NUŠL
národní
úložiště
šedé
literatury

Metodika mikrobiologického vyšetření knih a prostředí knihovny a depozitářů

Šimůnek, Jan; Lefnerová, Danuše; Chaloupková, Jana
2016

Dostupný z http://www.nusl.cz/ntk/nusl-263362

Dílo je chráněno podle autorského zákona č. 121/2000 Sb.

Licence Creative Commons Uveďte autora-Zachovejte licenci 3.0 Česko

Tento dokument byl stažen z Národního úložiště šedé literatury (NUŠL).

Datum stažení: 18.04.2024

Další dokumenty můžete najít prostřednictvím vyhledávacího rozhraní nusl.cz .

Metodika mikrobiologického vyšetření knih a prostředí knihovny a depozitářů

Jan Šimůnek
Danuše Lefnerová
Jana Chaloupková

Metodika byla vytvořena v rámci Programu aplikovaného výzkumu a vývoje národní kulturní identity (NAKI) projektu DF12P01OVV047
Benediktinský klášter Rajhrad jako kulturní fenomén

Lékařská fakulta MU Brno
Ústav ochrany a podpory zdraví
ve spolupráci s Moravskou zemskou knihovnou

23. 10. 2015, upraveno dle připomínek oponentů 31. 10. 2016

1 Zdravotní rizika pro práci se vzorky mikroskopických vláknitých hub

1.1 Rizika pro personál

Zdravotní rizika odpovídají běžnému biohazardu v mikrobiologické laboratoři, pracující s nepatogenními nebo podmíněně patogenními organismy. Tomu odpovídají i zdravotní kritéria, kladená na zaměstnance (neměli by mít chronické choroby a stavy, zvyšující pravděpodobnost onemocnění oportunní infekcí)

1.2 Rizika pro okolí

Laboratoř by měla být zajištěna standardním způsobem, obdobným např. klinickým mikrobiologickým pracovištím. Klíčové je zajištění likvidace odpadu, které musí provozovat spěcializovaná firma s akreditací pro tuto práci. V případě častějších záchytů potenciálních producentů mykotoxinů by měl být zajištěn takový způsob likvidace kultur v Petriho miskách, plastových zkumavkách i na dalších médiích, který zajistí zničení těchto látek (toto bývá většinou splněno, jsou-li tyto materály páleny).

Pokud jsou použity anorganické prostředky proti roztočům (např. chlorid rtuťnatý), měly by být materiály jimi kontaminované sbírány a likvidovány odděleně s ohledem na chemické riziko (je nutno toto projednat s příslušnou firmou, případně zajistit sanitaci těchto materiálů firmou, specializující se na rizikový chemický odpad).

1.3 Příklad provozního řádu

Název pracoviště Laboratoř pro zpracování vzorků z knih

Druh Bez zvláštních požadavků, odpovídající potřebám základních chemických a mikrobiologických technik

Umístění Místnost č., podlaží, adresa budovy

Zaměření a činnost Izolace mikrobů, především mikropskopických hub ze vzorků knih a prostředí knihovny (depozitáře . . .), čištění, identifikace a detekce vlastností izolátů, další činosti . . .

Osoba zodpovědná za provoz . . .

Seznam osob s přístupem do místnosti

Nezapomenout alespoň obecně na pracovníky úklidu a dalších servisních služeb, mají-li do laboratoře přístup

Podmínky vstupu Bílý plášť, omyvatelná, desinfikovatelná obuv

Zásady chování a práce Platí běžné zásady pro laboratorní provoz: Nejíst, nepít, nekuřácký je celý pavilon. Při odchodu z laboratoře je možnost umytí a desinfekce rukou.

Předepsaný ochranný oděv a pomůcky Zaměstnanci fasují kompletní bílé oblečení a obuv. Speciální ochranné pomůcky (rukavice, roušky apod.) podle charakteru konkrétní práce

Jednorázové pomůcky a ochranné prostředky Pomůcky a prostředky jsou po použití baleny do plastových pytlů a odkládány na vyhrazené místo a následně odnášeny do kontejnerů firmy, likvidující bioodpad.

Mikrobiologické pomůcky pro opakované užití Tyto (např. laboratorní sklo) jsou buď na místě desinfikovány nebo přímo autoklávovány

Praní ochranných oděvů Provádí fakultou najatá firma, odvod je jednou za týden, místo k jejich odkládání ...

Lékárnička a oční sprcha Popis jejich umístění, zaměstnanci by měli mít od příslušných místností (jsou-li jinde než v samotné laboratoři) klíč

Zajištění úklidu Úklid zajišťuje laborantka a firma najatá pracovištěm (musí být zajištěno poučení pracovníků, co smí a co nesmí dělat a definovat, co mají uklízet a jak, též musí být nadefinováno používání vhodných desinfekčních prostřerdků a režimu jejich střídání)

Frekvence úklidu Běžný úklid a vynesení odpadkových košů je zajišťován denně. Mikrobiologická kontaminace podlah a stolů je likvidována bezprostředně po vzniku prostředky, které jsou ... (popis místa uložení)

Definice pohybu Případných dalších osob

2 Okruh osob, jimž je metodika určena

Okruh osob, pro něž je seznámení se s předkládanou metodikou přinosem, je poměrně rozsáhlý:

- Pracoviště, která budou vyšetření podobných materiálů provádět
  - Pracoviště, zabývající se metodikou stanovení mikrobiologie prostředí v jiných typech prostředí a na jiných materiálech, aby upravily zavedené metodiky pro daný účel
  - Pracoviště, zabývající se diagnostikou mikrobů, jako podklad pro rozvahu, zda si odběry budou provádět samy, nebo je zadají specializovanému pracovišti
- Pracoviště, která takováto vyšetření budou zadávat, jako podklad pro rozvahu, co vše je třeba zajistit, i pro ekonomickou rozvahu
- Alespoň informačně pro pracovníky v archivnictví a knihovnictví, aby byli seznámeni s možnostmi, které moderní mikrobiologie přináší

Uvedená pracoviště potřebují seznámení se s metodikou v odlišném režimu. Pracoviště, provádějící samotné odběry, si přizpůsobí předkládané metody svým konkrétním podmínkám (a s rostoucím časovým odstupem i spektru půd, které budou k dispozici na trhu, případně budou v budoucnu preferovány normotvornými institucemi).

3 Omezení doporučených metod

Metody spojené se zvlhčováním podkladu (tj. použití vlhkých tamponů a otiskových sad typu Hygicult) by měly být bezpečné v případě černého tisku na kvalitním papíře. Problémy mohou být způsobeny:

- U tisků na nekvalitním papíru (zejména starší novinové papíry, které mají tendenci se rozpadat již při mechanickém namáhání)
- U vpisků, razítek, ručně kolorovaných obrázků (u starších tisků mohou být dosti často rytiny ručně kolorované barvami, které nesnášejí vodu), ex libris apod. Těmto prvkům v knihách je nutno se vyhýbat
- Citlivé mohou být i vlepené ilustrace, mapy apod.
- Rukopisy je třeba otestovat ve spoluporáci s restaurátory, některé starší inkousty mohou být i dosti výrazně vodovzdorné, u jiných nebudou odběry na vlhko možné

Naopak bezproblémové bývají prvky vazby, ořízka apod. Mimo knih a dalších archiválií na papírech citlivých na vlhkost jsou bezproblémové prázdné, nepotištěné a nepopsané plochy (úvodní strany, patitul, prázdná místa za obsahem, prázdná místa mezi částmi obsahu apod.).

Tento výčet je v souladu s omezeným spektrem druhů materiálů, které byly v rámci výzkumného úkolu testovány. Měl by sloužit pro orientaci, rozhodně nemůže nahradit konzultaci či testování odolnosti konkrétních materiálů ve spolupráci s restaurátorem nebo jiným podobně zaměřeným odborníkem.

Uvedené metody zpravidla nejsou problematické při vyšetření stěn, nábytku (včetně regálů) a podlah.

4 Ověřené a upřesněné metody

4.1 Doporučený postup sledování kontaminace povrchů

4.1.1 Osvědčené půdy

Doporučujeme nasazení trojice půd:

1. Půdu pro záchyt silně osmolárních a xerofilních organismů
2. Semisyntetickou půdu
3. Sladinkový agar

Půdy jsou podrobněji uvedeny na str. 26

Aspergillus diferenciační médium nebo podobné půdy považujeme za vhodné nasadit teprve v případě, kdy by byl větší záchyt podezřelých kolonií (možný *Aspergillus flavus* nebo *A. parasiticus*).

4.1.2 Osvědčený postup stěrů

Za optimální postup považujeme stěr ze 100 cm^2, což odpovídá čtyřem přiložením sterilní šablony 5 × 5 cm. Toto umožňuje vyhnout se na náhodně vybraných stranách případným místům, která by stěr vlhkým tamponem nemusela snést.

V případě stěrů suchým tamponem by měla být stíraná plocha zvětšena na nejméně pětinásobek, aby bylo dosaženo podobné density zárodků. I suchý tampon doporučujeme následně vytřepat do fyziologického roztoku (viz dále), aby misky s různými druhy půd reprezentovaly kontaminaci identické plochy. Dále tím významně snížíme riziko zavlečení roztočů do laboratoře (viz str. 16).

Následné vytřepání tamponů do 5 ml fyziologického roztoku a aplikace po 1/3 ml na povrch půd ve třech Petriho miskách od každé půdy. Očekáváme-li vyšší výskyt kvasinkovitých organismů, baktérií, případně kontaminaci roztoči, je vhodnější zalití vzorku v prázdné Petriho misce půdou ochlazenou na 45 °C. Inkubaci provádět při 24 °C v termostatu s odečtením po 12 – 14 dnech. Pro primozáchyt potenciálních patogenů je možné další 1 ml výtřepku, aplikovaný na tři Petriho misky Malt extract agaru (nejširší spektrum, mohou vyrůst i patogenní kvasinky), inkubovat při 37 °C s odečtením do tří dnů (ale kontrolovat průběžně).

4.1.3 Hygiculty

Hygicult představuje sadu, zahrnující lopatičku se dvěma plochami půdy o ploše 2×5 cm, v nádobce, která následně slouží i pro kultivaci. Půda se přitiskne na dvou různých místech na sledovanou plochu, lopatička se vrátí do kontejneru a kultivuje dle návodu výrobce.

Pro odpočet dodává výrobce škálu semikvantitativního hodnocení nárůstu na 0 až 3 křížky.

4.2 Doporučený postup sledování kontaminace ovzduší

4.2.1 Odběry zárodků mikroskopických hub ze vzduchu

Aeroskopem odebrat vzorky vzduchu dle návodu výrobce. Na počátku v neznámém prostředí provést sérii měření s různými objemy přečerpaného vzduchu. Odběrové stripy (případně jiná média), uzavřené zpětně do originálních obalů kultivovat při teplotě a čase udané výrobcem.

4.2.2 Detekce potenciálně patogenních mikroskopických hub

Pro detekci této skupiny hub prosávat čtyřnásobné množství vzduchu z místnosti. Inkubaci provést v termostatu při 37 °C do 72 hodin, při prohlížení po 24 a 48 hodinách.

4.3 Odběry plísní ze vzduchu sedimentační metodou

Petriho misky s půdou (DRBC, Malt agar, Sabouraudův agar, DG agar a Czapek Doxův agar, nejčastěji 2 – 3 různé typy agaru vedle sebe, DRBC jako jediný samostatně) odkrýt na vhodnou dobu, poté zakrýt víčkem a kultivovat při laboratorní teplotě a na světle po dobu 12 – 14 dnů při průběžném prohlížení.

Doba odkrytí misek závisí na intenzitě kontaminace ovzduší. Je vhodné v neznámém prostředí provést orientační měření na více miskách, exponovaných různě dlouhou dobu (např. řada 15 minut, 30 minut, hodina, dvě hodiny).

Případné patogeny kultivovat při 37 °C. Pro jejich záchyt je možné dobu spadu prodloužit oproti záchytu běžných mikroskopických hub na několikanásobek.

4.4 Počítání kolonií na fotografiích pevných médiích

4.4.1 Důvod

Kvantitativní stanovení počtu kolonií na pevném médiu je součástí kvantitativního vyhodnocení kontaminace vzorku. Na rozdíl od metod, kde se pracuje s ± uniformními koloniemi, je situace na primozáchytu mykologického vyšetření kontaminace daleko nepřehlednější, protože zachycené kolonie mohou mít velmi rozdílné tvary, barvu i densitu. Z tohoto důvodu patrně ještě delší dobu nebude možné použít počítačové hodnocení, jaké je dnes již běžné např. u Amesova testu a jiných podobných, kde se pracuje s jedním druhem mikroorganismu.

4.4.2 Zdroj fotografií

Zdrojem fotografií může být běžná fotografická dokumentace misek s nárůstem. Je dobré si uvědomit, že ideální je možnost fotografování skrze víčko, protože po otevření misky se povrch půdy kontaminuje spadem, nemáme-li k dispozici vysoce sterilní prostředí. To má význam zejména v situaci, kdy se misky nechávají kultivovat delší dobu a hodnotí průběžně.

K pořízení fotografií postačuje běžný fotoaparát v mobilním telefonu o rozlišení 5 megapixelů a více (což novější typy mobilů zpravidla splňují). Platí, alespoň dle našich zkušeností z praktických cvičení, kdy si studenti dokumentují své misky do protokolů, že s méně „smart“ přístroji je práce snazší. Je to z toho důvodu, že miska není objekt, na jehož dokumentaci najde „smart“ zařízení vhodný program.

4.4.3 Metodika hodnocení

Doporučujeme grafický editor GIMP, protože

- je zdarma
- je dostupný na většině platforem
- práce s ním se odehrává v režimu grafického interface

Postup: Obrázek misky nahrajeme do GIMPu, ořízneme (nástroj „skalpel“ v hlavní nabídce a uložíme do formátu xcf (nativní formát tohoto editoru). Překontrolujeme, zda jsou na obrázku černé body. Informaci zjistíme z menu Barvy podmenu Informace a podpodmenu Histogram. V záhlaví histogramu překontrolujeme, zda je nastaven jas. Pod obrázkem histogramu nastavíme obě hranice škály na nulu (vložením nuly místo číslice 255 pod obrázkem histogramu a odenterováním). Počet pixelů by měl být nula. Není-li stačí nepatrně přidat jas v menu Barvy podmenu Jas - kontrast. Takto upravený obrázek uložíme. Nyní v hlavní nabídce vybereme tužku (nelze použít štětec, nekreslí vždy černě) a velikost stopy nastavíme na Circle (01).

Tužkou vykreslíme po jednom bodu na každou kolonii. Při „uklepnutí“ můžeme v hlavním menu prohodit barvy a bod navíc přemazat bílou. Pokud v histogramu vyvoláme stejně jako výše počet černých bodů, dostaneme číslo, rovnající se počtu kolonií. Kolonie lze takto počítat nejen na miskách. ale i stripech z aeroskopu nebo médiu Hygicultu. Necháme-li si otevřené subsubmenu Histogram, můžeme přímo vidět přibývající černé body.

Obrázek lze zachovat pro archivní účely buď uložením opět do formátu xcf (pozor, řada jiných grafických editorů tento interní formát GIMPu neumí otevřít), nebo použijeme neztrátový bitmapový formát, jako je png, pcx nebo ppm. Rozhodně jej nesmíme uložit jako jpg nebo gif, protože při převodu na tyto formáty není zaručeno, že čistě černé body zůstanou čistě černé (tj. úroveň jasu = 0).

4.4.4 Rozšíření

Protože lze jako barvu tužky v GIMPu nastavit i barvy červenou, zelenou nebo modrou barvu, můžeme nastavit i barvu červená = 0, zbylé 255 (= cyan), zelená (= 0) a zbylé 255 (=magenta) a modrá = 0, zbylé 255 (= žlutá). Takže můžeme nezávisle na sobě vyznačit na misce čtyři různé typy kolonií (nebo jiných druhů nárůstu), aniž by si vzájemně vadily (jen v záhlaví dialogu Histogram nastavíme místo jasu příslušnou barvu).

5 Určování a dokumentace zachycených vláknitých mikroskopických hub

Přestože samotné určování mikroskopických hub není předmětem této práce a musí je provádět patřičně školený mykolog se specializací na mikroskopické houby, je orientační sledování preparátů ze zachycených kultur a jejich dokumentace žádoucí.

Elektronická dokumentace umožňuje i konzultace po internetu, včetně zjištění, které pracoviště bude schopné zachycené mikroskopické houby určit.

5.1 Růst na standardních médiích

Zachycené kmeny vyočkujeme do tří bodů, tvořících vrcholy rovnostranného trojúhelníka, vzdálené cce 2 cm od okraje misky na Czapek-Doxův agar (nejlépe v úpravě podle Pitta a Hockingové), sladinkový agar (opět nejlépe půda dle uvedených autorů (jako půda MEA) a agar G25N, který vyvinuli též oni.

Kmeny vyočkované na MEA a G25N kultivujeme při teplotě zpravidla 24 – 28 °C, kmeny na Czapek-Doxův agar vyočkujeme 3×, jednu misku kultivujeme s předchozími, druhou při 37 °C a jednu v chladničce při 4 °C. Czapek-Doxův agar pro chladničkovou kultivaci a agar G25N je možné vylévat na Petriho misky o menším průměru (třeba 5 cm), protože je v těchto podmínkách zpravidla pomalý růst (pak stačí vyočkovat jen na jeden nebo dva body).

Necháváme růst standardně 5 dnů.

5.2 Mikroskopické preparáty

5.2.1 Preparáty v tekutém médiu

Preparáty se připravují v roztoku laktofenolu [2] nebo v Melzerově činidle [3]. Postup je takový, že do kapky tohoto média přeneseme kousek kultury a dvěma preparačními jehlami roztáhneme do plochy. Tato operace je velice choulostivá, protože při nedostatečném roztažení dostaneme neprůsvitný chumáč, při přiliš „důkladném“ naopak dojde k rozbití konidioforů a dalších struktur, které jsou pro určení zásadní. K vytvoření dobrých preparátů se patrně nelze dopracovat jinak, než určitou praxí. Rovněž výběr místa, odkud vzorek z kolonie na mikroskopování vezmeme, je důležitý, protože v centru kolonie mohou být germinativní orgány přestárlé a poničené autolýzou, na samém okraji nemusí být vyvinuté.

Kapku s kulturou překryjeme krycím sklíčkem. Někdy pomůže pro odstranění bublin v preparátu jeho povaření nad kahanem, protože unikající pára s sebou strhne i vzduch.

Preparáty pozorujeme při zvětšeních do objektivu 60× zvětšujícího, tedy bez imerze (vzácně se vyskytují i objektivy 100× zvětšující bez imerze). Pokud preparát obsahuje struktury, které považujeme za reprezentativní a nosné pro určení, provedeme jednak fotodokumentaci, jednak můžeme preparát zarámovat. Pro rámování existují různé postupy, nám se osvědčilo běžné akrylátové lepidlo, prodávané pod různými obchodními názvy.

Tímto materiálem obkroužíme krycí sklíčko na podložním, dbáme o zatečení pod okraje krycího sklíčka i o překrytí jeho okraje shora. Necháme několik hodin zaschnout.

Zarámované preparáty můžeme lépe skladovat, je možné jejich prohlížení i s použitím imerzního oleje. Bohužel, trvanlivost těchto preparátů je omezená na několik týdnů, poté prostoupí médium stěny hyf a jejich kontrast se ztratí. Na preparátu zůstanou jen nezřetelné stíny, nebo ani to ne. Tento problém obecně dosud nebyl vyřešen. Může ho obejít dobrá a bohatá fotodokumentace (viz str. 13 a násl.).

5.2.2 Mikroskopické kultury

Existuje vetší počet postupů vytvoření mikroskopických kultur. Doporučujeme následující postup:

- Podložní a krycí sklíčka vysterilizujeme v horkovzdušném sterilizátoru ve skleněných Petriho miskách. Krycí sklíčka doporučujeme v misce podložit mírně pomačkanou hliníkovou fólií, která umožni jejich lepší uchopení pinzetou.
- Uvaříme vhodnou půdu, nejlépe Czapek Doxův agar v úpravě dle Pitta a Hockingové a vylejeme velice tence (do 1 mm) na Petriho misky. Orientujeme se podle toho, že mezi okrajem víčka Petriho misky a hladinou agaru musí být mezera větší než součet tlouštěk podložního sklíčka, dna Petriho misky a rezervy, aby se krycí sklíčko na kultuře nedotýkalo víčka Petriho misky.
- Do Petriho misky o průměru 9,5 cm umístíme (semisterilně) víčko Petriho misky o průměru 5 cm, okraji vzhůru (tj. orientované opačně než když je na misce).
- Na víčko umístíme sterilně vysterilizované podložní sklíčko.

  Takovéto „polotovary“ je možné si připravit do zásoby.
- Z vylité půdy vyřízneme obdélníček menší než krycí sklíčko a umístíme na horní stranu podložního sklíčka v misce.
- Na půdu, nejlépe na její okraj, naočkujeme studovaný kmen.
- Sterilně přikryjeme krycím sklíčkem
- Okolo víčka, na němž je preparát umístěn, nalejeme několik ml destilované nebo demi vody (nemusí být striktně sterilní, byť je to lepší)
- Dáme kultivovat v teplotě vhodné pro studované kmeny.

V malém zvětšení můžeme zpravidla mikrokultury pozorovat v Petriho misce, aniž bychom je otevřeli, což je výhodné pro kontrolu růstu a současně eliminaci nežádoucí kontaminace.

Pro větší zvětšení je nutné sklíčka s mikrokulturami vyjmout z Petriho misky na podložní stolek mikroskopu. Zpravidla není možné tyto kultury pozorovat pod imerzí.

Výhodou uvedených kultur je poměrně rychlé vytvoření germinativních orgánů, důležitých pro určení a jejich nepoškození vytvářením preparátu v tekutém médiu.

Nevýhody mikrokultur jsou následující:

- Je-li okolo struktur mikroskopické houby vzduch místo silně světlolomného média typu laktofenolu, nejsou rozpoznatelné některé detaily.
- Některé kmeny nemusí při „nabídce“ tak malého množství média k růstu germinativní orgány vytvořit.
- Zejména druhy z rodů *Penicillium* a *Aspergillus* mohou vytvářet aberantní germinativní orgány, podle nichž nejsou určitelné.

Technika digitální fotografie umožňuje levné vytvoření a uložení velkého množství fotografií (a výběru těch nejlepších) a rovněž jejich zasílání elektronickou poštou v případě konzultací.

6 Fotodokumentace

6.1 Materiální vybavení

Výhodou dnešní doby je, že pro fotodokumentaci není potřeba žádné specifické vybavení. Fotoaparáty v mobilních telefonech od 5 Mpx nahoru včetně dávají postačující kvalitu pro běžnou dokumentaci, pouze pro mimořádně náročné úkoly (typu mikrofotografií nejvyšší kvality při největším zvětšení) je nutné speciální vybavení.

6.2 Předmět dokumentce

Dokumentovat je možné:

- samotné prostředí, které je sledováno
- primární záchyty na Petriho miskách, Hygicultech, stripech z aeroskopu apod.
- čisté kultury na diagnostických půdách
- mikroskopické preparáty

6.3 Mikropreparáty

Dokumentace prostředí i jednotlivých médií s nárůsty nevyžaduje zvláštních dovedností. Zde je nutno postupovat podle běžných návodů a postupů, které pro digitální fotografii interiérů a drobnějších předmětů existují.

Fotografie mikroskopických preparátů umožňují nejen sledovat morfologii zachycených hub, ale i přibližné (s chybou do cca pěti procent) rozměry útvarů na preparátech.

Fotografovat lze bez jakéhokoli speciálního vybavení, pouze přiložením objektivu fotoaparátu k okuláru mikroskopu a jeho nepatrným oddálením (dle kontroly na displeji). Automaticky zaostří dle našich zkušeností „nesmart“ nebo „málo smart“ přístroje, takže do jisté míry platí, že čím levnější aparát, tím snadnější pořízení snímku a lepší výsledky.

Snímek se zpravidla nepovede na poprvé, ale zachycení zorného pole s preparátem zvládne téměř každý.

Problémy mohou nastat u tmavších preparátů při větším zvětšení, kdy nedostatek světla spustí blesk (u přístrojů, kde nelze automatický blesk vypnout).

Vzhledem k tomu, že dokumentaci touto technikou provádějí naši studenti rutinně v rámci praktických cvičení z potravinářské mikrobiologie, je to zobecnění nad několika desítkami typů mobilních zařízení, telefonů, případně tabletů s vestavěným fotoaparátem.

Rozměry sledovaných objektů lze odhadnout pomocí vložené mřížky.

Mřížku definujeme vyfotografováním dna Bürgerovy komůrky, u níž strana menšího čtverce má 0,05 mm. Poté pro každý objektiv zvlášť vypočteme počet pixelů na 0,1 mm, případně (pro velká zvětšení) 0,01 mm. Protože délka strany čtverečku zpravidla nebude celočíselně převoditelná na pixely, je mřížka, která musí mít z podstaty věci rozměry v celých pixelech, zatížena drobnou chybou, která byla výše zmíněna.

6.3.1 Vytvoření mřížky

Mřížku s jeden pixel silnými čarami na sebe kolmými o definované vzdálenosti n-pixelů lze vytvořit mnoha různými způsoby, od vygenerování obrázku nějakými programovými prostředky po „otrocké“ ruční vykreslení v nějakém editoru. Lze vykreslit i malou část mřížky a nástroji jako „razítko“ ji posléze překopírovat po celé potřebné ploše obrázku.

Postup pomocí Perlu a ImageMagicku

```
#!/usr/bin/perl
print ''verze 1\n'';
open (VYS, ''>>Mr10.sh'') or die ''Nelze otevrit vystupni soubor'';
print VYS ''convert -size 2592x1944 xc:white '';
print VYS ''-fill black '';
print VYS ''-draw 'line 0, 0 2592,0' '';
print VYS ''-draw 'line 0, 0 0,1944' '';
print VYS ''-draw 'line 0, 1 2592,1' '';
print VYS ''-draw 'line 1, 0 1,1944' '';
print VYS ''-draw 'line 0, 27 2592,27' '';
print VYS ''-draw 'line 27, 0 27,1944' '';
print VYS ''-draw 'line 0, 54 2592,54' '';
print VYS ''-draw 'line 54, 0 54,1944' '';
print VYS ''-draw 'line 0, 81 2592,81' '';
print VYS ''-draw 'line 81, 0 81,1944' '';
```

...

```
print VYS ''-draw 'line 2565, 0 2565,1944' '';
print VYS ''-draw 'line 2591, 0 2591,1944' '';
print VYS ''-draw 'line 2592, 0 2592,1944' '';
print VYS '' mrizkax10.png'';
print ''\n'';
print ''Program dobehl do konce\n'';
```

Uvedený skript v jazyce Perl vyprodukuje velmi dlouhý příkaz pro program convert z balíku Image Magick, který by se ručně psal neobyčejně špatně, protože se jedná o jeden jediný velmi dlouhý řádek. Příkaz je uložen jako skript linuxového shellu, proto je uložen v souboru s příponou sh.

Program nejprve nadefinuje prázdnou bílou plochu 2592 × 1944 pixelů a poté na ni kreslí od kraje ke kraji černé jeden pixel silné čáry s tím, že okraj snímku lemuje čára dvojitá. Dal by se nadefinovat i cyklus, který by koncové body vygeneroval, ale takto je to jednodušší a s menším rizikem chyby. Mřížka je vygenerována jako soubor mrizkax10.png.

Velikost plochy byla dána velikostí konkrétního fotoaparátu (pro každou dvojici fotoaparát – mikroskop je nutné sestrojit podobnou, avšak v detailech se lišící, mřížku). Uvedená

mřížka je pro 10× zvětšující objektiv námi používaného mikroskopu a námi používaný fotoaparát.

Vkreslení mřížky je možné v jakémkoli grafickém editoru, který umí spojit dva obrázky do sebe (nejčastěji pomocí vrstev).

V Image Magicku je možné použít program composite, který má syntaxi:

```
composite obrázek černá-plocha mřížka obrázek-s-mřížkou
```

Za „obrázek“, „černá-plocha“ a „mřížka“ vklídíme jména souborů, v nichž míme příslušné obrázky uloženy, „obrázek-s-mřížkou“ je název výsledného obrázku (který si můžeme pojmenovat libovolně s omezeními obecně platnými pro názvy souborů).

Černou plochu vygenerujeme analogicky prvnímu (a poslednímu) vygenerovanému příkazu z výše uvedeného programu

```
convert -size 2592x1944 xc:white cerna_plocha.png
```

jen barvu white nahradíme black.

Mřížka při kombinaci obrázků tímto programem, pochopitelně, nemusí být čistě černá, ale může se do obrázku místo jednolité černé plochy (zde soubor černá-plocha) promítnout jeho zatmavená verze, případně jeho negativ, což umožňuje vidět struktury i na ploše mřížky. V grafických editorech typu GIMPu jde něco podobného vytvořit také, ale daleko složitěji.

Pokud je obrázek výřezem z fotografie, tj. nemá rozměry mřížky a černé plochy, nic se neděje. Mřížka i černá plocha začnou na levém horním rohu obrázku a co z nich přesahuje vpravo a dole za jeho okraje, to se do výsledného obrázku nedostane. Na rozdíl od většiny grafických editorů tedy není nutné řešit stejnou velikost dílčích obrázků v rímci kombinace, jen musí být druhý a třetí stejné nebo větší než první.

6.4 Dokumentace primozáchytů

Misky s nárůsty je možné vyfotografovat ze strany nárůstu i skrze dno misky (např. pro záchyt tvorby pigmentu pod kolonií). Fotografie mohou sloužit i pro pojmenování izolátů, pokud je provádíme, i pro počítání kolonií.

Pro pojmenování izolátů je vhodné označit na fotografii misky s nárůstem jednotlivé kolonie písmeny a toto značení respektovat při označení kmenů, jejichž izolace se zdařila.

Pro fotografování misek je ideální denní světlo někde v blízkosti okna, ale nikoli přímý sluneční osvit.

6.5 Dokumentace čistých kultur

Stejně jako misky s primozáchyty lze dokumentovat i čisté kultury pro potřeby konzultace a archivace makroskopického obrazu.

Je to žádoucí i z toho důvodu, že při opakovaném přeočkování zachyceného kmene se mohou jeho makroskopické vlastnosti měnit.

7 Roztoči

Roztoči jsou skupina členovců, kteří se živí mj. mikroskopickými houbami. Jsou schopni přelézat z misky na misku a vzájemně kontaminovat kultury, což představuje největší problém z hlediska získání a udržení čistých kultur.

7.1 Zdroje roztočů

Roztoči se mohou vyskytovat v materiálu, obsahujícím mikroskopické houby, zejména, je-li zde přítomnost organického prachu.

Druhým zdrojem roztočů pro laboratoře je běžná vzduchotechnika bez filtrování přiváděného vzduchu, případně s filtry neschopnými tyto organismy eliminovat.

7.1.1 Rizikové vzorky

Rizikový je jakýkoli surový materiál, donesený z místa, kde se roztoči potenciálně vyskytují, tedy i knihovny nebo knihovního depozitáře, pokud nebylo před odběry provedeno jeho ošetření vhodnými prostředky k ničení podobných škůdců.

Rizikové jsou otisky (pokud z nich izolujeme kmeny mikroskopických hub, z dobře uzavřené nádobky roztoči ven neproniknou), misky se spady a stripy z aeroskopu. Rizikové jsou i stěry, nanášené přímo na povrch půdy (je to jeden z důvodů, proč tuto metodiku nedoporučujeme jako metodiku první volby).

Minimální riziko je u stěrů, kde je tampon vytřepán do fyziologického roztoku a výtřepek následně zalit na Petriho misce kultivačním médiem na bázi agaru. Část roztočů zahyne během této procedury, zbytek přeživších je zalit agarem a po jeho ztuhnutí se udusí.

7.2 Preventivní opatření

Pokud pracujeme se vzorky, které by mohly obsahovat roztoče, zařadíme do běžného periodického úklidu laboratoře i ošetření insekticidy a akaricidy.

Laboratoř těmito prostředky ošetříme po ukončení prací (výzkumných úkolů apod.) se vzorky, které by mohly roztoče obsahovat.

7.3 Známky přítomnosti roztočů v laboratoři

Podezření by měly vyvolat následné jevy:

- Nápadně častá kontaminace misek během přeočkování
- Častý výskyt kontaminujících kolonií na okrajích půd v miskách
- „čárová“ kontaminace, daná tím, jak roztoč leze po povrchu půdy a z jeho trusu vyrůstají organismy, přeživší cestu skrze jeho trávicí ústrojí, včetně konidií mikroskopických hub

- Jamky o průměru něco přes jeden mm na povrchu nárůstu mikroskopické houby v misce (velice často se takto projeví roztoč, který je na jednom místě a vyžírá hyfy okolo sebe)

Jistota je dána objevením roztočů pod mikroskopem. Při zvětšení 10× jsou viditelní špatně, při zvětšení 40 – 50× (objektiv 4 nebo 5 × zvětšující, okulár 10× zvětšující – tato sestava zpravidla umožňuje prohlížet povrch půd mikroskopem bez otevření misky). Dále jsou dobře pozorovatelní v mikrokulturách, při masívní kontaminaci se dostanou i do běžných preparátů.

7.4 Opatření proti roztočům

Roztoče hubí běžné insekticidy a akaricidy (používané např. na klíšťata, nebo při výskytu roztočů v domácnostech alergiků), sehnatelné v běžné obchodní síti. Měly by být střídány preparáty s různými účinnými látkami, aby se předešlo vzniku rezistence.

Lze nastříkat víčka Petriho misek (prostředky většinou nejsou sterilní, ale neobsahují mikroskopické houby). Lze misky balit do papírů těmito prostředky postříkanými. Misky lze uchovávat na podložkách ošetřených preparátem proti roztočům. Lze těmito preparáty zevně ošetřit zátky kultur ve zkumavkách.

Dříve se používal chlorid rtuťnatý (sublimát), pokud by byl použit, měly by se jím ošetřené prostředky (misky, zátky, papíry, podložky apod. likvidovat jako chemicky rizikový materiál. Použití tohoto prostředku padá v úvahu při záchytu linie roztočů rezistentní na dostupné insekticidy a akaricidy.

Roztoče do jisté míry ničí i UV záření z germicidních lamp (na ničím nekrytých površích, nikoli v Petriho miskách), ale tento účinek rozhodně nelze použít jako hlavní nebo dokonce jediné opatření proti roztočům.

8 Výsledky, použité pro vývoj metodiky

V této kapitole jsou presentovány nejdůležitější výsledky *popisných statistik*, porovnávajících jednotlivé metody z hlediska kvantitativních výsledků záchytů.

8.1 Vlhké stěry s výtřepem, 20 cm^2

Tabulka 1: Počet záchytů vláknitých hub na půdách, stěry vlhkým tamponem s vytřepáním

	Počty kolonií na miskách dané půdy u stejného vzorku														
Půda	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	25
Dg	304	37	7	3	2	5	2	1	1						
Asp	187	15	2	1		1									1
Sab	286	41	14	6	2	4	1	1		1	3	1	2		
Malt	104	24	10	6	2	2	2	2				1	1	1	

Asp Aspergillus diferenciační médium, připravené dle návodu výrobce (HiMedia), následující viz oddíl 10

Dg DG agar

Malt Malt Extract Agar

Sab Sabouraudův agar

Tabulka 2: Počet zárodků kvasinek a bakterií na půdách, stěry vlhkým tamponem s vytřepáním

	Počty kolonií na miskách dané půdy u stejného vzorku																			
Půda	0	1	2	3	4	5	7	8	9	10	11	12	13	14	19	33	41	108	170	nesčetně
DgK	357	1	3				1													
Asp	207																			
Sab	254	12	35	18	13	11	3	1	1	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
Malt	113	29	14	9	5	2	3	2	1	1	1									

Zkraty názvů půd viz předchozí tabulka.

8.2 Vlhké stěry s výtřepem, 10 cm^2

V této varientě metody byly počty kolonií cca poloviční a bylo i výrazně vyšší procento misek zcela bez záchytu mikroskopických vláknitých hub i kvasinek a bakterií.

8.3 Stěry s aplikací přímo na misku

Následující tabulka shrnuje porovnání výsledků metod s aplikací stěru suchým či vlhkým tampomem přímo na misku s metodou vytřepání vlhkého tamponu a aplikaci výtřepku.

Všechny tyto metody byly provedeny po 30 vzorcích ze sektoru T.

Tabulka 3: Porovnání záchytnosti třemi různými postupy

		Vzorky	
Půda	Způsob záchytu	bez nárůstu	s nárůstem
Dg	Suchý tampon 100 cm^2	26	4
Dg	Vlhký tampon celá stránka	22	8
Dg	Vlhký tampon výtřepek odpov. 20 cm^2	22	8
Sab	Suchý tampon 100 cm^2	28	2
Sab	Vlhký tampon celá stránka	15	15
Sab	Vlhký tampon výtřepek odpov. 20 cm^2	24	6

Zkratky názvů půd viz tabulka 1 na straně 18

V případě DG agaru je počet pozitivních a negativních vzorků pro různé úpravy zpracování vlhkého tamponu stejný. V případě Sabouraudova agaru je při vytřepání počet vzorků s nárůstem nižší než při setření celé stránky, ale rozdíl není statisticky významný (χ^2 test p = 0,2546).

8.4 Otisky na Hygicult

Tabulka 4: Záchyty na Hygicultu

	Křížky			
Strana testu	0	1	2	3
Méně porostlá	264	76	19	3
Více porostlá	171	87	70	34

0 = žádný nárůst, 1 až 3 nárůst na jeden, dva nebo tři křížky podle šablony dodávané výrobcem (strany odběrové lopatičky nejsou výrobcem nijak označeny)

8.5 Analýza výsledků

8.5.1 Analýza nárůstů z výtřepků

Tabulka 5: Tabulka záchytů na půdách u srovnatelných odběrů

Průměrný záchyt		Statist. významnost (p)			
Půda	KTJ na vzorek	Dg	Asp	Sab	Malt
Dg	0,3315	–	*0,02974*	0,06816	**0,000002**
Asp	0,2512	.	–	**0,0003414**	**0,00000001**
Sab	0,5580	.	.	–	**0,003083**
Malt	0,9161	.	.	.	–

Zkratky názvů půd viz tabulka 1 na straně 18

Poznámka: Na Aspergillus diferenciačním médiu nebyla zachycena za celou dobu jeho používání ani jedna kolonie *Aspergillus flavus* nebo *Aspergillus parasiticus*, na něž je půda určena, a též ani jeden pozitivní kmen *Aspergillus niger* (u tohoto druhu dává cca 5 – 10 % kmenů falešně pozitivní reakci).

Shrnutí: Nejvyšší záchyt byl na Malt Extract Agaru, téměř poloviční na Sabouraudově agaru, následuje DG agar a nejnižší byl na Aspergillus diferenciačním médiu, kde ale zůstal nevyužit jeho chromogenní potenciál pro selektivní stanovení *Aspergillus flavus* nebo *Aspergillus parasiticus*.

8.5.2 Porovnání výsledků otiskových ploch Hygicultu

Tabulka 6: Tabulka korelace stran u Hygicultu

	Maximální			
Minimální	0	1	2	3
0	171	48	35	10
1	0	39	23	14
2	0	0	12	7
3	0	0	0	3

Výtahy z tabulky

- Součet totožných výsledků $(0,0) + (1,1) + (2,2) + (3,3)$ **225**
- Součet totožných nenulových výsledků **54**
- Procento totožných výsledků se započtením nulových **62,15 %**
- Procento totožných výsledků bez oboustranně nulových **28,27 %**
- Procento totožných výsledků, kde byl na obou otiscích nějaký nárůst **44,90 %**

9 Diskuse

9.1 Vyšetření kontaminace ploch

Pro rutinní práci se osvědčilo použití stěru 100 cm^2 na vlhko a následné vytřepání, protože:

1. Všechny misky od jednoho vzorku si vzájemně odpovídají
2. Záchyt je vyšší než suchým tampomem
3. Je možno vynechat v knize místa, které by stěr potenciálně poškodil (např. kolorované rytiny, vpisky apod.)

Na základě dosažených výsledků doporučujeme použití půd Dg jako zástupce půd pro osmofilní organismy, které lze na suchém materiálu, jako je knižní papír, očekávat, dále Sab jako standardní semisyntetickou půdu a Malt jako půdu s přirozenou komponentou.

9.1.1 Výběr půd

Půdy byly vybrány z dvou hledisek, aby na nich byl co nejvyšší záchyt a aby pokrývaly co nejširší spektrum sledovaných mikroorganismů.

9.1.2 Výběr metodiky stěrů

Nejvíce se v námi sledovaných podmínkách osvědčily vlhké stěry ze 100 cm^2. Uvedená plocha se může lišit u jinou intenzitou kontaminovaných materiálů. Vlhké stěry nejsou použitelné na některé druhy tisků a rukopisy, zde je nutno použít stěry suchým tamponem z plochy přibližně čtyřnásobné.

Je rovněž nutno počítat s tím, že výsledky stěrů suchým a vlhkým tamponem budou mít i poněkud odlišnou kvalitu ve smyslu zastoupení druhů, protože kolonie tvořící jednotky různých druhů se budou na suchém a vlhkém tamponu zachacovat s různou pravděpodobností, případně ze suchého tamponu při další manipulaci odpadnou. Při zvlhčení tamponu je do značné míry eliminován i vliv elektrostatického náboje, který při otírání papíru může vzniknout a ovlivnit množství a spektrum zachycených spor.

Vytřepání tamponu do vhodného média (nám se plně osvědčil fyziologický roztok) je výhodnější, protože misky s různým druhem půd odpovídají téže setřené ploše a současně je i sníženo riziko zavlečení roztočů do laboratoře.

9.1.3 Výběr typu inokulace

V konkrétních podmínkách materiálů z knihovny benediktýnského kláštera v Rajhradě se nám osvědčila aplikace vzorku na povrch půdy v Petriho misce. V případě vzorků více kontaminovaných bakteriemi a kvasinkovitými organismy, majícími tendenci tvořit na půdě povlaky (s jakými se lze běžně setkat např. v potravinách nebo potravinářských provozovnách či provozovnách veřejného stravování, je výhodnější zalití vzorku půdou na Petriho misce. Nárůst nežádoucích bakterií lze omezit přídavkem vhodného antibiotika do půdy.

Aplikace na povrch půdy v Petriho misce má ještě tu výhodu, že pro potřeby vytvoření akreditované metody lze hotové misky nakupovat od akreditovaného pracoviště a ušetřit náklady na akreditaci přípravy půd svépomocí. [1] Inokulaci aplikací na povrch půdy na Petriho misce doporučují i normy ČSN ISO pro vzorkování povrchů [4] a pro počítání kolonií pro výrobky s a_w menší nebo rovnou 0,95 [5].

Nejsou-li k dispozici půdy s obsahem antibiotika, je možná jejich alespoň nouzová náhrada dodatečnou aplikací 3 – 4 vhodných komerčních antibiotických disků (se širokospektrým antibiotikem) na povrch ztuhlé půdy. Tuto metodu jsme také vyzkoušeli, ale bez souvislosti se vzorky z Rajhradu.

9.2 Hygiculty

Nepodařilo se nám v dostupné literatuře dohledat použití Hygicultu, určeného původně pro účely potravinářské mikrobiologie, k vyšetřování knih a podobných materiálů, ověření použitelnosti hygicultů pro tento typ materiálu považujeme za nový prvek v metodice.

Hygiculty jsou o něco šetrnější než vlhký tampon, protože se odběrová půda na testovaný materiál pouze přitiskne, nedochází k otěru.

Největší záchyt pro knihy postavené standardním způsobem v poličkách byl na horní ořízce.

K porovnání otiskových ploch z jednoho vzorku se domníváme, že v případě nulového nárůstu na obou otiscích lze předpokládat, že testované plochy obsahovaly Hygicultem nezachytitelnou kontaminaci (= prakticky nulovou, z pohledu této metody).

Z tohoto důvodu se jeví jako důležitější výsledky, kde alespoň na jedné z ploch Hygicultu byl nějaký nárůst (= je zde záruka nenulové kontaminace sledované plochy). V tomto případě se ukazuje vysoká míra nehomogenity testovaných ploch.

9.3 Sledování kontaminace ovzduší

9.3.1 Sedimentační metoda

Tato metoda se používá více než sto let a kromě výběru půd a časů na ní nelze mnoho modifikovat. Navrhujeme takové spektrum půd, které by mělo zachytit všechny významné vláknité houby v prostředí (nejen mikroskopické).

9.3.2 Aeroskopie

V případě použití přístroje (aeroskop, airsampler apod.) na záchyt vzorků vzduchu je nutné pracovat striktně podle pokynů výrobce konkrétního zařízení.

[1] Na našem pracovišti probíhá výuka pre- i postgraduálních studentů, což je zásadní překážkou pro akreditaci pracoviště.

9.4 Metodické problémy

9.4.1 Vyšetření ploch

Hygiculty lépe, ale i stěry ukazují velmi vysokou heterogenitu sledovaného materiálu.

Dalším problémem je skutečnost, že jednou setřená plocha je ovlivněná a není možné, aby na ní byl podruhé dosažen identický výsledek. Z tohoto důvodu bylo nutné počítat s faktem, že jsou stírány různé plochy a jejich reprezentativnost je dána pouze velkým počtem zpracovaných vzorků.

9.4.2 Vyšetření kontaminace ovzduší

Je nutno si uvědomit, že při sedimentační metodě jsou zachyceny kolonie tvořící jednotky spontánně klesající na povrch půdy, zatímco přístroje na odběr vzorků zpravidla ženou proud vzduchu na povrch kultivačního média, kdy k záchytu kolonietvořících jednotek dochází v místě změny směru tohoto proudu odstředivou silou.

Pro různě tvarované a různě hmotné zárodky bude procento záchytu při těchto metodách různé, proto doporučujeme i při rutinním použití přístrojové metody použít metodu sedimentační, zejména při snaze o kvalitativní zhodnocení kontaminace vzduchu (tj. následném určování zachycených druhů vláknitých hub).

9.5 Preparáty

Laktofenol je bezproblémové a široce používané médium pro přípravu mikroskopických preparátů hub.

Melzerovo činidlo dává o něco lepší výsledky u některých druhů vláknitých hub, protože jod v něm obsažený barevně reaguje s některými polysacharidy ve stěnách houbových hyf. Je mimo bývalou ČSR prakticky neznámé (a už vůbec ne na pracovištích se zaměřením na mikroskopické vláknité houby), protože jeho autor byl český amatérský mykolog, specializující se na holubinky a působící na počátku minulého století.

Technický problém s uvedeným činidlem spočívá v tom, že zatímco laktofenol běžně namíchá nemocniční lékárna, chloralóza, která je základem Melzerova činidla, byla před časem vyřazena z materia medica (tudíž není v lékárnách běžně k dispozici) a mykologické pracoviště si buď musí namíchat toto činidlo kompletně samo, nebo se dohodnout s nějakou lékárnou, která ho připraví ze zvlášť zakoupené a do ní dodané chloralózy.

9.6 Fotodokumentace

Uvedenou kapitolu a postupy v ní uvedené jsme zařadili z toho důvodu, že řada terénních, ale i akademických pracovníků se domnívá, že tyto aktivity nesou možné bez velmi rozsáhlého a patřičně nákladného vybavení. Platí však Mooreův zákon, který velmi nekompromisně způsobuje, že elektronika dnešních levných zařízení má vyšší výkon než velmi drahá zařízení, jaká existovala na konci minulého století a pro většinu terénních i akademických pracovišť byla finančně nedostupná.

U fotoaparátů jsme vyšli i ze zkušeností, které máme z praktických cvičení, v nichž si studenti dokumentují podobnými prostředky jak nárůsty na Petriho miskách, tak i mikroskopické preparáty.

Méně „smart“ zařízení zpravidla dává lepší výsledky z toho důvodu, že miska či pohled do okuláru mikroskopu nejsou objekty a situace, na jehichž dokumentaci najde „smart“ zařízení vhodný program, zatímco „nikoli smart“ zařízení zaostří na nejvyšší ostrost ve středu zorného pole a dále nad snímkem neřeší žádné úkoly.

V případě mikroskopických snímků by bylo možné pořídit sérii téhož preparátu s nepatrně odlišnými rovinami ostření a pokusit se je spojit do jednoho snímku. Existují na to komerční programy, používané profesionálními fotografy, ale je to možné provést i manuálně spojením ostrých částí více snímků do jednoho.

V případě sowtwarových prostředků jsme se zaměřili na ty, které jsou open source, tedy zdarma a bez omezení použitelné.

9.7 Roztoči

Preventivní opatření proti těmto škůdcům akcentujeme zejména proto, že některá pracoviště se s nimi nemají příležitost setkat a vyšetření knižních fondů, papírových dokumentů a podobných materiálů může být jejich prvním zdrojem potenciálně takto kontaminovaných vzorků.

10 Doporučené půdy a činidla

10.1 Zajištění přípravy půd

Pro přípravu půd autoklávováním (což se týká naprosté většiny) je podle současných bezpečnostních předpisů nutná samostatná místnost (resp. může být sdružena s jinými přístroji, nevyžadujícími trvalou přítomnost obsluhy, např. automatickou myčkou laboratorního skla). Personál, provádějící tuto práci, musí být periodicky proškolován pro práci s tlakovými nádobami.

10.2 Komerční půdy

1. DG agar, výrobce Bang. Co, silně osmolární půda pro záchyt xerofilních druhů, nebo
   - případně ekvivalent od jiného výrobce (pro spady jsme vyzkoušeli DRBC agar od stejného výrobce nebo od firmy HiMedia)
   - nebo agar G25N dle Pitta a Hockingové (viz dále)
2. Sabouraudův agar, jako zástupce semisyntetických půd, vyrábí a dodává řada firem
3. Malt extract agar, jako zástupce půd s přírodní komponentou, vyrábí řada firem, případně obohacený jako půda MEA dle Pitta a Hockingové (viz dále)

10.3 Půdy dle Pitta a Hockingové a jejich ekvivalenty

Czapek-Dox agar: Roztok stopových prvků: [2]

$CuSO_4.5H_2O$	0,5 g
$ZnSO_4.7H_2O$	1,0 g
Destilovaná voda	100,0 ml

Koncentrovaný Czapkův roztok: [3]

$NaNO_3$	30,0 g
KCl	5,0 g
$MgSO_4.7H_2O$	5 g
$FeSO_4.7H_2O$	0,1 g
Destilovaná voda	100,0 ml

[2] Lze uchovávat neomezeně beze sterilizace.

[3] Lze uchovávat neomezeně beze sterilizace. Před použitím suspendovat precipitát $Fe(OH)_3$.

Samotná půda:

K_2HPO_4	1,0 g
Koncentrovaný Czapkův roztok	10 ml
Roztok stopových prvků	1 ml
Yeast extract práškový	5,0 g
Sacharóza	30 g
Agar	15 g
Destilovaná voda	1000,0 ml

Sacharóza má být rafinovaná bez obsahu siřičitanů. Sterilizovat při 121 °C 15 minut. pH nastavit na 6,7.

MEA:

- Původní receptura

Malt extract	20,0 g
Pepton	1,0 g
Glukóza	20,0 g
Agar	20,0 g
Destilovaná voda	1000,0 ml

- Náhražka s využitím komerční půdy

  Vzít 2/3 navážky *Malt extract agar* HiMedia (= 33,33 g na litr), doplnit (množství na litr) 20 g *glukóza* a 10 g *Agar*

G25N:

- Originální receptura

KH_2PO_4	0,75 g
Koncentrát pro Czapek-Doxův agar	7,5 ml
Yeast Extract	3,7 g
Glycerol	250g
Agar	12,0 g
Destilovaná voda	750,0 ml

- Náhrada s použitím komerční půdy

  Vzít 3/4 navážky *Czapek-Dox HiMedia* (= 36,75 g na litr) a doplnit (množství na litr) 0,75 g $NaNO_3$, 0,75 g agaru a 3,75 g yeast extraktu; navážka na 1 l se rozpustí ve směsi 250 g glycerolu a 750 ml vody.

10.3.1 Poznámky

- Půdy s Malt Extractem, i půdy připravené přímo z pivovarské sladinky, nesnáší záhřev po sterilizaci. Musí se vylít kompletně všechny navařená na misky, nelze je schovávat a po rozvaření znovu vylévat (jak běžně lze provést s většinou agarových půd), hrozí, že pak neztuhnou. Je-li třeba připravit šikmé agary, pak tyto půdy rozvaříme při 90 – 100 °C, rozplníme do zkumavek a poté přeautoklávujeme a našikmíme..

- Pro půdy s gylcerolem je kritická jeho čistota. Použití staršího glycerolu, který do sebe pojal vodu, může vést k tomu, že půda nebude tuhnout.[4]

10.4 Činidla na přípravu preparátů

10.4.1 Laktofenol

Složení: fenol 20g, kyselina mléčná 20 g, glycerol 40 g, voda destilovaná 20g. Je možný přidavek cotton-blue.

10.4.2 Melzerovo činidlo

Jedná se o Lugolův roztok, téměř nasycený chloralhydrátem: (složení: 1,5 g KJ, 0,5 g J, 22 g chloralhydrátu, 20 ml destilované vody), uchovávat v temnu

[4]Byť je to k nevíře vzhledem k podílu vody v receptuře půdy.

Reference

[1] Pitt J. I., Hocking A. J.: Fungi and Food Spoilage. Blackie Academic & Professional, London - Weinheim - New York - Tokyo - Melbourne - Madras, 1997, 593 str.

[2] Fassatiová O.: Plísně a vláknité houby v technické mikrobiologii. SNTL Praha, 1979, 211 str. + 25 příloh

[3] Kolektiv: Melzerovo činidlo http://www.agromanual.cz/cz/atlas/vykladovy-slovnik/melzerovo-cinidlo.html?asort=M, stav k 26. 10. 2015

[4] ČSN ISO 18593

[5] ČSN ISO 21527-2

Nejsou zde uváděny návody výrobců k jednotlivým půdám, pomůckám a přístrojům.