

5. ročník (2020/2021)



# Experimentální bonus

Autorské řešení

**MUNI | RECETOX**  
SCI

**MUNI** Ústav  
SCI experimentální  
biologie

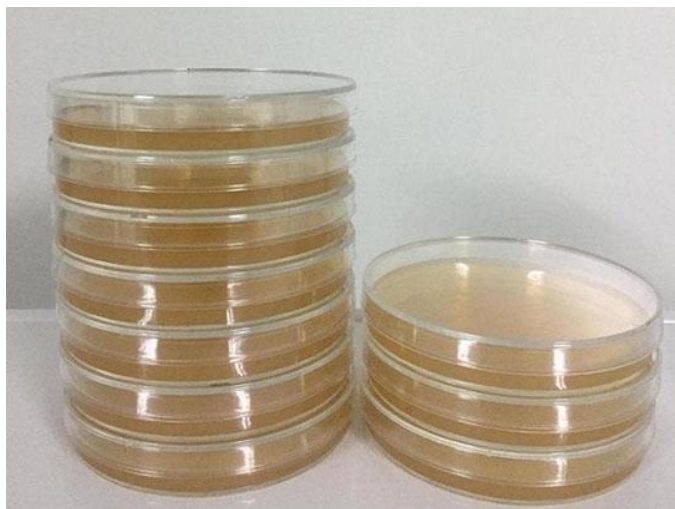
Daniel Pluskal (e-mail: pluskal.daniel@gmail.com)

## Kam za kulturou?

50 bodů

To je otázka, kterou si ve dnešní době společně s otázkou „Kdy už konečně za kulturou?“ pokládá snad každý z nás. Zatímco na druhou z těchto otázek sice neznají odpověď ani ti nejostřílenější epidemiologové, na tu první, která se příznačně stala také titulem letošní IBISí experimentální úlohy, vám může dát odpověď každý biolog – přece do mikrobiologické laboratoře!

Mikrobiální kultura, rozuměno jako jakýkoliv soubor mikroorganismů často ve společném prostředí a ponechán samovolnému vývoji za určitých podmínek, je totiž základem mikrobiologie jako oboru – a také mnohých dalších oborů pracujících s mikroorganismy, biotechnologií počínaje a medicínou konče; v každém z těchto oborů hraje kultivace mikrobiálních kultur stěžejní roli. Zatímco kultivace mikroorganismů pro výrobu všemožných kvašených, kysaných či kynutých pochutin je známa odedávna, kultivace mikroorganismů na úhledných agarových plotničkách, jak ji známe dnes, je metodou relativně novou. Po trošce bádání její kořeny vystopujeme do laboratoře významného německého mikrobiologa Roberta Kocha, jehož asistent Walther Hesse na radu své ženy Fanny roku 1882 začal kultivovat mikroorganismy na agaru namísto na želatině. A v návaznosti na tento objev vynalezl pro účel kultivace jiný Kochův asistent, Julius Richard Petri, dodnes nenahraditelné Petriho misky.



Sterilní Petriho misky s LB agarem

1. Jedním z příkladů přirozeně vznikající a historicky využívané mikrobiální kultury je tzv. „octová matka“. Jak tento útvar vypadá? Který mikroorganismus je za jeho tvorbu zodpovědný? A jak si „octová matka“ vysloužila své jméno? [1,5 b]

Takzvaná „octová matka“ je želatinu připomínající, průsvitný útvar, který se za přístupu kyslíku samovolně tvoří v kvasících alkoholických tekutinách. Barvu nabývá podle tekutiny, ve které vznikla (např. v červeném víně bude červená).

Za vznik octové matky jsou odpovědné octové bakterie, typicky bakterie rodu *Acetobacter*, které si kolem sebe vytvářejí jakési mikroklima, které do želatinové podoby zpevňují za použití celulózy.

Octová matka si své jméno vysloužila ještě v dobách, kdy lidé vůbec neměli ponětí, že nějaké mikroorganismy existují. Vznik octové matky v octovatějším alkoholu si neuměli vysvětlit, viděli však, že pokud z octa octovou matku vyndají, je schopná na ocet velmi rychle přeměnit i jakýkoliv jiný alkoholický nápoj, do které octovou

matku nebo i jen její kousek dají. Ocet se v jejich očích tedy uměl množit a ta divná želatinová věc, to byla jeho matka, z ní ocet vznikal.

2. Zamyslete se a zkuste vysvětlit, proč je pro mikrobiologii agar vhodnější želírující látka než želatina. Uveďte alespoň tři důvody. [1,5 b]

Agar má nad želatinou jednu obrovskou výhodu – taví se při daleko vyšších teplotách. Mikrobiální kultury se tedy mohou kultivovat v teplejších inkubátorech (v závislosti na konkrétním kultivovaném druhu), v průmyslu a ve výzkumu často při 37 °C – tedy teplotě, při které by se želatina už dávno roztavila. Želatina je také na rozdíl od agaru přesněji definovaná látka – zatímco želatina je směs různě hydrolyzovaného kolagenu a dalších proteinů, základ agaru tvoří definovaný polysacharid. Agar lze tedy principiálně připravit čistší a s lépe definovanými vlastnostmi (jako hustota, bod tání, bod želírování, difusní koeficient...) Tento polysacharid také není v přírodě úplně běžný, tvoří jej jen některé vybrané druhy, a proto jej drtivá většina mikrobiálních druhů neumí rozkládat a degradovat – kolagen se naproti tomu vyskytuje ve velkém množství organismů a mikroorganismy tak mají daleko lepší předpoklady pro jeho rozkládání. Další výhodou agaru je, že při stejné koncentraci je daleko pevnější a tužší než želatina – lépe se s ním pracuje. Agar lze také lépe vyrábět, můžeme zkrátka kultivovat řasu, ve které se agar přirozeně vyskytuje.

3. V praxi se pro kultivaci mikroorganismů nepoužívají pouze média pevná (agarová), ale i média tekutá (bez přidaného agaru, tedy netuhnou). Tyto dva typy médií se významně liší svým laboratorním využitím. Popište, jaký zásadní rozdíl je ve významu kultivace na pevném a v tekutém médiu. (Nápověda: představte si, že vysadíte naprosto stejnou kulturu do pevného a tekutého média o stejném složení (vyjma agaru samozřejmě) – jaký bude rozdíl ve výsledku kultivace?) [1 b]

Tekutá média se v laboratoři používají obecně tehdy, pokud potřebujeme mikroorganismy významně pomnožit: tekuté médium naočkujeme mikrobiální kulturou a mikroorganismy mohou růst – mají dobrý přístup k živinám, kyslíku, mají dostatek prostoru. Na druhou stranu je takové využití omezené – sklídíme, co jsme zaseli. Pokud tekuté médium naočkujeme mikrobiální kulturou, získáme nazpět stejnou mikrobiální kulturu, akorát koncentrovanější; selekce je sice možná, nicméně separace je buďto velmi základní, anebo naopak pracná a složitá.

Pevná média se naproti tomu používají spíše pro (semi)analytické účely. Pokud na pevné médium nasadíme mikrobiální kulturu, při optimálním naředění inokula nám narostou kolonie mikroorganismů jednotlivě – můžeme pozorovat jejich tvar, velikost, strukturu, profil, také např. počet a tak dále. Dále od sebe můžeme jednotlivé mikroorganismy odlišit – bylo inokulum čisté či smíšené? To, že nám kolonie mikroorganismů rostou jednotlivě, můžeme také využít pro přípravu čistých kultur – směsnou kulturu nasadíme na agar, necháme narůst, z média odebereme pouze jednu kolonii jediného mikrobiálního druhu. Další výhodou spojenou s dobrou separací a pozorovatelností je možnost přípravy selektivně-diagnostických agarů – chceme z kultury vyselektovat pouze G- bakterie a zároveň

rozlišit, jestli umí či neumí zpracovávat laktózu? Agar je pro takovéto komplexní separace ideální. Na rozdíl od tekutých médií však agar neumožňuje tak rozsáhlý růst kultury – mikroorganismy mají omezený přístup k živinám, prostoru...

Jak vám již jistě došlo z prvního, úvodního odstavce, letošní experimentální úloha bude zaměřena na kultivaci mikroorganismů na pevném živném médiu naší vlastní výroby.

**Práce s mikroorganismy s sebou přináší určitá specifická úskalí. Ještě předtím, než začnete se samotným experimentováním, si proto prosím dopředu pozorně přečtěte celé zadání – to proto, abyste věděli, proč děláte to, co děláte, a tím se vyhnuli zbytečným chybám. Obzvláště důležité poznámky hodné vaší zvláštní pozornosti budou podobně jako tato zvýrazněny tučně.**

## 23-19! Máme tu kód 23-19!

Základním problémem, se kterým se mikrobiologové při experimentování denně setkávají, je zajištění dokonalé sterility pracovního prostředí – nepotřebujeme, aby nám na miskách rostlo něco, co tam nepatří. V profesionální laboratoři je jakákoliv kontaminace cizorodými organismy nepřípustná, protože ovlivňuje a tím znehodnocuje pracně získané výsledky; při experimentování je tedy nutné důsledně dodržovat postupy aseptické práce. Se stejným problémem se při řešení této úlohy budete muset poprat i vy, a proto se nyní seznámíme s několika základními pravidly, která vám pomohou k dosažení co nejlepších výsledků.



*Aneb co se vám v laboratoři stane, když nastane kontaminace. Věřte mi. Fakt. Oholí vás. A ten límec taky dostanete.*

- **Vyberte si pro svou práci vhodné a klidné místo. Vaše pracovní místo by pokud možno mělo být vzdáleno od běžných zdrojů mikrobiální kontaminace, zejména rostlin, zvířat, lidí, zdrojů prachu a průvanu.**
- **Uvědomte si, že i vy jste potenciálním zdrojem kontaminace – při práci se snažte nemluvit (nepískat, nekašlat...) ve směru vašeho pracovního místa. Nad pracovní plochu se také nenaklánějte.**
- **Pracovní plochu před prací připravte. Povrchy vyčistěte běžným domácím čistícím prostředkem, případně vydesinfikujte např. alkoholovou dezinfekcí nebo Savem (pozor však na poškození nebo odbarvení povrchů!).**
- **Před prací si buďto důkladně umyjte ruce teplou vodou a mýdlem, anebo použijte jednorázové rukavice. Rukavice je nicméně také vhodné vydesinfikovat například alkoholovou dezinfekcí.**
- **Pro práci používejte pouze sterilní materiál. V případě této úlohy budete potřebovat:**
  - **Sterilní vodu. Tu připravíte tak, že technickou destilovanou vodu buďto převaříte (alespoň 30 minut), anebo ji umístíte ve vhodné nádobě do mikrovlnky, kde ji budete mikrovlnit na nejvyšší výkon 3–5 minut (takto sterilizujeme vždy pouze cca 250 ml vody jinak sterilizace nebude efektivní). Po skončení procesu nádobu s nyní sterilní vodou přikryjte alobalem, aby se do ní neprašilo.**
  - **Sterilní Petriho misky (resp. jejich domácí náhražku). V případě víček na zavařovací sklenice je minimálně 30 minut povařte ve vodě (kovové předměty nelze mikrovlnit). V případě jiné alternativy Petriho misek záleží na materiálu – kovové misky můžete povařit, plastové či skleněné přes noc ponořit do 10% roztoku Sava (po Savové koupeli je ale misky potřeba opláchnout sterilní**

vodou). Je také možné sehnat skutečné předsterilizované jednorázové Petriho misky vyrobené z plastu, kupříkladu v prodejnách zdravotnických potřeb (je ale potřeba mít dávku štěstí, zdaleka ne všechny prodejny Petriho misky vedou). Misky před použitím nechte uschnout tak, aby se na ně neprášilo (vnitřní stranou dolů na savém materiálu).

- **Sterilní vatové tyčinky (alias uchošťoury).** Vatové tyčinky jsou velmi dobře sterilní již z výroby, jsou přece jenom určené pro styk se sliznicemi. Pro práci však použijte nové balení vatových tyčinek, které otevřete pouze na jedné jeho straně – každá tyčinka tak bude mít jeden konec, který bude blíže místu otevření balení, tyto konce budeme považovat za nesterilní, za tento konec vatovou tyčinku uchopíte a vytáhnete z balení, a sterilní práci provádějte pouze druhým koncem vatové tyčinky.
- **Jakmile skončíte s prací, opět důkladně vyčistěte své pracovní místo a pečlivě si umyjte ruce teplou vodou a mýdlem, a to i v případě, že jste při práci použili rukavice.**

Jak jste již mohli pochopit, v domácnosti se vám s velkou pravděpodobností nikdy nepodaří dosáhnout dokonale sterilního prostředí, nikoliv bez vynaložení zbytečného úsilí. My to zcela chápeme a s určitou nesterilitou počítáme – do úlohy jsou pro posouzení dosažené sterility jak našeho média, tak dalších pomůcek a materiálu zařazeny také kontrolní experimenty a určitá nesterilita při postupu rozhodně nebude mít za následek jakoukoliv penalizaci při bodování. Mírná kontaminace tedy není důvodem pro zbytečné opakování experimentů, pokud tedy sami nechcete. Tolerance samozřejmě pouze do určité míry – pokud vám kontrolní miska, na kterou jste ani nic nenaočkovali, naroste více než zaočkované misky, bylo by vhodné experimenty zopakovat. Sečteno a podtrženo, snažte se dodržovat zásady sterilní práce co nejdůsledněji, protože chceme, aby získané experimentální výsledky měly určitou výpovědní hodnotu i přes naše provizorní provedení.

4. Pro rutinní sterilizaci roztoků a nástrojů se v laboratořích využívá buďto suchá, anebo mokrá sterilizace (také nazývaná jako sterilizace vlhkým teplem) prováděná ve speciálních sterilizátorech. Zatímco v případě suché sterilizace musíme sterilizovaný materiál zahřívat na 160–180 °C po dobu až dvou hodin, v případě mokré sterilizace využíváme vodní páru o teplotě 121 °C, kterou stačí udržovat pouze 21–23 minut. Jak je možné, že v případě mokré sterilizace stačí nižší teplota a zároveň kratší čas sterilizace? [1 b]

Při suché a mokré sterilizaci se liší médium, které sterilizované předměty zahřívá – zatímco v případě suché sterilizace se jedná o suchý vzduch, v případě mokré jde o přehřátou vodní páru. Vodní pára je daleko lepší médium pro přenos tepla než vzduch a předměty se prohřejí daleko rychleji než pomocí vzduchu. Další výhodou páry je, že lépe penetruje buněčné stěny i membrány a zahřívá tak efektivněji nejcitlivější části mikroorganismů. Dalším faktorem je odlišnost procesů, které při sterilizaci probíhají. V obou případech probíhá spontánní denaturace teplem, v případě suchého vzduchu se nicméně jedná pouze o oxidativní procesy, zatímco při sterilizaci párou dochází jak k oxidativním, tak i hydrolytickým reakcím.

5. Přestože je mokrá sterilizace v mnoha ohledech efektivnější než sterilizace suchá, taky má svoje limity. Zamyslete se a jmenujte tři příklady materiálu, pro který je využití mokré sterilizace nevhodné či nemožné, a stručně zdůvodněte vaši volbu. [1,5 b]

Mokrou sterilizací není možné obecně sterilizovat jakékoliv na vodu citlivé materiály, kupříkladu práškovité nebo ve vodě rozpustné látky (pára by je znehodnotila), kovové předměty obecně, obzvláště pokud jsou ostré (mokrý sterilizace značně urychluje jejich korozi, případně je tupí), dále materiály, které do sebe jsou schopné vodní páru pohlcovat, charakteristicky silikon nebo výrobky z něj. Dále takto nemůžeme sterilizovat oleje a jiné s vodou nemísící se látky (pára je efektivně nepenetruje), prázdné sklo (ze stejných důvodů, i při suché sterilizaci je potřeba teplota až 250 °C) a v neposlední řadě také elektronika (která je na vlhkost citlivá ze zřejmých důvodů).

6. Sterilizátory pro zmíněnou mokrou sterilizaci za zvýšeného tlaku se označují speciálním jednoslovným názvem. Stejný název se používá obecně pro chemické reaktory, ve kterých probíhají procesy za vysokého tlaku a teploty. Jak tento název zní? [0,5 b]

Reaktoru zajišťující průběh procesů s vysokou teplotou a tlakem se obecně říká autokláv.

Co budeme dělat, to už víme, nebo alespoň tušíme. Jak si přitom máme počínat, abychom předešli kontaminaci, to už víme také. Co nám tedy ještě zbývá? Nu, asi se do toho už konečně pustit. Začnemež.

**Pomůcky a materiál potřebné k úloze naleznete v seznamu na konci zadání.**

## Příprava agarových ploten

Agarové plotny, jak už víte, slouží k tomu, abychom mohli pozorovat či stanovovat organismy pouhým okem běžně nepozorovatelné. V praxi se nejčastěji jedná o Petriho misky, do kterých naléváme tenkou vrstvu živného média obsahujícího agar – želírovací agens sloužící k tomu, aby médium ztuhlo a vytvořilo nám tzv. plotnu, která bude sloužit jako substrát pro růst mikroorganismů; jedinou buňku mikroorganismu bez mikroskopu nepostřehneme, jakmile ale utvoří kolonii (soubor jedinců vzniklých z dělení jediné původní buňky), stává se pozorovatelnou. Agarové plotny mohou obsahovat nejrůznější kombinace látek a živin navržené pro všechny možné účely – my například usilujeme o kultivaci širokého spektra běžných a nenáročných bakterií a podle toho si volíme recepturu agarů: jako živiny nám v agaru poslouží masový bujon a sacharóza.



*Křížový roztěr bakteriální kultury na agarové plotně.*

7. V našem postupu budeme jako hlavní složku živného média používat masový bujon, který v průběhu přípravy ochudíme o tuk. V laboratorní praxi se používají podobné receptury, nicméně namísto masových bujonů vědci využívají pepton či trypton. O jaké látky se z hlediska charakteru a složení jedná? Jaký je mezi peptonem a tryptonem rozdíl? Jak se pepton liší od našeho masového bujonu v kostce? (Dejte si pozor, česká Wikipedie je v tomto tématu poněkud zmatená – např. anglický článek „tryptone“ vás nesprávně přesměruje na český článek „pepton“, jakoby šlo o zaměnitelné pojmy, což není pravda.) [1,5 b]

Pepton i trypton jsou směsi polypeptidů, které vznikly digescí proteinů nějakým trávicím enzymem nebo kyselou hydrolýzou. Pepton vzniká obecným štěpením bílkovin, trypton je specifickým druhem peptonu, který vzniká při štěpení nejčastěji kaseinu pomocí trypsinu. Pepton stejně jako náš masový bujon obsahuje proteiny, které byly různým způsobem hydrolyzovány – v případě peptonu zmíněnou enzymatickou nebo kyselou digescí. Masový bujon obsahuje proteiny hydrolyzované daleko méně, pouze varem ve vodě, a tak jsou aminokyseliny a další živiny z něj pro mikroorganismy hůře dostupné.

Nyní přistupujeme k přípravě našich agarových ploten. Recept v postupu je navržen pro přípravu zhruba 0,55 l tekutého agarového média, což pohodlně stačí k nalití 20 agarových ploten (= počet ploten potřebných pro všechny úkoly dohromady). V receptu je určitá množství rezerva, z připravovaného média byste byli schopni vyrobit cca 25 ploten, něco vám zbude, a proto ingredience není nutné nadhodnocovat; naopak, pokud byste si nebyli jistí, jestli např. některou z misek při nalévání/zpracovávání nepoškodíte nebo omylem

**nekontaminujete, lze misek ze stejného množství připraveného agarů nalít více. Vše je testováno se středně velkými víčky od zavařovacích sklenic<sup>1</sup> sterilizovaných třicetiminutovým varem.**

1. Pro přípravu ploten budete potřebovat 20 sterilních Petriho misek (případně více, viz výše). Misky si připravte dopředu podle postupu uvedeného v pokynech k metodě aseptické práce.
2. Do vhodného hrnce či jiné varné nádoby odměřte 600 ml nesterilní destilované vody. Do vody vhodte 1 kostku hovězího bujonu (12 g) a vodu zahřívajte např. na sporáku, dokud se bujon dobře nerozpustí.
3. Připravený bujon nechte vychladnout (aby tuk v něm obsažený zase ztuhl). Po vychladnutí bujon přefiltrujte přes jemné sítko anebo plátýnko do jiné čisté nesterilní nádoby, abychom z bujonu odstranili většinu tuku a také nerozpustné složky bujonu (koření, bylinky...).
4. Připravte si varnou nádobu o kapacitě optimálně 1 litr, ze které se vám budou dobře nalévat vaše agarové misky, případně kombinaci varná nádoba/nalévací nádoba kdy nalévací nádobu dopředu vysterilizujete (charakter nádob viz příloha; dle materiálu a charakteru nalévací nádoby postupujte při sterilizaci podobně jako v případě vašich Petriho misek).
5. Do vaší varné nádoby přelijte přecezený bujon. Do bujonu přidejte 5 g cukru a 6 g agarů. Bujon dobře promíchejte a nechejte pár minut stát.
6. Bujon s cukrem a agarem přiveďte k varu a bez zakrytí zvolna vařte 20-30 minut (část vody se odpaří). Bujon přitom často míchejte, aby se agar nepřichycoval ke dnu nebo netuhnul na hladině. Nástroj, kterým budete agar míchat, nikam neodkládejte – buďto jej nechávejte ponořený přímo v bujonu, anebo jej pokládejte na okraj varné nádoby, ve které bujon vaříte. Při tomto kroku totiž, kromě toho, že rozpouštíte agar, naše médium sterilizujeme a nechceme, abychom si do něj naším míchátkem zanesli kontaminaci.
7. Po uplynutí stanoveného času přestaneme agar zahřívát a dle pokynů k provádění aseptické práce si připravíme a dezinfikujeme pracovní plochu, na které budeme nalévat naše misky. Připravíme si také samotné sterilizované Petriho misky. Agar přitom necháme pozvolna chladnout. **Agar nesmí ve varné nádobě vychladnout zcela, jinak ztuhne!**

---

<sup>1</sup> Při testování byla použita víčka o průměru 8 cm a hloubce 1 cm, agar byl naléván maximálně do poloviny hloubky víčka (0,5 cm). Teoreticky na jednu takovou misku vychází maximálně  $\pi \times 4^2 \times 0,5 = 25,1$  ml agarů, pro 20 misek tedy asi 502 ml agarů. Prakticky to bude méně – naléváme méně agarů, nepočítáme s tloušťkou stěn víčka... Pokud máte své Petriho misky nějakých netypických rozměrů, můžete si takto snadno ověřit, jestli vám dané množství agarů bude pro přípravu stačit, a případně připravované množství přizpůsobit vašim miskám.

8. Jakmile agar trochu zchladne, naléváme jej do našich sterilních Petriho misek buďto přímo z rendlíku, anebo ho z varné nádoby přelijeme do sterilní nalévací nádoby a z ní teprve do misek. Agar naléváme v tenké vrstvě (do výšky maximálně 0,5 cm) tak, aby pokryl celé dno misky. Při nalévání postupujte tak, že do misky nalijete trochu agaru, misku uchopíte a jemně s ní zakroužíte, aby se agar rozlil po celém dně misky. Pokud bude v misce agaru stále málo, dolijete agar do požadovaného množství (takto dosáhneme pokrytí celého dna při menší tloušťce agarové vrstvy – agaru se při nižších teplotách může přestávat chytit dobře téct a pro pokrytí celého dna misky byste potřebovali nalít velmi tlustou vrstvu). Takto nalijeme celkem 20 misek (případně více dle vašeho uvážení).
9. Agar v miskách necháme vychladnout a utuhnout. Agarová média v koncentraci, kterou připravujeme my, tuhnou velmi rychle (zpravidla do 10 minut), po tuto dobu misky nemusíme přikrývat (misky přikryjeme pouze tehdy, pokud by se agaru z nějakého důvodu nechtělo tuhnout a museli byste ho nechat tuhnout déle – u agaru by se však tohle nemělo stát). **Agaru se nedotýkejte.**
10. Po vychladnutí agarové misky buďto ihned využijeme v dalších částech úlohy (doporučovaný postup), anebo misky přikryjeme a umístíme do chladu (např. umístíme na pekáč, přikryjeme druhým pekáčem a šoupneme na balkon).

Pokud jste v experimentování doputovali až sem, můžu vám říct – dobrá práce! Tímto máte za sebou tu nejobtížnější a nejpracnější část úlohy.

**Misky po přípravě a vychladnutí využijeme v dalších částech úlohy co nejdříve po přípravě (přestože misky skladujeme v chladu), nejlépe do dvou dnů od jejich přípravy. Jak jsem již zmiňoval, naše sterilní prostředí nikdy nebude zcela sterilní, stejně tak to platí pro naši metodu skladování. Něco „extra“ nám na miskách pravděpodobně stejně vyrostě, nicméně rychlou spotřebou našich misek dáváme mikroorganismům, které na misky naočkujeme my, náskok a početní převahu.**

**Misky společně s kontrolními miskami inkubujte všechny na jednom místě, agarem dolů (agarem dolů = závitem dolů, tedy tak, jak by víčko bylo obvykle nasazené na sklenici; činíme tak proto, aby se z agaru neodpařovala voda) za stejných a pokud možno stabilních podmínek. Pro inkubaci doporučujeme pokojovou teplotu a místo, kam nesvítí přímé sluneční světlo. Neinkubujeme tedy přímo pod radiátorem, kde se teplota skokově mění z pokojové na velmi vysokou podle toho, zda se zrovna topí nebo ne, nebo na okenním parapetu, kde nám mikroorganismy pozabíjí UV záření. Pod misky je vhodné umístit voděodolnou podložku, např. tácek nebo pekáč, kdyby náhodou. Misky inkubujeme, dokud zřetelně nepozorujeme narostlé kolonie, podle teploty zpravidla 3–7 dnů.**

## Základní test sterility

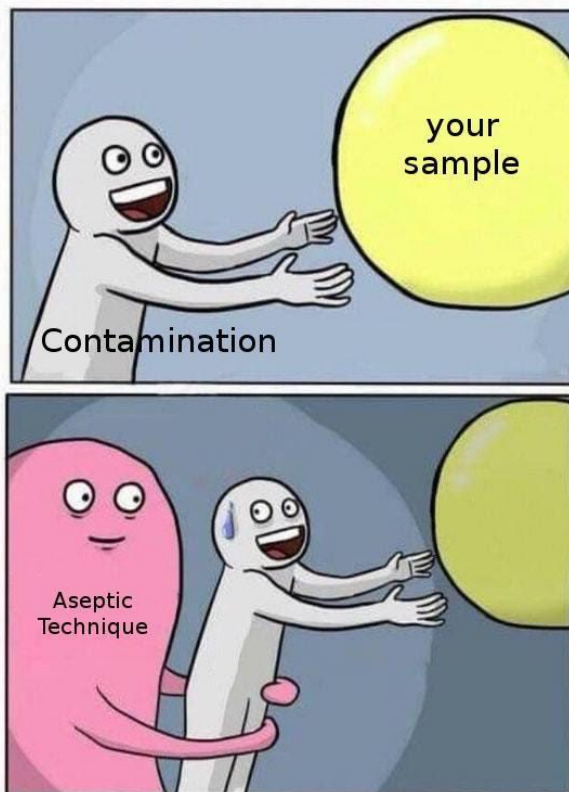
Jakmile máte své misky nalité, utužené a vychladlé, můžeme začít s mikrobiologií. Abychom si ale byli jistí, že na miskách nám skutečně roste pouze to, co tam chceme, musíme provést jednoduchou kontrolu sterility našich misek a materiálu. V této části úlohy si taky představíme, jak naše misky zapečetit a jak je inkubovat.

1. Přichystejte si dvě sterilní agarové plotny, sterilní destilovanou vodu a vatové tyčinky. Připravte si pracovní místo dle pokynů k provádění aseptické práce.

2. Jednu z misek nechte zcela prázdnou a nic s ní nedělejte – to bude naše kontrola sterility připravovaného média. Misku (na „vršek“ víčka) popište a zapečetěte potravinářskou fólií – stranu misky s agarem překryjte napnutou fólií a fólii z druhé strany (té „víčkové“) zakruťte a fólii přitom udržujte stále napnutou. Fólie se při zapečetění nesmí dotýkat agaru. Přebytečnou fólii odstříhněte. (Pro názornost se můžete řídit obrázkovým postupem v příloze 2, napoprvé si můžete postup vyzkoušet na prázdné misce bez agaru). Stejným způsobem zapečetujeme všechny misky. **Jakmile misku jednou zapečetíme, snažíme se ji již neotevírat – rostoucí mikroorganismy pozorujeme (a v rámci dokumentace fotografujeme) přes fólii.**

3. Vytáhněte vatovou tyčinku a její sterilní stranu namočte do sterilní destilované vody. Namočenou vatovou tyčinkou pak potřeme celý povrch agaru. Misku popíšeme a zapečetíme. Tato miska nám poslouží jako kontrola sterility naší vody a také vatových tyčinek.
4. Obě misky necháme inkubovat při pokojové teplotě agarem dolu společně s ostatními naočkovanými miskami.

**Jakmile začnete plotny očkovat podle pokynů v následujících úkolech, je dobré naočkovat misky pro všechny úkoly zaráz – použít k tomu stejné sterilní pomůcky, stejnou sterilní vodu, stejné podmínky, stejné všechno. Takto můžete pro všechny misky sdílet jedinou kontrolu sterility. Kdybyste některou část úlohy chtěli nebo museli zopakovat, vždy je potřeba současně s daným úkolem znovu provést kontrolu sterility.**



8. Přiložte fotografie svých kontrolních misek po inkubaci (jak kontrolu sterility média, tak vody a vatových tyčinek) – celkem tedy 2 misky. Pokud jste některé části úlohy opakovali, přiložte fotografie všech vytvořených kontrolních misek a dejte najevo, které kontrolní misky patří ke které části úlohy. [2 b]

Řešení individuální.

## Kulturní akce 1: Tour de Barák aneb Mikrobiologický screening domácnosti

Země je planeta života. A přestože život, který vidíme kolem nás, je z velké většiny buďto chlupatý, opeřený, šupinatý, bzučící anebo zelený, drtivou většinu veškerých živých organismů na zemi tvoří život, který nevidíme – mikroorganismy ve formě bakterií, kvasinek, plísní, mikroskopických hub a taky v mnoha dalších podobách – připravovali jste někdy v hodinách biologie třeba senný nálev? Jak vám ale musí být jasné, ne všude je mikroskopický život stejný – v půdě nalezneme jiné bakterie než ve vodě a ve vodě zase jiné než třeba na živočiších nebo rostlinách. My si nyní vytvoříme jakousi mikrobiologickou „mapu“ vaší domácnosti.



*Světznámý otisk ruky na agaru.*

Jak již bylo naznačeno, mikroorganismy, které vám na miskách vyrostou, jsou nedílnou součástí života každého z nás a pokud vám celá miska takřikajíc rozkvete, neznamena to nic špatného (ostatně takový výsledek čekáme) a rozhodně se nemusíte děsit nebo stydět – pouze to ukazuje, jak pestrý je mikrobiom okolo nás.

**Až na vzácné výjimky se na svých miskách setkáte s všedními a nepatogenními druhy mikroorganismů, které tvoří běžnou součást našeho života – v koncentraci, ve které vám ale vyrostou na miskách, mohou představovat biologické riziko. Vyhněte se tedy jakémukoliv přímému kontaktu s naočkovaným agarem a také s čímkoliv, co vám na něm naroste – ať už se vám to bude zdát jakkoliv heboučké a/nebo přítulné, prosím, nemazlete se s tím.**

1. Připravte si pět sterilních agarových ploten, sterilní destilovanou vodu a vatové tyčinky. Připravte si pracovní místo dle pokynů k provádění aseptické práce.
2. Vytipujte si pět míst ve vaší domácnosti, jejichž stěr provedete. Pro inspiraci, zajímavé a pěkné výsledky můžeme získat ze stěru např. počítačové myši či klávesnice, kliky u frekventovaných dveří, dálkového ovladače, zaprášené poličky, listu pokojové květiny, vypínače světla, displeje mobilního telefonu, vodovodní baterie... **Cíleně se prosím vyhýbejte stěrům z míst, kde můžete přímo očekávat výskyt patogenních mikroorganismů, neprovádějte tedy stěry např. z toaletní mísy nebo odpadů umyvadel.**

3. Vytáhněte vatovou tyčinku a její sterilní stranu namočíte do sterilní destilované vody. Namočenou tyčinkou pak setřeme povrch jednoho námi vybraného místa v domácnosti. Vlhkou tyčinkou se stěrem pak potřeme celý povrch agarů. Misku zapečetíme a popíšeme.
4. Stejný postup opakujeme pro zbývající čtyři vytipovaná místa v domácnosti vždy s novou agarovou miskou.
5. Misky necháme společně inkubovat při pokojové teplotě agarem dolu společně s kontrolními miskami.
6. Po tom, co vám misky narostou, každou z nich vyfoťte tak, aby byl vidět celý povrch agarů. Na každé z misek určete celkový počet narostlých kolonií a počet přítomných druhů mikroorganismů (viz níže).

Při vyhodnocování našich narostlých agarů budeme pracovat se dvěma základními veličinami. První z nich je počet mikrobiálních druhů, které na miskách narostly. Tuto veličinu bez diagnostických testů nikdy neurčíte přesně, nicméně ji můžete odhadnout podle toho, jak budou vaše narostlé kolonie vypadat z makroskopického hlediska – zde rozlišujeme zejména jejich tvar, barvu, lesk, profil a podobně. Pokud vám na misce narostlo třeba třicet kolonií béžových a lesklých, dvacet žlutých a lesklých, dvě světlehnědé, matné a s nepravidelným okrajem, jedna větší než všechny ostatní a tvořená černými vlákny a třeba čtyři lesklé červené, odhadem narostlo na vaší misce pět různých druhů mikroorganismů. Tato veličina udává pestrost mikrobiomu v místě stěru. Druhou veličinou je samotný počet kolonií, které vám na misce narostou – v uvedeném příkladu jsme napočítali 57 kolonií. Tato veličina zase indikuje, kolik mikroorganismů na místě stěru bylo. **Při počítání kolonií při vyhodnocování vám doporučuji následující postup: narostlou misku vyfoťte, aby byly dobře patrné všechny narostlé kolonie. Fotografie si v počítači otevřete v nějakém grafickém editoru (i Malování vám bude stačit), počítejte kolonie a ty, které jste již spočítali, si označte třeba tečkou. Pokud bude miska narostlá hodně (více než 200 kolonií), spočítejte kolonie např. jen na polovině, čtvrtině apod. misky a výsledný počet vynásobte převrácenou hodnotou tohoto zlomku (spočítám kolonie na čtvrtině misky, počet tedy vynásobím čtyřmi, abych získal přibližný počet kolonií na celé misce).**

9. Uveďte místa, ze kterých jste prováděli vaše stěry. Ještě předtím, než vám misky narostou, odhadněte, na kterém ze stíraných míst nejspíše naleznete nejvíce/nejméně druhů mikroorganismů a nejvyšší/nejnižší celkový počet mikroorganismů. Stručně zdůvodněte svůj názor. [1 b]

Řešení individuální.

10. Přiložte fotografie svých misek se stěry z pěti míst ve vaší domácnosti po inkubaci – celkem tedy 5 misek. Každou misku popište místem stěru a uveďte k ní počet narostlých druhů mikroorganismů a celkový počet narostlých kolonií (např. formou tabulky). Souhlasil váš odhad z předchozího úkolu s realitou? [7,5 b]

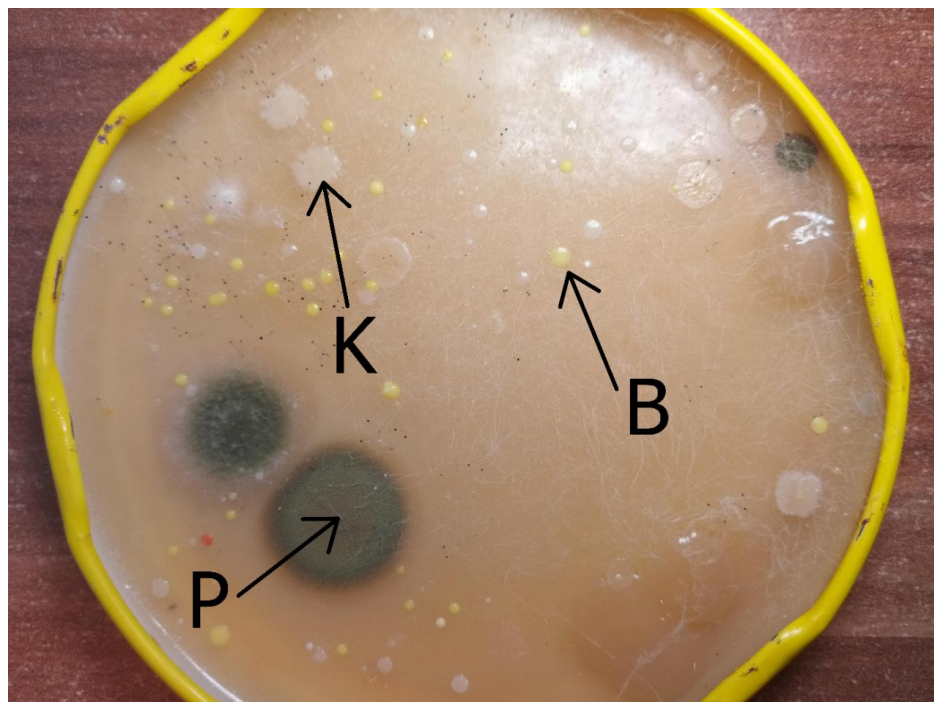
Řešení individuální.

11. Když na miskách spočítáme narostlé kolonie, číslo, které získáme, ve skutečnosti neodpovídá celkovému počtu mikroorganismů původně přítomných ve stěru. Mikrobiologové proto tohle číslo vyjadřují pomocí jednotek označovaných anglickou zkratkou CFU (česky KTJ). Co tohle číslo vyjadřuje a jak se počet CFU liší od celkového počtu mikroorganismů ve stěru? [1 b]

Zkratka CFU (anglicky „colony forming unit“) resp. KTJ (česky „kolonie tvořící jednotky“) označuje veličinu, která vyjadřuje počet mikroorganismů ve vzorku, které byly za daných podmínek na agaru o daném složení schopné vytvořit kolonii. Číslo tedy nezahrnuje mikroorganismy neschopné dělení (ať už z důvodu špatných podmínek na agaru či špatného fyziologického stavu), které by třeba za jiných podmínek kolonie byly schopné vytvářet. Číslo zahrnuje pouze za našich podmínek životaschopné a dělivé mikroorganismy.

12. Dovedete od sebe na vašem agaru alespoň přibližně rozlišit bakterie, kvasinky a plísně? Které makroskopické znaky kolonií nám mohou napovědět, o který z uvedených druhů mikroorganismů se jedná? Pokuste se na svých miskách najít a označit příklad bakteriální, kvasinkové a plísňové kolonie. [2 b]

Běžné bakterie, které budete na miskách pozorovat, tvoří většinou kolonie malé velikosti (zde platí výjimky) s jasně definovanými okraji a jednotnou barvou, často také výrazným leskem. Na obrázku označené písmenem B. Kvasinky tvoří větší kolonie většinou bílé nebo béžové barvy, které nemají jasně definované okraje a bývají matné. Na obrázku označeno písmenem K. A nakonec plísně tvoří velké „kolonie“ (nejedná se o kolonie v pravém slova smyslu) často bílé či naopak tmavé barvy charakteristické vláknité struktury, ve které můžou být pozorovatelné jednotlivé plísňové plodničky. Na obrázku označeno písmenem P.



## Kulturní akce 2: Turnaj v dezinfekčnosti

Kromě sterilizace se jak ve vědecké praxi, tak i ve všedním životě používají pro dezinfekci povrchů a materiálů velmi často různá dezinfekční činidla – prostředky chemické dezinfekce. Tento fakt vám za poslední rok ale nejspíše neušel. S dezinfekcí se můžete setkat na každém kroku, ať už při vstupech do obchodů nebo třeba ve vozidlech MHD. Není však dezinfekce jako dezinfekce. Prostředků existuje mnoho druhů a typů, přičemž každý obsahuje jiné aktivní látky lišící se svým účinkem a principem likvidace mikroorganismů. V této části úlohy tedy postavíme různé typy dezinfekce proti sobě v majestátním a šlechtném turnaji o věhlasný titul „*Desinficiens optimus*“.

Pro tuto část úlohy budete potřebovat čtyři různé dezinfekční přípravky, pokud možno lišící se ve svém mechanismu účinku nebo aktivní složce. Možností máte opravdu hodně – pro příklad (a inspiraci) můžete do svého turnaje přihlásit mýdlo (ať už tekuté či pevné), alkoholovou dezinfekci (ať už na bázi ethanolu, isopropanolu, nebo třeba slivovice), dezinfekci na bázi chloru (například zmiňované Savo), dezinfekci na bázi peroxidu vodíku nebo přímo jeho 3% roztok, dezinfekci využívající více mechanismů dezinfekce (např. dnes všudypřítomný Anti-COVID) nebo třeba domácí „zaručeně účinné“ recepty – ocet, citronku... Finální výběr soutěžících je ale jen a jen na vás – jedinou podmínkou je, aby bylo u prostředku oprávněné očekávat nějakou dezinfekční schopnost. Nebraňte se kuriozitám – máte k dispozici jodovou tinkturu? Ozonizér? UV lampu? Roztok formaldehydu, fenolu nebo chloraminu po dědečkovi – vesnickém chirurgovi? Jen směle do toho – dejte jen pozor na svoji bezpečnost, pracujte opatrně a s rozmyslem. **Pokud si jako dezinfekci zvolíte Savo, pracujte v nějakém starším nebo pracovním oblečení. Savo totiž není jen dezinfekce, ale také účinné bělidlo. Pokud se jím tedy pokapete či postříkáte, poznáte také jeho třetí prokazatelný účinek: magickou schopnost přeměnit JAKÉKOLIV oblečení na pracovní. Světložluté flíčky na novém černém tričku nebo sukni prostě nechcete.**

13. Představte své vybrané čtyři soutěžící – typy dezinfekce. Ke každému uveďte, s čím do turnaje přichází – určete jeho aktivní složku/složky a princip, na kterém likviduje mikroorganismy. [2 b]

Řešení individuální, závisí na typu dezinfekce, který použijete.

Obecně – mýdla působí na buněčnou membránu mikroorganismů. Membrána má jak polární (na povrchu), tak nepolární (uvnitř) charakter – z tohoto důvodu může existovat. Mýdlo má ale charakter stejný. Každá molekula mýdla má polární i nepolární část. V prostředí se tedy najednou objeví významný podíl nepolárnosti a buněčná membrána (závislá na polárním prostředí) se může narušit, buňka se tedy rozpadne.

Alkoholové dezinfekce fungují na principu denaturace mikrobiálních proteinů – ať už v membráně, nebo uvnitř buňky. Důsledkem je opět narušení integrity mikroorganismu a jeho destrukce. Podobně účinkují také aldehydy, fenol a podobná činidla.

Dezinfekce na bázi oxidačních činidel – peroxidu vodíku, chlornanů (Savo) a další – působí přesně tak, jak byste čekali. Agresivně oxidují a následkem toho rozkládají a ničí vše, co jim přijde do cesty – membrány, proteiny, nukleové kyseliny, ale také všemožné zejména organické sloučeniny (např. barviva ať už v oblečení nebo ve vlasech); proto se také využívají jako bělidla. Podobně účinkují také ozonizéry, činidla s jodem, manganistan draselný, chloramin a další látky.

Dezinfekce UV zářením narušuje strukturu zejména nukleových kyselin uvnitř buněk. Není nukleová kyselina, není množení. A je to. Na podobném principu funguje také dezinfekce radiací (tu však doufám nikdo, ale nikdo z vás nepoužil).

Domácí dezinfekce na bázi kyseliny octové či citronové většinou nefunguje příliš dobře. Mechanismus účinku je založen na denaturaci proteinů buněk významným snížením pH; proteiny obecně takto denaturovat lze, nicméně proteiny strukturní (tvořící buněčné stěny či strukturní složku membrán) jsou většinou vůči nízkému pH relativně robustní a pro jejich opravdu spolehlivé zničení bychom museli použít velmi vysokou koncentraci těchto látek. No a taková koncentrace buďto běžně není dostupná, anebo by mohla mít destruktivní účinky také na samotný dezinfikovaný předmět.

1. Připravte si osm sterilních agarových misek, jednorázové rukavice (alespoň čtyři kusy) a kuchyňské papírové utěrky. Připravte si pracovní místo podle pokynů k provádění aseptické práce (však už to znáte 😊). Připravte si také svoje čtyři soutěžící (nejlépe někam k umyvadlu).
2. Nasadte si čistou jednorázovou rukavici. Rukou v rukavici důkladně ohmatejte, co vás napadne – kliku, zemi, domácího mazlíčka... Jde nám teď o to, abychom rukavici pořádně kontaminovali (místo, které ohmatáte, si ale zapamatujte – budete to dělat vícekrát, tak ať jsou výsledky porovnatelné).
3. Rukou v nyní kontaminované rukavici pořádně pošpávejte celý povrch jednoho agaru. Dejte jen pozor a nešpávejte moc silně, ať agar nepotrháte nebo do něj prsty nezaryjete. Misku odložte stranou, rukavici ještě nesundávejte.
4. Vyberte si jednu z vašich dezinfekcí a touto dezinfekcí teď (nejlépe nad umyvadlem) důkladně vydezinfikujte svoji kontaminovanou rukavici (kterou máte stále nasazenou na ruce), zvláště tu část, kterou špávkáte po agaru. Vydezinfikovanou rukavici pak osušte čistými papírovými utěrkami.
5. Nyní vydezinfikovanou rukavicí pořádně pošpávejte celý povrch druhé agarové misky. Rukavici sundejte a vyhodte, stejně tak papírové utěrky, kterými jste rukavici sušili.
6. Obě pošpávané misky popište a zapečťete.
7. Stejný proces proveďte se třemi zbývajícími typy dezinfekce. **Rukavici použijte vždy novou a čistou, stejně tak papírové utěrky, kterými budete rukavici po**

**vydezinfikování sušit. Snažte se vždy rukavici kontaminovat na stejném místě a v podobné míře, ať jsou výsledky srovnatelné.**

8. Všechny misky nechejte společně inkubovat při pokojové teplotě agarem dolu společně s kontrolními miskami.
9. Po tom, co vám misky narostou, každou vyfoťte, aby byl zřetelně vidět celý povrch agaru. Pro každou z misek spočítejte celkový počet narostlých kolonií a počet přítomných druhů mikroorganismů.
14. Přiložte fotografie svých narostlých misek pořádaných kontaminovanou a vydezinfikovanou rukavicí – celkem tedy 8 misek. Každou misku popište typem dezinfekce + jestli se jedná o misku před použitím/po použití dezinfekce a uveďte k ní počet narostlých druhů mikroorganismů a celkový počet narostlých kolonií (např. formou tabulky). [10 b]

Řešení individuální.

15. Turnaj se blíží ke konci a nyní musíte vyhlásit vítěze a udělit prestižní titul *Desinficiens optimus*. Výkony jednotlivých dezinfekčních soutěživců máte k dispozici na vašich narostlých miskách. Vyhodnoťte, jak si která dezinfekce za vašich podmínek vedla – zohledněte určitě změnu v počtu narostlých kolonií a také změnu v počtu narostlých druhů mikroorganismů před a po použití dezinfekce. Zohlednit můžete také doplňková kritéria – cenu dezinfekce, jednoduchost provedení dezinfekčního procesu, nežádoucí účinky dezinfekce (koukám se na tebe, Savo!) a další kritéria, které uznáte za zvážení hodná. Po zvážení všech kritérií jmenujte šampiona turnaje. [2 b]

Řešení individuální.

16. V případě běžných alkoholových dezinfekcí koncentrace alkoholu pohybuje okolo 70 %. Proč je tato koncentrace pro dezinfekční účely nejvhodnější, resp. co by se stalo, pokud bychom použili alkohol o významně nižší/vyšší koncentraci? [1 b]

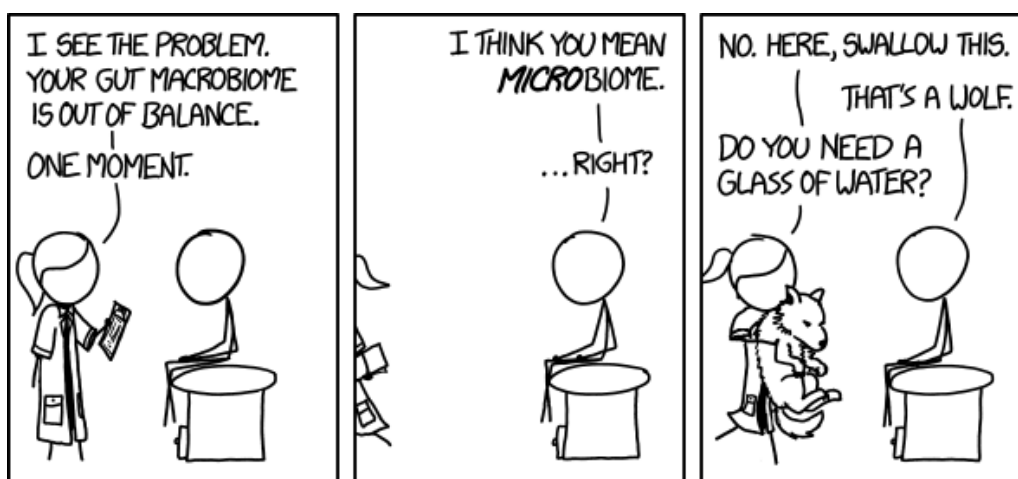
V případě alkoholových dezinfekcí musíme nalézt jakési optimum mezi dobrou denaturační schopností alkoholu (čím větší koncentrace alkoholu, tím lépe) a schopností alkoholového prostředku proniknout do vnitřních prostor buněk (čím menší koncentrace alkoholu, tím lepší). Pokud použijeme alkohol o příliš vysoké koncentraci (obecně od 90 % výše), účinnost se snižuje zaprvé z důvodu, že roztok prudce zdenaturuje pouze povrch buněčné stěny, která ale může zůstat neporušená (a vnitřek tedy dál funguje a je schopen množení) a zadruhé se přípravek příliš rychle odpařuje (a nemá tedy čas pro řádnou denaturaci). Při použití koncentrace naopak nižší než řekněme 60 % je denaturační účinek naopak příliš slabý – přípravek se sice do buňky dostává dobře, avšak často ne v koncentraci, která by byla pro buňku fatální.

### Kulturní akce 3: Voda živá...

Voda = život. To je základní rovnice, která je základem také veškerého známého života. Neexistuje organismu, který by byl schopen fungovat bez vody. Voda je ale živá také v jiném slova smyslu, než jako „ingredience“ života – poskytuje pro život také prostor a podmínky; je zkrátka plná života. To ale může být i nežádoucí faktor. Na rozdíl od známé písně Anety Langerové, ze které jsme si vypůjčili název pro tuto část úlohy, „voda živá“ může být sice na první pohled skutečně „čistá a důvěřivá“, nicméně brzo po její konzumaci můžeme začít úspěšně pochybovat o verších „ve mně navždy zůstává“, „uvnitř odpočívá“, a „tiše odplouvá“, jakmile se dostaví brutální průjmy a další radosti konzumace mikrobiálně kontaminované vody. Naopak se s paní Langerovou zcela jistě shodneme na sloce páté:

„Když končí se den a usne má zem,  
nevnímám čas ...  
Vrací se zpět můj niterní svět,  
snad probudí nás ...  
Zdá se nezbylo nic,  
jenže čím dál tím víc ...“

obzvláště když po konzumaci zaručeně čisté křišťálové studniční vody z lokálního pramene dostaneme v noci běhavku a stoprocentně se dobře nevyspíme.



Z tohoto a mnoha dalších důvodů je kvalita vody jak v domácích rozvodech, tak ve vodních tocích a dílech, které zásobují rezervoáry pitné vody, pečlivě monitorována a jakákoliv její významná kontaminace je opravdu průser<sup>2</sup>.

My sice v našem pokuse nebudeme schopni stanovit míru kontaminace vody těmi „špatnými“ bakteriemi, pro tento účel jsou zapotřebí speciální selektivně diagnostické agary jako například Endův agar, mFC agar nebo agar dle Slanetz-Bartleyho, budeme však schopni alespoň přibližně stanovit celkovou míru znečištění vody mikroorganismy obecně.

Pro tuto úlohu budete potřebovat tři zdroje vody k testování – vodu z domácího rozvodu vody (např. z kohoutku v kuchyni či koupelně), vodu z přírodního zdroje stojaté vody (např.

<sup>2</sup> Pun intended.

z jezírka, rybníku nebo podobné nádrže, stačí vám ale třeba i kaluž) a vodu z přírodního zdroje tekoucí vody (např. z potoku či řeky). Pokud to nemáte tak pohodlné jako autor úlohy, který má potůček na jedné straně zahrady a rybníček na druhé, budete potřebovat také tři sterilní vzorkovnice s víčkem (např. zavařovací sklenice, které vysterilizujete dle pokynů uvedených dříve), do kterých vodu nabereíte a donesete domů.

1. Proveďte odběr vzorku vody. To uděláte tak, že vzorkovnici naplníte vodou a bez jakéhokoliv kontaktu s vodou uvnitř vzorkovnice ji uzavřete. **Následující kroky je pro správnost výsledku nutné učinit co nejdříve po odběru vody, ideálně do pár hodin.** Pokud budete misky očkovat přímo u zdroje vody, tento krok není nutný.
2. Připravte si vatové tyčinky a tři sterilní agarové misky. Pokud pracujete doma, připravte si také pracovní místo dle pokynů k provádění aseptické práce. (Pokud budete misky očkovat přímo v terénu, není příprava místa samozřejmě možná, udržte ale sterilitu vatových tyčinek.)
3. Opatrně otevřete vaši vzorkovnici a namočte v ní sterilní konec jedné sterilní vatové tyčinky. V případě práce v terénu tyčinku namočte přímo do vodního zdroje, nedotýkejte se ale dna nebo útvarů ve vodě, např. rostlin.
4. Namočenou vatovou tyčinkou potřete celý povrch jednoho agaru. Misku popište a zapečteíte.
5. Stejný postup proveďte také se zbývajícími dvěma vzorky vody. Vždy použijte novou sterilní vatovou tyčinku.
6. Všechny tři naočkované misky inkubujte agarem dolů za pokojové teploty společně s kontrolními miskami.
7. Potom, co vám misky narostou, misky vyfotografujte tak, aby byl zřetelně viditelný celý povrch agaru. Určete u každé z nich celkový počet narostlých kolonií a celkový počet přítomných mikrobiálních druhů.
17. Přiložte fotografie vašich narostlých misek z rozboru vody – celkem 3 misky. Ke každé doplňte zdroj, odkud pochází voda, kterou byla miska naočkována, celkový počet narostlých kolonií a počet narostlých druhů mikroorganismů. [4,5 b]

Řešení individuální.

18. Který vzorek vyšel z testu nejlépe a který nejhůře? Dovedete výsledek odůvodnit? Zkuste odůvodnit také rozdíl mezi mírou mikrobiální kontaminace zdroje stojaté a tekoucí vody. [1,5 b]

Nejlépe vám velmi pravděpodobně vyjde voda z domácího rozvodu. Tato voda, jelikož je klasifikovaná jako pitná, musí splňovat velmi přísné dodavatelské nároky na kvalitu. Naopak přírodní zdroje vody vždycky nějak kontaminované budou – voda je obecně společně s půdou jedno z nejdůležitějších míst výskytu mikroorganismů.

Jako nejvíce kontaminovaná vám zase nejpravděpodobněji vyjde voda ze zdroje stojaté vody. Na rozdíl od vody tekoucí bakterie nejsou tolik odplavovány, dochází k většímu obohacení vody o živiny rozkladem organických zbytků apod.

19. V případě normovaného laboratorního rozboru vody, ať už pitné nebo koupací, se pro určení celkové mikrobiální kontaminace využívá tzv. TYEA agar (tryptone yeast extract agar). Vzorkem vody se naočkují dvě misky s TYEA agarem; jedna z nich se pak nechá inkubovat při 22 °C, druhá zase při 35 °C. Proč se misky nechávají inkubovat paralelně při dvou různých teplotách? [1 b]

Bakterie žijící ve vodním prostředí mají různé požadavky pro svůj optimální růst. Dle těchto požadavků je můžeme rozdělit na dvě základní kategorie – bakterie psychrofilní (chladnomilné) a mezofilní (preferující běžné mírné teploty). Při obecném testu mikrobiálního znečištění se snažíme zachytit obě tyto skupiny, nicméně není možné dobře zvolit jednu teplotu, aniž by nám jedna z těchto skupin „nepřerostla“ druhou. Miska inkubovaná při 22 °C tedy bude ideální pro růst psychrofilních bakterií, miska inkubovaná při 37 °C zase pro růst bakterií mezofilních.

## Kulturní akce 4: (Ne)průkazný test účinnosti roušky aneb Co když přijde kontrola

Kromě dezinfekce jsme se za poslední rok museli sblížit také s dalším prostředkem ochrany osobního zdraví – ochrannými rouškami. Tento kus látky s provázkami rozšířil náš základní „jdu z domu“ checklist, původně obsahující mobil, klíče a peněženku, a stal se součástí našeho každodenního života k nepřízni obrýlených lidí, kteří mají na poli zamlžování brýlových čoček novou nemesis. Tak se zhluboka nadechněme... A jdeme na to. V této části úlohy si vyzkoušíme otestovat funkčnost roušky ve filtraci vykašlávaného vzduchu od mikrobů. Tento experiment ale bude oproti ostatním také o něco rychlejší, jednodušší a také v něčem jiný – nám totiž půjde o to udělat něco trochu špatně.

Doctor: Protect the ones you love most from Coronavirus  
Me:



**Tato část experimentálního bonusu vám tedy nejspíše nevyjde tak, jak si myslíte, že vyjde. Přestože z výsledků našeho experimentu se může zdát, že máme přímý důkaz toho, že roušky vůbec nejsou účinným prostředkem pro filtraci vydechaného vzduchu od mikroorganismů, opak je pravdou: roušky opravdu fungují. Tento pokus je pouze demonstrací, že nejen výsledek, ale i design experimentu je klíčový při jeho vyhodnocování a špatná interpretace výsledků experimentu může mít opravdu drastický vliv. Při interpretaci každého „vědeckého“ experimentu tedy prosím myslete kriticky a používejte zdravý selský rozum.**

20. Jedním z virálních experimentů nesčetněkrát zopakovaným influencery po všech možných sociálních sítích je pokus o sfouknutí svíčky s nasazenou rouškou. Experimentátorovi se samozřejmě vždy podaří svíčku sfouknout, a to i vícekrát v řadě, experiment má tedy dobrou opakovatelnost. Experiment zároveň se stejným výsledkem zopakovalo obrovské množství lidí v různých podmínkách, experiment je tedy i velmi dobře reprodukovatelný. Experimentátoři ale tento svůj výsledek interpretují tak, že protože přes roušku zvládnou sfouknout zapálenou svíčku, roušky jsou neefektivní při ochraně před šířením SARS-CoV-2. Tento závěr je samozřejmě nesmyslný. Uveď, jaké chyby (případně jakých chyb) se tito samozvaní vědci při interpretaci výsledků pokusu dopustili. Jak můžeme výsledek experimentu interpretovat správně (tedy jaké tvrzení je tímto pokusem možné podpořit nebo napadnout)? [1 b]

Samozvaní vědci se dopustili chyby tím, že podle nich spolu korelují dva zcela nezávislé jevy – propustnost roušek pro vydechaný vzduch a propustnost

roušek pro virové částice. Alegoricky bychom takto mohli prokázat (ne)účinnost tenisových raket v odpalování tenisových míčků, protože vzduch prokazatelně bez nejmenšího problému výpletem rakety prochází.

Výsledkem můžeme naopak napadnout třeba názor odpůrců roušek, že „roušky snižují přísun vzduchu do organismu“. Pokus totiž naopak ukazuje, že přes roušku je sfouknutí svíčky stejně snadné jako bez ní. Výsledek samozřejmě není takto černobílý – roušky sice přísun vzduchu do organismu nesnižují (prokázáno testováním na principu stanovení obsahu kyslíku v krvi), přísun vzduchu ale o něco ztěžují (kladou při dýchání určitý odpor, musíme proto vynakládat větší úsilí pro nadechnutí stejného množství vzduchu).

1. Připravte si dvě sterilní agarové misky a čistou roušku libovolného typu. Připravte si své pracovní místo dle pokynů k provádění aseptické práce (už naposled, nebojte 😊).
2. Vezměte si jednu z misek, podržte ji agarem k sobě cca 30 cm od svých úst a ve směru misky pořádně zakašlejte. Misku popište a zapečetejte.
3. Nyní si nasadte roušku, vezměte si druhou misku a opakujte postup ve druhém kroku experimentu. Zkuste kašlat (samozřejmě přes roušku) přibližně stejnou měrou jako při kašlání bez roušky. Misku opět popište a zapečetejte.
4. Obě misky inkubujte společně s kontrolními miskami agarem dolů při pokojové teplotě.
5. Po tom, co vám misky narostou, je vyfotografujte tak, aby byl zřetelně viditelný celý povrch agarů. Určete u každé z nich celkový počet narostlých kolonií a počet různých mikrobiálních druhů.

**21. Přiložte fotografie vašich pokašlaných misek – celkem 2 misky. Ke oběma uveďte, jestli jste na ně kašlali bez roušky nebo přes roušku a také počet narostlých kolonií a počet narostlých mikrobiálních druhů. [3 b]**

Řešení individuální.

Na svých miskách nejspíše pozorujete, že ať už pokašlané s rouškou nebo bez ní, narostly obě misky víceméně stejně (případně miska pokašlaná přes roušku o něco méně). Z tohoto faktu samotného bychom mohli bez přemýšlení prohlásit, že roušky jsou ve filtraci mikrobů z kašle neúčinné.

**22. My ale přemýšlet budeme. Náš experiment totiž už z principu nemůže poskytnout výsledek, ze kterého by se dalo něco pořádně usuzovat. Zamyslete se a uveďte, kde v designu našeho experimentu nastala chyba, která nám znemožňuje vyhodnotit účinnost roušek. (Nápověda: nezdají se vám vaše misky obě až podezřele prázdné?) Navrhněte také způsob, jak bychom mohli pokus vylepšit, abychom účinnost roušek skutečně otestovali. [2 b]**

Při našem experimentu chceme na médiu zachytit bakterie, které se běžně vyskytují v horních cestách dýchacích. Náš experiment ale selhává v tom ohledu, že na našem složení média z těchto druhů bakterií nemůže pořádně růst prakticky žádná. Bakterie, které na médiu marně očekáváme, jsou většinou citlivé a vyžadují speciální podmínky pro život, a tedy i kultivaci. Kdyby bakterie horních cest dýchacích mohly žít i na tak všedním médiu, jako je náš cukr a hovězí bujon, byl by přenos bakteriálních onemocnění dýchací soustavy daleko jednodušší – to je důvod, proč se většina podobných nemocí šíří jen čerstvě vykašlanými kapénkami.

Pro vylepšení pokusu bychom mohli změnit složení média na nějaké, na kterém by nám naše cílová skupina bakterií alespoň teoreticky mohla narůst. Pokud budeme o něco techničtější a chtěli bychom pokus opravdu reprodukovatelný, mohli bychom odstranit lidský faktor. Lidské plíce nahradíme vhodně upraveným kompresorem, do jeho vývodu nakapeme předem definovanou suspenzi bakterií a z definované vzdálenosti ji vzduchem z kompresoru „střílíme“ na médium vhodné pro naše bakterie silou lidského kašle buďto přes roušku, nebo jen tak.

## No a teď jak to všechno pozabíjet

Nadpis říká vše – po všem našem pokusování, pokousávání, pokoušení a dalších jednoslovných zmrveninách slova „provádět pokus“ máme spoustu Petriho misek plných bakterií, kvasinek a plísní a teď nevíme co s tím.

Použité Petriho misky s agarem nejprve dezinfikujeme tak, že je opatrně odpečetíme a přes noc ponoříme do 10% roztoku Sava (1 díl Sava, 9 dílů vody), čímž efektivně zlikvidujeme všechno živé, co se na nich nachází. Pokud misky ještě budeme chtít někdy použít, nasadíme si pevné gumové rukavice, pomocí např. příborového nože z misek odstraníme agar, případné zbytkové nečistoty odstraníme starým zubním kartáčkem. Nápis a popisky odstraníme technickým lihem nebo acetonem. Misky poté opláchneme pitnou vodou a usušíme (případně můžeme po opláchnutí dát misky ještě do myčky na nádobí). Agar, který jsme z misek odstranili, nesplachujeme do výlevky (ne že by to bylo nebezpečné, ale výlevku tím pravděpodobně ucpeme), dáme ho do sáčku, zavážeme a vyhodíme do komunálního odpadu – po dezinfekci už není nebezpečný. Pokud misky už používat nechceme, dezinfikované misky i s agarem vložíme do sáčku, opět zavážeme a vyhodíme.

Pokud jste úspěšně zdolali celou experimentální úlohu, tak vám upřímně gratuluji. Naučili jste se, o co nám při kultivacích jde, jak pracovat tak, aby nám při nich rostlo jen to, co chceme, a taky jak dosaženou sterilitu otestovat. Dále jsme si ukázali konkrétnější dovednosti – jak si připravit vlastní domácí agarové plotny a taky jak je očkovat a inkubovat. No a taky dovednosti ještě konkrétnější, třeba jak se rozhodovat, pokud vás někdo někdy pověří udělováním renomovaného titulu *Desinficiens optimus*, anebo jak misinterpretovat texty populárních songů třeba od Anety Langerové. Potom z těch důležitějších, nikoliv striktně biologických dovedností také to, že není všechno, jak se na první pohled zdá, a že na všechno je potřeba nahlížet kriticky – následky jinak mohou být značné. A nakonec že přestože zatím nemůžeme do kina, do divadla ani na koncert, kulturu máme všude kolem sebe, být jen tu mikrobiologickou. Tvoří nedílnou součást našeho života a také velkou část nás samotných. Jen na to nesmíme zapomenout.

„Support bacteria – they’re the only culture some people have.“

Steven Wright

## Příloha 1: Seznam potřebných pomůcek a materiálu

- Agar
  - Agar seženete snadno v obchodech se zdravou výživou jako želírovací látku, náhražku klasické želatiny. Agar je pro účely mikrobiologie daleko lepší želírovací látka, s agarem se zároveň pracuje daleko lépe než s želatinou. Pozor jen na cenu, mnozí výrobci ji přehánějí – férová cena se pohybuje kolem 50 Kč za 20 g agaru.
- Alobal
- Cukr krystal
- Destilovaná voda technická
  - Seženete v domácích potřebách, kutilských obchodech, na benzínkách...
- Dezinfekční přípravky, 4 různé druhy, pokud možno lišící se svým mechanismem účinku nebo aktivní složkou
- Fix nesmazatelný pro popis misek
- Hovězí bujon v kostce
  - Zde platí čím méně soli, tím lépe. Požadavek na málo soli však může být u bujonů složitý, pokud koupíte běžný bujon, nic špatného se nestane.
- Jemné sítko nebo plátýnko
- Laboratorní termostat Q-Cell 45/40 Basic s teplotním rozsahem +8–+40 °C
  - No anebo prostě místo ve vaší domácnosti, které má pokojovou teplotu, nesvítil na něj přímo sluneční světlo a nedochází na něm k prudkým změnám teplot.
- Líh technický (příp. odlakovač, aceton...) pro smytí nápisů z misek
- Nádoba varná nebo mikrovlnitelná na vodu
- Nádoba varná o kapacitě optimálně 1 litr, případně kombinace varná nádoba/nalévací nádoba
  - Nejlépe se vám bude pracovat např. s rendlíkem opatřeným výlevkou. Pokud žádnou takovou nádobou neoplýváte nebo chcete, aby se vám pracovalo ještě lépe, připravte si kombinaci varná nádoba/nalévací nádoba. Varná nádoba bude v tomto případě sloužit pouze k přípravě agaru. Z této varné nádoby budete agar po částech přelévat do nalévací nádoby, ze které budete teprve nalévat agarové misky. Nalévací nádobu tedy volte tak, aby se vám s ní dobře manipulovalo, a to i za horka (budete z ní nalévat horký agar), a tak, aby se dala rozumně vysterilizovat (např. ponořením do 10% roztoku Sava a následným opláchnutím sterilní vodou).
- Potravinářská folie
- Rukavice jednorázové, minimálně 4 ks
  - Minimálně 4 kusy rukavic budete určitě potřebovat pro provedení testu dezinfekcí, použití rukavic pro ostatní práci je na vašem uvážení
- Utěrky papírové kuchyňské, jednorázové
- Vatové tyčinky do uší, přezdívané „uchošťoury“
- Víčka na zavařovací sklenice (20-25x) anebo jiná náhražka Petriho misek dle vašich možností

- Pokud doma nemáte zásobu, víčka na zavařovací sklenice lze s úspěchem levně sehnat v obchodech s domácími potřebami. Prodávají se samotná, bez sklenic, balené třeba po dvaceti, třiceti kusech.
- Voda vodovodní z domácího rozvodu
- Voda ze zdroje stojaté vody
  - Může být z jezírka, rybníku, ale stačí i z kaluže.
- Voda ze zdroje tekoucí vody
  - Třeba z říčky, potoka...
- Voděodolná podložka
- Vzorkovnice na vodu, 3 ks (např. zavařovací sklenice)

## Příloha 2: Fotonávod pro zapečetování agarových misek

1. Petriho misky (v tomto případě víčka od zavařovaček) vysterylizujeme dle návodu a necháme uschnout závitem dolů, aby se do nich neprášilo.



2. Do misek nalijeme připravené agarové médium a necháme zatuhnout. Po zatuhnutí misky skladujeme agarem nahoru, opět chráněné proti prachu a nesterilitě a v chladu.



3. Misky podle návodu naočkujeme.



4. Po naočkování misku přetáhneme potravinářskou fólií.



5. Fólii udržujeme napnutou a na druhé straně misky ji zakroučíme. Přebytečnou fólii odstříháme.



6. Takto by zapečetěné misky měly vypadat z agarové strany. Fólie je napnutá a nedotýká se samotného agaru.



7. Misky si nezapomeneme popsat, nejlépe ze spodní strany.



8. Misky inkubujeme zapečetěné, společně, agarem dolu při pokojové teplotě na místě, kde nedochází k prudkým změnám teploty, nejlépe na nepromokavé podložce.

