používáno kultur z kmenů *Penicillium viridicatum* a *Penicillium nalgiovensis*.

K *vedlejším plísňovým kulturám*, vyráběným pro různá odvětví potravinářství, patří kmeny *Scopulariopsis brevicaulis* Bainier (plíseň pro výrobu trvanlivých salámů) a *Geotrichum candidum* (plíseň pro zrání eidamských sýrů) (19).

2.4. Mikroorganismy v mlékárenství

Přehled nejčastěji používaných mikroorganismů, jejich fyziologických a kultivačních vlastností - při výrobě KMV (volně přežato (19)).

2.4.1. Bakterie

Bifidobacterium bifidum je tyčinka velikosti 0,5 – 0,7 x 2,0 – 8,0 μm. Tyčinky jsou sdružené ve dvojicích nebo krátkých řetězcích. V kultuře udržované delší dobu v mléce již nejeví známky větvení jako v kultuře čerstvě izolované ze stolice kojenců. Kolonie na syrovátkovém agaru s kvasničním autolyzátem jsou bílé, drobné, s nepravidelnými okraji. V tekutém prostředí tvoří zákal a později vločkovitý sediment. Mléko koaguluje při optimální teplotě 37°C za 16 až 24 hodin. Při zahřátí na teplotu 60°C po dobu 15 minut kultura hynie (obr. viz CD).

Brevibacterium linens tvoří tenké tyčinky velikosti 0,6 μm x 2,5 - 3 μm. Vyskytují se převážně jednotlivě nebo v krátkých řetězcích. Jsou grampozitivní, aerobní a množí se dělením. Optimální podmínky jejich růstu jsou: teplota kolem 20 °C, pH 6 až 9 (při pH nižším než 5 již nerostou), snášejí i vysoké koncentrace NaCl v prostředí. Proteolytické enzymy rozkládají bílkoviny, nerozkládají tuky a tvoří katalázu. Tvoří tečkovité kolonie o průměru asi 1 mm, jsou okrouhlé, kompaktní, lesklé, hnědožlutě až červenohnědě zbarvené. Želatinu ztekucují. Bujón zakalují a tvoří sediment. Vyskytují se ve vodě, vzduchu i půdě. Je to tzv. bakterie sýrové červeně na plísňových sýrech. U sýrů zrajících pod mazem tvoří důležitou složku mikroflóry mazu (obr. viz CD).

Čeleď *Lactobacteriaceae*

Rod Lactobacillus

Grampozitivní nebo gramlabilní, rovné nebo zahnuté tyčky, krátké až kokovité, často tenké a dlouhé. Vyskytují se jednotlivě i v řetězcích, někdy tvoří až vláknité formy. Jsou mikroaerofilní až anaerobní, nepohyblivé. Dusičnany na dusitany neredukují, indol netvoří, želatinu neztekucují (výjimku mohou tvořit některé anaerobní druhy). Povrchové kolonie jsou drobné. Růst na povrchu je slabý, pigment tvoří ojediněle – pokud se vyskytuje, je žlutý, oranžový nebo cihlově červený. Hloubkové kolonie jsou diskovité i chomáčkovité. Sacharidy zkvašují buď homofermentativně na mléčnou kyselinu, nebo heterofermentativně na mléčnou, octovou, mravenčí, propionovou, máselnou kyselinu, oxid uhličitý a ethanol. Netvoří katalázu. Optimální teplota se pohybuje v rozmezí 30 až 40 °C, tepelné rozmezí růstu je při 5 až 53 °C. optimální pH prostředí je 5,5 až 5,8 nebo i méně. Při vyšším pH

prostředí se růst zpomaluje. Vyskytují se v mléčných výrobcích, kvasících rostlinných šťávách a v potravinářských výrobcích. Často je najdeme v ústech a ve vagině, kde mohou být podmíněně patogenní.

Lactobacillus acidophilus jedná se o tyčinky velikosti $0,6 - 1 \mu\text{m} \times 1,5 - 6 \mu\text{m}$. najdeme je jednotlivě, ve dvojicích nebo v krátkých řetízcích. Jsou grampozitivní (staré kultury až gramnegativní), mikroaerofilní a rozmnožují se dělením. Optimální teplota je 37°C . tvoří rychle inaktivní mléčnou kyselinu v množství $1,2 - 1,6 \%$. Mléko sráží za $3 - 4$ hodiny. Mléčnou kyselinu tvoří z glukózy, galaktózy, sacharózy, laktózy a maltózy. Působí silně antagonisticky proti hnilobné mikroflóře. Na syrovátkovém agaru tvoří při teplotě 37°C za $3 - 7$ dní vakovité kolonie o průměru až 7 mm s nepravidelným mechovitým okrajem. *Lb. acidiphilus* tvoří dva typy kolonií - R-formy a S-formy. R-forma tvoří drsné (rough) kolonie, S-kolonie tvoří hladké (smooth) kolonie. Diagnosticko-selektivní půdou pro kultivaci a identifikaci mléčných bakterií je Lactobacilli-Broth. Tento druh se nalézá v mikroflóře sýrů s vysoko dohřívanou sýřeninou a je důležitou složkou mikroflóry jogurtu a jiných mléčných výrobků. Tvoří typickou mléčnou střevní mikroflóru lidí, v jejichž stravě je více laktózy a dextrinů. Je důležitý při výrobě acidofilního mléka (obr. viz CD).

Lactobacillus bulgaricus jsou dlouhé tyčinky se zaoblenými konci o rozměrech $0,3 - 1,2 \mu\text{m} \times 4 - 10 \mu\text{m}$ i více. Často vytvářejí řetízky až vlákna. Snadno tvoří volutinová zrna a involuční tvary. Jsou velmi tvarově variabilní, podle vlivů prostředí či teploty mohou měnit tvar či granulovat. Jsou grampozitivní (starší kultury gramlabilní), fakultativně anaerobní a rozmnožují se dělením. Optimální teplota růstu je 45°C , rostou však i v rozmezí $22 - 52,5^\circ\text{C}$ a byl pozorován i růst při teplotě 60°C . V mléce tvoří mléčnou kyselinu v množství $1,7\%$. Mléko sráží za $2 - 4$ hodiny a to velmi typickým způsobem – při teplotě $45 - 50^\circ\text{C}$ za tuto dobu mléko ztuhne v celé hmotě na kompaktní porcelánovitou hmotu. Na agarových půdách rostou v peříčkovitých koloniích. Vyskytuje se hojně ve všech mléčných výrobcích. Je důležitou složkou mikroflóry jogurtu (obr. viz CD).

Lactobacillus casei buňky tvoří tlustší tyčinky se zaoblenými konci velké $0,4 - 0,7 \mu\text{m} \times 2 - 4 \mu\text{m}$. V mléčných kulturách dosahují ještě větší délky. Zpravidla jsou uspořádány do diplobakterií nebo streptobakterií. Můžeme je však najít i samostatně. Jsou grampozitivní, mikroaerofilní a rozmnožují se dělením. Optimální teplota růstu je 30°C , ale některé kmeny rostou ještě při teplotě 45°C . Významně rozkládají bílkoviny. Napadají a štěpí kasein až na volné aminokyseliny. Mléko okyselují pomalu a sráží je až za $3 - 5$ dnů. V mléce tvoří $1 - 1,5\%$ převážně

pravotočivé mléčné kyseliny. Mléčnou kyselinu tvoří převážně z glukózy, fruktózy, manózy, galaktózy, maltózy, laktózy, manitu a salicinu. Nejlépe se kultivuje na syrovátkovém agaru a kvasničným hydrolyzátem. Kolonie jsou malé, bílé a ploché. Inkubační doba je 30 až 48 hodin. Vyskytuje se v mléce, sýrech, přírodních syřidlech, v silážích a ve výkalech. Některé kmeny způsobují za určitých podmínek táhlovitost mléka. Tvoří důležitou složku ementálských kultur. Uplatňuje se při zrání většiny druhů sýrů. Prochází nezměněna zaživačím traktem zvířat i lidí (obr. viz CD).

Lactobacillus delbrückii je to tenká tyčinka, jednotlivě i v párech nebo vláknech. Pokud se pěstuje samostatně, vytváří často involuční tvary. Roste dobře při teplotě 40 – 44°C, některé kmeny však mají optimální teplotu růstu při 30°C. Od kmene *Lactob. bulgaricus* se liší výškou teplotního maxima, které je zde 45°C. Tepelné minimum růstu je 18 – 22°C (obr. viz CD).

Lactobacillus helveticus je tyčinka o velikosti 2 – 6 µm, většinou samostatná, méně často sdružená ve velmi krátké řetízky. Se stoupající kultivační teplotou se zvyšuje sklon tvořit nit'ovité tvary. Povrchové kolonie na agarových půdách jsou malé, šedobílé, hloubkové kolonie jsou obdobné jako u *Lactob. bulgaricus*. Mléko sráží na homogenní porcelánovitou hmotu bez syrovátky a plynu. Je základní bakterií pro sýrařské kultury.

Lactobacillus lactis jsou dlouhé tenké tyčinky široké 1,2 µm a dlouhé 6 - 10 µm. vyskytují se jednotlivě nebo ve dvojicích za sebou. Obsahují volutinová zrna. Jsou grampozitivní a rozmnožuje se dělením. Podmínky pro jejich růst jsou: optimální teplota 40 °C (minimální 18-22 °C, maximální 50 °C). Tvoří levotočivou kyselinu mléčnou v množství do 1,6 %. Zkvašuje laktózu, maltózu a slabě sacharózu. Mléko srážejí za 4 - 6 hodin a netvoří plyn. Rozkládají pomalu bílkoviny a produkují antibiotikum nisin. Na syrovátkovém agaru tvoří typické bílé až šedobílé kolonie. Tento druh je důležitou složkou mikroflóry mléka a sýrů. Je tedy významným druhem v mlékárenském průmyslu.

Lactobacillus plantarum jsou tyčinky se zaoblenými konci o velikosti 0,6 - 1 µm x 3 - 6 µm. najdeme je jednotlivě nebo v krátkých řetízcích. Jsou grampozitivní, mikroaerofilní a rozmnožují se dělením. Optimální teplota jejich růstu je 37°C. Tvoří především inaktivní kyselinu mléčnou (částečně i pravotočivou). Z dusičnanů netvoří dusitany. Některé kmeny produkují za určitých podmínek peroxid vodíku, který inhibuje bakterie mléčného kvašení. Kasein nerozkládají. Zkvašují silně mono- i disacharidy a rafinózu. Nejsou zvláště náročné na druh živin a rostou

rychle a dobře jak v tekutých, tak i v tuhých půdách. Rostou již za 1 - 2 dny při teplotách 20 - 35 °C. Na pevných půdách tvoří hutné, čočkovité kolonie o průměru často i několik milimetrů. V přírodě je velmi rozšířený. Vyskytují se v rostlinném materiálu všeho druhu, v mléce, másle, sýrech, v kyselém zelí, silážovaných bramborách apod. (Obr. viz CD).

Klíč k rozlišení druhů rodu *Lactobacillus*

Identifikační systém (podle Bergerova klíče vydaného v roce 1975) (19)

1.	<i>Homofermentativní</i> . Hlavním produktem při zkvašování je mléčná kyselina (85% a více).
1.1	Plyn z glukózy netvoří, ribosu nezakvašují, thiamin k růstu nevyžadují. Rostou při 45 °C a při vyšších teplotách. Obvykle nerostou při 20 °C. 15 °C růst inhibuje. Kolonie normálně drsné přecházejí v hladké až kompaktní v přítomnosti Tweenu 80.
1.1.1	Produkují D (-) mléčnou kyselinu <i>Lbc.delbrückii</i> <i>Lbc.leichmanii</i> <i>Lbc.jensenii</i> <i>Lbc.lactis</i> <i>Lbc.bulgaricus</i>
1.1.2	Produkují D, L-mléčnou kyselinu <i>Lbc.helveticus</i> <i>Lbc.acidophilus</i>
1.1.3	Produkují L (+) mléčnou kyselinu a malé množství D (-) mléčné kyseliny <i>Lbc.salivarius</i>
1.2	Plyn z glukózy netvoří, tvoří jej však z glukonátů. Pokud zkvašují ribosu, tvoří octovou mléčnou kyselinu bez plynu. Thiamin k růstu nevyžadují. Rostou při 15 °C. růst při 45 °C je variabilní.
1.2.1	Produkují L (+) mléčnou kyselinu, zkvašují ribosu. <i>Lbc.casei subsp.casei</i> <i>Lbc.casei subsp.rhamnosus</i> <i>Lbc.casei subsp.alactosus</i> <i>Lbc.casei subsp.tolerans</i> <i>Lbc.xylosum</i>
1.2.2	Produkují D, L (-) mléčnou kyselinu, zkvašují ribosu. <i>Lbc.casei subsp.pseudopiantarum</i> <i>Lbc.piantarum</i> <i>Lbc.curvatus</i>
1.2.3	Produkují D, L (-) mléčnou kyselinu, zkvašování ribosy je neurčité. <i>Lbc.coriniformis subsp.coriniformis</i>
1.2.4	Produkují D (-) mléčnou kyselinu, ribosu nezakvašují. Dávají přednost růstu v prostředí s pH 5,0. <i>Lbc.coriniformis subsp.torquens</i>

	<i>Lbc.homohiochii</i>
2.	<i>Heterofermentativní</i> . Produkují asi 50% mléčné kyseliny z glukózy a značné množství oxidu uhličitého a ethanolu.
2.1	Tvoří plyn z glukózy a glukonátu. Ribosu zkvašují na mléčnou a octovou kyselinu bez plynu. K růstu vyžadují thiamin. Produkují D, L (-) mléčnou kyselinu.
2.1.1	Rostou při 45 °C, nerostou při 15 °C. <i>Lbc.fermentum</i>
2.1.2	Růst při 45 °C a 15 °C je variabilní, rostou při 48 °C. <i>Lbc.cellobiosus</i>
2.1.3	Rostou při 15 °C, nerostou při 45 °C. <i>Lbc.brevis</i> <i>Lbc.büchnerii</i> <i>Lbc.viridescens</i> <i>Lbc.coprophylyus</i>

Z rodu *Lactobacillus* se ve výrobě čistých mlékařských kultur používají hlavně druhy homofermentativní.

Rod *Leuconostoc*

Buňky jsou grampozitivní, obvykle kulaté. V zeleninové nebo ovocné šťávě mohou dosáhnout tvaru krátké tyčinky. Některé kmeny v prostředí se sacharózou tvoří slizová pouzdra. Rostou na běžných kultivačních půdách, jejich růst umožňuje přidavek kvasničného extraktu a rajčatové šťávy. Mléko srážejí jen výjimečně. Tvoří levotočivou nebo racemickou mléčnou kyselinu. Z glukózy tvoří kromě mléčné kyseliny octovou kyselinu, oxid uhličitý a ethanol (obr. viz CD).

Leuconostoc dextranicum tvoří kulaté buňky o průměru 0,6 – 1 µm seskupené ve dvojicích nebo krátkých řetězcích. Optimální teplota růstu je 21 – 25°C, roste však ještě i při teplotě 40°C. Mléko sráží velmi pomalu a produkuje acetoin a diacetyl.

Klíč k rozlišování rodu *Leuconostoc*

Identifikační systém (podle Bergerova klíče vydaného v roce 1975) (19):

1.	Tvoří mléčnou kyselinu ze sacharózy.
1.1	Tvoří mléčnou kyselinu z pentóz <i>L.mesenteroides</i>
1.2	Netvoří mléčnou kyselinu z pentóz <i>L.dextranicum</i>
2.	Netvoří mléčnou kyselinu ze sacharózy <i>L.cremoris</i>

Micrococcus roseus tvoří okrouhlé buňky o průměru 1 - 1,2 µm. Vyskytují se ve dvojicích, čtveřicích a nepravidelných shlucích. Roste na povrchu syrovátkového agarů s kvasničným autolyzátem

v drobných, hladkých, růžových koloniích. V tekuté půdě tvoří zákal a růžový sediment (obr. viz CD).

Čeď *Streptococcaceae*

Buňky jsou kulovité nebo oválné, zřídka prodloužené do tyčinkovitého tvaru. Jsou sdruženy v párech, krátkých nebo dlouhých řetězcích a tvoří tetrády. Pouze u enterokoků je možné pozorovat menší shluky. Pouzdra jsou rozeznatelná pouze u některých druhů za určitých podmínek. Buňky jsou grampozitivní nepohyblivé. Katalásu netvoří, dusičnany na dusitany neredukují.

Některé patogenní druhy jsou rozpustné ve žluči. Na povrchu agarových půd rostou obvykle málo. Kolonie jsou malé, většinou do 1 mm v průměru. Vzhled kolonií jednoho druhu může být ovlivněn teplotou, zdrojem dusíku i jinými látkami. Přečází od formy drsné až po formu mukoidní. Hlubkové kolonie mají diskovitý tvar s různě utvářenými. Růst v bujónu je rovněž vzhledově proměnlivý, nikdy však netvoří na povrchu blanku. Zkvašování glycidů je homofermentativní s tvorbou pravotočivé mléčné kyseliny jako hlavním produktem. Oxid uhličitý a ethanol se tvoří pouze ve stopách. Zkvašování glycidů může být i heterofermentativní. Všechna rody této čeledi jsou náročné na složení živného prostředí. Lancefieldová (1928, 1933) rozlišuje jednotlivé druhy čeledi *Streptococcaceae* podle sérologických hledisek na skupiny A, B, C, D, E, F, G, H, K a N. Při rozlišování rodů čeledi *Streptococcaceae* se především posuzuje vztah ke krevnímu barvivu. Při rozlišování a popisů jednotlivých znaků a vlastností rodů a druhů této čeledi je popis zaměřen na hlavní skupiny a jejich zástupce používané k výrobě čistých mlékařských kultur.

Streptococcus cremoris tvoří buňky o velikosti 0,6 – 0,7 μm , seskupené zpravidla do dlouhých řetězků, tvořených dvojicemi koků. Tento znak je charakteristický pro čerstvé kultury pěstované v jakostním mléce. V starších kulturách se řetězky rozpadají v dvojice. Na syrovátkovém agaru tvoří kolonie podobné *Strep. lactis*. Roste v rozpětí teplot 10 – 37°C. Teplota 40°C růst inhibuje. Optimální teplota je 30°C.

Streptococcus faecalis buňky mají kulovitý někdy až vejčitý tvar, průměr buněk je asi 0,7 - 1,3 μm . Najdeme je nejčastěji ve dvojicích nebo v krátkých řetězcích. Jsou grampozitivní, fakultativně anaerobní a rozmnožují se dělením. Optimální teplota jejich růstu je 37 °C, ale rostou i v širokém rozmezí 10 – 45°C. Tvoří kyselinu z glukózy, manózy a laktózy. Škrob nehydrolyzují. Ze 4%peptonu tvoří amoniak. Snáší poměrně vysokou koncentraci NaCl v prostředí. Na agarových půdách tvoří malé, okrouhlé, mléčně bílé kolonie. Inkubační doba je 16 - 20

hodin. V bujónu tvoří zákal a hustý sediment. *Streptococcus faecalis* patří mezi tzv. enterokoky, které se vyskytují v mikroflóře trávicího traktu. Vzhledem k tomu, že jde o střevního saprofyta, je třeba jeho výskyt v potravinách posuzovat velmi přísně. Má určité patogenní účinky, vyvolává tzv. enteritidy, choroby žlučníku, žlučových cest, urogenitálního systému aj. Nehemolytické kmeny se používají při výrobě sýrů čedar a jiných tvrdých sýrů, kterým dodávají výraznější chuť (obr. viz CD).

Streptococcus faecium tvoří v tekutém prostředí diplokoky a krátké streptokoky, buňky jsou středně velké 0,5 – 1 µm. Růstová teplota se pohybuje v rozmezí 10 – 45°C. Optimální teplota je 37 – 40°C. Dobře snáší dlouhodobou pasterizaci, 6,5% NaCl v prostředí a zásaditou reakci prostředí odpovídající pH 9,6. Stejně jako předcházející kmen se uplatňuje při zrání sýra čedar a dává mu výraznější chuť (obr. viz CD).

Streptococcus lactis tvoří buňky o velikosti 0,9 - 1 µm, zpravidla sdružené v diplokoky, méně často v krátké řetízky a pouze některé variety tvoří dlouhé řetízky. Je to fakultativní anaerob. Buňky se rozmnožují dělením. Tepelné rozmezí jejich růstu je 10 - 40 °C, optimální teplota je 30 °C. Jsou homofermentativní. Tvoří kyselinu z glukózy, maltózy a laktózy. Kolonie na agarových půdách jsou malé, okrouhlé, šedobílé barvy, s ostře vyznačenými okraji. Kolonie mají obvykle 1,5 - 2,5 mm v průměru. Vpich do želatiny je nitovitý, želatina není ztekucená. V bujónu tvoří zákal a později sediment. Na krevním agaru rostou po přidání 40% žluče. Krevní agar nehemolyzují. Vyskytuje se především v mléce a mléčných výrobcích. Je převládajícím druhem v samovolně zkyslém mléce. Je důležitou složkou mikroflóry máslařských zákysů používaných ke zrání kyselých smetan. Nejvíce se uplatňuje v mlékárenském průmyslu (obr. viz CD).

Streptococcus lactis, subsp. diacetylactis v mléčném prostředí roste ve tvaru diplokoků a krátkých řetízků. Od *Str.lactis* se liší schopností vytvářet hlavně za přítomnosti fruktózy oxid uhličitý, octovou kyselinu a štěpit citrónovou kyselinu. Při této reakci probíhá tvorba acetoinu a diacetylů.

Streptococcus thermophilus buňky jsou velmi malé kuličky uspořádané v různě dlouhé řetízky. Průměr buněk je 0,7 - 0,9 µm. Jsou grampozitivní, fakultativně anaerobní a rozmnožují se dělením. Podle složení prostředí a vlivu teploty tvoří krátké nebo dlouhé řetízky. Optimální teplota je 40 - 45 °C, ale rostou v rozmezí 20 – 50°C. Tvoří kyselinu z glukózy, fruktózy, sacharózy a laktózy. Na rozdíl od ostatních druhů tohoto rodu jsou velmi citlivé již na koncentraci 2 - 2,5% NaCl v prostředí. Prostředí

s obsahem 3% NaCl již inhibuje jejich růst. Kasein proteolyzují jen velmi slabě. Želatinu neztekucují. Nejlepším kultivačním prostředím je mléko. To koaguluje při pokojové teplotě několik dní, při teplotě 30–45°C již za 24 hodin. Na syrovátkovém agaru s kvasničným hydrolyzátem tvoří šedé, okrouhlé kolonie o průměru 1-3 mm. Optimální pH je 4,2 - 4,6, při pH 6,9 již neroste (obr. viz CD).

Klíč k rozlišení rodů čeledi *Streptococcaceae*

Identifikační systém (podle Bergerova klíče vydaného v roce 1975) (19): Glukózu a hexózu zkvašují homofermentativně za tvorby pravotočivé mléčné kyseliny. Buňky jsou sdruženy v páry a krátké řetězky, katalázu netvoří.

Rod *Streptococcus*

Z glukózy tvoří levotočivou mléčnou kyselinu a octovou kyselinu, oxid uhličitý a ethanol. Katalázu netvoří, buňky jsou uspořádány ve dvojicích nebo v krátkých řetězích.

Rod *Leuconostoc*

Z glukózy tvoří inaktivní mléčnou kyselinu. Buňky jsou sdruženy v páry, tetrády nebo tvoří krátké řetězky. Tvorba katalázy je variabilní.

Rod *Pediococcus*

Z glukózy tvoří pravotočivou mléčnou kyselinu. Buňky jsou sdruženy v páry a tetrády. Dělí se ve dvou rovinách. Tvorba katalázy je variabilní.

Rod *Aerococcus*

Glukózu zkvašují, ale produkty zkvašování se neuvádějí. Buňky jsou grampozitivní až gramlabilní. Katalázu netvoří.

Klíč k rozlišování druhů rodu *Streptococcus*

Identifikační systém (podle Bergerova klíče vydaného v roce 1975) (19):

1.	Zástupci této skupiny nerostou při 10 °C a při 45 °C. nerostou v prostředí s 6,5% NaCl a v prostředí s pH 9,6. neredukují lakmusové mléko před sražením. Nerostou na mléce s 0,1% methylenové modří. Z peptonu tvoří amoniak. Manit a glycerol většinou nezkašují. Podle Lancenfieldové jsou zahrnuty do sérologické skupiny A, B, C, H, G a F.
1.1	Nehydrolyzují hippurát sodný: <i>Str.pyogenes</i> <i>Str.zooepidemicus</i> <i>Str.dysgalactiae</i> <i>Str.equisimilis</i> <i>Str.equii</i> <i>Str.sanguis</i> <i>Str.pneumonia</i> <i>Str.anginosus</i>
1.2	Hydrolyzují hippurát sodný: <i>Str.agalactiae</i> <i>Str.acidominimus</i>
2.	Zástupci rostou při teplotě 45 °C, netvoří amoniak z argininu (výjimku může tvořit <i>Str.mitis</i>) a peptonu. Nerostou v prostředí

	s 6,5% NaCl, 0,1 % methylenové modři a v prostředí a pH 9,6. lakmusové mléko před sražením neredukují. Nejsou β -hemolytické. Podle Lancefieldové patří do sérologické skupiny B, K a D.
2.1	Zkvašují laktózu, nerostou při 10 °C.
2.1.1	Nerostou při 50 °C, jsou α -hemolytické nebo viridující. Většinou zkvašují inzulín, rafinózu, salicin a dextrin. Rostou v prostředí s 2% NaCl. <i>Str.salivarius</i> <i>Str.mitis</i> <i>Str.bovis</i>
2.1.2	Rostou při teplotě 50 °C, krevní barvivo nemění, nezkvašují rafinózu, inzulín, salicin a dextrin. Nerostou v prostředí s 2% NaCl. <i>Str.termophilus</i>
2.2	Nezkvašují laktózu, nerostou při 10 °C, rostou v přítomnosti 40% žluči v prostředí. <i>Str.aquinus</i>
3.	Rostou při 10 °C a 45 °C. Rostou v prostředí se 6,5% NaCl, 0,1% methylenové modři a při pH 9,6. z peptonu a tyrosinu tvoří amoniak. Podle Lancefieldové patří do sérologické skupiny D a Q.
3.1.1	Lakmusové mléko okyselují, redukují před sražením, ale nepeptonizují. Zkvašují sorbit a manit. Želatinu neztekucují. Jsou hemolytické. <i>Str.faecalis subsp.faecalis</i>
3.1.1.1	Nejsou hemolytické, želatinu neztekucují, lakmusové mléko okyselují, srážejí a nakonec peptonizují. <i>Str.faecalis subsp.liquefaciens</i>
3.1.1.2	Cerstvě izolované jsou hemolytické. Tuto schopnost mohou během kultivace ztratit. Želatinu mohou, ale nemusí ztekucovat. Mléko okyselují, srážejí a mohou peptonizovat. <i>Str.faecalis subsp.zymogenes</i>
3.1.2	Lakmusové mléko okyselují, ale před srážením neredukují. Sorbit a manit nezkvašují. Želatinu neztekucují. <i>Str.faecium (Str.durans)</i>
3.2	Rostou v prostředí se 6,5% NaCl, pH 9,6, nerostou v prostředí s 0,1% methylenové modři. Zkvašují arabinózu a sorbit. Netvoří amoniak z argininu. Podle Lancefieldové patří do skupiny D a C. <i>Str.avium</i>
3.3	Nerostou v prostředí s 6,5% NaCl a pH 9,6 a v mléce s obsahem 0,1% methylenové modři. Zkvašují sorbit, nezkvašují arabinózu. Z argininu tvoří amoniak. <i>Str.uberis</i>
4.	Rostou při teplotě 10 °C, nerostou při 45 °C. Rostou v prostředí

	s 6,5% NaCl a pH 9,6. lakmusové mléko redukuje před sražením, rostou v mléce s 0,1% methylenové modři. Krevní barvivo nemění. Podle Lancefieldové patří do sérologické skupiny N.
4.1	Rostou při teplotě 40 °C v prostředí se 4% NaCl a v prostředí upraveném na pH 9,2. Rostou v mléce s 0,3% methylenové modři. Zkvašují maltózu a dextrin. Z argininu tvoří amoniak. <i>Str.lactis</i>
4.1.1	V prostředí se zkvasitelnými cukry zkvašují citráty za tvorby oxidu uhličitého, acetoinu a diacetylu. <i>Str.lactis subsp.diacetylactis</i>
4.2	Nerostou při teplotě 40 °C v prostředí s 4% NaCl a 0,3% methylenové modři. Z argininu netvoří amoniak, maltózu obvykle nezkašuje. <i>Str.cremoris</i>

Rod *Pediococcus*

Tvoří grampozitivní mikroaerofilní nepohyblivé koky, sdružené ve dvojice, tetrády nebo v krátké řetězky. Jsou homofermentativní. Z glukózy tvoří inaktivní mléčnou kyselinu. Dusičnany na dusitany neredukují. Vyskytují se v rostlinných šťávách.

Pediococcus acidilactici tvoří buňky velikosti 0,6 – 1 μm, a to buď jednotlivé diplokoky, nebo krátké řetězky. Optimální teplota růstu je 45°C. Konečné pH v bujónu s glukosou se pohybuje v rozmezí 4,5 – 4,8. 2% soli v živném prostředí blokuje jeho růst. V tekutém prostředí tvoří zákal a slabý sediment. Je homofermentativní, zkvašováním laktózy tvoří inaktivní mléčnou kyselinu. Optimální teplota růstu je 40 – 45°C. Neroste v prostředí s pH vyšším než 7,2. Přítomnost 0,1% methylenové modři růst inhibuje. V mlékařských kulturách zprostředkovává udržení optimálního vztahu mezi laktobacily a streptokoky (obr. viz CD).

Klíč k rozlišení rodu *Pediococcus*

Identifikační systém (podle Bergerova klíče vydaného v roce 1975) (19):

1.	Rostou při pH 5,0, nerostou při pH 9,0
1.1	Nerostou při pH 7,0 a teplotě 37 °C. Dávají přednost růstu v anaerobním prostředí. <i>Ped.cerevisiae</i>
1.2	Rostou při pH 7,0 a teplotě 37 °C. jsou mikroaerofilní. Mohou růst při teplotě 50 °C. <i>Ped.acidilactici</i>
1.2.1	Nerostou při 50 °C.

	<i>Ped.pentosaceum</i>
2.	Nerostou při pH 5,0, rostou při pH 9,0. jsou mikroaerofilní.
2.1	Jsou halofilní <i>Ped.halophilus</i>
2.2	Nejsou halofilní. <i>Ped.urinae – equi</i>

Z rodu *Pediococcus* se v mlékárenské praxi uplatnil pouze druh *Ped.acidilactici*.

Rod *Aerococcus* a *Gemella* nemá v mlékárenské praxi uplatnění.

Čeleď *Propionibacteriaceae*

Grampozitivní, nepohyblivé, nespíralující, anaerobní nebo aerotolerantní mikroorganismy. V neutrálním prostředí tvoří krátké tyčinky, někdy až podobné kokům. Tvoří katalázu. Kolonie na agaru s kvasničným autolyzátem jsou patrné až po 5 dnech inkubace. Optimální teplota růstu je 30 °C. mléčnou kyselinu a sacharidy rozkládají na propionovou a octovou kyselinu a oxid uhličitý.

Propionibacterium freudenreichii buňky mají tvar velmi malých tyčinek až kuliček velikosti 0,5 - 0,6 μm. velikost i tvar se během vývoje jedince mění, v mládí jsou buňky tyčinkovité, ve stáří se pak zkracují až do tvaru kulovitého. Jednotlivé buňky se často sdružují po dvou nebo do krátkých řetězků. Za aerobních podmínek mohou narůstat až do dlouhých vláken, která se větví. Jsou grampozitivní, anaerobní a rozmnožují se dělením. Optimální teplota jejich růstu je 30 °C. z dusičnanů netvoří dusitany. Zkvašují cukry na kyselinu propionovou, octovou, CO₂ a H₂O, ale nezkvašuje laktózu. Tvoří katalázu a netvoří indol. Dobře se kultivují na živných půdách obsahující cukry a mléčnou kyselinu. V tekuté půdě tvoří zákal se šedokrémovým sedimentem. *Pb. freudenreichii* se vyskytuje v mléčných výrobcích a má hlavní podíl na tvorbě ok v tvrdých sýrech. Oka vznikají tlakem CO₂ v mladém, pružném sýrovém těstě. Podobné vlastnosti má také *Pb. shermanii*.

Propionibacterium freudenreichii subsp. schermanii. tvoří okrouhlé buňky velikosti 0,5 – 0,6 μm, sdružené většinou v mapovité shluky. V tekutém kultivačním médiu tvoří šedobílý zákal a sediment. Od předchozího se liší schopností zkvašovat laktózu (obr. viz CD).

Rozlišení rodu *Propionibacteriaceae*

Jsou aerobní až aerotolerantní. Produkují propionovou, octovou kyselinu, menší množství isovalerové, jantarové, mravenčí a mléčné kyseliny:

Rod *Propionibacterium*

jsou nepohyblivé až pohyblivé. Jsou obligátně anaerobní. Zahrnují typy tvořící i netvořící kyseliny. Druhy produkující kyseliny tvoří směsi

organických kyselin, často obsahující máselnou, octovou, mravenčí, mléčnou kyselinu nebo jiné monokarboxylové kyseliny:

Id. mléčků: "System of the Milk Bacteria" of the year 1975

1	Esterní hydrolyza
1.1	Částečné hydrolyza
1.1.1	Tvoří kyseliny z mléčků
1.1.1.1	Redukují dusičnany na dusičnany
1.1.1.1.1	Tvoří kyseliny z mléčků
	<i>P. freudenreichii</i> - subspp. <i>freudenreichii</i>
1.1.1.1.2	Tvoří kyseliny z mléčků
	<i>P. freudenreichii</i> subspp. <i>probitans</i>
1.1.1.2	Redukují dusičnany na dusičnany
1.1.1.2.1	Tvoří z trihalogeny kyseliny
	<i>P. freudenreichii</i> subspp. <i>virginiae</i>
1.1.1.2.2	Tvoří z trihalogeny kyseliny
	<i>P. thoenii</i>
1.1.2	Tvoří kyseliny z mléčků
1.1.2.1	Dusičnany redukuje na dusičnany
	<i>P. acidipropionis</i>
1.1.2.2	Dusičnany redukuje
	<i>P. jensenii</i>
1.2	Hydrolyza: celková
	<i>P. acidum</i>
2	Esterní nehydrolyza
	<i>P. alpesis</i> , <i>P. freudenreichii</i> , <i>P. longipolium</i>

V mikrobiologickém průmyslu se používá z rodu *Propionibacterium* pouze druh *P. freudenreichii* subspp. *freudenreichii* a *P. freudenreichii* subspp. *virginiae*.

Roď *Propionibacterium* nemá v mikrobiologickém průmyslu význam.

Klíč k rozlišení druhů rodu *Propionibacterium*

Identifikační systém (podle Bergerova klíče vydaného v roce 1975) (19):

1.	Eskulin hydrolizují.
1.1	Částečně hydrolyzují želatinu.
1.1.1	Tvoří kyselinu z mannitu.
1.1.1.1	Redukují dusičnany na dusitany.
1.1.1.1.1	Netvoří kyselinu z laktózy: <i>P.freudenreichii subsp.freudenreichii</i>
1.1.1.1.2	Tvoří kyselinu z laktózy: <i>P.freudenreichii subsp.globosum</i>
1.1.1.2	Neredukují dusičnany na dusitany.
1.1.1.2.1	Netvoří z trehalozy kyseliny: <i>P.freudenreichii subsp.shermanii</i>
1.1.1.2.2	Tvoří z trehalozy kyseliny: <i>P.thoenii</i>
1.1.2	Tvoří kyseliny z mannitu.
1.1.2.1	Dusičnany redukují na dusitany: <i>P.acidipropionici</i>
1.1.2.2	Dusičnany neredukují: <i>P.jensenii</i>
1.2	Hydrolyzují želatinu: <i>P.avidum</i>
2.	Eskulin nehydrolyzují: <i>P.acnes P.granulosum P.lymphophilum</i>

V mlékárenském průmyslu se používá z rodu *Propionibacterium* pouze druh *P.freudenreichii subsp.freudenreichii* a *P.freudenreichii subsp.shermanii*.

Rod *Eubacterium* nemá v mlékárenském průmyslu uplatnění.

2.4.2. Identifikační znaky bakteriálních kultur

Rozlišovací znaky vybraných druhů rodu *Lactobacillus* (19)

Druh <i>Lactobacillus</i>	Velikost buněk (μm)	Minimální teplota ($^{\circ}\text{C}$)	Optimální teplota ($^{\circ}\text{C}$)	Maximální teplota ($^{\circ}\text{C}$)	Mléčná kyselina
1. <i>Lbc.lactis</i>	1,2x6,0- 10,0	18-22	40	50-53	D(-)
2. <i>Lbc.helveticus</i>	0,7- 0,9x2,0- 6,0	20-25	40-42	50-53	DL
3. <i>Lbc.acidophilus</i>	0,6- 0,9x1,5- 6,0	20-22	37	43-48	DL
4. <i>Lbc.bulgaricus</i>	0,3- 1,2x4,0- 8,0	22	45-50	62	D(-)
5. <i>Lbc.delbrückii</i>	0,5- 0,8x2,0- 9,0	18-25	40-45	50-55	D(-)
6. <i>Lbc.casei</i>	0,7- 1,0x2,0- 10,0	10	30-32	37-40	L(+)
7. <i>Lbc.plantarum</i>	0,7- 1,0x3,0- 8,0	10	30	37-40	DL
8. <i>Lbc.leichmannii</i>	0,6x2,0- 4,0	10	35-37	40-46	D(-)
9. <i>Lbc.brevis</i>	0,7- 1,0x2,0- 4,0	15	30	38	DL
10. <i>Lbc.fermentum</i>	0,5- 1,0x3,0- 15,0	15-18	33-42	48-50	DLL

Tvorba kyselin (19)

Druh <i>Lactobacillus</i> *		1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.
Tvorba kyselin z	Glukózy	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Galaktózy	+	+	+	+	+	+	+	/	+	+
	Laktózy	+	+	+	+	-	+	+	-	(+)	+
	Maltózy	+	+	+	(/)	+	+	+	+	+	+
	Arabinózy	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
	Sacharózy	+	-	+	(/)	+	(+)	+	+	(+)	+
	Fruktózy	+	+	+	(-)	+	+	+	+	+	+
	Rafinózy	+	n	(/)	n	-	+	+	-	(+)	+
	Trehalózy	+	+	(/)	/	-	(+)	n	+	n	-
	Inulínu	-	-	n	-	-	(+)	-	-	-	-
	Manitu	-	n	-	-	-	+	/	/	-	-
	Sorbitu	-	n	-	-	-	+	/	n	-	-
	Salicinu	+	/	n	-	/	+	n	n	-	-
	Xylózy	/	-	-	-	-	-	/	n	+	(+)
	Glycerolu	-	n	-	-	n	n	/	n	-	n
	Manózy	+	+	+	+	+	+	+	n	(+)	+
	Rhamnózy	-	-	-	-	-	+	-	n	-	-
	Ribózy	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+
eskulinu	-	-	+	-	n	+	+	n	+	-	

+ pozitivní reakce, - negativní reakce, / slabá reakce, () možnost výjimky, n reakce neznámá.

* čísla označují druhy ve stejném pořadí jako v předchozí tabulce

Rozlišovací znaky vybraných druhů rodu *Streptococcus* (19)

Druh <i>Streptococcus</i>	Velikost buněk (μm)	Sérologická skupina Lancenfiel.	Růst při 10°C	Růst při 40°C	Růst při 45°C	Záhřev °C/min
1. <i>Str. thermophilus</i>	0,7-0,9	N	-	+	+	65/30
2. <i>Str. lactis</i>	0,5-1,0	N	+	+	-	60/30
3. <i>Str. cremoris</i>	0,6-1,0	N	+	-	-	30/30
4. <i>Str. faecalis</i>	0,5-1,0	D	+	+	+	63/30
5. <i>Str. faecium (durans)</i>	0,5-1,0	D	+	+	+	63/30
6. <i>Str. avium</i>	0,5-1,0	D,Q	+	+	+	63/30
7. <i>Str. uberis</i>	0,5-1,0	n	+	+	+	60/30

Rozlišovací znaky vybraných druhů rodu *Streptococcus* - pokračování

Druh <i>Streptococcus</i>	Růst 2% NaCl	Růst 4% NaCl	Růst 6,5% NaCl	Růst % methyl.modři	Růst při pH 9,6	Růst při 40% žluči
1. <i>Str.thermophilus</i>	-	-	-	0,01	-	+
2. <i>Str.lactis</i>	+	+	-	0,30	-	+
3. <i>Str.cremoris</i>	+	-	-	0,10	-	+
4. <i>Str.faecalis</i>	+	+	+	0,10	+	+
5. <i>Str.faecium</i> (<i>durans</i>)	+	+	+	0,10	+	+
6. <i>Str.avium</i>	+	+	+	0,00	+	n
7. <i>Str.uberis</i>	+	+	-	0,00	-	-

n reakce neznámá

Tvorba kyselin (19)

Druh <i>Streptococcus</i> *	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.
Tvorba kyselin	Glukózy	+	+	+	+	+	+
	Galaktózy	n	n	n	n	n	+
	Laktózy	+	+	+	+	+	+
	Maltózy	(-)	+	/	+	+	+
	Arabinózy	(-)	/	-	(+)	-	+
	Sacharózy	+	/	/	(+)	(-)	+
	Fruktózy	+	n	+	n	n	+
	Rafinózy	/	(-)	(+)	(+)	(-)	n
	Trehalózy	-	/	-	+	/	+
	Inulínu	-	-	-	-	-	+
	Manitu	-	/	-	+	-	+
	Sorbitu	-	-	-	(+)	-	n
	Salicinu	-	/	-	+	/	n
	Xylózy	n	/	-	n	n	+
	Glycerolu	-	/	-	(+)	-	+
	Manózy	n	-	n	n	n	n
	Rhamnózy	-	/	-	(+)	(+)	n
Eskulinu	-	/	(+)	+	+	+	

+ pozitivní reakce, - negativní reakce, / slabá reakce, () možnost výjimky, n reakce neznámá.

* čísla odpovídají druhům jako v předchozích tabulkách.

Tvorba kyselin (19)

Druh		1.	2.	3.	4.	5.	6.
Tvorba kyselin	Glukózy	-	+	+	+	+	+
	Galaktózy	+	+	+	+	+	+
	Laktózy	+	-	/	-	+	+
	Maltózy	+	n	n	-	(-)	+
	Arabinózy	+	-	+	-	(+)	n
	Sacharózy	-	n	+	-	-	+
	Fruktózy	+	n	+	+	+	+
	Rafinózy	n	(+)	n	-	-	+
	Trehalózy	-	+	+	n	-	+
	Inulínu	n	n	(+)	-	-	+
	Manitu	n	n	+	-	-	n
	Sorbitu	n	n	(+)	n	-	n
	Salicinu	-	-	-	n	-	+
	Xylózy	+	-	+	-	-	n
	Glycerolu	n	n	(+)	n	n	n
	Manózy	+	n	+	+	+	n
	Rhamnózy	n	n	(+)	-	-	n
Eskulinu	-	-	+	+	+	n	

+ pozitivní reakce, - negativní reakce, / slabá reakce, () možnost výjimky, n reakce neznámá.

1. *Leuconostoc cremoris*
2. *Leuconostoc dextranicum*
3. *Leuconostoc mesenteroides*
4. *Propionibacterium freudereichii*
5. *Propionibacterium freud.subsp.shermani*
6. *Bifidobacterium bifidum*

2.4.3. Kvasinky

Z celého obsáhlého systematického celku hub se v mlékárenské praxi používají kvasinky a plísně třídy *Endomycetes* a třídy *Deuteromycetes* ze skupiny *Eucomycota*.

Zařazení kvasinek používaných při výrobě čistých mlékařských kultur:

Třída *Endomycetes*

Řád *Endomycetales*

Čeleď *Saccharomycoideae*

Podčeleď *Saccharomycoideae*

Rod *Kluyveromyces*

Druh Kluyveromyces fragilis
Kluyveromyces lactis

Třída Deuteromycetes

Řád Deuteromycetales

Čeleď Cryptococcaceae

Podčeleď Cryptococcoideae

Rod Cryptococcus

Druh Cryptococcus laurentii

Rod Torulopsis

Druh Torulopsis candida

Torulopsis lactis-condensi

Rod Candida

Druh Candida utilis

Candida pseudotropicalis

Candida kefyri

Podčeleď Rhodotoruloideae

Rod Rhodotorula

Druh Rhodotorula glutinis

Candida kefyri je oválná kvasinka velikosti 3 - 6 μm , někdy 5 - 8 x 11 - 15 μm . kolonie na sladidlovém agaru jsou drobné, smetanové, hladké. Kolonie na syrovátkovém agaru jsou kožovité, smetanově bílé. Asimilují sacharózu, laktózu, dextrin, levulózu a manózu. Asparagin, síran amonný a pepton využívají jako zdroj dusíku. Z laktózy tvoří ethanol a oxid uhličitý. V mladině tvoří po 3 dnech sediment (obr. viz CD).

Cryptococcus laurentii (*Torulopsis flavescens*) tvoří oválné až okrouhlé buňky o rozměrech 2 – 5,1 x 1,2 – 2,5 μm , množí se pučením, nesporulují. Na mladinové želatině tvoří za 60 dnů při teplotě 15°C obrovité kolonie. Kolonie je matná, smetanově zbarvená, má nepravidelný tvar. Okraje mírně laločnaté a nízké, kolonie uprostřed zdvižená. Kvasinka silně asimiluje galaktózu a maltózu. Slaběji asimiluje glukózu, sorbózu, laktózu a sacharózu. Arabinózu a levulózu nemění. Z dusíkatých zdrojů asimiluje asparagin, pepton a síran amonný. Dusičnan amonný a močovinu nemění. Proteolytická a lipolytická aktivita je nepatrná. Optimální pH pro růst kvasinky je 6,5. Roste však dobře i v rozmezí 5,5 až 7,5. Záhřev kultury na teplotu 70°C po dobu 1 minuty kulturu usmrcuje.

Kluyveromyces fragilis kvasinka oválná až protáhlá - velikosti 6,0 - 10,0 μm x 2,5 - 5,5 μm často seskupená v řetízky. Při teplotě 25°C tvoří za 24 hodin spory, při teplotě 30°C tvoří spory za 3 dny. Optimální teplota je 30°C. Asimiluje galaktózu, sacharózu, laktózu a rafinózu za tvorby

vyššího procenta ethanolu. Na sladínovém agaru tvoří na povrchu kožovité šedožluté kolonie.

Kluyveromyces lactis má oválný tvar buňky o velikosti 2,0 - 5,2 μm x 1,7 - 4,0 μm . struktura buňky je zpočátku hyalinní, později se objevuje středně velká vakuola. Obrovitá kolonie je okrouhlá, lesklá, smetanově bílé barvy, s nepatrným nádechem barvy po agaru, vysoká, s rovnými okraji a slizovitou konzistencí. Střed kolonií je nepatrně zdvižený. Růst po vpichu do sloupce sladínového agaru je zpočátku hřebíkovitý, později se tvoří plynové bublinky a agar se trhá. V sladínové želatině se po 11 dnech projevuje ztekucení. Růst ve sladíně je dosti pomalý, na povrchu se tvoří bílý prstenec, v tekutině se tvoří střední zákal a křkatý sediment. Asimiluje sacharózu, laktózu, glukózu, maltózu a galaktózu. Jako zdroj dusíku slouží pepton, asparagin, močovina, síran amonný a dusičnan draselný. Kvasinky mají slabou proteolytickou aktivitu, rozkládají mléčnou bílkovinu až na aminokyseliny. Lipolytická aktivita je nepatrná. Tvorbou vitaminů B doplňují symbiózu bakterií mléčného kvašení a ušlechtilé plísně *Penicillium roqueforti*. Roste dobře v rozmezí pH 5,5 - 7,5. Optimum je pH 6,5 při teplotě 25 - 28°C. Může přežít i teploty okolo 10°C. Zahřátí na 70°C po dobu 1 minuty kvasinky usmrcuje. Kmen roste i při 4% NaCl v prostředí, vyšší koncentrace soli růst zpomalují, ale ani koncentrace okolo 9% růst zcela nezastaví (obr. viz CD).

Torulopsis candida tvoří oválné buňky velikosti 2,0 - 4,2 μm x 1,0 - 2,2 μm . Množí se pučením, nesporeluje. Vyskytují se jednotlivě nebo po dvou buňkách. Na mladínové želatině tvoří za 60 dnů při teplotě 15°C obrovité kolonie. Kolonie má smetanovou barvu, je téměř pravidelná, kruhovitá, vysoká, má rovné okraje. Konzistence je suchá, kožovitá. Růst v mladíně je pomalý, na povrchu se tvoří slabý, smetanově bílý prstenec. V prostředí tvoří slabý zákal, hrubý a křkatý sediment. Proteolytická a lipolytická aktivita je nepatrná. Asimiluje silně maltózu a galaktózu. Slabě asimiluje glukózu a laktózu. Nemění sacharózu, arabinózu, levulózu a sorbózu. Jako zdroj dusíku asimiluje pepton, slabě asparagin a síran amonný. Močovinu a dusičnan draselný nemění. Záhřev kultury na 70°C po dobu 1min.kulturu usmrcuje. Optimální pH pro růst kmene je 6,5. Roste však i v rozmezí 5,5 - 7,5 (obr. viz CD).

Torulopsis lactis tvoří kulaté až oválné buňky o velikosti 4,0 - 7,5 μm x 3,0 - 5,0 μm . buňky zůstávají při pučení v malých skupinkách. Na syrovátkovém agaru tvoří šedobílé lesklé kolonie. Optimální teplota růstu je 33 - 34°C. Přežívají záhřev na teplotu 50°C po dobu 30minut. Z laktózy tvoří ethanol a oxid uhličitý (obr. viz CD).

2.4.4. Plísně

Zařazení plísní používaných při výrobě čistých mlékařských kultur:

Třída *Deuteromycetes*

Řád *Moniliales*

Čeleď *Moniliaceae*

Rod *Geotrichum*

Druh *Geotrichum candidum*

Rod *Scopulariopsis*

Druh *Scopulariopsis brevicaulis*

Rod *Penicillium*

Sekce *Biverticillata - Asymmetrica*

Subsekce *Divaricata*

Série *Penicillium canescens (P.nalgiovensis)*

Subsekce *Velutina*

Série *Penicillium roquefortii (P.roquefortii)*

Subsekce *Lanata*

Penicillium camamberti

Penicillium caseicolum

Subsekce *Fasciculata*

Penicillium viridicatum

Geotrichum candidum tato plíseň je charakteristická tím, že se množí rozpadem hyf na oidie. Má dvojmo až trojmo rozvětvená vlákna, která se postupně od konců zaškrucují a oddělují ve formě oidii, především postranní vlákna. Oidie mají téměř obdélníkový tvar a jejich velikost je ovlivněna významně prostředím a jinými činiteli. Nejčastěji jsou 3 – 7 μm široké a 8 – 12 μm dlouhé. Jejich plazma bývá jemně zrnitá s vakuolami. Enzymově je velmi aktivní, dovede rozkládat sacharidy, tuky i bílkoviny. Optimální teplota pro růst je 28°C, ale její teplotní rozmezí je značně veliké. Vyznačuje se oxidační činností, stravuje org. kyseliny i etanol apod. Roste dobře na půdách s nižším pH i na půdách s pH asi 7. Na tuhých půdách vytváří bílé, okrouhlé, plst'ovité kolonie paprsčitě se rozbíhající od středu. Na sladidě tvoří žlutobílou, nepravidelně vrásčitou mázdru p. Na mléce roste v podobě chloupkaté mázdry, která se později mění na žlutavý sliz. Tato plíseň je nejčastějším zástupcem tohoto rodu. Vyskytuje se především v mléce a mléčných výrobcích - mléčná plíseň. Kontaminuje také často potravinářské suroviny, polotovary i finální výrobky. V prostředí chudém na bílkoviny roste rychle a 80% její hmoty tvoří hodnotná stravitelná bílkovina. Toho se využívá pro produkci bílkovinných látek ze syrovátky. Některé kmeny se také využívají k biosyntéze tuků, k výrobě krmného droždí, k biologickému čištění odpadních vod potravinářských závodů apod. (obr. viz CD).

Penicillium camamberti konidiofory této plísně jsou různě dlouhé, průměrně 200 - 400 μm , široké 2,5 - 3,5 μm . Větve dosahují délky 12 - 18 μm , šířky 2,2 - 3,4 μm . Metuly bývají po dvou až třech ve skupinách, jsou velké 9 - 14 μm x 2,2 - 2,8 μm . Konidie mají tvar kulovitý až elipsovitý, velikosti 3,5 - 5 μm . Plíseň se rozmnožuje konidiami. Vyznačuje se silnou proteolytickou schopností. Je také lipolyticky aktivní a vytváří žampionovou vůni a chuť. Na Czapekově-Doxovově agaru dosahují kolonie za 10 dnů při teplotě 20 - 25 °C velikosti v průměru 2 - 2,5 cm. Kolonie jsou vatovitého vzhledu, uprostřed zdvižené, 2 - 3 mm vysoké, měkké, čistě bílé se smetanovým odstínem a velmi mírně zvrásněné. Spodní část kolonií je bělavá až žlutobílá, paprscitě zvlněná. Tato plíseň je nezbytná pro výrobu sýrů s plísní na povrchu, na nichž tvoří bílé, pravidelné, nízké a vyrovnané porosty.

Penicillium caseicolum kolonie na sladinovém agaru jsou po sedmi dnech kultivace při pokojové teplotě veliké 2,0 - 2,5 cm. Jsou bílé nebo nepatrně nažloutlé, někdy lehce narůžovělé. Mají vatovitý vzhled, uprostřed jsou zdvižené, asi 2 - 3 mm vysoké a mírně vrásčité. Spodní část kolonie je bělavá až nažloutlá, paprscitě zvlněná. Konidiofory vyrůstající z mycélia jsou 400 - 450 μm dlouhé, vyrůstají-li ze substrátu, nebo 50 - 100 μm dlouhé, vyrůstají-li ze vzdušných hyf. Bývají 3 - 4 μm silné. Penicillia jsou asymetrická, nepravidelně větvená, 60 - 85 μm dlouhá. Mají po dvou až třech metulách a sterigmatech. Větve bývají 15 - 30 μm x 3 - 4 μm velké, metuly 8 - 12 μm x 2,5 - 3,0 μm , sterigmata 10 - 13 μm x 3,3 - 4,5 μm . Kultura má dobrou proteolytickou a lipolytickou aktivitu. Vůně je žampionová, později připomíná bramborové slupky (obr. viz CD).

Penicillium nalgiovensis kultura tvoří na Czapekově-Doxonově agaru za 12 - 14 dní kultivace při pokojové teplotě kolonie o průměru 3,0 - 3,5 cm. Kolonie jsou zpočátku bílé, později žlutozelené. Na okraji tvoří kolonie bezbarvou mycelární zónu širokou 3 - 4 mm. Spodní strana kolonie bývá oranžovočervená, konidiofory jsou až 500 μm dlouhé. Větve jsou 8 - 12 μm x 2 - 3 μm velké. Sterigmata dosahují velikosti 8 - 10 μm x 2 μm . Konidie jsou kulaté, v průměru 3,2 - 3,6 μm . Jsou hladké nebo mírně nepravidelné. Kolonie na sladinovém agaru rostou rychleji a dosahují za 10 - 12 dnů v průměru 3,5 - 4,0 cm. Tvoří typický porost na nalžovském sýru, odkud byla plíseň izolována.

Penicillium roqueforti z mycélia vyrůstají konidiofory, které jsou dlouhé 100 - 200 μm a široké 4 - 6 μm . Metuly jsou velké 12 - 15 μm x 3 - 4,5 μm , většinou s drsnými stěnami. Sterigmata jsou velká 8 - 12 μm x 3 -

3,5 μm . konidie jsou kulaté, hladkostěnné, někdy i elipsovité, velikosti 3,5 - 5 μm . Plíseň se rozmnožuje konidiami. Vyznačuje se proteolytickou a lipolytickou činností. Nejlépe se jí daří v prostředí obsahujícím 1 - 2% kyseliny mléčné. Pro její růst je optimální relativní vlhkost atmosféry 95 - 100%, při vlhkosti 70% roste velmi pomalu. Optimální teplota jejího růstu je 15 - 23 °C. vegetuje i při nízkých teplotách, při 0°C však růst úplně zastavuje, kdežto při 5 - 7°C v krátké době vyroste a sporuluje. Kyslík v atmosféře je pro růst plísně důležitým činidlem, i když je tato plíseň na kyslík málo náročná. Roste v prostředí obsahujícím až 75% CO₂. Plynové dutinky v sýru obsahují 21 - 40% CO₂, a proto ostatní nežádoucí plísně rostou v sýru obtížně. Snese až 12% NaCl v prostředí. Asimiluje mléčnou kyselinu a oxidačními pochody ji převádí na CO₂ a H₂O. lipolytickou aktivitou činností rozkládá mléčný tuk na glycerol a mastné kyseliny, které jsou základními složkami při tvorbě ketonických aromatických látek. Proteolytickou činností rozkládají mléčnou bílkovinu přes albuminózy a peptony až na aminokyseliny a deaminací pak vzniká amoniak. Kolonie na Czapkově-Doxonově agaru dosahují po 10 - 12 dnech při teplotě 20°C velikosti 5 - 6 cm v průměru. jsou sametové s hladkým povrchem, barvy modravě zelené s nerovným, paprskovitým bílým okrajem pavučinkovitého až závojovitého vzhledu. Spodní část kolonie je slabě zelenavá nebo modravě zelenavá, dosti měnivé barvy. Kolonie na sladinovém agaru jsou téměř stejné, avšak jsou větší, dorůstají průměru 8 - 10 cm za 8 - 10 dnů při teplotě 20°C. spodek kolonie stárím černá. Tato plíseň je nezbytná pro zrání sýrů s plísní v těstě. Je také původcem typické chuti i vůně těchto sýrů (obr. viz CD).

Penicillium viridicatum plíseň patří podle rozvětvení a souměrnosti konidioforů do skupiny *Asymetrica*. Konidiofory jsou dlouhé až 480 μm a široké 3,2 - 3,8 μm . Penicilly jsou velké 60 - 70 μm x 4 μm i větší. Jejich tvar není vždy pravidelný. Někdy jsou uspořádány přeslenovitě, jindy zase v různých stupních přikloněny asymetricky k hlavní ose. Konidie jsou ve stádiu tvorby oválné, později kulovité, velké 3,1 - 4,3 μm a jsou uspořádány v rovnoběžné řetízky k sobě přitisknuté. Stěny konidioforů, penicillů i metul jsou zdrsňlé. *P. viridicatum* se vyznačuje velkou enzymatickou aktivitou. Má značnou lipolytickou a proteolytickou schopnost. Parakasein rozkládá přes albumosy a peptony až na aminokyseliny, amidy a amoniak. Na odstředěném mléce se za 8 dnů vytvoří bílá kožovitá vrstva se žlutým spodkem. Na mléce vyrůstá žlutozelená fruktifikace. Kolonie na Czapkově-Doxonově agaru dosahují v průměru 2,5 - 3,5 cm za 12 - 14 dnů při teplotě 22 - 25 °C. barva kolonií je v mládí žlutozelená. Spodní strana kolonií je nejdříve bezbarvá až žlutavá, u starších kolonií hnědá. Je to sýrašská povrchová plíseň, významní především tím, že rychlou fruktifikací tvoří ochrannou

vrstvu sýra, zabraňuje růstu nežádoucí mikroflóry a udržuje do určité míry jeho žádoucí vlhkost. Tato plíseň je nejvíce zastoupena v holandských sýrech.

Scopulariopsis brevicaulis kultura tvoří na Czapekově-Doxonově agaru při kultivaci 18 - 22 °C za 5 - 7 dní šedobílé kolonie, později žlutavě hnědé až čokoládově zbarvené. Na sladinovém agaru za stejných kultivačních podmínek tvoří téměř morfologicky stejné kolonie. Sterigmata jsou velká 20 μm x 3 - 4 μm. Konidie jsou kulaté až oválné a vyznačují se tím, že jsou zpočátku hladké, později drsné až ostnaté. Jsou poměrně velké, dosahují 6,5 - 7,0 μm x 7,5 - 9,0 μm. Kultura ztekucuje želatinu a štěpí mléčnou bílkovinu přes albuminosy a peptony až na aminokyseliny a amoniak. Plíseň rychle roste v neutrálním i alkalickém prostředí, kyselé prostředí růst zpomaluje.

3. Praktická část

Pro ověření předpokladu, že většina zakoupených jogurtů obsahuje životaschopné bakterie a zároveň, že jejich vitalita je úměrná senzorické kvalitě výrobku, jsem si vybrala kultivační zkoušku. Ta by měla být také hlavním obsahem připravovaného laboratorního cvičení. Zjistila jsem tedy zároveň, zda je téma didakticky použitelné. Zda výstupy z praktických cvičení mohou při pozitivním výsledku být dostatečně průkazné.

Pro kultivační zkoušku jsem zvolila tři kultivační média. Jedná se vždy o pevné půdy. Jako základní byl použit krevní agar, jako selektivně diagnostické potom MRS Agar a China Blue Lactose Agar. Použila jsem připravené kultivační půdy firmy Oxoid na jednorázových Petriho miskách. Zpracování materiálu a kultivaci jsem provedla v Laboratoři klinické mikrobiologie NsP v České Lípě. Zde byly také zhotoveny makroskopické snímky po kultivaci. Kultivováno bylo při teplotě 37°C za přístupu vzduchu 48 hodin. Zároveň jsem zpracovala vzorky, které jsem uložila do tmavé krabice při pokojové teplotě (22-24 °C). Tato zkouška sloužila pouze ke kontrole, zda je možný nějaký nárůst kolonií i při méně výhodné teplotě. Výsledky viz souborná tabulka.

3.1. Vzorky

Vzorek č.	Obchodní název výrobku	Výrobce / distributor	Datum spotřeby	Označení výrobku	Další údaje na obalu
1.	Jogurt selský	Hollandia	26.5.04	CZ 709 41	
2.	Vitalinea 0,1% tuku	Danone	11.6.04	CZ 01 EHS	
3.	Silueta light	OLMA	08.06.04	CZ 08	
4.	Yoplait Originál		29.5.04	CZ 6504	
5.	Revital activ	OLMA	21.5.04	CZ 08	
6.	Klasik	OLMA	2.6.04	L 02	
7.	Vian 0,1%tuku	Mlékárna Kunín	4.6.04	L 026	
8.	Choceňský smetanový jogurt	Choceňská mlékárna	28.5.04	CZ 717 EHS	
9.	Kristián	Friesland ČR	22.5.04	L1/00	
10.	Mr.Classic	Meggle	21.5.04	SK 017 EHS	

3.2. Senzorické vlastnosti

Vzorek č.	Barva	Konzistence	Vůně	Chuť	Kyselost
1.	Bílá	Hrudkovitá až hladká	Jogurtová	Jogurtová	Mírně kyselý
2.	Bílá	Rídká až tekutá	Jogurtová	Jogurtová	Málo kyselý
3.	Mírně nažloutlá	Ridší hladká	Jogurtová	Jogurtová	Nasládlý
4.	Bílá	Krémovitá	Jogurtová	Jogurtová	Přiměřený
5.	Bílá	Krémovitá	Jogurtová	Jogurtová	Přiměřený
6.	Bílá	Krémovitá	Jogurtová	Jogurtová	Mírně kyselý
7.	Bílá	Ridší	Jogurtová	Jogurtová	Mírně překysaný
8.	Bílá	Smetanová krémovitá	Jogurtová	Jogurtová	Přiměřený
9.	Bílá	Krémovitá	Jogurtová	Jogurtová	Mírně kyselý
10.	Mírně nažloutlá	Ridší	Jogurtová	Jogurtová	Sladký

3.3. Výsledky

Vzorek č.: 1.

Popis výrobku: Jogurt selský

Složení: mléko, mléčná bílkovina, jogurtová kultura s přídavkem probiotické kultury *Bifidobacterium* a *Lactobacillus acidophilus*. Jogurt bílý neobsahuje stabilizátory konzistence. Balení 200g

Výživové hodnoty ve 100g výrobku: energie 280 kJ, 67 kcal, bílkoviny 3,4 g, sacharidy 3,5 g, tuk 4,0 g, vápník 125 mg - t.j. 15,5% doporučené denní dávky.

Výsledek kultivační zkoušky (obr. viz CD):

Krevní agar: sterilní

Mikroskopie: neprovedena

MRS agar: do 100 kolonií, nepravidelných, bílých, plochých, s vláknitým růstem, matné. Několik kolonií nepravidelného tvaru, drobné, růst do půdy, nažloutlé barvy.

Mikroskopie: vidíme dlouhé tyčinky, gram pozitivní až gram labilní. V některých místech můžeme nalézt náznak větvení. Jinak se vyskytují převážně jednotlivě nebo v náhodných shlucích.

China Blue Lactose Agar: 1 kolonie kompaktní, plochá, jasně žlutá, s prosvětlením 5 mm. 1 kolonie bílá se světle modrým středem, velikosti 4 mm, bez prosvětlení. Do 100 drobných kolonií, modré barvy, okrouhlé, velikosti do 0,5 mm.

Mikroskopie: vidíme středně velké koky, jednoznačně gram pozitivní. Vyskytují se ve dvojicích a v krátkých řetízích, náhodně také v nepravidelných shlucích.

Určené mikroorganismy: *Lactobacillus acidophilus* a *Streptococcus lactis*

Vzorek č.: 2.

Popis výrobku: Vitalinea 0,1% tuku

Gramáž: 150 g, sacharidy ve 100g: 6,1 g, využitelná energie ve 100g: 184 kJ, bílkoviny ve 100g: 4,5 g, vápník ve 100g: 155 mg.

Výsledek kultivační zkoušky (obr. viz CD):

Krevní agar: sterilní

Mikroskopie: neprovedena

MRS agar: do 100 kolonií, drobné, světlé, okrouhlé, s nepravidelným okrajem, velikosti do 1 mm, barva bělavá až nažloutlá, kolonie ploché, lesklé.

Mikroskopie: vidíme dlouhé tyčinky, gram pozitivní až gram labilní. V některých místech můžeme nalézt náznak větvení. Jinak se vyskytují převážně jednotlivě nebo v náhodných shlucích.

China Blue Lactose Agar: 1 kolonie jasně žlutá, velikosti do 2 mm. 1 kolonie bílá, nepravidelná, jasně modrá přechází do bílé, okraje jsou světlé. Do 10 kolonií, drobné okrouhlé, bez prosvětlení, velikosti do 0,5 mm.

Mikroskopie: vidíme menší gram pozitivní koky, sdružené do dvojic a čtveřic (diplo a tertakoky).

Určené mikroorganismy: *Lactobacillus lactis* a *Streptococcus cremoris*

Vzorek č.: 3.

Popis výrobku: Light jogurt SILUETA - 0.1% tuku je vyráběn z kvalitního mléka za přispění speciálních živých jogurtových kultur, které pozitivně působí na lidský organismus, především na zažívání. Cukr je v nich nahrazen aspartamem a acesulfamem, neobsahují žádný tuk. Jsou vhodné pro udržování štíhlé linie a pro diabetiky. Nejsou vhodné pro osoby trpící fenylketonurií. Trvanlivost: 20 dní Energie: 195 kJ/ 47 kcal

Výsledek kultivační zkoušky (obr. viz CD):

Krevní agar: 17 kolonií, narůžovělé, okrouhlé, 2 mm velké, vypouklé, bez hemolýzy.

Mikroskopie: vidíme středně dlouhé silnější gram pozitivní tyčinky, vyskytují se převážně jednotlivě. Dále vidíme středně velké gram pozitivní až gram labilní koky nejčastěji sdružené do streptokoků.

MRS agar: 2 kolonie okrouhlé, vypouklé, hladké, lesklé, bělavé až dožluta, velikosti 2-4 mm. Do 100 kolonií velikosti 2-4 mm, okrouhlé, směrem ke krajům s vláknitým růstem, ploché a matné. Do 100 kolonií, drobné, pravidelné, lesklé, okrouhlé, velikosti 0,2 mm.

Mikroskopie: vidíme směs tří druhů bakterií. Jednak nalezneme středně velké gram pozitivní, ale především gram labilní tyčinkovité bakterie tvořící až vlákna. Dále pak větší gram pozitivní koky tvořící dvojce, kratší řetízky až shluky a menší gram pozitivní koky s prosvětleným středem vyskytující se hlavně ve dvojicích, které pak tvoří menší shluky nebo řetízky.

China Blue Lactose Agar: 1 kolonie velikosti do 5 mm, šedá, okrouhlá, s prosvětlením, plochá. Do 100 kolonií, velikosti do 0,5mm, modré barvy, okrouhlé. Do 100 kolonií, velikosti pod 0,5 mm, světle modré barvy, lesklé.

Mikroskopie: v preparátu je zastižen pouze jeden druh koků, ty jsou středně velké, gramlabilní a tvoří dvojice až krátké řetízky.

Určené mikroorganismy: *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Streptococcus lactis*.

Vzorek č.: 4.

Popis výrobku: Yoplait Originál – bílý jogurt se sníženým obsahem tuku. Složení: mléko, sušené mléko, jogurtová kultura a bifidokultura. Obsah tuku 2,5%. Sušina nejméně 15%. Průměrné výživové hodnoty ve 100g: energie 283kJ (67kcal), bílkoviny 5,0g, sacharidy 6,0g, tuk 2,6g. Skladujte od 2°C do 8°C. S aktivním Bifidem, zvyšuje odolnost organismu, přispívá k vnitřní rovnováze a zdraví, jeho účinek zvyšují živé jogurtové kultury.

Výsledek kultivační zkoušky (obr. viz CD):

Krevní agar: sterilní

Mikroskopie: neprovedena

MRS agar: do 100 kolonií, drobné s nepravidelným okrajem, ploché, světlé, bělavé až šedožluté, velikosti do 1mm, výrazně rostou v půdě (v defektu vzniklém při očkování).

Mikroskopie: vidíme středně velké gram pozitivní až gram labilní tyčinky, vyskytují se v řetízcích až s tendencí tvořit vlákna, na některých místech je možné pozorovat náznak větvení.

China Blue Lactose Agar: 1 kolonie jasně žlutá, okrouhlá, s prosvětlením a vypouklým středem. Do 100 kolonií, velikosti do 0,5mm, modré barvy, okrouhlé. Do 100 kolonií, velikosti pod 0,5 mm, světle modré barvy, lesklé.

Mikroskopie: v preparátu jsou patrné příliš obarvené větší útvary na jejichž okraji jsou jehlicovité útvary. Předpokládám, že se jedná o části plísňe, která na půdě vyrostla a je pravděpodobně kontaminací.

Určené mikroorganismy: *Lactobacillus acidophilus*.

Vzorek č.: 5.

Popis výrobku: REVITAL active obsahuje rozpustnou vlákninu a probiotické kultury (*Bifidobacterium* sp., *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*), které chrání trávicí trakt organismu, snižují hladinu cholesterolu, harmonizují zažívání po léčbě antibiotiky a působí proti kvasinkovým infekcím. Rozpustná vláknina snižuje hladinu tuků a zvyšuje příjem vápníku z potravy. Trvanlivost: 20 dní Energie: 290 kJ/69 kcal.

Výsledek kultivační zkoušky (obr. viz CD):

Krevní agar: sterilní

Mikroskopie: neprovedena

MRS agar: do 100 kolonií, bílé, středně velké do 5 mm, lesklé, hladké, vypouklé, spojují se v nepravidelné útvary.

Mikroskopie: vidíme kratší grampozitivní tyčinky se zaoblenými konci, tvoří dvojice až krátké řetězky.

China Blue Lactose Agar: 1 kolonie šedožluté barvy, plochá, bez prosvětlení, kolonie má rohličkovitý tvar. Do 100 kolonií, velikosti do 0,5mm, modré barvy, okrouhlé. Do 100 kolonií, velikosti pod 0,5 mm, světle modré barvy, lesklé.

Mikroskopie: vidíme velké množství středně velkých grampozitivních koků, vyskytují se ve dvojicích a především shlucích.

Určené mikroorganismy: *Lactobacillus plantarum* a *Streptococcus thermophilus*.

Vzorek č.: 6.

Popis výrobku: KLASIK je vyráběn z velmi kvalitního čerstvého mléka pomocí speciálních živých jogurtových kultur. Neobsahuje žádné konzervační látky, ani není tepelně ošetřen za účelem prodloužení trvanlivosti. KLASIK, má nízkou kalorickou hodnotu, je proto vhodný k udržování štíhlé linie a při snižování nadváhy. Díky své čisté chuti se

hodí jak k přímé spotřebě, tak k výrobě různých salátů, pomazánek, krémů a jiných specialit. Trvanlivost: 20 dní Energie: 295 kJ/ 70 kcal

Výsledek kultivační zkoušky (obr. viz CD):

Krevní agar: sterilní

Mikroskopie: neprovedena

MRS agar: 2 kolonie, bílé, velikosti do 4mm, okrouhlé, vypouklé, lesklé. Do 100 kolonií, šedobílé, středně velké, s paprscitým růstem, okrouhlé.

Mikroskopie: vidíme především středně velké grampozitivní až gramlabilní tyčinky tvořící řetízky až vlákna. V male míře můžeme nelézt menší grampozitivní koky sdružené do dvojic až krátkých řetízků.

China Blue Lactose Agar: 1 kolonie jasně žlutá, velikosti 5 mm, s matným středem, s prosvětlením, okrouhlá, plochá. Do 100 kolonií, velikosti do 0,5mm, modré barvy, okrouhlé. Do 100 kolonií, velikosti pod 0,5 mm, světle modré barvy, lesklé.

Mikroskopie: preparát je přebarvený. Přesto zde můžeme nalézt několik typů částic. Jednak větší grampozitivní koky sdružené do dvojic a čtveřic. Ve velmi malém množství nalezneme gram pozitivní až gram labilní kratší jednotlivé tyčinky střední velikosti. V neposlední řadě na pozadí vidíme množství špatně obarvených útvarů. Mohlo by se jednat o defekt barviva. Přesto tyto útvary vykazují pravidelnost ve tvaru velikosti a tvorbě dvojic, řetízků a shluků, proto si myslím, že jde skutečně o bakterie případně jejich spory.

Určené mikroorganismy: *Lactobacillus bulgaricus* a *Streptococcus cremoris*.

Vzorek č.: 7.

Popis výrobku: Vian 0,1%tuku – odtučnělý jogurt bílý. Obsah tuku 0,1%, sušina min 11%. Složení: odtučnělé mléko, sušené odtučněné mléko, želatina, živá jogurtová kultura. Uchovávejte při teplotě 2°C až 8°C. Průměrné výživové hodnoty ve 100g (v balení): energie kJ/kcal 164/39 (246/56), bílkoviny 4,8g (7,2g), sacharidy 4,5g (6,8g), tuky 0,1g (0,15g).

Výsledek kultivační zkoušky (obr. viz CD):

Krevní agar: sterilní

Mikroskopie: neprovedena

MRS agar: do 100 kolonií, nepravidelné, světlé až do šeda, ploché, matné, s vláknitou strukturou, středně velké do 3 mm. Do 100 kolonií, velmi drobné, světlé, lesklé, okrouhlé, ploché.

Mikroskopie: nalézáme spíše gramnegativní (to může být způsobeno stářím kultury) tenké dlouhé tyčinky až vlákna.

China Blue Lactose Agar: do 100 kolonií, velmi drobné, světlé, okrouhlé. Do 100 kolonií, drobné, modré barvy, okrouhlé, lesklé, vypouklé

Mikroskopie: vidíme několik dlouhých gramnegativních vláken. Dále najdeme větší množství grampozitivních až gramlabilních středně velkých koků vytvářejících pouze někdy dvojice, jinak převážně samostatně.

Určené mikroorganismy: *Lactobacillus delbrückii* a *Sterptococcus termophilus*.

Vzorek č.: 8.

Popis výrobku: Choceňský smetanový jogurt Složení: smetana, jogurtové kultury bez konzervačních látek Spotřeba: do data uvedeného na obalu (18 dní) uchovejte při teplotě (4-8)°C.

Průměrné výživové hodnoty ve 100 g výrobku: energie 500 kJ/120 kcal, bílkoviny 3,3 g, sacharidy 3,9 g, tuk 10,3 g, vápník 160 mg (20% DDD) (*DDD doporučená denní dávka)

Výsledek kultivační zkoušky (obr. viz CD):

Krevní agar: sterilní

Mikroskopie: neprovedena

MRS agar: do 10 kolonií, velmi drobné, světlé, lesklé, okrouhlé.

Mikroskopie: vidíme male množství větších grampozitivních koků, které tvoří dvojice, kratší řetízky nebo shluky.

China Blue Lactose Agar: do 100 kolonií, velmi drobné, světlé, okrouhlé. Do 100 kolonií, drobné, modré barvy, okrouhlé, lesklé, vypouklé

Mikroskopie: v preparátu vidíme pravděpodobně fruktifikační organ plísňě. Ta je zde jednoznačně kontaminací.

Určené mikroorganismy: *Streptococcus lactis*.

Vzorek č.: 9.

Popis výrobku: Kristián – bílý jogurt se sníženým obsahem tuku. Složení: mléko, sušené mléko, škrob, želatina, živé jogurtové kultury. Nejvíce 3% tuku. Průměrné nutriční hodnoty na 100g: energie 295kJ/70kcal, bílkoviny 4,3g, sacharidy 7,3g, tuk 2,7g. Neobsahuje lepek ani konzervační látky. Uchovejte při (2-8)°C. po otevření ihned spotřebujte.

Výsledek kultivační zkoušky (obr. viz CD):

Krevní agar: do 20, velmi drobné kolonie velikosti do 1mm, šedomodré, lehce vypouklé.

Mikroskopie: vidíme velké množství menších grampozitivních koků, v některých místech můžeme najít kratší řetízky, jinak ale převládá jednotlivý výskyt buněk.

MRS agar: do 10 kolonií, velikosti do 3 mm, okrouhlé, lesklé, světlé, bílo-žluté, vypouklé. Do 100 kolonií, bílé drobné – velikosti do 1 mm, lesklé, okrouhlé, vypouklé.

Mikroskopie: v preparátu nelzáme jednak středně dlouhá gramnegativní vlákna. A dále větší množství středně velkých grampozitivních koků, které nejčastěji vytvářejí shluky, ale také dvojice nebo se vyskytují jako jednotlivé buňky.

China Blue Lactose Agar: 1 kolonie světlá nepravidelná, s plazivým růstem, s prosvětlením, vlhké konzistence. V rámci této kolonie světle modré kolonie velikosti do 0,1mm. Do 100 kolonií, drobné, modré barvy, okrouhlé, lesklé. Do 100 kolonií, velmi drobné světlejší než předchozí, okrouhlé.

Mikroskopie: vidíme menší množství středně velkých grampozitivních až gramlabilních tyčinek. Na pozadí se objevují menší špatně obarvené koky, které nevytvářejí žádné pravidelné útvary. Především zde však vidíme větší množství větších nepravidelných tmavě obarvených útvarů.

Mohlo by se jednat o spóry nebo části plísňe.

Určené mikroorganismy: *Streptococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus* a *Lactobacillus bulgaricus*.

Vzorek č.: 10.

Popis výrobku: Mr.Classic – jogurt se sníženým obsahem tuku. Složení: mléko, mléčné bílkoviny, sušené odstředěné mléko, živá jogurtová kultura. Tuk méně než 3,0%. 100g výrobku obsahuje: energie 270kJ/66kcal, bílkoviny 4,3g, sacharidy 13,3g, tuk 3,0g. Uchovejte při teplotě 4°C až 8°C. spotřebujte do data uvedeného na víčku.

Výsledek kultivační zkoušky (obr. viz CD):

Krevní agar: 2 typy kolonií. Drobné, světlé, bílé až šedé, viridace, velikosti do 1mm. 2 kolonie velikosti 4 mm, bez viridace či hemolýzy, ploché, soustředné.

Mikroskopie: vidíme velké grampozitivní koky s mírně nepravidelným okrajem tvořící krátké řetízky a menší shluky. Na pozadí jsou patrné špatně obarvené kokovité útvary pravidelně tvořící dvojice nebo samostatné buňky. Mohlo by se jednat i o spory.

MRS agar: 1 kolonie větší – 2 mm, bílo-žlutá, okrouhlá vypouklá. Do 100 kolonií, velmi drobné světlé, okrouhlé, lesklé.

Mikroskopie: v preparátu vidíme několik vláken tvořených gramlabilními středně velkými tyčinkami. Dále zde najdeme větší množství velmi

krátkých tyček grampozitivních až gramlabilních tvořících krátké řetězky nebo shluky.

China Blue Lactose Agar: 2 kolonie jasně žluté barvy, okrouhlé nad 0,5 mm, s prosvětlením a zvednutým středem. 1 kolonie tmavě modré barvy, nepravidelného tvaru s vláknitým růstem, velikosti 5 mm, plochá, vlhké konzistence, vláknitá. Do 100 kolonií, drobné, modré barvy, okrouhlé, lesklé. Do 100 kolonií, velmi drobné světlejší než předchozí, okrouhlé.

Mikroskopie: vidíme malé množství krátkých gramlabilních tyček pravděpodobně obsahujících granula. Dále nacházíme větší množství velmi tmavě obarvených spíše nepravidelných útvarů. Pravděpodobně se jedná o spory kontaminující plísně.

Určené mikroorganismy: *Sterptococcus termophilus*, *Lactobacillus acidophilus* a *Lactobacillus lactis*.

3.3.1. Výsledky kultivace – souhrn

Vzorek č.	Teplotě 37 °C			Při pokojové teplotě		
	KA	MRSA	ChBLA	KA	MRSA	ChBLA
1.	-	+	+	-	+	+
2.	-	+	+	-	-	-
3.	+	+	+	+	-	+
4.	-	+	+	-	+	+
5.	-	+	+	-	-	-
6.	-	+	+	-	-	+
7.	-	+	+	-	-	-
8.	-	+	+	-	+	+
9.	+	+	+	+	-	-
10.	+	+	+	+	-	+

+ pozitivní výsledek – tj. došlo k nárůstu bakterií,

- negativní výsledek – tj. na Petriho misce nenarostly žádné bakterie, je sterilní,

KA – krevní agar,

MRSA – MRS agar,

ChBLA - China Blue Lactose Agar

Ze souhrnu výsledků je patrné, že navrhované zkoušky jsou průkazné a to ve smyslu, že při dodržení optimálních podmínek kultivace došlo vždy k nárůstu bakteriálních kolonií. I při kultivaci při pokojové teplotě, především na ChBLA, bakterie často narostly. Při kultivaci za optimálních podmínek je možno i provést srovnání kvality jednotlivých výrobků z hlediska mikrobiologie.

Poznámka: pro nedostatek místa je obrazová dokumentace k praktické části zařazena na přiloženém CD.

4. Didaktická část

4.1. Praktická cvičení jako aktivizující metoda výuky?

V didaktice není zařazení praktických cvičení vždy zcela jednoznačné. V posledních pracích jsou však praktická cvičení zařazovaná jednoznačně jako didaktická metoda (26).

Skalková uvažuje zařazení praktických cvičení jako didaktickou metodu a zároveň jako specifickou organizační formu výuky. Proto také tuto formu výuky, ať již se jedná o didaktickou metodu nebo organizační formu výuky, řadí spíše k aktivizujícím formám výuky.

S nárůstem počtu nejrůznějších nových metod výuky se však zařazení praktických cvičení právě pro svou tradičnost posouvá k metodám klasickým, kam je řadí i Kalhous a Obst.

Praktická cvičení a to především v přírodních vědách mají v našem školství dlouholetou tradici. Nutno však připustit, že systém vzdělávání učitelů od poloviny minulého století této tradici zcela nepřál. Praktická cvičení sice byla standardní součástí výuky na všech školách, ale jejich realizace mohla být často ovlivněna množstvím a strukturou učiva předmětu.

Stále je poukazováno na tradiční předimenzovanost učiva, jeho obsahové a pojmové struktury a malý důraz na komplexnost poznatků (34). Žáci se ve školách musí naučit spoustu pojmů. Přírodní vědy jsou v tomto často na špičce náročnosti. Toto tradiční pojetí potom dává menší prostor pro nové způsoby výuky.

Tento problém je však mnohem komplexnější. Návaznost jednotlivých stupňů vzdělávání a prostupnost v rámci systému, klade vysoké nároky na jednotlivé stupně. To se pak může odrážet i v náročnosti a požadavcích na výsledky vzdělávání na jednotlivých stupních. V tomto směru je jedním z významných reformních kroků zavedení celostátní maturitní zkoušky.

Velmi zajímavým krokem je zavedení rámcových vzdělávacích programů pro základní a gymnaziální vzdělávání, které dávají učitelům větší prostor k práci při strukturování probíraného učiva. To však klade větší nároky na učitele v mnoha nejrůznějších směrech a vzdělávání učitelů by tomu mělo odpovídat.

I přes všechny tyto změny se žáci i učitelé na praktická cvičení dívají jako na zajímavou součást výuky. Já sama považuji praktická cvičení spíše za aktivizující metodu výuky. Podle mého názoru toto zařazení úzce souvisí s tím, jak je tato metoda či forma výuky využita.

V zásadě souhlasím se zařazením Kalhous a Obsta praktických cvičení mezi metody praktické. V jejich dalším řazení do metod reproduktivních s nimi nejsem zcela za jedno. Žáci sice při praktických

cvičeních budou pracovat podle návodů k určité činnosti, která je především v mikrobiologii jednoznačně typizovaná a nepřipouští mnoho možností je měnit. Interpretace a také zadání práce může tuto metodu posunout do oblasti problémových nebo dokonce výzkumných metod. Záleží na učiteli, především na jeho erudici pedagogické i odborné jak potenciál praktických cvičení ve výuce využije.

V neposlední řadě bych chtěla zmínit názor Maňáka a Švece (30), kteří sice praktická cvičení řadí do skupiny metod dovednostně-praktických. Zároveň ale dodávají, že metody manipulování, laborování a experimentu mají vždy určitou spojitost s hrou a tím jsou pro žáky atraktivní. S věkem žáků stoupá i náročnost metody, ale nemyslím si, že by se atraktivnost pro žáky významně měnila, a to ani kladným ani záporným směrem. Podle psychologických výzkumů je hra i pro dospělé lidi často velmi příjemným prožitkem a mnohdy i potřebou. Pokud je s učením spojen i kladný emoční potenciál, je jeho účinek potencován. Tedy co nás zaujme a baví, to si také lépe pamatujeme.

Nezanedbatelný je i přínos názornosti, který přináší praktická cvičení do výuky a který je především v oblasti mikrobiologie u žáků nižších tříd významný. Tento požadavek souvisí s vývojem abstraktního myšlení u žáků.

4.2. Zařazení mikrobiologie do výuky na ZŠ a SŠ

Buňky a bakterie jsou stavebním kamenem a kolébkou života. Přesto je jim ve výuce podle mého názoru věnováno skutečně málo prostoru.

Ve vzdělávacích programech, které mají spíše systematické členění učiva biologie (jako program Základní škola), je nauka o buňce a také o jednobuněčných organismech zařazena na začátek 6. ročníku. To je však vzhledem ke schopnosti žáků pracovat pro ně v podstatě s abstraktními pojmy dosti nevýhodné. Mikroorganismy jsou sice všude okolo nás, ale uvědomit si jejich všudypřítomnost si často ztěžují uvědomují i dospělí lidé, kteří k tomu již potenciál mají. Zde by praktická cvičení měla mít svou nezastupitelnou úlohu, právě jako prostředek názornosti, který žákům pomůže si mnoho skutečností i souvislostí uvědomit.

Na mikroorganismech jsme schopni demonstrovat snad všechny možné vztahy prostředí a organismu. Můžeme demonstrovat, jak může prostředí ovlivňovat organismy, které v něm žijí. I při relativně nedostatečném technickém zázemí jsou tyto pokusy realizovatelné. Je třeba jen trochu vynalézavosti a hodně nadšení.

Ve vzdělávacích programech, které preferují ekologickou strukturu (např. vzdělávací program Národní škola), je mikrobiologie možná více opomíjena než u systematického pohledu. Bakterie jsou zde jako větší celek zařazeny pouze jako původci chorob u člověka a stálí obyvatelé

jeho sídel. U ostatních ekosystémů jsou bakterie zmíněny často jen jednou větou nebo vůbec.

Ve vzdělávacích standardech jsou požadavky na rozsah mikrobiologického vzdělávání jednoznačné. Žáci mají mít poměrně rozsáhlé vědomosti v tématu buňky, vzniku a projevů života, ale v oblasti bakteriologie je kladen hlavní důraz na bakterie jako původce chorob a jejich prevence. To je sice důležité, ale podle mého názoru by žáci měli o pozitivním vlivu a využití bakterií vědět více. Také houby – plísně a kvasinky, jsou oproti houbám, které tvoří plodnice v nevýhodě. Standardním požadavkem je dovednost žáků pracovat s mikroskopem a mikroskopickými preparáty včetně jejich přípravy. Navrhovaná cvičení tento požadavek rozšiřují o dovednosti spojené s kultivací mikroorganismů. Podle mého názoru tyto postupy nepředstavují neúměrné rozšíření učiva, zvláště proto, že není třeba vyžadovat, aby žáci postupy ovládali bez návodu a tedy z paměti. Naučit se pracovat s návodem k určité činnosti, je důležitou dovedností, která je v tomto případě ještě důležitější než samotné provedení zkoušky.

Se zavedením rámcových vzdělávacích programů pro základní vzdělávání do výuky se v tomto ohledu může mnohé změnit. Dá se ale předpokládat, že minimálně po dobu určitého přechodného období budou původní vzdělávací programy sloužit jako výchozí materiál pro konstrukci těchto rámcových vzdělávacích programů.

Rámcové vzdělávací programy jsou také základním dokumentem platným pro gymnázia. Gymnázia, která mají ve výuce zařazený přírodopis nebo biologii, však často vycházejí ze zažitého systematického pojetí učiva. To je pochopitelné, protože často jsou výchozím stupněm, ze kterého žáci pokračují ve vzdělávání v přírodovědných oborech. Proto musí kopírovat spíše vědecký model pohledu na přírodní vědy. Systematický základ je totiž na mnoha školách terciárního vzdělávání zaměřeného na přírodní vědy jednoznačně očekáván.

Učitelé často vycházejí z několika učebnic i jiných publikací a učivo si sami strukturují. Dodržují však systematický model výuky.

Při práci na své závěrečné práci z pedagogiky jsem se v dotaznících od učitelů středních škol dozvěděla, že největší problémy cítí v aktualizaci učiva podle nových vědeckých poznatků, a dále v oblastech geologie, obecné biologie, genetiky a mikrobiologie. Při zařazení mikrobiologických cvičení často největší překážku vidí spíše na poli zkušeností a teoretického zázemí. Těší mě, že i přesto, že přiznávají nedostatky v technickém vybavení, nevidí to jako zásadní problém při realizaci praktických cvičení z mikrobiologie.

Mikrobiologie obecně je oborem, který dnes v návaznosti na další rychle se rozvíjející metody zaznamenává velký vývoj. Mikroby se v našem okolí vyskytují v tak velkých množstvích a stále, že je velmi

těžké si představit, že by dnes a denně neovlivňovaly náš život. Přesto právě pro jejich malou velikost si jejich společnosti nejsme vědomi. Přesto si ale myslím, že rozšíření učiva v oblasti mikrobiologie i přes objektivní problémy jejího zařazení do výuky je vhodné.

4.3. Zastoupení mikrobiologie v některých používaných textech pro výuku

V textech používaných pro výuku je mikrobiologie zastoupena různou měrou. Při své práci jsem pracovala se dvěma učebnicemi: Kvasničková: Ekologický přírodopis (27, 28, 29) a Jelínek, Zicháček: Biologie pro gymnázia (25).

Členění učiva v těchto učebnicích je jednoznačně odlišné. Zatím co u Kvasničkové převažuje ekologický aspekt, u Jelínka je jednoznačně kladen důraz na systém. Učebnice Kvasničkové je určena žákům základních škol a může být používána i na nižším stupni gymnázií. Jelínkova učebnice je určena žákům gymnázií.

Obecně je pojmologie u Kvasničkové méně obsáhlá. Jelínkova učebnice je z hlediska pojmů a systému jednoznačně složitější a odpovídá vědeckému pojetí systematiky v biologii.

Z hlediska mikrobiologie u Kvasničkové najdeme v 6.ročníku zmínku o půdních bakteriích u oddílu ekologie půdy. V 7.ročníku jsou pak bakteriím věnovány dva oddíly. Jeden spíše systematický úvod o jednobuněčných organismech. Ten zahrnuje všeobecné informace o tvaru, velikosti a výskytu bakterií. A druhý oddíl u ekologie lidských sídel. Ten se zabývá především vztahem člověka a mikroorganismů, které ho obklopují. Soustředí se na komenzály a patogeny. Navazuje na dříve uvedené informace.

U Jelínka je systematický oddíl věnovaný bakteriím jednoznačně pojmově náročnější a vědecky exaktnější. Předchází obecnému oddílu o jaderných organismech, což by mohlo umožnit lépe si uvědomit rozdíly mezi prvobuněčnými a jednobuněčnými organismy a buňkami, které jsou součástí těl výcebuněčných organismů. Naopak ekologická souvislost a vztahy bakterií s okolím zde nejsou tak jednoznačně zvýrazněny. Dále v knize nalezneme poměrně obsáhlou kapitolu věnovanou obecné biologii a v rámci ní oddíl věnovaný prokaryotním organismům. Zde je probrána obecná bakteriologie. I tady je učivo pojmově předimenzované. A podle mého názoru není nezbytné, aby ho i žáci střední školy plně ovládali. Přesto si myslím, že je dobré, když se studenti s pojmy alespoň setkají.

Výhodou Jelínkovy učebnice je to, že obsahuje i oddíl praktických cvičení, která by měla dobře kopírovat látku probranou v hlavním textu. Mikroskopická pozorování a příprava preparátů je zde běžnou úlohou.

Proto si myslím, že rozšíření cvičení o kultivaci by bylo přínosem pro komplexnost poznatků.

Volba učebnice je vždy na učiteli. V dotazníku použitým v mé závěrečné práci z pedagogiky jsem se dozvěděla, že učitelé často pro jednotlivé části učiva využívají různých textů. A i v rámci těchto rozličných textů cítí výše uvedené nedostatky.

Obě učebnice mají své klady i zápory. Pro ekologické pojetí Kvasničkové mluví zdůraznění vztahů mezi organismy a systémy. Proti je právě malá systematickosti, která by dokumentovala vedle ekologických také fylogenetické vztahy mezi organismy. U Jelínka je struktura učebnice zároveň kladem i zápor. Pro některé školy je příliš pojmově obsáhlá. Také ekologické vztahy mezi organismy nejsou tak jednoznačně zdůrazňovány.

Z hlediska mikrobiologie bych pro ZŠ doporučila spíše učebnici Kvasničkové. Informace jsou jednoduché a srozumitelné, i když si myslím, že by bylo možné je ještě trochu rozšířit právě ve směru potravinářského využití mikroorganismů a biotechnologii. Pro střední školy gymnaziálního typu by se tato učebnice hodila pro nižší stupeň jako základ pro další systematické studium, které by mohlo vycházet z učebnice Jelínka.

Myslím si však, že kombinací obou učebnic by mohla vzniknout učebnice lépe vyhovující potřebám střední školy. Problémem ovšem zůstává, jak koncipovat text, který by měl stejně zohlednit systematický i ekologický pohled. Pokud ale zvolíme jeden pohled jako nosný a druhým ho budeme důsledně doplňovat, mohlo by se to zdařit.

4.4. Návrh praktických úloh

4.4.1. Kultivace koliformních bakterií

Vzorek: Mléko a mléčné výrobky (pro pozitivní výsledek nepasterované mléko a výrobky z nepasterovaného mléka). **POZOR!** Nutno přísně dodržovat hygienické postupy! Žáci nesmí mléko ochutnávat!

Zkoumané mikroorganismy: koliformní bakterie

Koliformní bakterie jsou gramnegativní tyčinky, fakultativně anaerobní. Rozkládají laktózu a tvoří kyseliny a plyn. V mléce a mléčných výrobcích se vyskytují druhy *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli* a *Klebsiella pneumoniae*. Jedná se o bakterie, které jsou součástí střevní mikroflóry člověka i hospodářských zvířat. Vyskytují se také v přírodě. Koliformní bakterie jsou termolabilní. Pokud se vyskytují v pasterovaném mléce nebo mlékárenských výrobcích, signalizují buď nedostatečný pasterizační záhřev, nebo následnou kontaminaci. Inkubace při 30, 35 a 37 °C po dobu 24 hodin.

Časové nároky: příprava 15 minut, kultivace 24 hodin (při nižší (pokojové) teplotě až 5 dní), pozorování 15 minut

Náročnost: žáci SŠ mohou pracovat samostatně, žáci ZŠ pod dozorem učitele.

Pomůcky a materiál: vzorek, fyziologický roztok, zkumavku na ředění, skleněná tyčinka, mikrobiologická klička, kahan, Petriho misky s připravenou agarovou půdou – doporučujeme VČŽL agar (viz receptář živných půd), termostat nebo místo se stálou teplotou.

Postup: Do sterilní zkumavky nalijeme asi 5 ml fyziologického roztoku. Sterilní skleněnou tyčinkou promícháme vzorek a množství vzorku, které na ní ulpělo přeneseme do připravené zkumavky a pořádně rozmícháme ve fyziologickém roztoku. Pokud je vzorek příliš tekutý postup opakujeme a to maximálně 3x (množství odebraného vzorku by mělo představovat objem asi 0,5 – 1 ml). Mikrobiologickou kličku vyžeháme plamenem nebo použijeme sterilní jednorázovou kličku. Zchladlou kličku namočíme do zředěného vzorku a nanese na povrch připravené agarové půdy. Nejvhodnější je použít očkování čárkováním. Petriho misku uchopíme do levé ruky (praváci) a kličku do pravé. Namočíme do vzorku a v levé horní polovině misky „namalujeme“ 3-4 čáry. Pak misku otočíme o 90° proti směru hodinových ručiček a postup zopakujeme. Takto zaplníme všechny 4 kvadranty. Je třeba, aby se čáry překrývaly, protože tak dochází k rozočkovávání a tím i dalšímu ředění. Mezi jednotlivými otočeními již kličku nenamáčíme ani nežeháme! Pracujeme stále jednou kličkou. Je třeba pracovat velmi opatrně, abychom při očkování neporušili agar. Pro méně šikovné žáky je možné použít k očkování sterilní vatové tampóny. Naočkované plotny zavřeme a uložíme dnem vzhůru do termostatu nebo na místo kultivace. Žáci by měli mít možnost kultivaci sledovat v určitých časových intervalech (např. o přestávce) a zapisovat si průběh narůstání počtu kolonií.

Co uvidíte: Pokud je mléko skutečně dobře pasterované a není sekundárně kontaminované, měla by být zkouška negativní – sterilní. Pokud je mléko kontaminované - postupně se budou na povrchu půdy objevovat kolonie bakterií s typickou barvou, tvarem, velikostí a vztahem k půdě. Tyto znaky se používají při determinaci jednotlivých kmenů a jsou závislé na druhu mikroorganismu, zvolené půdě a podmínkách kultivace. Množství kolonií odpovídá počtu životaschopných bakterií v naočkovaném vzorku.

4.4.2. Kultivace mezofilních a fakultativně anaerobních mikroorganismů na agarových půdách

Vzorek: mléko, kysané mléčné výrobky

Zkoumané mikroorganismy: bakterie mléčného kvašení

Časové nároky: příprava 20 minut, kultivace při teplotě 30°C 72 hodin (při nižší (pokojové) teplotě delší)

Náročnost: žáci SŠ mohou pracovat samostatně, žáci ZŠ pod dozorem učitele.

Pomůcky a materiál: vzorek, fyziologický roztok, zkumavku na ředění, skleněná tyčinka, mikrobiologická klička, kahan, Petriho misky s připravenou agarovou půdou – doporučujeme MRS agar, China Blue Laktose agar nebo Todd-Hewitt agar (viz receptář), termostat nebo místo se stálou teplotou.

Postup: Do sterilní zkumavky nalijeme asi 5 ml fyziologického roztoku. Sterilní skleněnou tyčinkou promícháme vzorek a množství vzorku, které na ní ulpělo přeneseme do připravené zkumavky a pořádně rozmícháme ve fyziologickém roztoku. Pokud je vzorek příliš tekutý postup opakujeme a to maximálně 3x. (množství odebraného vzorku by mělo představovat objem asi 0,5 – 1 ml) Mikrobiologickou kličku vyžeháme plamenem nebo použijeme sterilní jednorázovou kličku. Zchladlou kličku namočíme do zředěného vzorku a nanese na povrch připravené agarové půdy. Nejvhodnější je použít očkování čárkováním. Petriho misku uchopíme do levé ruky (praváci) a kličku do pravé. Namočíme do vzorku a v levé horní polovině misky „namalujeme“ 3-4 čáry. Pak misku otočíme o 90° proti směru hodinových ručiček a postup zopakujeme. Takto zaplníme všechny 4 kvadranty. Je třeba, aby se čáry překrývaly, protože tak dochází k rozočkovávání a tím i dalšímu ředění. Mezi jednotlivými otočeními již kličku nenamáčíme ani nežeháme!! Pracujeme stále jednou kličkou. Je třeba pracovat velmi opatrně, abychom při očkování neporušili agar. Pro méně šikovné žáky je možné použít k očkování sterilní vatové tampóny. Naočkované plotny zavřeme a uložíme dnem vzhůru do termostatu nebo na místo kultivace. Žáci by měli mít možnost kultivaci sledovat v určitých časových intervalech (např. o přestávce) a zapisovat si průběh narůstání počtu kolonií.

Co uvidíte: postupně se budou na povrchu půdy objevovat kolonie bakterií s typickou barvou, tvarem, velikostí a vztahem k půdě. Tyto znaky se používají při determinaci jednotlivých kmenů a jsou závislé na druhu mikroorganismu, zvolené půdě a podmínkách kultivace. Množství kolonií odpovídá počtu životaschopných bakterií v naočkovaném vzorku.

4.4.3. Kultivace psychrotrofních mikroorganismů

Vzorek: mléko, smetana

Zkoumané mikroorganismy: Psychrotrofní mikroorganismy rostou v rozmezí 0 – 15 °C. jsou ukazatelem dodržování předepsaných chladících teplot v zemědělské prvovýrobě, hygieně práce a sanitaci. Stejně podmínky platí pro mlékářenskou výrobu.

Časové nároky: příprava 20 minut, kultivace při teplotě 6,5°C 10 dnů (popř. 21 °C po dobu 25 hodin).

Náročnost: žáci SŠ mohou pracovat samostatně, žáci ZŠ pod dozorem učitele.

Pomůcky a materiál: vzorek, fyziologický roztok, zkumavku na ředění, skleněná tyčinka, mikrobiologická klička, kahan, Petriho misky s připravenou agarovou půdou – doporučujeme GTK agar (viz receptář), termostat nebo místo se stálou teplotou (v tomto případě se může jednat o chladničku).

Postup: Do sterilní zkumavky nalijeme asi 5 ml fyziologického roztoku. Sterilní skleněnou tyčinkou promícháme vzorek a množství vzorku, které na ní ulpělo, přeneseme do připravené zkumavky a pořádně rozmícháme ve fyziologickém roztoku. Pokud je vzorek příliš tekutý postup opakujeme a to maximálně 3x. (množství odebraného vzorku by mělo představovat objem asi 0,5 – 1 ml) Mikrobiologickou kličku vyžeháme plamenem nebo použijeme sterilní jednorázovou kličku. Zchladlou kličku namočíme do zředěného vzorku a nanese na povrch připravené agarové půdy. Nejvhodnější je použít očkování čárkováním. Petriho misku uchopíme do levé ruky (praváci) a kličku do pravé. Namočíme do vzorku a v levé horní polovině misky „namalujeme“ 3-4 čáry. Pak misku otočíme o 90° proti směru hodinových ručiček a postup zopakujeme. Takto zaplníme všechny 4 kvadranty. Je třeba, aby se čáry překrývaly, protože tak dochází k rozočkovávání a tím i dalšímu ředění. Mezi jednotlivými otočeními již kličku nenamáčíme ani nežeháme!! Pracujeme stále jednou kličkou. Je třeba pracovat velmi opatrně, aby jsme při očkování neporušili agar. Pro méně šikvné žáky je možné použít k očkování sterilní vatové tampóny. Naočkované plotny zavřeme a uložíme dnem vzhůru do termostatu nebo na místo kultivace. Žáci by měli mít možnost kultivaci sledovat v určitých časových intervalech (např. o přestávce) a zapisovat si průběh narůstání počtu kolonií.

Co uvidíte: postupně se budou na povrchu půdy objevovat kolonie bakterií s typickou barvou, tvarem, velikostí a vztahem k půdě. Tyto znaky se používají při determinaci jednotlivých kmenů a jsou závislé na druhu mikroorganismu, zvolené půdě a podmínkách kultivace. Množství kolonií odpovídá počtu životaschopných bakterií v naočkovaném vzorku

4.4.4. Kultivace kvasinek

Vzorek: máslo, sýry, tvarohy, kefir, ostatní mléčné výrobky jako sekundární kontaminace

Zkoumané mikroorganismy: kvasinky

V mlékařské výrobě se uplatňují kvasinky ve formě čistých mlékařských kultur pro výrobu zakysaných výrobků a sýrů. Často jsou však kontaminujícími mikroorganismy v mlékárenství. Jejich spory

nejsou termorezistentní a i krátkodobý záhřev na teplotu 60°C a vyšší je zničí. Problémem pak zůstává kontaminace mykotoxiny.

Časové nároky: příprava 20 minut, kultivace při teplotě 25°C 5 dnů.

Náročnost: žáci SŠ mohou pracovat samostatně, žáci ZŠ pod dozorem učitele

Pomůcky a materiál: vzorek, fyziologický roztok, zkumavku na ředění, skleněná tyčinka, mikrobiologická klička, kahan, Petriho misky s připravenou agarovou půdou – doporučujeme Sabouraud agar (viz receptář), termostat nebo místo se stálou teplotou.

Postup: Do sterilní zkumavky nalijeme asi 5 ml fyziologického roztoku. Sterilní skleněnou tyčinkou promícháme vzorek a množství vzorku, které na ní ulpělo, přeneseme do připravené zkumavky a pořádně rozmícháme ve fyziologickém roztoku. Pokud je vzorek příliš tekutý postup opakujeme a to maximálně 3x (množství odebraného vzorku by mělo představovat objem asi 0,5 – 1 ml). Pokud máme pevný materiál – sýr, odebereme vzorek stěrem z povrchu, seškrábnutím nebo velmi malé kousky, které se ve fyziologickém roztoku rozmělní. Mikrobiologickou kličku vyžeháme plamenem nebo použijeme sterilní jednorázovou kličku. Zchlazenou kličku namočíme do zředěného vzorku a nanese na povrch připravené agarové půdy. Nejvhodnější je použít očkování čárkováním. Petriho misku uchopíme do levé ruky (praváci) a kličku do pravé. Namočíme do vzorku a v levé horní polovině misky „namalujeme“ 3-4 čáry. Pak misku otočíme o 90° proti směru hodinových ručiček a postup zopakujeme. Takto zaplníme všechny 4 kvadranty. Je třeba, aby se čáry překrývaly, protože tak dochází k rozočkovávání a tím i dalšímu ředění. Mezi jednotlivými otočeními již kličku nenamáčíme ani nežiháme!! Pracujeme stále jednou kličkou. Je třeba pracovat velmi opatrně, abychom při očkování neporušili agar. Pro méně šikovné žáky je možné použít k očkování sterilní vatové tampóny. Naočkované plotny zavřeme a uložíme dnem vzhůru do termostatu nebo na místo kultivace. Žáci by měli mít možnost kultivaci sledovat v určitých časových intervalech. Standardně se provádí odečet po 3 a 5 dnech. Počet kolonií se zapisuje. Počet kontrol můžeme zvýšit. Ke stanovování se běžně používají misky, kde narostlo 15 – 150 kolonií.

Co uvidíte: větší kolonie typického kvasničného zápachu.

4.4.5. Kultivace plísní

Vzorek: máslo, sýry, ostatní mléčné výrobky jako sekundární kontaminace

Zkoumané mikroorganismy: plísně

Podobně jako kvasinky i plísně se v mlékárenství vyskytují jako technologický základ výroby některých produktů a jako nepříjemná kontaminace ostatních výrobků.

Časové nároky: příprava 20 minut, kultivace při teplotě 25°C 5 dnů.

Náročnost: žáci SŠ mohou pracovat samostatně, žáci ZŠ pod dozorem učitele

Pomůcky a materiál: vzorek, fyziologický roztok, zkumavku na ředění, skleněná tyčinka, mikrobiologická klička, kahan, Petriho misky s připravenou agarovou půdou – doporučujeme Sabouraud agar (vizreceptář), termostat nebo místo se stálou teplotou.

Postup: Do sterilní zkumavky nalijeme asi 5 ml fyziologického roztoku. Sterilní skleněnou tyčinkou promícháme vzorek a množství vzorku, které na ní ulpělo, přeneseme do připravené zkumavky a pořádně rozmícháme ve fyziologickém roztoku. Pokud je vzorek příliš tekutý postup opakujeme a to maximálně 3x (množství odebraného vzorku by mělo představovat objem asi 0,5 – 1 ml). Pokud máme pevný materiál – sýr, odebereme vzorek stěrem z povrchu, seškrábnutím nebo velmi malé kousky, které se ve fyziologickém roztoku rozmělní. Mikrobiologickou kličku vyžiháme plamenem nebo použijeme sterilní jednorázovou kličku. Zchladlou kličku namočíme do zředěného vzorku a nanese na povrch připravené agarové půdy. Nejvhodnější je použít očkování čárkováním. Petriho misku uchopíme do levé ruky (praváci) a kličku do pravé. Namočíme do vzorku a v levé horní polovině misky „namalujeme“ 3-4 čáry. Pak misku otočíme o 90° proti směru hodinových ručiček a postup zopakujeme. Takto zaplníme všechny 4 kvadranty. Je třeba, aby se čáry překrývaly, protože tak dochází k rozočkovávání a tím i dalšímu ředění. Mezi jednotlivými otočeními již kličku nenamáčíme ani nežiháme! Pracujeme stále jednou kličkou. Je třeba pracovat velmi opatrně, abychom při očkování neporušili agar. Pro méně šikovné žáky je možné použít k očkování sterilní vatové tampóny. Naočkované plotny zavřeme a uložíme dnem vzhůru do termostatu nebo na místo kultivace. Žáci by měli mít možnost kultivaci sledovat v určitých časových intervalech. Standardně se provádí odečet po 3 a 5 dnech. Počet kolonií se zapisuje. Počet kontrol můžeme zvýšit. Ke stanovování se běžně používají misky, kde narostlo 5 – 50 kolonií.

Co uvidíte: velké kolonie vláknitého charakteru.

4.4.6. Sledování růstové křivky plísně v závislosti na teplotě kultivace

Vzorek: máslo, sýry, ostatní mléčné výrobky jako sekundární kontaminace

Zkoumané mikroorganismy: plísně

Časové nároky: příprava 20 minut, kultivace při teplotě 25°C 5 dnů.

Náročnost: žáci SŠ mohou pracovat samostatně, žáci ZŠ pod dozorem učitele

Pomůcky a materiál: vzorek, fyziologický roztok, zkumavku na ředění, skleněná tyčinka, mikrobiologická klička, kahan, Petriho misky

s připravenou agarovou půdou – doporučujeme Sabouraud agar (viz receptář), termostat nebo místo se stálou teplotou.

Postup: Při přípravě postupujeme nejprve jako v úloze Kultivace plísní. Odečítání provádíme častěji (např. každý den). Žáci sledují změny vybrané kolonie. Především měří změny jejího průměru postupem času. Kultivaci můžeme i o několik dnů prodloužit podle potřeby. Naměřené hodnoty jsou výchozí pro sestavení grafu závislosti růstu kolonie na čase. Velice vhodné je doplnit tento pokus o sledování vlivu teploty na růst kolonií. Stejný vzorek naočkujeme na několik misek a kultivaci provádíme při různých teplotách (např. v termostatu 30-25°C, při pokojové teplotě 20-24°C, sklad 15-18°C, chladnička 0-4°C, příp. i mraznička méně než 0°C – jako důkaz inhibice růstu). Samozřejmě je nutné v takovémto případě také pravidelně sledovat teplotu v místě kultivace.

Co uvidíte: velké často vláknité kolonie, které s postupem růstu mění tvar a barvu.

4.4.7. Sledování účinku bakterií v lakmusovém mléce

Vzorek: bakterie přímo ze vzorků mléčných výrobků nebo získaných kultivací v předešlých zkouškách

Zkoumané mikroorganismy: především bakterie mléčného kvašení

Časové nároky: příprava 10 min, kultivace při 25 – 30°C 24 hodin, pozorování.

Náročnost: žáci mohou pracovat samostatně

Pomůcky a materiál: lakmusové mléko, vzorky, kapátko, bakteriologická zkumavka.

Postup: do lakmusového mléka (10 ml) přeneseme asi 1 ml vzorku. Pokud používáme bakterie z vypěstované kultury, přeneseme sterilní kličkou do 1 ml fyziologického roztoku 1-2 kolonie z povrchu půdy a dobře promícháme. Takto připravený vzorek použijeme k inokulaci mléka.

Co uvidíte: budeme pozorovat změny barvy a struktury mléka.

Změna barvy	Změna mléka	Skupina mikroorganismů	
Růžová	Možné až sražení mléka až na kasein v čiré syrovátce	Zkvašující glukózu a laktózu	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
	Bouřlivé srážení za masivní produkce plynu		<i>Clostridium perfringens</i>

Modrá	Alkalizace za tvorby bazických aminů a čpavku	Proteolytické mikroby	<i>Alcaligenes faecalis</i>
	Alkalická koagulace s tvorbou měkké, namodralé sraženiny		
Průhledná	Peptonizace mléka	Bakterie produkující proteolytické enzymy	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	Mléko se při dně odbarví	Bakterie produkující reduktázy	
Bílá	Mléko je beze změny	I tak může mléko obsahovat nejrůznější mikroorganismy	

Z takto připravených kultur lze připravovat mikroskopické preparáty pro pozorování. Viz dále.

4.4.8. Příprava nativního preparátu bakterií mléčného kvašení

Vzorek: kysané mléčné výrobky

Zkoumané mikroorganismy: bakterie mléčného kvašení – především *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*

Časové nároky: příprava 5 min., pozorování

Náročnost: žáci mohou pracovat samostatně

Pomůcky a materiál: vzorek, fyziologický roztok, zkumavku na ředění, skleněná tyčinka, kahan, kapátko, podložní a krycí sklo, mikroskop, příp. tuš a filtrační papír.

Postup: Do sterilní zkumavky nalijeme asi 5 ml fyziologického roztoku. Sterilní skleněnou tyčinkou promícháme vzorek a množství vzorku které na ní ulpělo přeneseme do připravené zkumavky a pořádně rozmícháme ve fyziologickém roztoku. Pokud je vzorek příliš tekutý postup opakujeme a to maximálně 3x. (množství odebraného vzorku by mělo představovat objem asi 0,5 – 1 ml). Podložní sklo vysterilizujeme protaženým plamenem kahanu. Kapátkem přeneseme trochu zředěného vzorku na podložní sklo. Přikryjeme krycím sklem a pozorujeme v mikroskopu pod největším zvětšením. Vhodným doplňkem je na závěr preparát dobarvit tuší. Na okraj krycího skla kápneme trochu tuše, pomocí filtračního papíru přiloženého na opačný okraj krycího skla prosajeme barvivo do preparátu. Tím dojde k usmrcení bakterií a také jejich kontrastnímu zvýraznění.

Co uvidíte: směs velmi drobných bakterií - koků a tyčinek, v nejrůznějším poměru. U pohyblivých bakterií můžeme pozorovat pohyb. Zvětšení většiny mikroskopů však neumožňuje kvalitní pozorování při takto nízkém kontrastu preparátu, proto je tato úloha spíše prokázáním přítomnosti mikroorganismů ve vzorku než jejich kvalitním pozorováním.

Tímto způsobem lze pracovat i s ostatními mléčnými výrobky.

4.4.9. Zhotovení fixovaného preparátu barveného Löfflerovým činidlem

Vzorek: mléčné bakteriální kultury z jogurtu nebo jiných mléčných výrobků

Zkoumané mikroorganismy: mléčné bakteriální kultury

Časové nároky: příprava a pozorování 20-25 min., kultivace cca. 2 – 7 dnů (podle kultivační teploty).

Náročnost: mohou provádět žáci ZŠ samostatně

Pomůcky a materiál: bakteriální kultura – nakultivovaná nebo z čerstvého výrobku, mikrobiologická klička, podložní sklo, kahan, fyziologický roztok, Löfflerovo činidlo, filtrační papír na osušení, imerzní olej pro pozorování.

Postup: Podložní sklo vysterilizujeme protažením plamenem. Po vychladnutí na sklo kápneme kapku fyziologického roztoku. Do kapky přeneseme sterilní mikrobiologickou kličkou malé množství vzorku nebo asi jednu kolonii vyrostlou na plotně. Vzorek dobře rozetřeme v kapce a necháme zaschnout. Sklíčko pak protáhneme plamenem tak, aby strana se vzorkem byla nahoře a tím ho zafixujeme. Na preparát nalijeme Löfflerovo činidlo a necháme 3 minuty působit. Po této době barvivo slijeme, preparát opláchneme vodou a osušíme filtračním papírem. Preparáty pozorujeme pod mikroskopem. Výhodnější je použít pozorování imerzním objektivem.

Co uvidíte: Podle toho jakou použijeme kulturu uvidíme koky nebo tyčinky případně vlákna plísni.

4.4.10. Příprava barveného preparátu podle Gramma

Vzorek: nejlépe mikroorganismy z kultury vypěstované na agarových půdách při některé z kultivačních úloh, lze použít i mikroorganismy přímo ze vzorku, ty však často nemývají takovou kvalitu jako mikroorganismy z kultury

Zkoumané mikroorganismy: bakterie, kvasinky, plísně – dle vzorku

Podle obsahu antigenních struktur v buněčné stěně dělíme bakterie na grampozitivní a gramnegativní. Tyto struktury lze příslušným barvením zvýraznit a tím zvýraznit i tvar bakterie pro mikroskopické

pozorování. Grampozitivní bakterie mají v buněčné stěně antigeny, na které se naváže hlavní barvivo karbolfuchsin a Lugolův roztok. Takto obarvené bakterie jsou v mikroskopu modré. Bakterie, které se tímto barvivem neobarví - gramnegativní, se dobarvují krystalovou violetí a v mikroskopu se jeví jako růžové nebo červené. Některé bakterie mohou být gramlabilní. To znamená, že se nebarví typicky modře nebo červeně, ale jejich zbarvení je na škále mezi těmito barvami. Podobně se někdy chovají i bakterie ze starších kultur. Tento fakt tedy musíme brát v potaz při určování grampozitivity zkoumaných bakterií.

Časové nároky: příprava 15 minut, pozorování

Náročnost: vzhledem k práci s barvivy, která se špatně odstraňují je vhodné aby barvení prováděl učitel, či aby na ně alespoň dohlížel, jinak mohou žáci pracovat samostatně.

Pomůcky a materiál: vzorky, podložní sklo, tužku pro označování skla nebo fix, kahan, mikrobiologickou kličku, fyziologický roztok, karbolfuchsin, Lugolův roztok, krystalová violet, ethanol, destilovaná voda, filtrační papír.

Postup: očištěné podložní sklo protáhneme třikrát plamenem kahanu a položíme na podložku vyžíhanou stranou nahoru. Na sklo kápneme kapku fyziologického roztoku. Sterilní mikrobiologickou kličkou odebereme malé množství vzorku a rozmělníme ho do připravené kapky. Preparát necháme zaschnout. Po zaschnutí provedeme fixaci plamenem. Podložní sklo protáhneme třikrát plamenem tak, aby strana s vzorkem byla nahoře a nepřišla do přímého kontaktu s plamenem. Preparát umístíme nad misku a přelíváme ho postupně barvivy. Barvivo vždy musí pokrýt celý vzorek. Každé barvivo necháme působit asi 30 sec. Postupujeme takto: karbolfuchsin, slijeme ho a přelijeme preparát Lugolovým roztokem, slijeme, odbarvíme ethanolem, vymyjeme vodou a přelijeme krystalovou violetí, nakonec slijeme a vymyjeme vodou. Preparát opatrně osušíme filtračním papírem a pozorujeme nejlépe v imersním zvětšení.

Pro barvení je třeba mít určitou zkušenost a zručnost. I přesto je však možné aby ho žáci zvládli sami. Je třeba zajistit ochranu oděvu a kůže protože barviva se dosti špatně smývají a to i z použitého náradí a náčiní.

Co uvidíte: směs koků a tyčinek gram pozitivních nebo gramlabilních, v některých případech se můžeme setkat i s jinými bakteriemi. Tímto způsobem můžeme zpracovávat bakterie, kvasinky i plísňe.

4.5. Mezipředmětové vztahy ve výuce mikrobiologie

Biologie je součástí komplexu přírodních věd. V rámcových vzdělávacích programech a při jejich zavádění do škol se můžeme

setkat se snahami tyto předměty spojit pod zastřešující komplexy. Tato snaha je zajímavá hned z několika důvodů.

V první řadě tímto systémem můžeme lépe do výuky zapracovat mezipředmětové a mezioborové vztahy, které v dnešní době nabývají na významu. Mnoho věd, které se dnes velice rychle rozvíjejí jako genetika či molekulární biologie apod. významně ovlivňují i poznatky ve vědách klasických. Ale také mnoho průmyslových odvětví.

Další výhodou takového systému je i možnost využít modulový systém strukturace učiva. To umožní žákům vytvořit svůj studijní plán tak, aby to co nejlépe odpovídalo jejich zájmům.

Ale i při klasickém rozdělení předmětů je možné zohlednit mezipředmětové vztahy. A právě v učivu mikrobiologie je zapojení mezipředmětových vztahů velmi jednoduché. Na bakteriích můžeme dobře dokumentovat fyzikální i chemické vlivy prostředí. A tyto vlivy spolu s vlivy, které mají bakterie na své okolí, můžeme zkoumat nejen biologickými, ale i fyzikálními a chemickými metodami.

Kromě vztahů s předměty v komplexu přírodních věd můžeme najít i mnoho vazeb s předměty mimo tento komplex. Nalezneme vazby v zeměpise, dějepise, literatuře a při troše fantazie např. i v umění. Působení bakterií může zasáhnout i do politiky, sociální sféry nebo ekonomiky. Vždy záleží na interpretaci dané situace a možnosti vidět ji v širším kontextu a vztazích.

V zapojení mezipředmětových vztahů opět hraje nejdůležitější roli zájem a rozhled učitele.

4.6. Další možnosti zařazení mikrobiologie do výuky

Navrhovaná cvičení by byla vhodná jako jeden z okruhů v rámci laboratorních cvičení probíhajících jako volitelný předmět, který rozšiřuje látku probíranou v hodinách biologie.

Mikrobiologie by také byla jistě zajímavá jako téma projektu a to jak třídního v rámci přírodních věd, tak i projektu celo školního. Jak již bylo naznačeno výše, je mnoho témat která mohou s mikroorganismy souviset. Pokud téma rozšíříme např. o mléčné výrobky, najdeme další témata. Několik příkladů:

- Český jazyk: Nemoc jako námět v literatuře, Recepty v literatuře.
- Dějepis: Velké epidemie v historii, Kdy vznikly biotechnologie? (jaké potraviny dokázali naši předkové připravit s pomocí bakterií a jak to dělali), Jak jedli naši předci?
- Zeměpis: Žijí u nás stejné bakterie jako u protinožců?, Má zeměpisná poloha vliv na výskyt bakterií?, Krajové speciality vyráběné z mléka, Jaké mléko se zpracovává na různých kontinentech?
- Fyzika: Jak ovlivňují fyzikální vlivy život bakterií?

- Chemie: Jak se život bakterií projevuje v jejich okolí?, Chemická analýza jako metoda určování bakterií.
- Rodinná výchova: Bakterie v potravinářství, Vaříme s výrobky, při jejichž výrobě se používají bakterie, Vliv podmínek skladování na obsah bakterií v potravinách, Nemoc jako sociální problém, Prevence přenosných chorob.
- Výtvarná výchova: Bakterie jako modely pro umělecká díla, Mikrofotografie jako umělecké vyjádření.
- Biologie: Bakterie jako poslové života na zemi, Rekordmani v neviditelném světě, Adaptační strategie přežití, Biotechnologie.

Příprava celoškolního projektu je sice velice náročná, ale při dobrém plánování a motivaci žáků se vždy vyplatí. Myslím si, že takový projekt by mohl být velice dobrým způsobem jak mikrobiologii ve výuce uplatnit. Pokud navíc všechny skupiny výsledky své práce prezentují ostatním a to nejrůznějšími formami od výstavy, přednášky po připravenou scénku apod. nebudou žáci ochuzeni ani o poznatky skupin, ve kterých nemohli nebo nechtěli pracovat.

Navrhovaná témata je však možno využít i v běžné výuce daných předmětů a tím podpořit komplexnost poznatků, které žáci o daném tématu získávají.

4.7. Příprava materiálu a postupy práce

4.7.1. Manipulace a odběr vzorků

Odběr vzorků, přeprava a manipulace s nimi má svá přesná pravidla, která musí být dodržována, aby nedošlo sekundární kontaminaci vzorku a tím ke zkreslení výsledku zkoušky. Pro školní praxi však není nezbytné všechna pravidla striktně dodržet. I kontaminující mikroorganismy mohou být pro pozorování zajímavé. Mohou se však objevit patogenní nebo podmíněně patogenní mikroorganismy, a proto je třeba dodržovat alespoň základní pravidla práce v laboratoři.

Základní pravidla práce:

- Žáci jsou seznámeni s pravidly práce v laboratoři.
- Při práci používáme ochranný oděv.
- Kromě sensorické zkoušky chuti výrobku je zakázáno v laboratoři jíst a pít nebo cokoli jiného ochutnávat či olizovat.
- Pokud výrobek neprošel zdárně ostatními sensorickými zkouškami, neprovádíme ochutnávku!
- Pracujeme vždy přesně podle návodu nebo pokynů vyučujícího.

- Místo, kde pracujeme před a po práci vydezinfikujeme. Nejlépe 70% ethanolem.
- Při práci se vzorky můžeme zajistit antisepsi prostředí tím, že budeme pracovat mezi dvěma kahany či hořáky hořícími erupčním plamenem.

Pravidla pro odběr vzorků:

- Pokud je to možné odebíráme vždy celé spotřebitelské balení.
- Pokud nemůžeme odebrat celé balení, měl by být vzorek přepravován a uchováván při teplotě asi 6°C (aby nedošlo k množení nežádoucích mikroorganismů), ve sterilní nádobě, bez přístupu světla.
- Před otevřením spotřebitelského balení otřeme víčko (místo vstupu) vatou namočenou v ethanolu.
- Tekuté a polotekuté vzorky je třeba před odebíráním řádně promíchat, např. sterilní skleněnou tyčinkou nebo jednorázovou sterilní špachtlí.
- Pozor např. jogurty obsahující sladkou složku (džem, ovoce) je lepší od této složky oddělit. Cukr obsažený v ochucovadlech může mít vliv na výsledek některých zkoušek.
- U pevných vzorků používáme sterilní nástroje (můžeme je např. vyžítat v plameni). Odebíráme malé části vzorků podle požadavků metody např. seškrábnutím, řezem, vpichem apod. Pro uchování a zpracování těchto vzorků používáme fyziologický roztok.

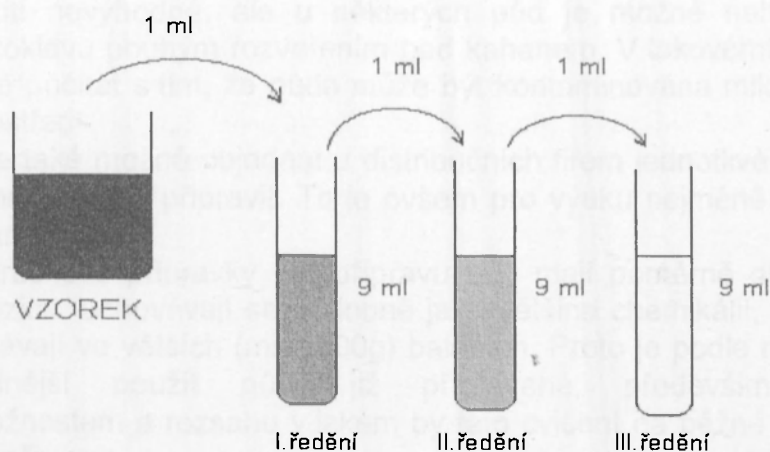
4.7.2. Ředění vzorků

Vzorky se ředí proto, aby vyrostlé kolonie dobře izolované a počítatelné. Pokud předpokládáme, že vzorek obsahuje malé množství mikroorganismů a jeho konzistence to dovolí, můžeme očkovat přímo vzorek. Vzorky viskózní a pevné ředíme vždy. Podle IDF je definováno výchozí (základní) ředění takto: Suspenze, emulze nebo roztok, získaný z naváženého nebo odměřeného množství vzorku smísením s devítinásobným množstvím ředícího roztoku a důkladným promícháním. Jedná se tedy o I. ředění vyšetřovaného vzorku. (12).

Ředění dalšího řádu získáme převedením 1 ml I. ředění do 9 ml ředícího roztoku. Tímto způsobem můžeme připravit i další řady ředění.

Pro naše praktická cvičení jsou vhodná ředění I. a II. řádu. Není ale nezbytné ředit vzorky takto exaktně. Tedy takováto přesnost není nutností pro zdárný výsledek zkoušky.

Ředění:



Obr. 1 Ředění vzorků

4.7.3. Příprava a použití půd

Ke kultivačním zkouškám je třeba připravit živné půdy. Ve své podstatě se jedná o média, která spolu s vhodnými fyzikálními (např. optimální teplota) a chemickými podmínkami zajišťují příhodné podmínky pro růst a množení mikroorganismů.

Podle konzistence dělíme půdy na tekuté a tuhé. Podle obsahu látek a tedy podle účelu použití dělíme půdy na: základní, obohacené, resuscitační, pomnožovací, diagnostické, selektivní, selektivně pomnožovací, selektivně diagnostické, k anaerobní kultivaci, ke stanovení citlivosti na ATB, k testování sterility, transportní, k uchování kultur apod.

Pro naši práci budeme používat půdy diagnostické, selektivní a selektivně diagnostické. Využití těchto typů půd je výhodné. Na těchto půdách totiž nejčastěji a nejlépe narůstají právě ty bakterie, které zkoumáme a růst ostatních mikroorganismů je omezen nebo potlačen. Navíc kolonie narostlé na těchto půdách jsou typické pro daný mikroorganismus a často i barevné. To je výhodné při identifikaci a také atraktivní pro studenty.

Příprava mikrobiologických půd dnes již není tak složitá jako dříve. Složení půd je stejné, ale jednotlivé složky jsou odborně zpracovány a

připraveny k velmi jednoduché přípravě, kterou mohou zvládnout i žáci sami.

Mikrobiologické půdy se dnes dodávají nejčastěji v prášku. Často se jedná již jen o jednu kompletní směs, kterou již jen podle návodu rozpustíte ve vodě a vaříte nejčastěji v autoklávu. To je pro školní použití nevýhodné, ale u některých půd je možné nahradit vaření v autoklávu pouhým rozvařením nad kahanem. V takovémto případě je nutné počítat s tím, že půda může být kontaminována mikroorganismy z prostředí.

Je také možné objednat u distribučních firem jednotlivé složky půdy a směs si sám připravit. To je ovšem pro výuku nejméně ekonomická varianta.

Práškové přípravky pro přípravu půd mají poměrně dlouhou dobu expozice, uchovávají se podobně jako většina chemikálií, ale často se prodávají ve větších (min. 500g) baleních. Proto je podle mého názoru vhodnější použít půdy již připravené, především vzhledem k možnostem a rozsahu v jakém by tato cvičení na běžné škole mohla být zařazena.

Již zmíněnou poslední možností je zakoupit půdy již připravené. Ty se prodávají nejčastěji v jednorázových plastových Petriho miskách. Výhodou je jednodušnost takto připravených půd, jejich sterilita a nenáročnost na přípravu. Jejich použití všude doporučuji, protože velice zjednodušují přípravu a tím i možnost zařazení tématu do výuky. Nevýhodou je jejich kratší doba expozice a nutnost uchovávat je v chladničce.

4.7.4. Receptář živných půd

MRS agar, složení (g/l) (23):

Pepton	10,0
Hovězí extrakt	10,0
Kvasničný extrakt	5,0
Glukóza	20,0
Octan sodný	5,0
Citrát amonný	2,0
Na ₂ HPO ₄	2,0
MgSO ₄	0,1
MnSO ₄	0,05
Tween 80	1,0
pH 6,5±0,2	

Příprava: 55g půdy se dá do 1 litru destilované vody teplé 60°C, rozvaří, rozplní do vhodných nádobek a sterilizuje 15 min při 121°C. Necháme zchladnout asi na 40°C a rozléváme do připravených

sterilních Petriho misek. Hladina by měla dosahovat maximálně do poloviny výšky misky. Nikdy nelijeme misku plnou. Půda by měla pokrýt rovnoměrně dno a neměli by v ní být bubliny, které mohou zkreslit odečet výsledku. Misky okamžitě zavíráme a na rovné podložce necháme ztuhnout. Pak misky otočíme dnem vzhůru a uložíme do chladničky do doby než je budeme potřebovat.

Použití: jedná se o selektivní půdu pro laktobacily. Osahuje obohacova, která dodávají kromě potřebné glukózy a kvasničného extraktu i mastné kyseliny, které jsou pro růst laktobacilů nezbytné. Růst ostatních mikroorganismů je tlumen přidavkem citrátu amonného a octanu sodného a také nízkým pH.

VČŽL agar, složení (g/l) (23):

Pepton pro bakteriologii	10,0
NaCl	5,0
Zlučové soli	1,5
Neutrální červeň	0,03
Krystalová violet'	0,002
Laktóza	10,0
Agar	10,5
pH 6,9±0,2	

Příprava: 37g VČŽL agaru se suspenduje v 1000 ml studené destilované vody, nechá se potřebnou dobu nabobtnat, rozvaří se a po ochlazení na 50°C rozlije do misek. Hladina by měla dosahovat maximálně do poloviny výšky misky. Nikdy nelijeme misku plnou. Půda by měla pokrýt rovnoměrně dno a neměli by v ní být bubliny, které mohou zkreslit odečet výsledku. Misky okamžitě zavíráme a na rovné podložce necháme ztuhnout. Pak misky otočíme dnem vzhůru a uložíme do chladničky do doby, než je budeme potřebovat.

Použití: zkratka je odvozena od obsahu látek (violet'-červeň-žluč-laktóza). Je selektivně diagnostickou půdou pro vyšetření přítomnosti enterobakterií. Inhibitory růstu nežádoucích mikroorganismů jsou violet' a žluč, substrátem je laktóza a indikátorem je neutrální červeň. Očkuje se nejčastěji zaléváním. Enterobakterie vyrůstají ve zřetelně růžově červených až purpurových koloniích obklopených dvorcem téže barvy. Pozor jedná se o bakterie, které jsou nežádoucí kontaminací a vzorky by tedy správně měly být sterilní!

Todd-Hewitt agar, složení (g/l) (23):

Infuze ze 450g libového mletého masa	10,0
Trypton	20,0
Glukóza	2,0
NaCl	2,0
NaHCO ₃	2,0
Na ₂ HPO ₄	0,4
pH 7,8±0,2	

Příprava: 36,4 g půdy se rozpustí v 1 litru destilované vody, rozplní do vhodných nádob a autoklávuje 10 min při teplotě 121°C. Necháme zchladnout asi na 40°C a rozléváme do připravených sterilních Petriho misek. Hladina by měla dosahovat maximálně do poloviny výšky misky. Nikdy nelijeme misku plnou. Půda by měla pokrýt rovnoměrně dno a neměli by v ní být bubliny, které mohou zkreslit odečet výsledku. Misky okamžitě zavíráme a na rovné podložce necháme ztuhnout. Pak misky otočíme dnem vzhůru a uložíme do chladničky do doby, než je budeme potřebovat.

Použití: jedná se o obohacenou půdu s univerzálním použitím vhodnou i pro náročnější mikroorganismy.

Saubouraud Dextrose Agar, složení (g/l) (23):

Pankreatický hydrolyzát kaseinu	5,0
Peptický hydrolyzát zvířecí tkáně	5,0
Glukóza	40,0
Agar	15,0
pH 5,6±0,2	

Příprava: řádně rozmíchat 65 g půdy v 1 litru destilované vody, zahřívát za častého míchání a povařit 1 min pro úplné rozpuštění, sterilizovat autokláfováním 15 min při 121°C. Necháme zchladnout asi na 40°C a rozléváme do připravených sterilních Petriho misek. Hladina by měla dosahovat maximálně do poloviny výšky misky. Nikdy nelijeme misku plnou. Půda by měla pokrýt rovnoměrně dno a neměli by v ní být bubliny, které mohou zkreslit odečet výsledku. Misky okamžitě zavíráme a na rovné podložce necháme ztuhnout. Pak misky otočíme dnem vzhůru a uložíme do chladničky do doby, než je budeme potřebovat.

Použití: je půdou obohacenou sacharidy. Její další složky jí však ve své podstatě mohou dodávat selektivní charakter. Kromě glukózy může obsahovat také maltózu. Nízké pH a případně i možné ATB přídavky

potlačují růst většiny bakterií. Proto na této půdě rostou především kvasinky a jiné houby.

China Blue Laktose Agar, složení (g/l):

Pepton	5,0
Lab-Lemco' powder	3,0
Laktóza	10,0
NaCl	5,0
China Blue	q.s.
Agar	12,0
pH 7,0±0,2	

pozn.: q.s. = dostatečné množství

Příprava: řádně rozmíchat 35 g půdy v 1 litru destilované vody, zahřívát za častého míchání a povařit 1 min pro úplné rozpuštění, sterilizovat autoklávováním 15 min při 121°C. Necháme zchladnout asi na 40°C a rozléváme do připravených sterilních Petriho misek. Hladina by měla dosahovat maximálně do poloviny výšky misky. Nikdy nelijeme misku plnou. Půda by měla pokrýt rovnoměrně dno a neměli by v ní být bubliny, které mohou zkreslit odečet výsledku. Misky okamžitě zavíráme a na rovné podložce necháme ztuhnout. Pak misky otočíme dnem vzhůru a uložíme do chladničky do doby, než je budeme potřebovat.

Použití: je standardní neinhibiční půdou pro diferenciaci a počítání bakterií v mléce. Slouží jako pH indikátor k rozlišení zkvašujících a nezakvašujících laktobacilů a zároveň neinhibuje koky. Po 18 hodinách kultivace při teplotě 35°C můžeme vidět:

Zkvašují laktózu	Modré	3-4mm	<i>Escherichia coli</i>
		1mm	<i>Staphilococcus sp.</i>
		0,5mm	<i>Streptococcus sp.</i>
Nezkvašují laktózu	Různé barvy		

GTK Agar, složení (g/l) (12):

Trypton nebo enzymatický hydrolyzát kaseinu	5,0
Kvasničný extrakt	2,5
Glukóza	1,0
Agar	15,0
pH 7,1±0,2	

Příprava: řádně rozmíchat 23,5 g půdy v 1 litru destilované vody, zahřívát za častého míchání a povařit 1 min pro úplné rozpuštění, sterilizovat autoklávováním 15 min při 121°C. Necháme zchladnout asi na 40°C a rozléváme do připravených sterilních Petriho misek. Hladina by měla dosahovat maximálně do poloviny výšky misky. Nikdy nelijeme misku plnou. Půda by měla pokrýt rovnoměrně dno a neměli by v ní být bubliny, které mohou zkreslit odečet výsledku. Misky okamžitě zavíráme a na rovné podložce necháme ztuhnout. Pak misky otočíme dnem vzhůru a uložíme do chladničky do doby, než je budeme potřebovat.

Použití: jedná se o obohacenou půdu s univerzálním použitím vhodnou i pro náročnější mikroorganismy.

Czapek-Doxov agar (SA), složení (g/l) (23):

Sacharóza	30,0
NaNO ₃	3,0
KH ₂ PO ₄	1,0
KCl	0,5
FeSO ₄	0,01
MgSO ₄	0,5
Agar	20,0
pH 5,5 ± 0,3	

Příprava: 55 g půdy se suspenduje v 1000 ml studené vody a nechá potřebnou dobu bobtnat. Po rozvaření v proudící páře při 100°C se pH upraví na 5,5 – 5,8. Sterilizuje se 20 min jen při 115°C. Necháme zchladnout asi na 40°C a rozléváme do připravených sterilních Petriho misek. Hladina by měla dosahovat maximálně do poloviny výšky misky. Nikdy nelijeme misku plnou. Půda by měla pokrýt rovnoměrně dno a neměli by v ní být bubliny, které mohou zkreslit odečet výsledku. Misky okamžitě zavíráme a na rovné podložce necháme ztuhnout. Pak misky otočíme dnem vzhůru a uložíme do chladničky do doby, než je budeme potřebovat.

Použití: Zapek-Doxonův agar se používá ke kultivaci saprofytických plísní a kvasinek. Má podobné vlastnosti jako Saubouraudův agar. Jako substrát ale obsahuje sacharózu.

Lakmusové mléko (Litmus Milk), složení (g/l) (23):

Sušení sbírané mléko	100,0
Lakmus	0,5
Na ₂ SO ₃	0,5
pH 6,8 ± 0,2	

Příprava: 101 g půdy se rozmíchá v 1000 ml destilované vody a za stálého protřepávání se rozplní po cca 10 ml do bakteriologických zkumavek. Sterilizuje se jen 5 min při 121°C. Nesmí se přehřát, jinak zkaramelizuje. Horká půda je redukována a proto bezbarvá. Klasické lakmusové mléko je udržovacím médiem pro bakterie mléčného kvašení.

Použití: je to médium, ve kterém můžeme pozorovat řadu změn v závislosti na aktivitě bakterií. Za barevné změny je odpovědný lakmus, který v této zkoušce nelze nahradit syntetickými barvivy. Další změny pozorujeme na samotném charakteru mléka.

Změna barvy	Změna mléka	Skupina mikroorganismů	
Růžová	Možné až sražení mléka až na kasein v čiré syrovátce	Zkvašující glukózu, laktózu	a <i>Lactobacillus acidophilus</i>
	Bouřlivé srážení za masivní produkce plynu		<i>Clostridium perfringens</i>
Modrá	Alkalizace za tvorby bazických aminů a čpavku	Proteolytické mikroby	<i>Alcaligenes faecalis</i>
	Alkalická koagulace s tvorbou měkké, namodralé sraženiny		
Průhledná	Peptonizace mléka	Bakterie produkující proteolytické enzymy	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	Mléko se při dně odbarví	Bakterie produkující reductázy	
Bílá	Mléko je beze změny	I tak může mléko obsahovat nejrůznější mikroorganismy	

4.7.5. Očkování

Přenos vzorku na nebo do kultivačního média se nazývá očkování. Podle charakteru mikroorganismů, které ve vzorku předpokládáme a chceme zjistit, můžeme použít různé způsoby.

Nejčastěji se používá metoda čárkování (viz obr.2). Misku si pomyslně rozdělíme na kvadranty. Ve zvoleném kvadrantu uděláme

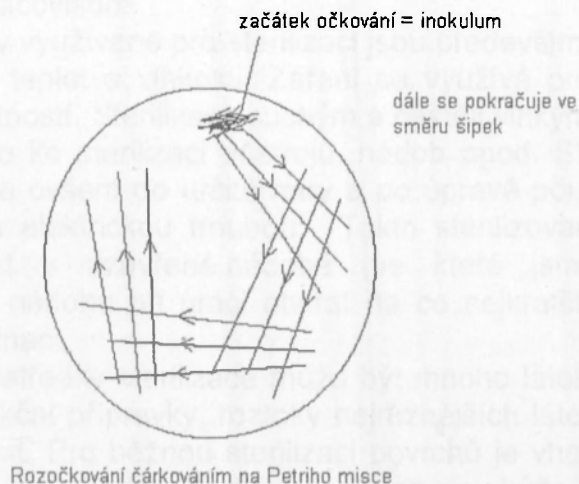
tzv. inokulum nebo-li začátek očkování. Z tohoto místa pak vedeme 3-4 čáry napříč pomyslným kvadrantem ve směru hodinových ručiček. Pak misku v tomto směru pootočíme a pokračujeme stejným způsobem v dalším kvadrantu (bez tvorby inokula). Čáry jednotlivých kvadrantů se na počátku překrývají. Tímto způsobem pokračujeme ještě dvakrát až vytvoříme obrazec jako na obrázku viz níže. Výhodou tohoto způsobu je, že se tak vzorek dále ředí a při velké koncentraci mikrobů ve vzorku takto získáme v závěru očkování jednotlivě izolované kolonie.

Další možností je zalévání. To je výhodné u bakterií anaerobních nebo fakultativně anaerobních. Na dno Petriho misky nalijeme 1 ml vzorku a ten zalijeme půdou. Půda by měla mít teplotu asi 40°C. To je teplota, při níž je půda ještě dostatečně tekutá a agar ještě netuhne a zároveň půda svou teplotou nezničí zkoumané bakterie.

Protože však většinou použijeme půdy již hotové, můžeme nahradit metodu zalévání vpichem do půdy. Sterilní jehlu namočíme do vybraného ředění a zapíchneme do půdy. Tímto způsobem můžeme demonstrovat růst bakterií za omezeného přístupu vzduchu. Pro tento způsob očkování je výhodnější použít půdu rozplněnou do zkumavek. V laboratořích se však takto používá tzv. šikmý agar. Půda se při přípravě nalije do zkumavky a ta se pak opře šikmo tak, aby byla půda dole asi 2 cm a nad ní byla šikmá hladina (viz obr.3). Hladina by však neměla dosahovat až k zátce zkumavky. Na šikmý agar očkujeme tak, že mikrobiologickou kličku namočenou do vzorku zapíchneme rovně dolů do půdy. Když ji z ní vytáhneme, rovnou namalujeme na povrch šikmé části půdy vlnovku. Po kultivaci tak vidíme chování bakterií v prostředí s i bez přístupu O₂.

Při cvičeních ve škole však není zcela nezbytné tato pravidla dodržovat. Děti mohou při práci na půdě udělat jen nepravidelný klikyhák. Je ale dobré, aby se děti při očkování snažily skutečně očkovat pouze na povrch půdy a pokud to není plánem, půdu nerozrušovaly. Tím se naučí pracovat s přiměřenou citlivostí a přesností.

Jako další variantu pro čistě kultivační zkoušky můžeme vyzkoušet otisky pevných vzorků nebo třeba prstů. Nikdy však neobtiskujeme rty nebo jazyk aby nedošlo k požití půdy. Zde můžeme použít výtěr, který provedeme sterilní vatovou tyčinkou namočenou do fyziologického roztoku. Tou potom očkujeme stejně jako očkovací kličkou.



Obr. 2 Očkování na pevné půdy metodou čárkování



Zkumavka se šikmým agarem

Obr. 3 Zkumavka se šikmým agarem

4.7.6. Sterilizace

Sterilizace se může provádět fyzikálními nebo chemickými metodami. Použití metody je závislé na tom, co chceme sterilizovat a jaké máme požadavky na účinnost metody. Dosáhnout absolutní

sterility je v praxi v podstatě nemožné a je to vyhrazeno jen velmi specializovaným pracovištím.

Fyzikální metody využívané pro sterilizaci jsou především různé typy záření a působení teplot a vlhkosti. Záření se využívá pro sterilizaci prostoru, např. místností. Sterilizace suchým a častěji vlhkým teplem se využívá velmi často ke sterilizaci nástrojů, nádob apod. Sterilizuje se v autoklávu, který je ovšem do určité míry a po úpravě použité teploty nahradit obyčejnou elektrickou troubou. Takto sterilizované nástroje musíme uchovávat v uzavřené nádobě (ve které jsme je také sterilizovali) a tuto nádobu při práci otvírat na co nejkratší doby, aby nedošlo ke kontaminaci.

Chemickými prostředky sterilizace může být mnoho látek. Jedná se o speciální dezinfekční přípravky, roztoky nejrůznějších látek, kyseliny, louhy, alkoholy apod. Pro běžnou sterilizaci povrchů je vhodné použití minimálně 70% ethanolu. Vždy je třeba dbát ochrany kůže a zdraví při práci s těmito agresivními prostředky.

Vzduch v místě práce je možno očistit od mikroorganismů jednak mechanicky prouděním vzduchu (odsávání) nebo plamenem při práci mezi dvěma hořícími kahany, jak již bylo zmiňováno.

Pro účely praktik není zcela nezbytné dodržovat všechna pravidla sterilní práce, ale zároveň je dobré, aby se žáci snažili dodržovat alespoň minimálně tato pravidla, protože zaručují přesnější výsledky.

4.7.7. Kultivace

Kultivace je proces, kdy vytváříme příhodné podmínky pro takové pomnožení mikroorganismů, aby tato činnost byla patrná pouhým okem.

Příhodnými podmínkami se rozumí správné chemické prostředí se všemi jeho parametry – tedy obsah živin a dalších látek, pH, složení atmosféry (O_2 , CO_2 , N_2 , apod.). Fyzikální vlivy jsou zastoupeny především optimální teplotou. Ta má spolu s ostatními složkami významný vliv na průběh a výsledek kultivace.

Teplotní optimum je teplota, při které je nárůst mikroorganismů za časovou jednotku největší. Tato hodnota je různá pro jednotlivé mikroby. U mikroorganismů uvádíme také teplotní rozmezí růstu. Je to rozmezí teplot, při kterých jsou bakterie ještě schopny růstu a rozmnožování, nebo ji alespoň dokáží přežít v deaktivovaném stavu, ale stále vitální. Toto rozmezí může mít různý rozsah. Podle toho dělíme mikroorganismy do tří skupin (viz slovníček pojmů: teplotní pásmo růstu mikroorganismů).

Při kultivaci v klinických oborech se nejčastěji využívá teplota $37^\circ C$. Při této teplotě se většina patogenů pomnoží během 24-72 hodin.

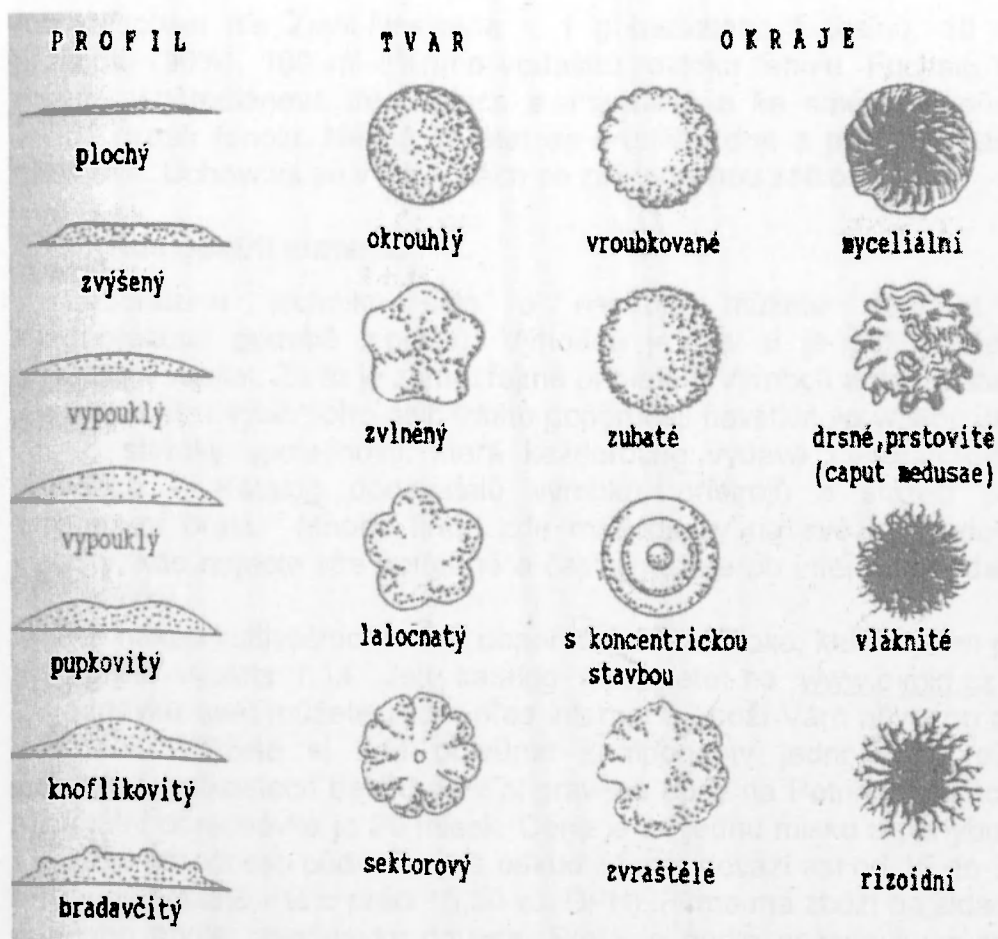
V potravinářské kontrole se standardně používají nižší teploty: 25°C pro kvasinky a plísně; 30, 35 a 37°C pro bakterie.

U každé zkoušky je uvedena teplota a doba kultivace. Pokud nemáte možnost kultivovat v inkubátoru se stálou teplotou, můžete kultivaci provést za teploty pokojové. Je však třeba uložit misky na místo, kde nebudou vystaveny světlu a výkyvy teplot budou co nejmenší. Je tedy vhodné pokus doplnit např. průběžným měřením teploty v místě kultivace.

Možností jak zajistit kultivaci v termostatu je také spolupráce s některou místní organizací, která termostat vlastní. Může to být laboratoř v místní nemocnici, hygienická stanice, velké potravinářské závody nebo potravinářské školy. Tuto variantu je také možné využít pro srovnání výsledků kultivace při optimální a pokojové teplotě.

Doba kultivace se podle teploty nejčastěji pohybuje okolo 48 hodin. Při nižší teplotě bude tato doba delší. Přesto při standardním rozvrhu hodin není možné druhá praktika pro hodnocení uskutečnit během jednoho týdne. v tomto případě můžeme kultivaci po kultivační době zastavit prostým umístěním ploten do chladničky. Růst bakterií se zpomalí nebo úplně zastaví. (Pozor ve výrobcích se mohou vyskytovat tzv. psychrofilní nebo-li chladnomilné bakterie, které mají teplotní optimum právě v rozmezí 0-15°C. Takže pokud se objeví po zastavení kultivace a umístění ploten v chladničce nové kolonie, může se jednat právě o tyto bakterie.)

Naočkované plotny se do termostatu ukládají dnem vzhůru. To proto, že při kultivaci se mohou uvolňovat vodní páry, které kondenzují především na víčku Petriho misky. Pokud by byla miska uložena víčkem nahoru, voda by stékala na povrch půdy a výsledek zkoušky by mohla zcela znehodnotit.



Obr. 4 Tvary kolonií (12)

4.7.8. Receptář roztoků a činidel

Fyziologický roztok, 0,9% vodný roztok NaCl – 90g NaCl se rozpustí v 1 litru destilované vody. Případně můžeme sterilizovat při teplotě 121°C po dobu 15 minut.

Krystalová violeť, (Gramovo barvení) – 5g barviva se rozpustí 200 ml 95 % ethanolu, 5 g šťavelanu amonného se rozpustí v 495 ml destilované vody, oba roztoky se smísí a přefiltrují papírovým filtrem.

Lugolův roztok, (Gramovo barvení) – 1g I a 2 g KI jemně rozetřeme ve třecí misce a za stálého tření rozpustíme v 300 ml destilované vody (příp. ve 240 ml destilované vody a na závěr přidáme 60 ml 5% vodného roztoku NaHCO₃).

Methylenová modř, (dle Loefflera) – 0,5g barviva se rozpustí ve 100 ml asi 50°C teplé destilované vody, přidá se 1 ml 1% vodného roztoku KOH a 30 ml 95% ethanolu. Směs se zfiltruje přes papírový filtr a nechá několik dní stát.

Zředěný vodní roztok karbolfuchsinu – 10 ml roztoku karbolfuchsinu dle Ziehl-Neelsena se zředí 90 ml destilované vody.

Karbofuchsin dle Ziehl-Neelsena – 1 g bazického fuchsinu, 10 ml ethanolu (96%), 100 ml 5%ního vodného roztoku fenolu. Fuchsin se rozetře v porcelánové třecí misce s ethanolem a ke směsi se přidá vodný roztok fenolu. Nechá se stát do druhého dne a pak se roztok přefiltruje. Uchovává se v lahvičkách se zabroušenou zátkou.

4.7.9. Kde opatřit materiál

Laboratorní techniku sklo a nástroje můžete obstarat i v jednorázové podobě z plastů. Výhodou je, že si je pak můžete objednat i sterilní. Za to je samozřejmě příplatek. Výrobců a dodavatelů je mnoho. Pro výběr toho nejbližšího doporučuji navštívit www.labo.cz. Jde o stránky společnosti, která každoročně vydává Laboratorního průvodce – Katalog dodavatelů výrobků, přístrojů a služeb pro laboratorní praxi. Mnoho firem zde má odkazy na své internetové stránky, kde najdete vše potřebné a často můžete po internetu zadat i objednávku.

Pro nákup kultivačních médií doporučuji firmu Dioxo, kterou jsem při své práci využila i já. Její katalog naleznete na www.oxid.cz. Objednávku opět můžete zadat přes internet a zboží Vám přivezou po celé ČR. Můžete si zde objednat komponenty jednotlivých půd v různých velikostech balení ale i připravené půdy na Petriho miskách. Minimální objednávka je 20 misek. Cena je za jednu misku a pohybuje se podle náročnosti půdy a místa odkud ji firma dováží asi od 15 do 30 Kč (půdy použité v této práci 15,50 vč. DPH). Firma má zboží na skladě nebo ho podle objednávky doveze. Proto je podle požadavku různá dodací lhůta, maximálně však kolem 3 týdnů. S tím je třeba počítat při plánování zařazení úlohy do výuky.

Další odkazy viz příloha č.1.

5. Diskuze

Motivací pro volbu tématu mojí diplomové práce byla v první řadě moje frustrace z toho, že jsem se na gymnáziu s mikrobiologií podle mého názoru setkala velmi málo. Při studiu na vysoké škole byla výuka mikrobiologie také dosti chudá. V tom vidím i příčinu, proč se s mikrobiologií na školách tak často nesetkáme. Učitelé většinou nemají dosti zkušeností a erudice pro zařazení laboratorních prací z mikrobiologie. Studenti pedagogické fakulty nejsou dostatečně vybaveni pro to, aby mohli takováto praktická cvičení do výuky zařadit.

Práce v mikrobiologické laboratoři má svá specifika. Je třeba co nejpřesněji dodržovat mnoho pravidel. Jejich upevnění vyžaduje množství opakování. Čím častěji člověk v laboratoři pracuje, tím je jeho pracovní postup efektivnější a tím také pracujeme s menší relativní chybou. Přiznávám, že tato zkušenost není pro zařazení praktických cvičení z mikrobiologie do výuky zcela nezbytná. Přesto podle mě má velký vliv na sebevědomí učitele v tomto směru.

Mohu říci, že ani výuka mikrobiologie na lékařských fakultách není příliš rozsáhlá. Deficit zde opět vidím především v praktické části výuky. Technika laboratorní práce bývá tedy vyhrazena specializovaným laborantkám. Při jejich práci je přesnost rozhodující. Laborantky se vzdělávají na specializovaných středních školách. Také na mnoha středních školách především s potravinářským zaměřením se žáci těmto dovednostem učí. Je podle mě škoda, že žáci vzdělávající se ve školách s všeobecným zaměřením se s touto problematikou setkávají pouze okrajově.

V dnešní době se ozývá čím dál více hlasů volajících po tom, aby výuka biologie byla více zaměřena na praktické poznatky, dovednosti a vědomosti. Praktický aspekt ve výuce biologie je však často těžké dodržovat. A co je vlastně praktické ve výuce biologie? Je důležitější, aby žáci dobře poznali jednotlivé organismy, aby znali spíše ekologické aspekty jejich života, nebo je důležitější znát systematické vztahy mezi jednotlivými organismy? Podle mne záleží především na tom, co daného člověka zajímá a zda se bude chtít studiu biologie také dále věnovat. Každý by však měl být schopen rozumět alespoň základním principům života v přírodě jako v systému.

Je velikou škodou, pokud dnes již žáci stěží rozeznají např. sýkoru koňadru od parukářky. Je sice hezké poznat slona, lva, tygra nebo šimpanze, ale mělo by být také pravidlem, že víme, kdo žije v našem sousedství. Mikroorganismy v našem sousedství žijí i v případě, že přírodu velmi ničíme. Nikdy se jich nezabýváme a také, ačkoliv nám to některé televizní reklamy tvrdí, to není žádoucí. Mikroorganismy jsou naši přátelé i nepřátelé. Bohužel většina z nás je vnímá pouze záporně.

Přesto nebo právě proto mají stejné právo na to, aby se o nich žáci ve škole učili a aby je znali a někdy také poznali.

Samozřejmě je vždy nejlákavější, pokud můžeme to, o čem se učíme také přímo pozorovat. S možnostmi dnešní techniky jistě není problém žákům zprostředkovat demonstraci jakékoliv přírodniny či organismu a to přímo v jeho životním prostředí. Podle mého názoru však není vhodné používat obraz tam, kde můžeme ukázat rostlinu. Použít video tam, kde můžeme ukázat přímo živočicha. Nebo fotografií nahradit přímé pozorování. Přesto uznávám, že vzhledem k tradičnímu koncipování rozvrhu ve většině škol a k standardním hodinovým dotacím pro přírodní vědy a biologii, je často velice těžké tuto krásnou myšlenku uvést do praxe. Na učitele jsou kladeny požadavky standardu vzdělávání a navíc je třeba dostát také požadavkům navazujících škol na výchozí vybavenost žáků.

Třída není kompaktní těleso složené pouze z milovníků přírody. Přesto si myslím, že mnoho skvělých pedagogů nadšených pro svůj obor a zároveň soudných ve svých požadavcích na výkon žáků, je schopno zprostředkovat svým žákům alespoň část ze svého nadšení. A nadšení je asi nejdůležitějším požadavkem. Pokud je učitel nadšeným obdivovatelem přírody, dokáže vytvořit pestrou výuku, která žáky baví.

Mikrobiologie v tomto ohledu klade hlavní nároky na toto pedagogovo nadšení. Myslím si, že samotná cvičení z mikrobiologie nejsou tak časově a organizačně náročná jako např. příprava přírodovědné exkurze. Přesto se na školách častěji setkáme s přírodovědnými expedicemi než s mikrobiologickými praktiky. Proč je tomu tak?

Odpověď na tuto otázku vidím především ve třech problémech, a to v nedostatku zkušeností s laboratorní prací, nedostatkem literatury a nedostatkem technického zázemí pro takováto cvičení.

První problém byl již několikrát zmíněn na začátku této úvahy. Mnoho pedagogů je ze školy nedostatečně připraveno pro tuto problematiku.

Druhý problém se snaží alespoň částečně řešit tato práce. Není zcela pravdou, že literatura není. Problém je složitější. Vhodná literatura je natolik stará, že učitel na základní nebo střední všeobecné škole k ní nemá přístup. Odborné školy stále ještě pracují s touto literaturou (jak jsem se při své praxi přesvědčila), ale i zde se objevuje požadavek novějších vydání nebo nové literatury. Nová literatura dostupná v tomto oboru je naopak pro pedagogickou praxi na základních a středních školách použitelná jen s výhradami. Hlavní nevýhodou jak pro učitele tak pro žáky je její přílišná odbornost. Texty nejsou vhodné pro žáky a učitel pokud s nimi chce pracovat, musí tyto texty upravovat. Bohužel ne každý je schopen odlišit skutečně podstatné informace od těch

méně důležitých a to především tehdy pokud je vybírá z příliš odborného textu, kterému někdy ani sám příliš nerozumí.

I třetí problém se snaží tato práce alespoň okrajově řešit. Ne vždy je třeba disponovat termostatem přímo ve škole, sterilizaci je také možné řešit i náhradními způsoby. I zde může nadšení a snaha učitele nahradit technické nedostatky.

Proč je tedy výuce mikrobiologie ve škole věnováno tak málo času? Možná proto, že mikroorganismy nejsou vidět. Jejich přítomnost si uvědomíme až ve chvíli, kdy nám způsobí nějakou škodu. Člověk je tvor, který většinu informací získává zrakem a pro ten jsou mikroorganismy skryté. Abychom je viděli, musíme si pomoci. Ale proč to dělat, když je tolik věcí, na které se můžeme dívat přímo a bez „práce“. Možná proto, že nám bakterie častěji pomáhají, než ubližují, a proto by si zasloužili, abychom si jich více vážili. A možná také proto, že v tom miniaturním organismu je všechno, co bakterie potřebuje k životu a všechno to skvěle funguje už několik miliónů let.

6. Závěr

V této práci jsem se nesnažila něco vyzkoumat. Možná je to chyba. Snažila jsem se však vyplnit mezeru, kterou cítím ve výuce biologie a která se mi zdála závažná. Téměř vše co je v této práci napsané již někdo vymyslel. Přínosem této práce ale má být dát tyto myšlenky, poznatky a dovednosti do jednoho textu, který bude přehledný, komplexní a užitečný. Práce je určena učitelům, kteří by rádi výuku obohatili o mikrobiologii, ale nemají dostatek zkušeností, znalostí a dovedností k tomuto úkolu.

Práce by měla učiteli pomoci při řešení již zmíněných problémů s realizací laboratorních cvičení z mikrobiologie. Předpokládám však tvůrčí přístup učitele při práci s tímto textem. Volba materiálu i organizace práce je na učiteli. Stejně tak využití možností kultivace jako takové při práci i s jinými potravinami nebo přírodninami.

Podarilo se mi prokázat, že při kultivaci za optimálních podmínek je možné každý mléčný výrobek, a kysané mléčné výrobky zvláště, použít jako zdroj životaschopných bakterií, kvasinek nebo plísní.

Bohužel se mi nepodařilo ověřit provedení cvičení v praxi, přesto v tom nevidím zásadní nedostatek. Cvičení byla navržena s využitím návodů, které jsou běžně používány na školách nejrůznějšího typu a zaměření. Podobné kultivační zkoušky se dokonce vyskytují v populárně naučných knihách navrhujících zábavné činnosti s dětmi. V těchto knihách však chybí zásadní informace o způsobu získávání materiálu a pomůcek pro takovou práci.

Myslím si, že předložený text je dostatečný pro základní potřebu učitele v praxi. Může sloužit i jako zdroj informací z potravinářské mikrobiologie a tím umožnit jejich využití ve výuce. Přesné určení bakterií podle zařazených klíčů sice vyžaduje provedení nejrůznějších zkoušek, jejichž postupy z důvodu limitovaného rozsahu nejsou součástí této práce, přesto si myslím, že ani tato skutečnost neubírá práci na její komplexnosti. V praxi se často v diagnostice využívá především makroskopického a mikroskopického vyšetření kultivovaných kolonií.

Praktická cvičení jsou pro mnoho žáků atraktivním způsobem výuky a já doufám, že by moje práce mohla přispět k tomu, že tato metoda bude do výuky zařazena častěji a s novými mikrobiologickými tématy.

Slovníček

Tato práce je určena pro potřeby vyučujících v biologických oborech, proto předpokládám, že biologicky vzdělaný člověk většinou termínů rozumí. Přesto zde zařazuji, z mého pohledu, nejdůležitější pojmy, vztahující se k tématu potravinářské mikrobiologie. S některými se v textu dále setkáme, zbývající jsou výběrem např. pro přípravu úvodní hodiny.

Ucelenější přehled najdete v použitých slovnících, viz seznam literatury.

A

- *Acidofilní mikroorganismy* – obecné pojmenování mikroorganismů, rostoucích v kyselém prostředí v rozmezí pH 1,5 až 6,5.
- *Aerobní mikroorganismy* - mikroorganismy závislé na přístupu kyslíku.
- *Agar* – název je převzat z malajštiny a znamená želé. Je komplexní polysacharid získaný ze stélek mořských řas. Používá se jako ideální prostředek ke ztužování tekutých živných půd. Bod tání je kolem 95°C, zatímco roztaven tuhne při teplotě kolem 40°C. po ztuhnutí vylučuje tzv. agarovou vodu. Do živných půd se přidává 2 – 3 %. Agarové půdy s pH menším než 6 nesmíme tepelně sterilizovat. Došlo by k hydrolýze agaru.
- *Anaerobní mikroorganismy* - mikroorganismy rostoucí bez přístupu kyslíku, kyslík jejich růst inhibuje.
- *Autolýza, autolyzát* - poškození a rozložení buněk jejich vlastními enzymy a produkt tohoto pochodu.

B

- *Bujon* - hovězí vývar, klasické tekuté médium pro kultivaci bakterií.

Č

- *Čisté kultury mikroorganismů* – jsou takové, které jsou získány rozmnožením jediné buňky mikroorganismu. Přípravují se izolačními metodami, které dělíme na metody makroskopicky kontrolovatelné, tj. izolace litím ploten, čárkováním, roztěrem, nakapáváním, apod., a na metody mikroskopicky kontrolovatelné, tj. izolace ve vlhké komůrce metodou Lindnerovou, Hansenovou nebo nejlépe izolace pomocí mikromanipulačního zařízení (mikromanipulátoru) a pro plísně monosporového zařízení (monosporového izolátoru).

E

- *Enteropatogenní mikroorganismy* – je označení pro takové mikroorganismy, které způsobují onemocnění jen při určité specifické cestě nákazy.
- *Enterotoxiny* – jsou tvořeny tzv. enterotoxinogenními bakteriemi v lumen střeva, nevstřebávají se do oběhu, na střevní epitel působí jen lokálně a parenterálně, tj. mimo střevo jsou neúčinné. Zvyšují sekreci vody a elektrolytů střevním epitelem a tím vyvolávají charakteristické průjemy.
- *Eumikrobie* – představuje optimální fyziologické složení autochtonní, tj. původní, přirozené mikroflóry člověka, která je významným faktorem rezistence (nespecifické imunity) proti patogenním mikroorganismům. Jakékoliv porušení této eumikrobie, např. vlivem nesprávné výživy, působením antibiotik apod., dochází k tzv. dismikrobii, která naopak poskytuje příznivé podmínky pro vývoj patogenních mikroorganismů.

F

- *Fakultativně anaerobní mikroorganismy* – jsou takové, které mohou růst jak za přístupu tak i za nepřístupu kyslíku, a proto energii mohou získávat kvašením nebo aerobní, popř. anaerobní, respirací. Za aerobních podmínek se většinou rozmnožují rychleji, protože aerobní metabolismus je účinnější než anaerobní.
- *Fruktifikace* - tvorba plodů.

G

- *Gramovo barvení bakterií* – název podle dánského badatele Christiana Gramma. Jsou diferenciační barvení na rozlišení grampozitivních – G+ a gramnegativních – G- bakterií. Bylo zavedeno Dánem Gramem již v roce 1884. Principem tohoto barvení je, že u G+ bakterií se vytvoří trifenylnetanovým barvivem (krystalová violet) a jodidem draselným komplex nerozpustný v ethanolu nebo acetonu, kdežto u G- bakterií je tento komplex rozpustný. Bakterie G+ jsou tedy po obarvení modro fialové, bakterie G- se dobarvují fuchsinem a jsou tedy růžové. Nacházíme také gram labilní bakterie, které se barví pouze zčásti a v preparátu je tedy vidíme barevně mezi G+ a G- (může být způsobeno stářím bakterií).

H

- *Heterofermentativní bakterie* - sacharidy zkvašují mléčnou, octovou, mravenčí, propionovou, máselnou kyselinu, oxid uhličitý a ethanol.

- *Homofermentativní bakterie* - sacharidy zkvašují pouze na mléčnou kyselinu.

Ch

- *Chladový šok mikroorganismů* – nastává při jejich okamžitém přenosu z optimální teploty do teploty kolem 0°C. projevuje se ztrátou životnosti velkého podílu mikrobiální populace. Citlivost různých druhů mikroorganismu k chladovému šoku je však různá.

I

- *Imerze* – nahrazení vzduchové mezery mezi čelní čočkou objektivu mikroskopu a pozorovaným objektem vrstvou kapaliny většího indexu lomu.
- *Imerzní objektiv* – objektiv upravený pro použití imerze.
- *Inaktivace mikroorganismů* – znamená jejich převedení do klidové formy, za použití chemických, fyzikálních či biologických metod, které podstatně omezí jejich aktivní fyziologickou činnost. Zůstávají naživu bez fyziologických projevů (uchovávání potravin).
- *Indol* - 2,3 benzpyrrol, od něhož se odvozují biologicky významné sloučeniny. Společně se skatolem se vyskytuje ve střevech a stolici jako produkt rozkladu tryptofánových proteinů.
- *Inkubace* - proces, během něhož se v těle pomnoží cizí infekční mikroorganismus.
- *Inkubační doba* - interval mezi proniknutím infekčního zárodku do lidského organismu a rozvojem příznaků nemoci.
- *Inokulace* – znamená naočkování živné půdy mikroorganismy. Naočkovaná živná půda je pak tzv. inokulum.
- *Inokulum* – je označení pro mikroorganismy naočkované do sterilní živné půdy.
- *Involuční tvary mikroorganismů* – jsou neobvyklé a různě nepravidelné tvary, které mikroorganismy vytvářejí vlivem nepříznivého působení různých činitelů chemických, fyzikálních nebo biologických. Lze je zjistit poměrně často ve starých mikrobiálních kulturách.
- *Izolace mikroorganismů* – znamená vypěstovat je pouze z jediné mikrobiální buňky a oddělit je od všech ostatních mikroorganismů, ať již stejného, nebo jiného druhu. Cílem izolace je příprava biologicky čisté kultury mikroorganismů.

J

- *Jednorázová kultivace mikroorganismů* – je základní a nejčastější způsob kultivace. Při ní je sterilní živný roztok o daném počátečním

složení naočkován určitým počtem buněk daného mikroorganismu a za konstantních podmínek jsou buňky kultivovány, většinou do té doby, kdy v důsledku vyčerpání živin nebo nahromadění toxických metabolitů ustává růst a množení buněk.

K

- *Kataláza* - enzym rozkládající peroxid vodíku na vodu a molekulární kyslík.
- *KMV* - kysaný mléčný výrobek.
- *Koagulace* - stážení.
- *Koliformní bakterie* - bakterie stejného tvaru jako *E.coli*.
- *Konidie* – jsou pohyblivé buňky, které se oddělují z konců buněčných vláken některých bakterií. Z gonidií se tvoří nová vlákna buněk, která se obvykle shlukují za tvorby charakteristického hvězdicovitého seskupení, tzv. růžice vláken.
- *Konidiofor* - útvar nesoucí konidie.
- *Kontinuální kultivace mikroorganismů* – zvaná též průtoková kultivace nebo kultivace v proudícím prostředí. Spočívá v nepřetržitém pomalém přítoku živin k mikrobiální kultuře za současného nepřetržitého odebírání části kultury. Tím jsou zajištěny dlouhodobě optimální podmínky pro kultivaci. Pro tuto metodu musíme znát optimální rychlost růstu a množení kultivovaných mikroorganismů, jejich nároky na živiny, teplotu, pH a další činitele vnějšího prostředí a zajišťovat plynulé dodržování všech těchto podmínek po celou dobu kultivace.
- *Kompetice* - soutěž, mikroorganismy soutěží o to, který z nich bude za daných podmínek úspěšnější a více se pomnoží.
- *Kultivace mikroorganismů* – znamená jejich laboratorní pěstování v čistých mikrobiálních kulturách za podmínek, jež jsou pro ně optimální a zajišťují jejich dobrou virulenci. Virulence mikroorganismů je jejich správná životaschopnost s optimálními fyziologickými vlastnostmi. Základními kultivačními metodami jsou: stacionární kultivace, submerzní kultivace a kontinuální kultivace.
- *Kultura mikroorganismů* – kmen mikroorganismů, pocházející z jednoho mikroorganismu nebo z více mikroorganismů téhož druhu.

L

- *Lyofilizace* – je nejrozšířenější metoda dlouhodobějšího uchovávání čistých kultur mikroorganismů. Je založena na odebírání vody sublimací ze suspenze zmrazených mikrobiálních buněk ve vhodném médiu buď přidáním zmrazovadel, nebo použitím vakua. Vysušené – lyofilizované buňky můžeme uchovávat řadu let, aniž by utrpěla jejich životaschopnost.

M

- *Metula* - část těla plísně.
- *Mezofilní mikroorganismy* – jsou takové, které vyžadují teplotu zhruba mezi 15 – 45°C. Představují většinu všech mikroorganismů. U bakterií se optimální teplota růstu pohybuje nejčastěji okolo 37°C, u plísní a kvasinek kolem 25°C.
- *Mikroaerofilní bakterie* - bakterie, které ke svému růstu vyžadují přítomnost kyslíku jen v nízkých koncentracích, přičemž vyššími koncentracemi jsou ničeny. Tomu musí odpovídat i kultivační podmínky (např. 5% O₂, 10% CO₂)
- *Mikrobiální kolonie* – po naočkování jednotlivých mikroorganismů na povrch pevné živné půdy vzniká za příznivých podmínek z každé buňky jedna kolonie. Každá jednotlivá kolonie je pak tvořena potomky jedné buňky a je tedy v tomto smyslu buněčným klonem. Jako klon se označuje potomstvo vzniklé nepohlavní cestou z jedné buňky.
- *Mikroflóra* – je souborné označení pro mikroorganismy, žijící pohromadě v určitém prostředí.
- *Mikroorganismy* – jsou jednobuněčné nebo více buněčné organismy, které nejsou schopné tvořit funkční diferencované tkáně nebo pletiva. Jejich společným znakem jsou velmi malé rozměry (μm – mm). V systematice organismů jsou označovány jako Protophyta (Protista). Dělí se na Prokaryonta (sinice a bakterie) a Eukaryonta (řasy, houby – kvasinky, plísně, a protozoa). K mikroorganismům jsou zařazovány ještě viry – nebuněčné formy mikroorganismů.
- *Mléční kvašení* – způsobují tzv. mléčné bakterie, které ze sacharidů vytvářejí mléčnou kyselinu, popřípadě ještě různé jiné produkty. Podle toho je rozdělujeme na dvě velké skupiny:
 - 1.homofermentativní, které produkují mléčnou kyselinu jako hlavní produkt (*Lactobacillaceae* a *Streptococcaceae*).
 - 2.heterofermentativní, které produkují vedle mléčné kyseliny ještě mnoho různých zplodin. Mechanismus kvašení je stejný s ethanolovým až po tvorbu pyrohroznové kyseliny. Konečnou fází je přeměna kyseliny pyrohroznové na kyselinu mléčnou. Reakce je katalizována NAD-laktátdehydrogenázou.
- *Mycelium* - podhoubí, stavební součást hub. Je tvořeno vzájemně propletenými vlákny, která mohou být rozdělena přepážkami na jednotlivé buňky.

O

- *Obligátně aerobní mikroorganismy* – jsou takové, které pro svůj růst vyžadují přítomnost kyslíku v prostředí. Jejich metabolismus tedy označujeme jako aerobní respiraci.
- *Obligátně anaerobní mikroorganismy* – jsou takové, které pro růst vyžadují prostředí bez kyslíku. Ten jejich růst inhibuje. Vyznačují se buď fermentativním, nebo anaerobně respiračním metabolismem.
- *Očkování mikroorganismů* – znamená aseptické přenášení mikroorganismů do nového, živného a sterilního prostředí.

P

- *Pasterace* – je zvláštní forma tzv. neúplné sterilizace teplem. Používá se především u těch produktů a látek, u nichž by zahřívání na vyšší teploty měnilo jejich složení a jakost. Rozeznáváme pasterizaci: dlouhodobou (63-65°C po 30min.), krátkodobou (72-75°C po 15-20min.), vysokou – tzv. mžikovou (80-90°C několik sekund), uperizaci (vysoký a okamžitý ohřev až na 150°C s injekcí páry) nebo vakreaci (pasterace ve vakuu).
- *Patogenní mikroorganismus* - mikroorganismus způsobující chorobu.
- *Plotna* – slangový výraz, který se používá i v odborné literatuře. Označuje Petriho misku s živnou půdou, na které se provádí kultivace bakterií.
- *Psychofilní bakterie* - bakterie žijící za chladu, za nízkých teplot (teploty např. v chladničce). Např. salmonely, *Proteus*, *Pseudomonas aeruginosa*.

R

- *Růstová křivka mikroorganismů* – je grafické znázornění růstu a množení mikroorganismů v tekutém živném prostředí statické kultivace v závislosti na čase. Pro většinu mikroorganismů při takové kultivaci jsou typické tyto růstové fáze: 1.lag fáze (latentní – přizpůsobování se kultivačnímu prostředí), 2.fáze zrychleného růstu (pozitivně akcelerační), 3.fáze exponenciální (log fáze, logaritmičká), 4.fáze zpomaleného růstu (negativně akcelerační), 5.stacionární fáze a 6.fáze odumírání.
- *Růstové faktory mikroorganismů* – jsou látky, které vystupují zpravidla v úloze prekurzorů biosyntézy makromolekulárních sloučenin nebo enzymů, nezbytných pro růst. Mikroorganismy, které postrádají schopnost syntézy jednoho nebo více růstových faktorů označujeme jako auxotrofní. Prototrofní organismy mohou syntetizovat růstové faktory z jednoduchých složek. Růstovými

faktory jsou obvykle vitamíny, purinové a pyrimidinové báze a aminokyseliny.

- *Růstové konstanty mikroorganismů* – zahrnují specifickou rychlost růstu, generační dobu a rychlost rozmnožování. Tyto konstanty se odvozují matematicky, avšak jejich hodnoty je třeba chápat jako relativní, vycházející ze zjednodušeného pojetí růstu a rozmnožování mikroorganismů. Mají však nepostradatelný význam zejména v oblasti srovnávací fyziologie a genetiky.
- *Růstový cyklus bakterií* – představuje souhrn pochodů souvisejících s narůstáním buněk do určité velikosti a pak jejich rozdělení. Zvětšování velikosti buněk zahrnuje řadu biosyntetických pochodů, jejichž výsledkem je tvorba buněčných složek, především nukleových kyselin, bílkovin a ribozómů. Základním pochodem každého buněčného cyklu je replikace chromozomu. Oddělování chromozomu mezi mateřskou a dceřinou buňkou je umožněno růstem cytoplazmatické membrány, s níž je chromozom v kontaktu. Dokončení jednoho replikačního cyklu a rozdělení chromozomu je nezbytné pro tvorbu příčné přepážky bakteriální buňky, tzv. transverzálního septa.

S

- *Směsná kultura mikroorganismů* – je kultura, která obsahuje dva i více druhů mikroorganismů. Složení směsných kultur musí být přesně definované, neboť taková kultura může obsahovat jenom předepsané kmeny a to ve stanoveném poměru.
- *Spora* – je zvláštní, zárodečný útvar některých sporulujících mikroorganismů. Tvoří se na konci fáze jejich růstu a vyznačuje se značnou odolností k nepříznivým podmínkám prostředí. Procesu vytváření spor obecně říkáme sporulace. Rozlišujeme spory bakterií, kvasinek, plísní.
- *Sporangiofor* – je hyfové vlákno plísně nesoucí sporangium, ve kterém se vytvářejí endospory (sporangiospory). Část sporangiofogu zasahující do kulovitého sporangia se nazývá kolumela. Podle jejího tvaru lze určovat některé druhy plísní.
- *Sporangium* – je zvláštní vakovitý útvar plísní, ve kterém vznikají endospory. Má kulovitý, hruškovitý nebo válcovitý tvar a je umístěno na jednoduchém nebo větveném sporangioforu. U některých druhů plísní je sporangium doprovázeno nebo nahrazeno drobnými sporangiolami, jež obsahují pouze 1 – 10 spor.
- *Sterigma* – jsou kuželovité nebo lahvicovité buňky. Odškrcující na konci exospory plísní, tzv. konidie. Stejně označení se používá pro stopky, na nichž se tvoří basidie.

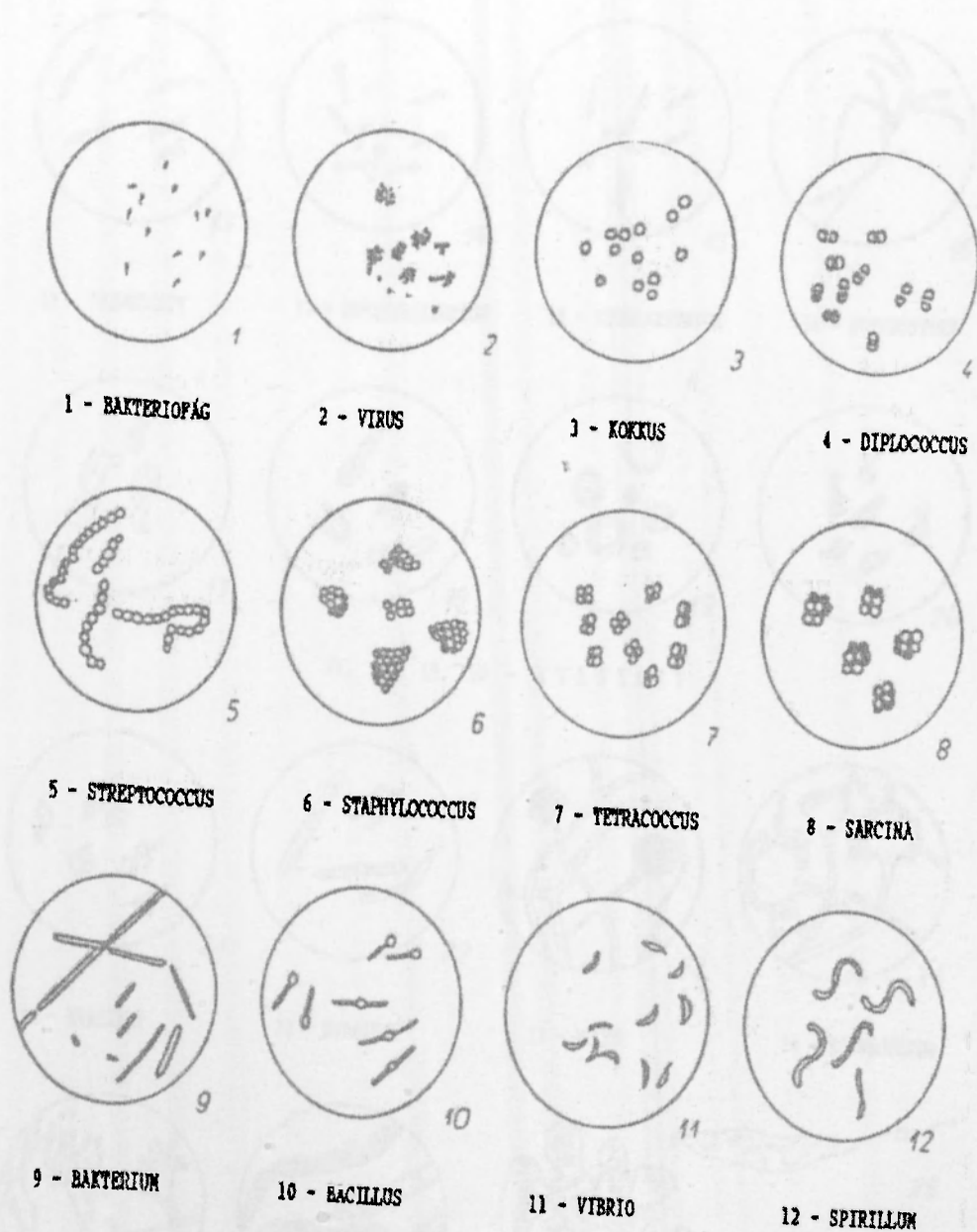
- *Sterilizace* – je pracovní postup, při kterém usmrcujeme veškeré vegetativní i nevegetativní formy mikroorganismů. Rozlišujeme několik typů podle způsobu provedení. V zásadě je to fyzikální a chemická sterilizace.
- *Submerzní kultivace mikroorganismů* – je kultivace v tekutých živných půdách v baňkách na třepacích strojích. Správné zavdušnění a míchání živných půd a v nich rostoucích mikroorganismů je jedním z hlavních činitelů, ovlivňující úspěšný průběh této metody. Touto metodou můžeme zvýšit fyziologickou činnost buněk a hlavně získat mnohem větší množství jejich metabolického produktu než při stacionární kultivaci.

T

- *Teplotní pásmo růstu mikroorganismů* – je rozmezí mezi maximální a minimální teplotou růstu mikroorganismů. Podle toho se mikroorganismy obecně rozdělují do tří skupin: 1. psychrofilní (chladomilné – i pod 0°C pokud není prostředí zmrzlé až do 15°C), 2. mezofilní (15 – 45°C – nejčastější), 3. termofilní (teplomilné – 45 – 70°C). Kromě toho existují mikroorganismy tzv. termotolerantní s teplotním rozmezím 5 – 70°C i více. Pásmo je velmi variabilní z hlediska druhů.
- *Termostat* – je speciálně upravený přístroj s vyhříváním vzdušným prostorem, využívaný převážně ke kultivaci mikroorganismů, které pro svou fyziologickou činnost potřebují nezbytně vyšší teplotu, nad 20°C. Aby se udržela konstantní teplota, je termostat opatřen tzv. termoregulátorem.
- *Termofilní bakterie* - bakterie vyžadující teplo, např. bakterie žijící v teplých pramenech.
- *Tvary bakteriálních buněk* - jsou značně různorodé. Znalost těchto tvarů je velmi často důležitá pro kvalifikaci jednotlivých bakterií do taxonomických skupin. Obecně podle tvaru rozlišujeme: 1. kulovité bakterie – koky, 2. tyčinkovité bakterie, 3. zakřivené bakterie – vibria, 4. vláknité bakterie a 5. větvičkové bakterie. Dále viz obrázek.

V

- *Volutinová zrna* - metachromatická zrna objevující se v cytoplazmě bakterií a kvasinek zvi. při nedostatku některých živin.



Obr. 5 Tvary bakterií (12)



13

13 - SPIROCHETY



14

14 - KORYNEBACTERIUM



15

15 - MYKOBACTERIUM



16

16 - AKTINOMYCES



17



18



19



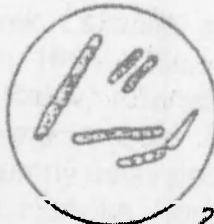
20

17, 18, 19, 20 - KVASINKY



21

21 - KVASINKY



22

22 - KVASINKY



23

23 - MUCOR



24

24 - ASPERGILLUS



25

25 - PENICILLIUM



26

26 - GEOTRICHUM



27

27 - AMOEBE



28

28 - MASTIGOPODA



29

29 - INFUSORIA

Obr. 6 Tvary bakterií, kvasinek a plísni (12)

Bibliografie

Teoretické publikace

1. *Historie mlékárenství v Čechách a na Moravě*. 1. vyd. Praha: Milpo, 1998. 279s. Z historie průmyslu. ISBN 80-86098-07-9.
2. Likner, Ladislav. *Historie mlékárenství v Čechách a na Moravě*. 1. vyd. II.díl. (1945-2000). Praha: Milpo Media, 2001. 219s. Z historie průmyslu. ISBN 80-86098-19-2.
3. Toussaint-Samat, Maquelonne, Bell, Anthem. *A history of food: [Orig. Historie naturele & morale de la nourriture]/Maquelonne Toussaint-Samat; translated from the French by Anthem Bell*. reprint. Cambridge, MA: Blackwell Reference, 1993. 801s. ISBN 0-631-17741-8.
4. *Universum/ Euromedia Group; všeobecná encyklopedie*. 1.díl. 1. vyd. Praha: Odeon, cop.2000. 681s. il. ISBN 80-207-1062-0.
5. *Universum/ Euromedia Group; všeobecná encyklopedie*. 5.díl. 1. vyd. Praha: Odeon, cop.2000. 681s. il. ISBN 80-207-1062-0.
6. *Universum/ Euromedia Group; všeobecná encyklopedie*. 6.díl. 1. vyd. Praha: Odeon, cop.2000. 681s. il. ISBN 80-207-1062-0.

Mikrobiologické publikace

7. Bednár, Marek. *Lékařská speciální mikrobiologie a parazitologie*. Praha: Triton, 1994. 226s.: obr., tab. ISBN 80-901521-4-7.
8. Dědek, Miroslav, Benešová, Luisa, Šmejkalová, Zdena. *Mikroorganismy a čisté kultury v průmyslu potravin*. 1. vyd. Praha: Výzkumný ústav potravinářského průmyslu, 1984. 217s.
9. Dragounová, Hedvika. *Hodnocení jakosti mléka a mlékárenských výrobků: návody pro praktická cvičení*. 1. vyd. Praha: Česká zemědělská univerzita, Agronomická fakulta, 2003. 57s. Živočišná výroba. ISBN 80-86642-24-0.
10. Halamčiková, Alena, Vajdík, Josef. *Biologie pro 3. ročník střední průmyslové školy studijního oboru konzervárenství*. 1. vyd. Praha: SNTL, 1988. 195s.
11. Hampl, Bohuš. *Potravinářská mikrobiologie: vysokoškolská učebnice pro posl. fakulty potravinářské technologie VŠCHT v Praze a Bratislavě*. 1. vyd. Praha: SNTL, 1968. 276s. Řada potravinářské literatury.
12. Havlová, Jana, Jičínská, Eva, Hrabová, Hana. *Mikrobiologické metody v kontrole jakosti mléka a mlékárenských výrobků*. 1. vyd. Praha: ÚZPI, 1993. 243s. ISBN 80-85120-37-2.

13. Hofman, Miroslav. *Biologie pro 3. ročník střední průmyslové školy potravinářské technologie: obor průmyslová výroba krmiv a mlynářství*. 1. vyd. Praha: SNTL, 1986. 181s.
14. Hylmar, Bohumil. *Zvyšování nutričních a dietetických vlastností mléka bakteriemi mléčného kvašení*. 1. vyd. Praha: VÚPP Středisko technických informací potravinářského průmyslu, 1985. 141s.
15. Lukášová, Jindra. *Hygiena a technologie mléčných výrobků*. 1. vyd. Brno: Veterinární a farmaceutická universita Brno, 2001. 180s. il. ISBN 80-7305-415-9.
16. *Obecná bakteriologie*. 1. vyd. Praha: SPN, 1981. 749s. Učebnice pro vysoké školy.
17. Šifner, František. *Vybrané kapitoly z biotechnologií: pro studující učitelství biologie a ekologické výchovy*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 1998. 145s. ISBN 80-7184-731-3.
18. Šilhánková, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. Vyd. 3., opr. a dopl., v nakl. Academia 1. vyd. Praha: Academia, 2002. 263s.: il. ISBN 80-200-1024-6.
19. Teplý, Miloš, et al. *Čisté mlékařské kultury: Výroba, kontrola, použití*. 1. vyd. Praha: NTL, 1984. 295s.
20. Tvrdoň, Milan. *Školní atlas mikroorganismů: pro 2. až 4. ročník středních průmyslových škol potravinářských*. 1. vyd. Praha: SNTL, 1978. 178s. Potravinářská literatura.
21. Tvrdoň, Milan. *Laboratorní cvičení mikrobiologická pro 2. ročník středních průmyslových škol potravinářských*. 1. vyd. Praha: SNTL, 1977. 88s. Řada potravinářské literatury.
22. Tvrdoň, Milan. *Atlas užitečných a škodlivých mikroorganismů v potravinářském průmyslu pro střední průmyslové školy potravinářské technologie*. 1. vyd. Praha: SPN, 1963. 213s. Učebnice odborných a středních odborných škol.
23. Votava, Miroslav. *Kultivační půdy v lékařské mikrobiologii*. 1. vyd. Brno: Nakladatelství Hortus, 2000. 408s. ISBN 80-238-5058-X.
24. Chumchalová, Jana, et al. *Miniatury mikroorganismů*. FPBT VŠCHT, PŘF MU, CCF-PŘF UK, CCM-PŘF MU. <http://www.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatury/index-b.htm>

Didaktické publikace

25. Baer, Heinz-Werner, Graf, Eberhardt, překl. Roubíček, Václav. *Biologické pokusy ve škole*. 1. vyd. Praha: SPN, 1965. 239s. Knižnice odb. lit. pro učitele.
26. Jelínek, Jan, Ticháček, Vladimír. *Biologie pro gymnázia: teoretická i praktická část*. 3. dopl. a oprav. vyd. Olomouc: Nakladatelství Olomouc, 1998. 551s. ISBN 80-7182-070-9.

27. Kalhous, Zdeněk, Obst, Otto. *Školní didaktika*. 1. vyd. Praha: Portál, 2002. 447s. ISBN 80-7178-253-X.
28. Kvasničková, Danuše, et al. *Ekologický přírodopis pro 7. ročník ZŠ a nižší ročníky víceletého gymnázia*. 1. část. 2. upr. vyd. Praha: Fortuna, 1999. 94s. ISBN 80-7168-423-6.
29. Kvasničková, Danuše, et al. *Ekologický přírodopis pro 7. ročník ZŠ a nižší ročníky víceletého gymnázia*. 2. část. 2. upr. vyd. Praha: Fortuna, 1999. 77s. ISBN 80-7168-440-6.
30. Kvasničková, Dana, et al. *Ekologický přírodopis pro 6. ročník ZŠ a nižší ročníky víceletého gymnázia*. 2. upr. vyd. – dotisk. Praha: Fortuna, 1997. 136s. ISBN 80-7168-385-X.
31. Maňák, Josef, Švec, Vlastimil. *Výukové metody*. 1. vyd. Brno: Paido 2003. 219s. ISBN 80-7315-039-5.
32. Pavelková, Jaroslava. *Oborová didaktika biologie a geologie: vybraná témata pro DPS učitelů VVP*. 1. díl. Praha: Pedagogická fakulta UK, 2002. 55s. ISBN 80-7290-086-2.
33. Průcha, Jan, Walterová, Eliška, Mareš, Jiří. *Pedagogický slovník: didaktika, ekonomika školství, nové formy ve vzdělávání... 4., aktualiz.* vyd. Praha: Portál, 2003. 322s. ISBN 80-7178-772-8.
34. Skalková, Jarmila. *Obecná didaktika*. 1. vyd. Praha: ISV, 1999. 292s. Pedagogika. ISBN 80-85866-33-1.
35. Švecová, Milada. *Nové směry v biologických oborech a jejich speciálních didaktikách*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2002. 193s. ISBN 80-246-0578-3.
36. Švecová, Milada. *Teorie a praxe zařazení školních projektů ve výuce přírodopisu, biologie a ekologie*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2001. 79s.: il. ISBN 80-246-0227-X.
37. Švecová, Milada. *Cvičení z didaktiky biologie I*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2000. 88s. il. ISBN 80-146-0000-5.

Ostatní dokumenty

38. Český normalizační institut. *ČSN ISO 690 (010197) Dokumentace – Bibliografické citace. Obsah, forma a struktura*. 2. vyd. Praha: Český normalizační institut, 1996.
39. Polach, Eduard. *Pravidla sazby diplomových prací*. České Budějovice, Pedagogická fakulta Jihočeské univerzity, 1998(aktualizováno 23.1.2000).
URL: <http://www.pf.icu.cz/~edpo/pravidla/pravidla.html>.
40. *Vyhláška č. 328/1997 Ministerstva zemědělství ze dne 11. prosince 1997, kterou se provádí § 18 písm. a), d), h), i), j) a k) zákona 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů, pro mléko a mléčné výrobky, zmrzliny a mražené krémy a jedlé tuky a oleje.*

41. Vyhláška č.91/1999 Ministerstva zdravotnictví ze dne 5. května 1999, kterou se mění vyhláška Ministerstva zdravotnictví č. 294/1997 Sb., o mikrobiologických požadavcích na potraviny, způsobu jejich kontroly a hodnocení.
42. Vyhláška č.294/1997 Ministerstva zdravotnictví ze dne 28. listopadu 1997 o mikrobiologických požadavcích na potraviny, způsobu jejich kontroly a hodnocení.
43. Vokurka, Martin, Hugo, Jan a kol. *Velký lékařský slovník*. 2.rev. vyd. Praha: Maxdorf 2002. 923 s. ISBN 80-85912-77-5.

Seznam příloh

Příloha 1

CD – obsahuje obrázky k jednotlivým částem a doporučení k praktickému ověření kvalitativních úloh

Příloha 2

Senzorické hodnocení jogurtových kultur

Seznam vyobrazení

Obr. 1 Ředění vzorků	str.60
Obr. 2 Očkování na pevné půdy metodou čárkování	str.68
Obr. 3 Zkumavka se šikmým agarem	str.68
Obr. 4 Tvary kolonií	str.71
Obr. 5 Tvary bakterií	str.85
Obr. 6 Tvary bakterií, kvasinek a plísní	str.86

Seznam příloh

Příloha 1

CD – obsahuje obrázky k teoretické části a dokumentaci k praktickému ověření kultivačních úloh.

Příloha 2

Senzorické hodnocení jogurtových kultur

Příloha 2*Senzorické hodnocení jogurtových kultur (19):*

Jogurtové výrobky a tedy i kultury můžeme hodnotit i bez použití mikrobiologických metod. Stačí trochu zkušenosti a vlastní smysly. Senzorické hodnocení kvality výrobku může mít pro konzumenta větší význam než hodnocení mikrobiologické. Jeho výsledek je v přímé souvislosti s mikrobiologickou kvalitou výrobku. Ve třech hodnocených kvalitách může výrobek získat celkem 20 bodů. V každé z těchto položek se udělují srážkové body podle následujícího přehledu. Čím více bodů výrobek získá, tím je kvalitnější a odpovídá technologickým a hygienickým požadavkům na kvalitu výrobku.

Hodnotíme:

Chuť: 14 bodů

Čistá, výrazně aromatická, jogurtová, správně kyselá

Srážkové body:

čistá jogurtová, nevýrazná

v aromaticčnosti:	jogurtová, středně aromatická	1 bod
	jogurtová, nepatrně aromatická	2 body
	jogurtová, bez arómatu	3 body
	prázdňá	4 body
v kyselosti:	slabě kyselá nebo slabě překysaná	1 bod
	nedokysaná nebo silně překysaná	2 body
cizí příchut':	smetanová, podle intenzity	3-6 bodů
	ostatní cizí příchut' kromě peptonizace a zatuchlosti	podle intenzity
	peptonizace a zatuchlost	7-10 bodů
	peptonizace a zatuchlost	14 bodů

Vůně: 3 body

Čistá, aromatická

Srážkové body:

slabě aromatická	1 bod
bez arómatu	2 body
cizí zápach	3 body

Film: 3 body

Typický, jogurtový

Srážkové body:

smetanový	1 bod
řidký, mléčný, ihned se silně trhá	2 body
neulpí vůbec na stěně	3 body

třída: 20 až 14 bodů, v chuti nejméně 11 bodů, bakteriologicky jen specifická mikroflóra

třída: 13 až 10 bodů, v chuti nejméně 9 bodů, bakteriologicky jen specifická mikroflóra

třída: 9 až 7 bodů, v chuti nejméně 7 bodů, bakteriologicky jen specifická mikroflóra

třída: 6 až 0 bodů, bakteriální kontaminace