



**Sledované parametry  
mikrobiální  
ekotoxikologie a  
působení toxických  
látek na ně**

# Umělé(!) rozdělení sledovaných parametrů (endpointů):

## 1) Měření kvantitativních parametrů

Množství mikroorganismů buď celkové, nebo některých skupin, či indikátorových druhů

*Využívá: mikroskopických technik (direct counts, barvení, fluorescence ...), izolačních a kultivačních technik (MPN, viable counts ...), biochemických metod (SIR), stanovení buněčných komponent (stanovení  $C_{bio}$ ,  $N_{bio}$ , ATP, DNA, fosfolipidů ...)*

## 2) Měření růstu mikroorganismů

Sledování kinetiky růstu, parametry např.  $\mu_{max}$ , lag apod.

*Využívá: statické a dynamické kultivace, inhibice růstu, sledování kinetiky růstu pomocí parametru aktivity (kinetika SIR) atd.*

## 3) Měření metabolických aktivit

Měření celkových aktivit společenstva či jen vybraných skupin (selekce).

*Využívá řadu různorodých technik: respirace, amonifikace, nitrifikace, fixace dusíku, anaerobní aktivity. inkorporace thymidinu, produkce tepla, enzymatické aktivity (dehydrogenáza ...) atd.*

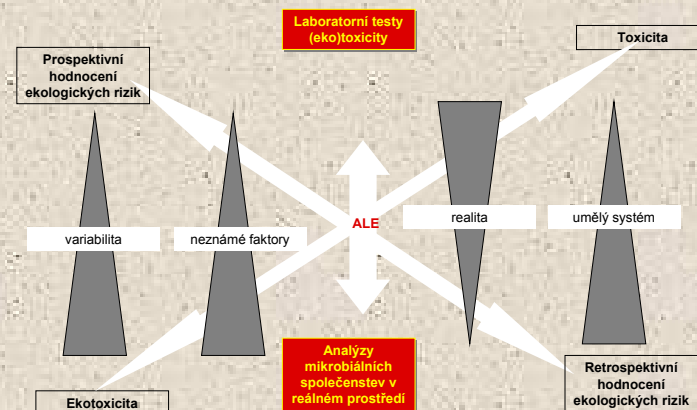
## 4) Měření struktury mikrobiálních společenstev

Hlavně hodnocení biodiverzity a také indikace skupin či individuálních mikroorganismů

*Využívá: mikroskopické techniky spojené s barvením (imunofluorescence, próby DNA ...), izolační a kultivační techniky (selektivní média, inhibitory skupin ...), genetické a molekulární techniky (próby DNA, rychlost annealingu, PCR, DGGE, RFLP ...), analýzy fosfolipidů, analýzy metabolického fingerprintu (BIOLOG), specifické biomarkery a bioindikátory (ergosterol, kys. muramová ...)*

**Výše jmenované parametry mohou být užívány jako endpointy v laboratorních testech i jako parametry při sledování mikroorganismů v prostředí**

Přístupy k ME výzkumu vs hodnocení ER



**Rozdělení sledovaných parametrů je umělé a techniky jsou využívány napříč tímto rozdělením**

## Množství dostupných technik závisí na skupině organismů:

- ekotoxikologie mikroorganismů nejvíce na prokaryotech (také mnoho metod)
- méně na houbách, zelených řasách a prvocích - **spíše ekologické techniky:**

### Houby

- **přímé pozorování**, mycelia na makroskopické škále
- **mikroskopické techniky** (např. délka hyf -  $H[\mu\text{m}/\text{grid}]$ ), pozorování, barvení a značení
- **imunologické techniky**: FAT - fluorescent antibody technique (FDA), RIA - radioimmunoassay, ELISA - enzyme-linked immunosorbent assay
- molekulárně – biologické techniky (PCR)
- izolační techniky

### Protozoa

- mikroskopické metody, separace na Petriho miskách
- počítání MPN
- gradientovaná centrifugace následovaná barvením, epifluorescenční barvičky

### Sinice

- dobře rostou v běžných univerzálních médiích
- počítání MPN, přímá a fluorescenční mikroskopie



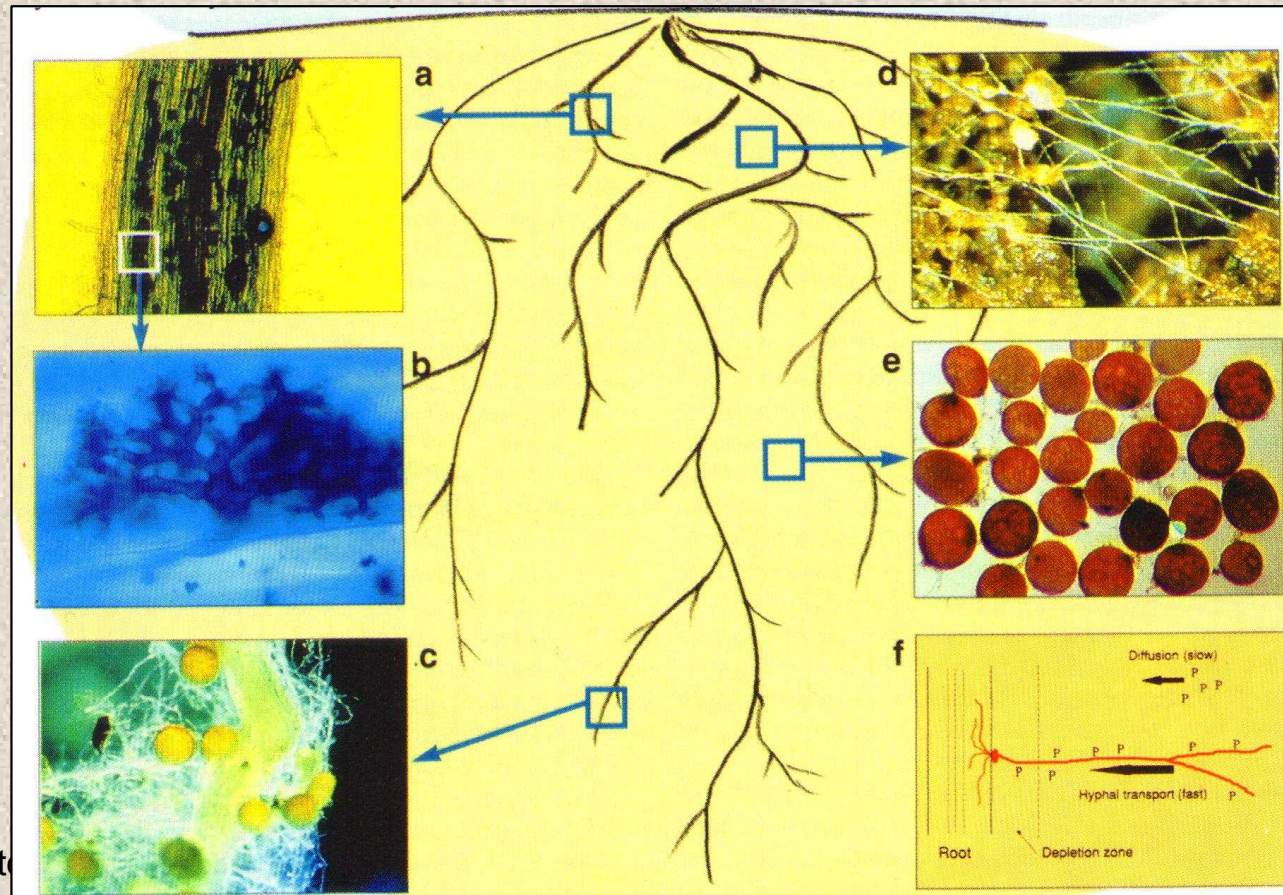
**Existují i další, víceméně ekologické techniky, které lze použít v ekotoxikologickém designu buď laboratorních testů či studií v reálných ekosystémech:**

### Sledování arbuskulární mykorrhizy

- houba (AM) roste intra- a intercelulárně na kořenech rostliny - několik typů, různé morfologie i fungování
- příklad symbiózy: houba získává z rostliny veškerý organický uhlík (až 10-20%  $\text{CO}_2$  asimilovaného rostlinou); oproti tomu rostlina získává minerální živiny (P, N, K, Ca, Mg, Zn a Cu) z houby

## Arbuscular Mycorrhiza in Soil Quality Assessment

- Arbuscular mycorrhizal (AM) fungi constitute a living bridge for the transport of nutrients from soil to plant roots, and are considered as the group of soil microorganisms that is of most direct importance to nutrient uptake by herbaceous plants.
- AM fungi also contribute to the formation of soil aggregates and to the protection of plants against drought and root pathogens.
- Assessment of soil quality, defined as the capacity of a soil to function within ecosystem boundaries to sustain ecological productivity, maintain environmental quality, and promote plant health, should therefore include both quantitative and qualitative measurements of this important biological resource.
- Various methods for the assessment of the potential for mycorrhizal formation and function are presented. Examples are given of the application of these methods to assess the impact of pesticides on the mycorrhiza.



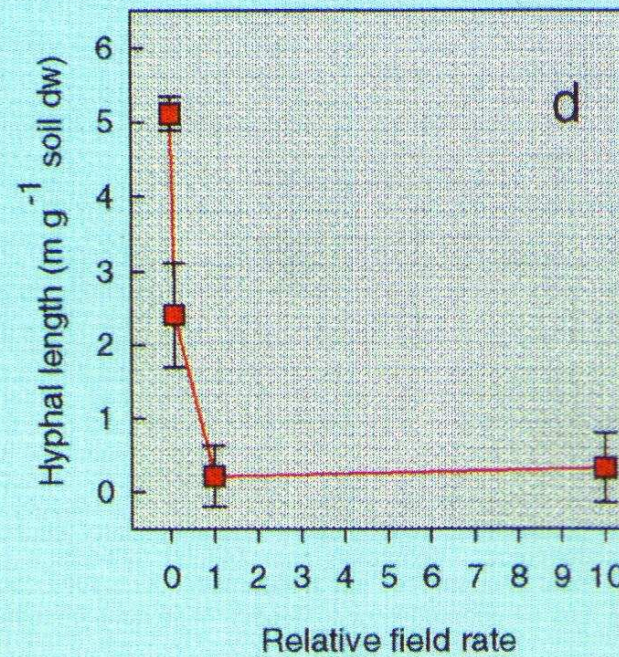
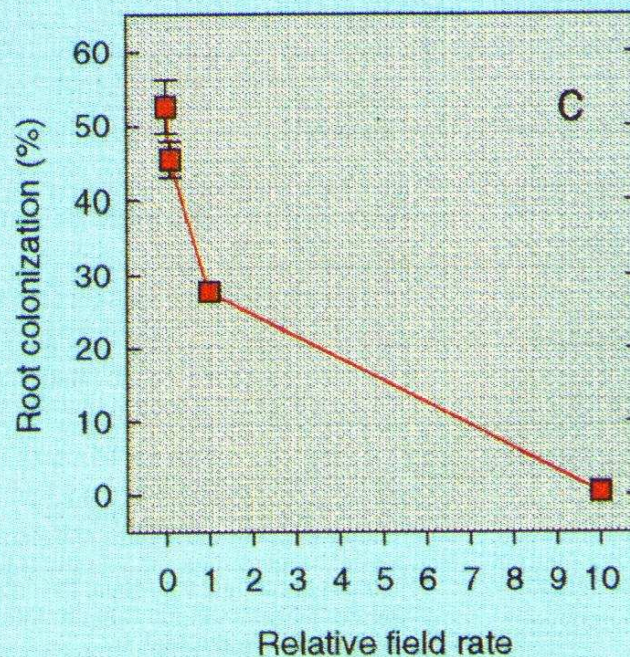
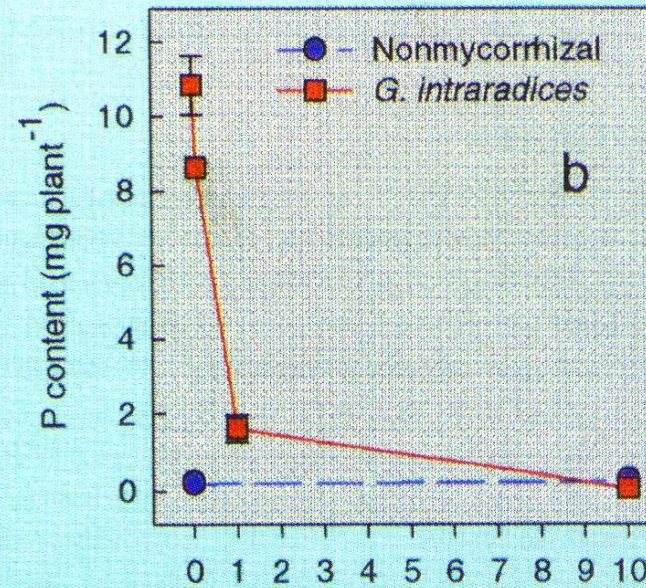
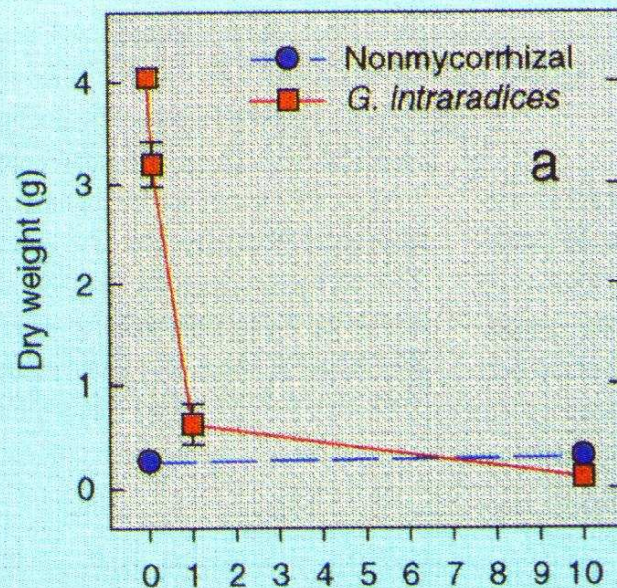


# Příklad:

## Endpointy

- a) Sušina rostlin
- b) celkový obsah fosfátů
- c) kolonizace kořenů
- d) délky hyf

AM symbioza ošetřená  
0, 0.1, 1.0, 10.0  $\mu\text{g}$   
carbendazimu na gram  
půdy







# Odběry pro mikrobiální analýzy

## Důležité jsou techniky odběrů:

- zejména kvantifikace může být odběrem a nakládáním se vzorky silně zkreslena
- také kvalitativní parametry (aktivita, diverzita) jsou ovlivnitelné odběrem, zpracováním a manipulací se vzorky

Hlavním cílem je: 1) získat reprezentativní vzorek  
2) minimálně či standardně (víme jak, o kolik) odběrem a manipulací změnit kvantitu

### Existuje mnoho metod a teorie kolem vzorkování

**pro vodu:** ISO 5667 řada

ČSN EN ISO 5667-16 Jakost vod - Odběr vzorků - Část 16: Pokyny pro biologické zkoušení vzorků

**pro půdu:** ISO 10381-6:1993 Soil quality - Sampling - Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory

**Table 7.1**

Comparison of microbial sampling approaches in major natural environments

| Environment | Access           | Numbers     | Sampling devices           | Sample processing         |
|-------------|------------------|-------------|----------------------------|---------------------------|
| Air         | Direct           | Low         | Filters, Andersen samplers | Concentration on filters  |
| Water       | Direct or remote | High or low | Nets, containers, filters  | Dilution or concentration |
| Sediment    | Remote           | High        | Grabs, corers              | Serial dilution           |
| Soil        | Direct           | High        | Shovels, corers            | Serial dilution           |



## Půda - vzorkování

- většinou vysoké obsahy mikroorganismů => stačí aseptické techniky (rýče, vzorkovací tyče - odeberou směsný vzorek, či celé jádro)
- další techniky: zakopaná sklíčka, pedoskop apod.
- u půd s nízkým oživením se použije atraktantu či návnady a tím dojde k zakoncentrování



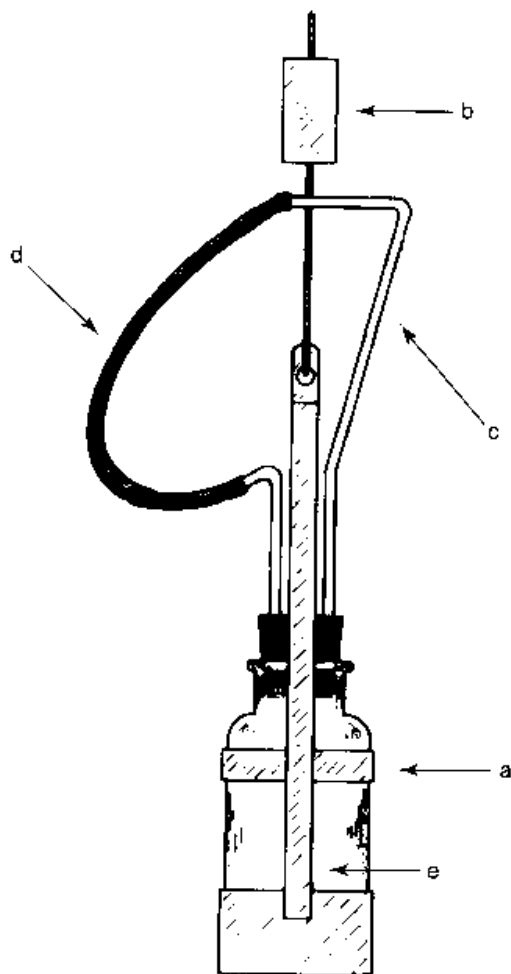
FIGURE 8.1 Hand auger. (Photo courtesy R. M. Maier.)

## Sedimenty - vzorkování

- bagrem, či vzorkovací tyčí

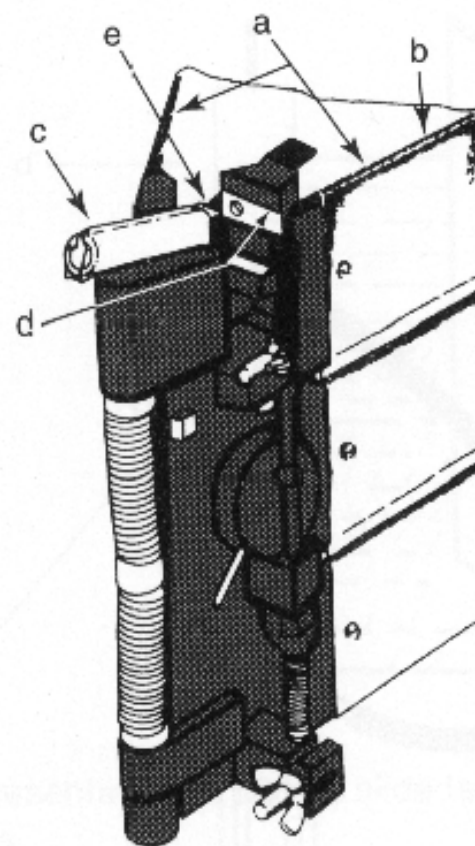
## Voda - vzorkování

- obtíže s možnou kontaminací jinými mikroorganismy, proto se používají speciální techniky



**Figure 7.3**

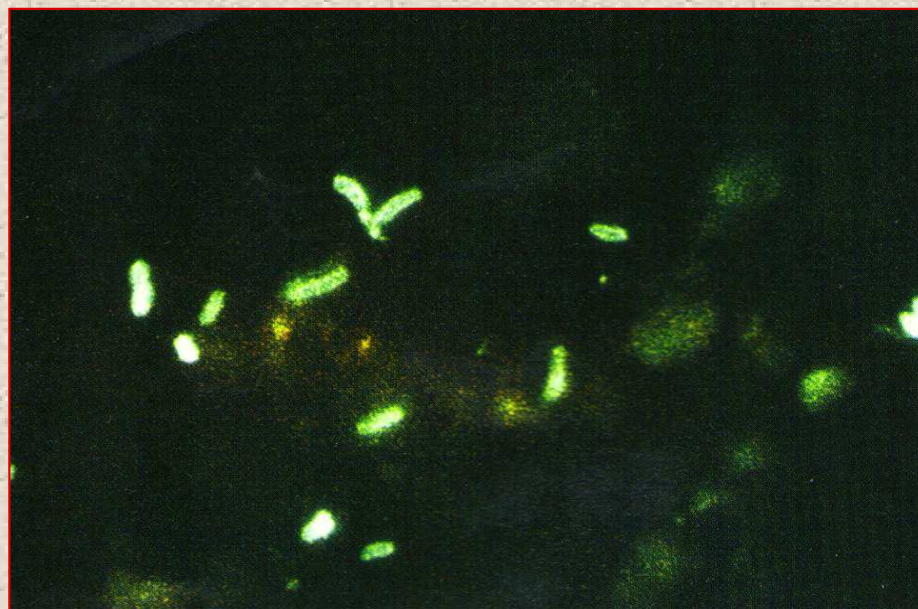
J-Z sampler for collection of water samples at shallow depths. (a) Bracket. (b) Messenger. (c) Glass tube to be broken by messenger. (d) Rubber inlet tube. (e) Partially evacuated sample bottle.



**Figure 7.4**

Sterile Niskin butterfly water collecting bag. (a) Spring-loaded holder. (b) Sterile plastic bag. (c) Rubber inlet tube. (d and e) Knife blade for opening inlet when triggered by messenger.

# Mikroskopické techniky



## Mikroskopické techniky

- přímé počítání a pozorování v mikroskopu
- často jsou mikroskopické techniky užívané při stanovení počtů živých (aktivních) mikroorganismů ve vzorcích kontaminované vody, půdy, sedimentu

### **Mikroskopická sledování mohou být velmi nespolehlivá**

- rušena koloidní organickou hmotou a org. residui
- subjektivní hodnocení
- nepřesné měření

Moderní přístroje a mikroskopy umožňují automatizaci analýz (např. analýza obrazu).

### **Světelná mikroskopie:**

- "Light-field " mikroskopie
- "Dark-field" mikroskopie
- Fázově kontrastní mikroskopie
- diferenciální interferenční mikroskopie DIC (Differential interference contrast)
- Fluorescenční mikroskopie

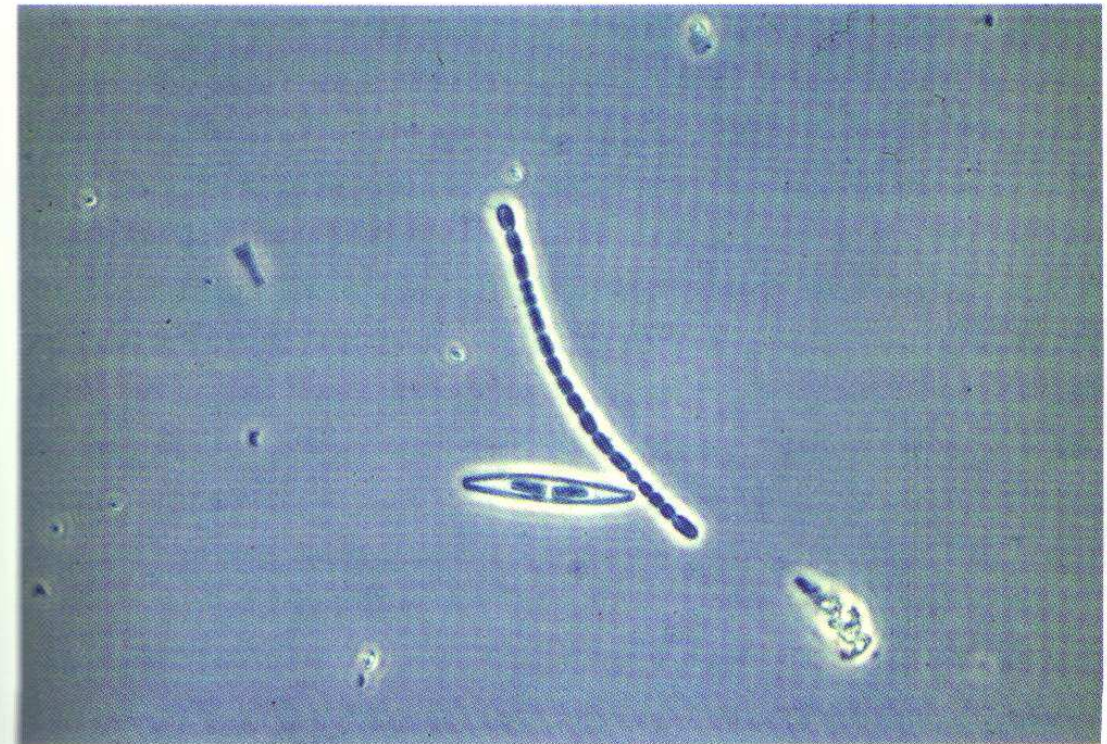
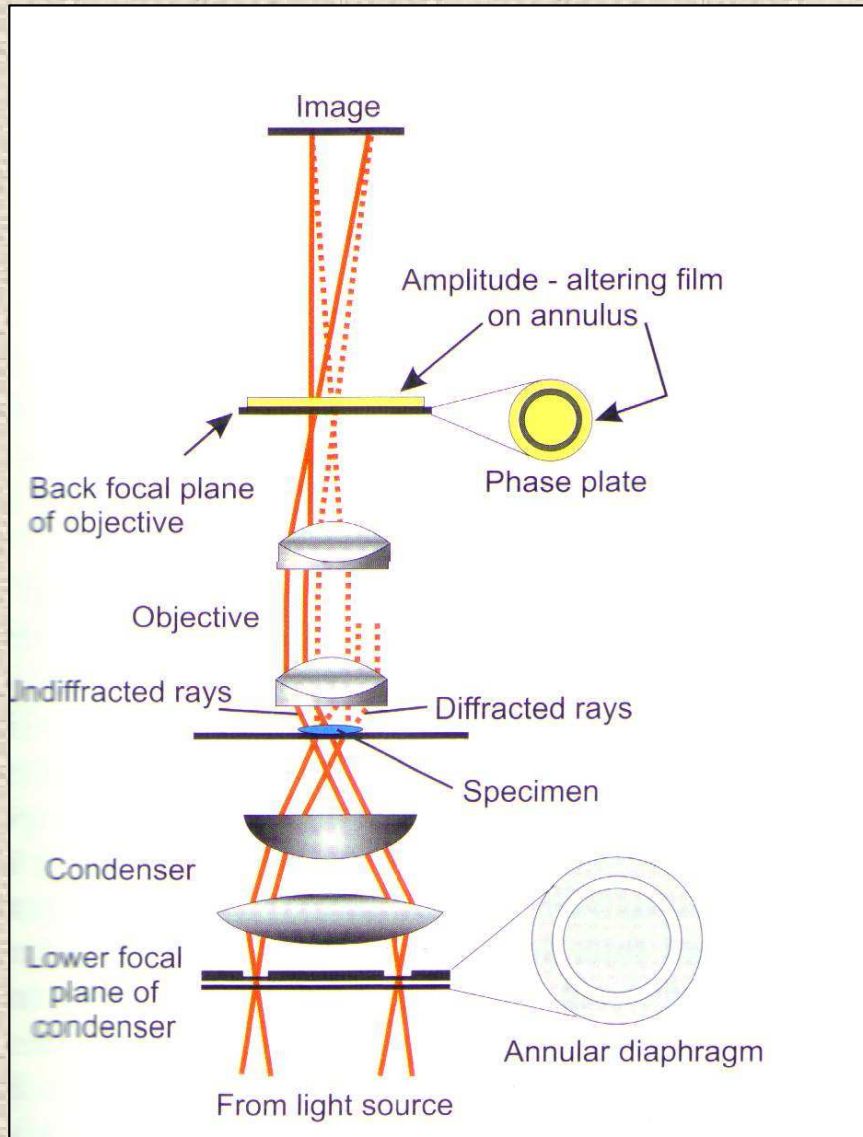
### **+ další techniky:**

polarizační mikroskopie, elektronová mikroskopie (SEM - scanning electron microscopy, TEM - transmission electron microscopy), flowcytometrie atd.



## Fázově kontrastní mikroskopie

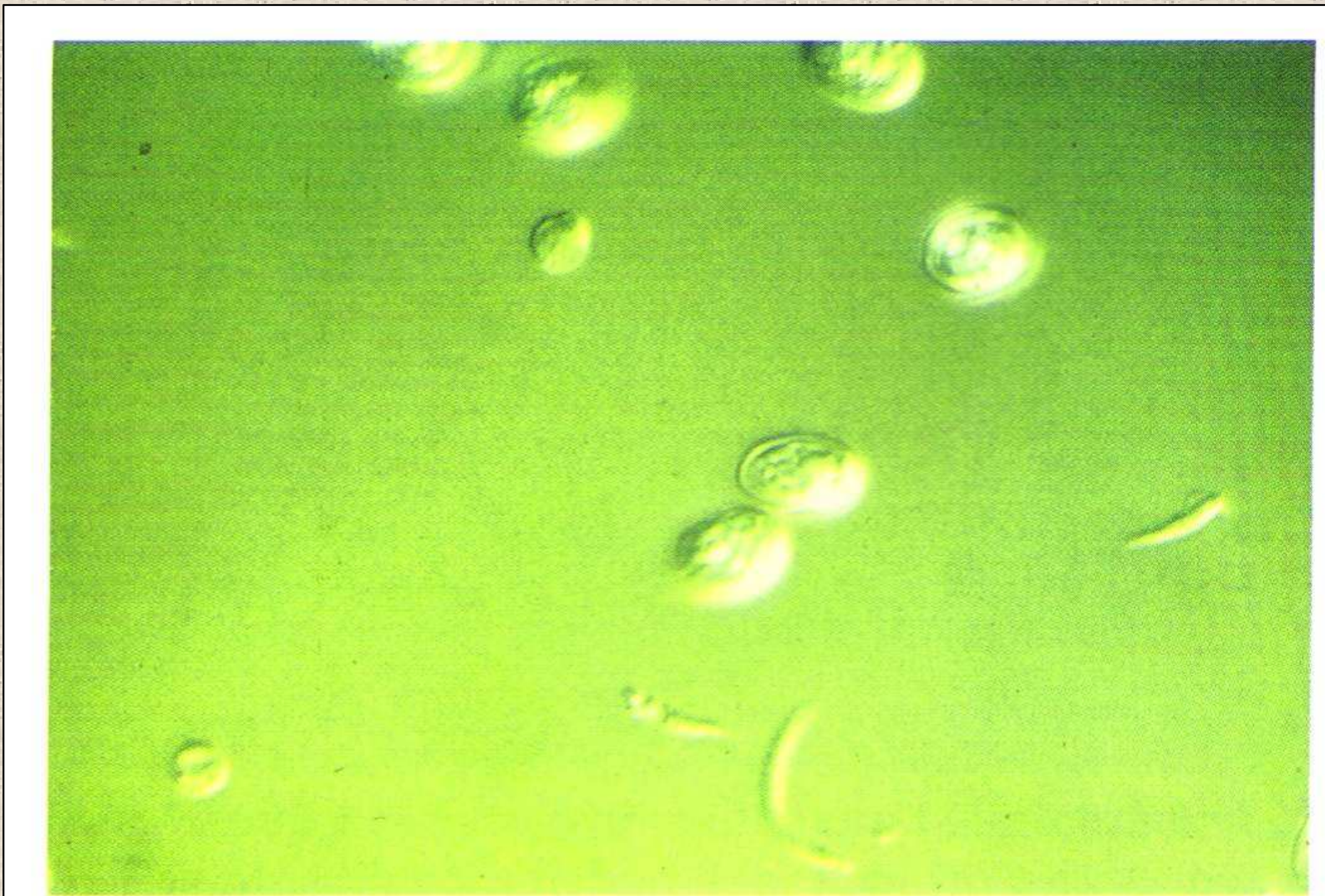
převádí fázové posuvy světelného vlnění, které prošlo vzorkem, na změny intenzity v obraze.



**FIGURE 9.5** Phase-contrast image of a free-living nitrogen-fixing cyanobacterium (40  $\mu\text{m}$  length) and the algal cell known as a diatom (12  $\mu\text{m}$  length). (Photo courtesy P. Rusin.)



Diferenciální interferenční mikroskopie



**FIGURE 9.7** A differential interference contrast (DIC) image of *Cryptosporidium* with associated sporozoites. (Photo courtesy P. Rusin.)



## SEM a TEM



**FIGURE 9.14** Scanning electron microscope image of a biofilm of a *Rhizobium* bacterium. Each bacterium is approximately  $2\ \mu\text{m}$ . (Photo courtesy I. L. Pepper.)



**FIGURE 9.16** A typical transmission electron microscope (TEM) (Photo courtesy FEI Company.)



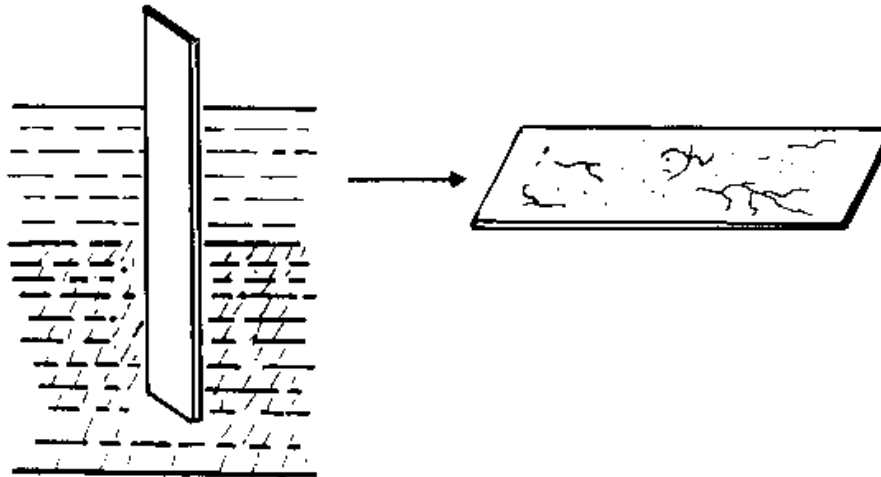
## In situ mikroskopie půdy

- lze sledovat mikroorganismy téměř přímo v prostředí, ovšem kvantifikace je poměrně nepřesná

### Metoda zakopaných sklíček (buried slide technique)

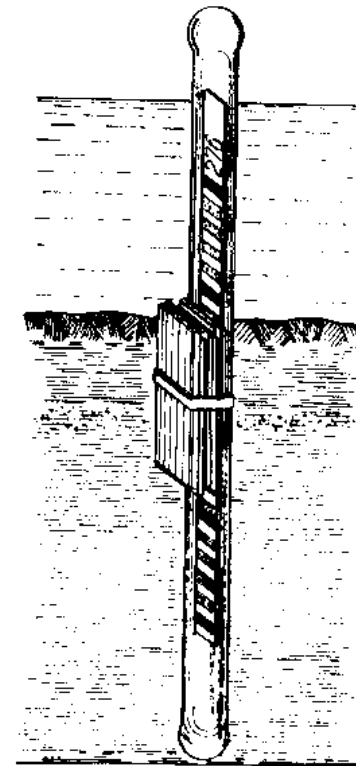
- zakopané mikroskopické sklíčko a po nějaké době lze opatrně vyjmout a mikroskopovat, barvit vzniklou vrstvu

- alternativou je **pedoskop** (simuluje půdní mikropóry hranatými skleněnými kapilárkami)



**Figure 7.1**

Schematic representation of buried slide technique for collection and enumeration of microorganisms.



**Figure 7.2**

Pedoscope for *in situ* observation of microorganisms in soil environment. A pedoscope is a similar device for observation in soil. (Source: Aristovskaya 1973. Reprinted by permission of British National Research Council.)

# Vizualizace mikroorganismů pomocí fluorescenčních prób

- fluorescenčně značená biomolekula (protein, NA, polysacharid či lipid) se váže selektivně na antigen, sacharid, sekvenci NA a označí tak tento cíl
- pro půdní vzorky intenzivně užívané od r.1970
- známé množství homogenizovaného vzorku je umístěno do mikroskopovaného prostoru a obarveno fluorescenčním barvivem
- lze stanovit délky buněk i jejich objemy (biovolume)
- lze stanovit % podíl buněk vykazujících invaginaci „Frequency of Dividing Cells" (**FDC index**) - *in situ* stanovený index indikující růstovou rychlost (Bloem, 1992)
- metabolicky aktivní hyfy hub mohou být stanoveny **fluorescein diacetátem (FDA)**, který se stává fluorescentním až po enzymatické hydrolýze

# Vizualizace mikroorganismů pomocí molekulárních prób a epifluorescenční mikroskopie

## Nespecifická vs specifická detekce

### Často užívaná barviva:

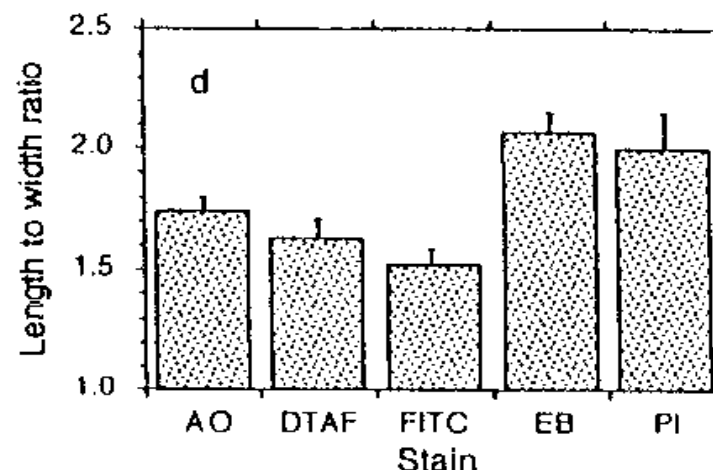
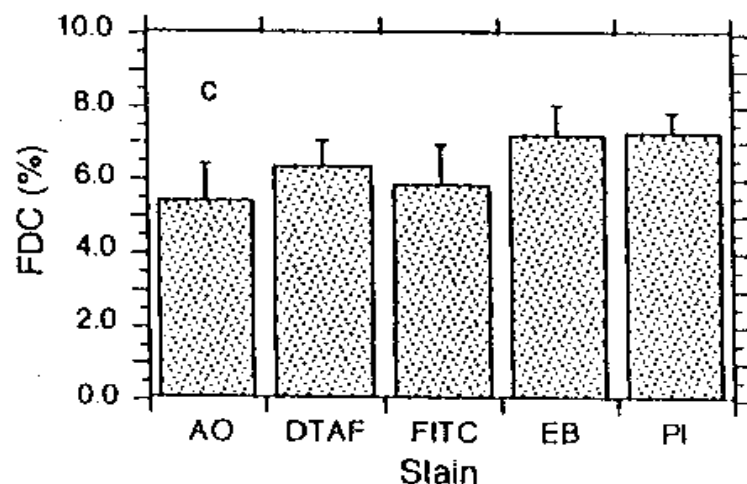
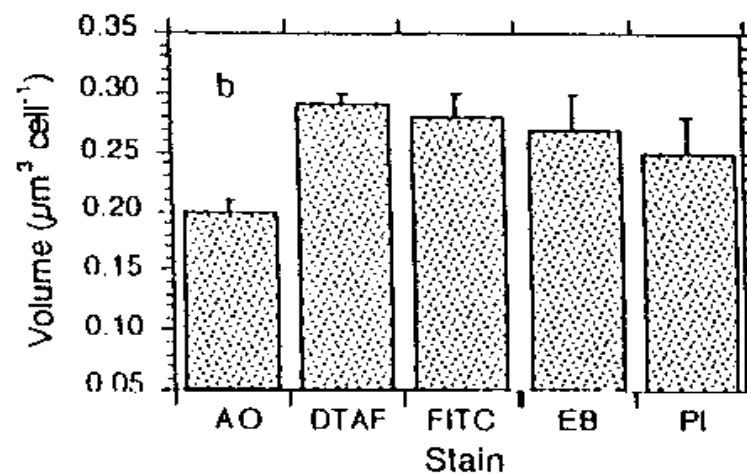
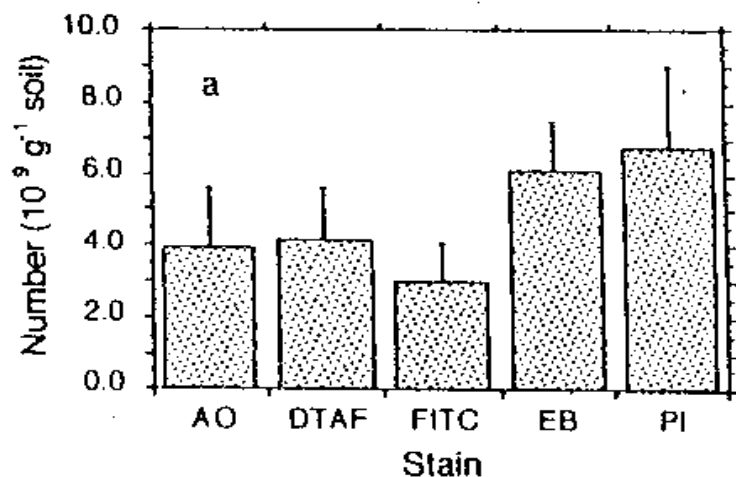
- Fluorescein isothiokyanát (FITC) - barví proteiny
- Acridin orange (AO) - barví nukleové kyseliny
- Ethydium bromid (ED) - barví nukleové kyseliny
- 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)
- atd .....



## Příklad:

### Epifluorescenční techniky

srovnání různých barviv při analýzách vzorků půdy



Bacterial numbers (a), mean cell volumes (b), frequencies of dividing cells (FDC) (c) and length to width ratios (d) in soil smears from one suspension of a loam soil as measured after staining with acridine orange (AO), 5-(4,6-dichlorotriazin-2-yl) aminofluorescein (DTAF), fluorescein isothiocyanate (FITC), ethidium bromide (EB) and propidium iodide (PI). Error bars indicate SD,  $n = 10$ . LSDs are: (a)  $1.45 \times 10^9$  bacteria per gram of soil; (b)  $0.019 \mu\text{m}^3$ ; (c) 0.78%; (d) 0.088.

# Antigenní techniky – specifická detekce

- 1) využití polyklonálních protilátek (vznikají např. při imunizaci králíků) - obsahují řadu protilátek; reagují s necílovými mikroorganismy
- 2) využití monoklonálních protilátek

## a) aglutinační techniky

- mikroorganismy se shluknou díky vazbám zprostředkovaným protilátkami
- citlivost od  $10^7/\text{ml}$  ---> spíše screening

## b) agar diffusion test - vznikají proužky sraženin

## c) immunomagnetické vychytávání - na principu selekce dotyčných mikroorganismů

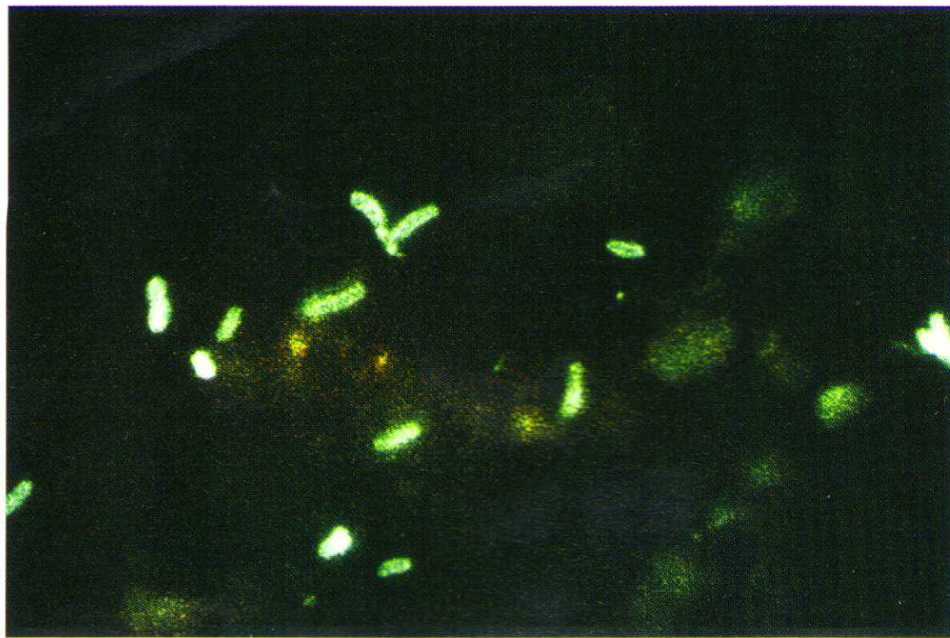
## d) značené protilátky

- fluorescenční (FAT) či luminiscenční barvičky, zlato či enzymy (ELISA - enzyme linked immunosorbent assay)
- citlivost až  $10^5 - 10^3/\text{ml}$

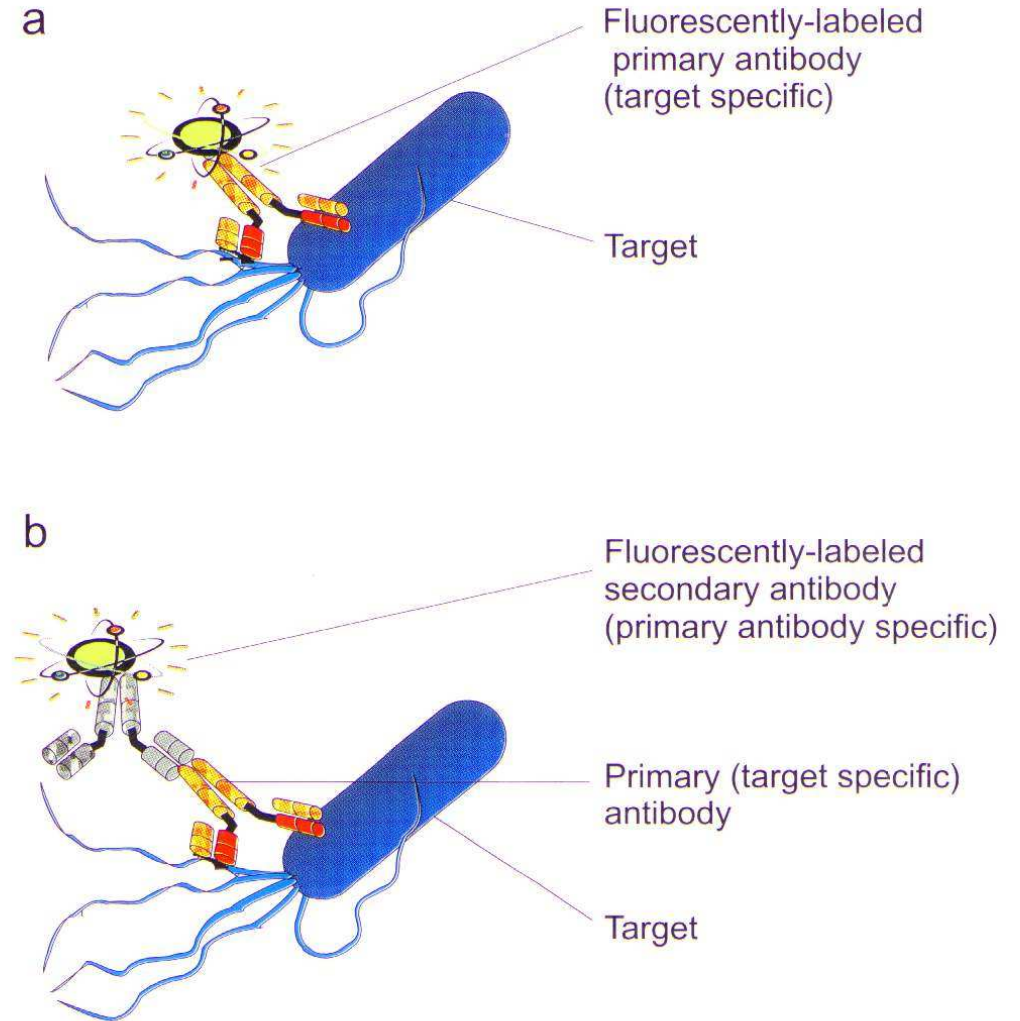
**Nevýhoda = musíme nejprve izolovat dotyčnou skupinu mikroorganismů, charakterizovat a získat protilátku**

## FAT

- fluorescent antibody technique
- využívány jsou fluorescenční protilátky
- primární a sekundární (viz. obr)



**FIGURE 9.9** Use of fluorescent antibodies coupled to fluorescein isothiocyanate to detect antigens. Here rhizobia fluorescence in response to UV irradiation is shown. (Photo courtesy I. L. Pepper.)



**FIGURE 9.8** Examples of reagents used in fluorescence microscopy. These can be nonspecific, such as the fluorescent dye acridine orange, which binds nucleic acids, or specific, such as fluorescently labeled antibodies. (a) Binding of a fluorescently labeled antibody (primary reagent). (b) Binding of a fluorescently labeled antibody (secondary reagent) to the primary antibody.

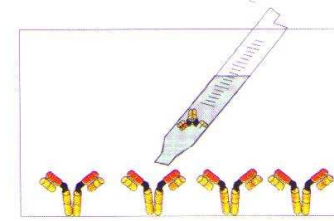


## ELISA

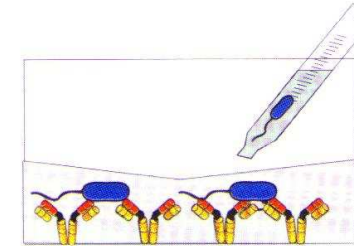
- enzyme linked immunosorbent assay
- často užívaná ke studiu biofilmů

**FIGURE 12.13** These figures are schematic representations of direct and indirect sandwich ELISAs. These reactions are usually carried out in a microtiter plate and the color change shown can be detected and quantitated using a plate reader.

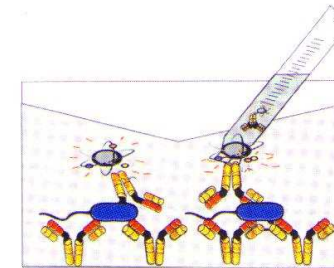
Direct ELISA



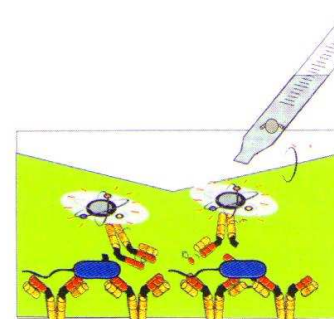
Well is coated with antibody



Sample containing antigen is added

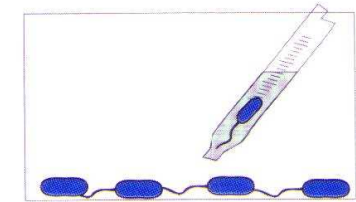


Second enzyme linked antibody is added and bound to antigen

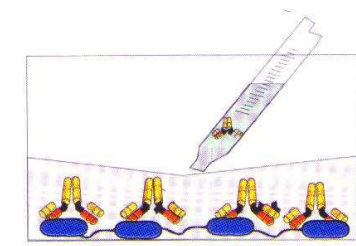


Enzyme substrate is added to produce color reaction

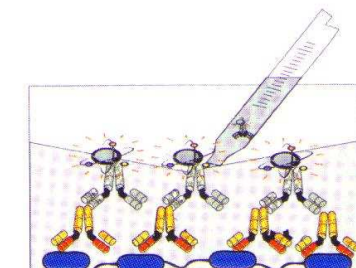
Indirect ELISA



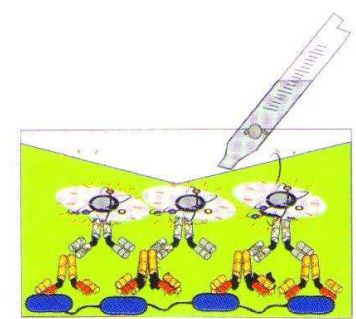
Well is coated with antigen



Sample containing antibody is added



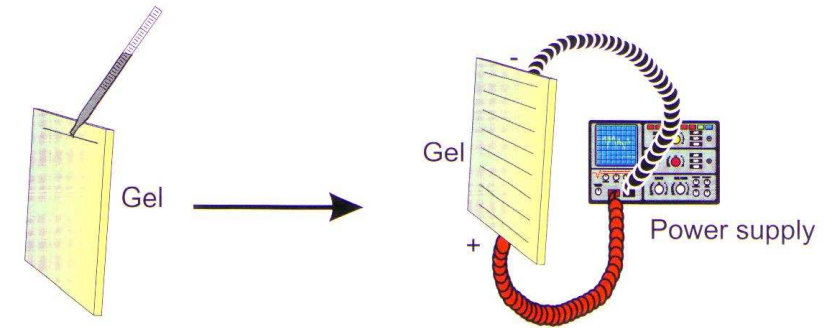
Enzyme linked antiglobulin is added



Enzyme substrate is added to produce color reaction

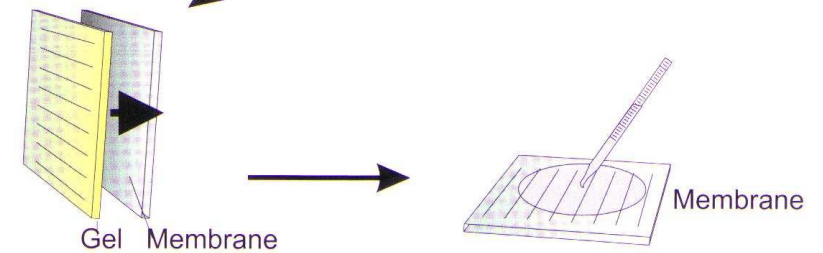
## Western blotting immunoassay

- značení předchází seperace



Step 1. Sample is added to an electrophoresis gel.

Step 2. Sample is separated by size as it migrates through the gel matrix.



Step 3. Sample is transferred to a nitrocellulose membrane.

Step 4. Labeled antibody is added to the nitrocellulose membrane and allowed to bind to the target antigen.

Target antigen is detected by color production



## Přímé mikroskopické počítání bakterií (direct bacterial counts)

- jde vlastně o první ze dvou "počítacích" technik (druhá je tzv. viable / indirect counts, neboli počítání po předchozí izolaci a kultivaci)

- většinou vyšší počty než při viable counts (pouze 10% je kultivovatelných); rozdíl lze zjistit tzv. direct viability counts (DVC) - inkubace s nalidixovou kyselinou - Krogurovou metodou (viz: dále)

- u vzorků vody lze přímo počítat v počítací komůrce, u půdy je potřeba nejdříve dispergace a separace od půdních částic (ty jsou při těchto technikách vážný problém)

- pro zlepšení pozorování se užívá řada barviv (FDA, AO, DAPI, FITC atd.)

- z přímých počtů lze i odvodit biomasu (musíme ale znát např. průměrnou velikost buněk bakterií či délku hyf hub)



TABLE 9.2 Equations for Calculating Biomass

Calculation of bacterial numbers in soil:

$$N_g = N_f \frac{A}{A_m} \frac{V_{sm}}{V_{sa}} D \frac{W_w}{W_d}$$

$N_g$  = number of bacteria per gram dry soil

$N_f$  = bacteria per field

$A$  = area ( $\text{mm}^2$ ) of smear (or filter)

$A_m$  = area ( $\text{mm}^2$ ) of microscope field

$V_{sm}$  = volume (ml) of smear of filter

$V_{sa}$  = volume (ml) of sample

$D$  = dilution

$W_w$  = wet weight soil

$W_d$  = dry weight soil

Bacterial biomass as carbon:

$$C_b = N_g V_b e S_c \frac{\%C}{100} \times 10^{-6}$$

$C_b$  = bacterial biomass carbon ( $\mu\text{g/g-soil}$ )

$N_g$  = number of bacteria per gram soil

$V_b$  = average volume ( $\mu\text{m}^3$ ) of bacteria ( $r^2L$ ;  $r$  = bacterial radius,  $L$  = length)

$e$  = density ( $1.1 \times 10^{-3}$  in liquid culture)

$S_c$  = solids content (0.2 in liquid culture, 0.3 in soil)

$\%C$  = carbon content (45% dry weight)

Calculation of fungal biomass carbon:

$$C_r = \pi r^2 L S_c \%C \times 10^{10}$$

$C_r$  = fungal carbon ( $\mu\text{g carbon/g-soil}$ )

$r$  = hyphal radius (often  $1.13 \mu\text{m}$ )

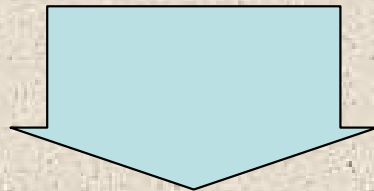
$L$  = hyphal length (cm/g-soil)

$e$  = density (1.1 in liquid culture, 1.3 in soil)

$S_c$  = solids content (0.2 in liquid culture, 0.25–0.35 in soil)

### Mikroskopické stanovení počtu aktivních (respirujících) mikroorganismů ve vzorcích prostředí

- důležité, neboť z celkového množství je aktivních jen asi 40%
- nelehký úkol, neboť inkubační techniky jsou příliš zdlouhavé, je problém s medii a jejich selektivitou, homogenizace vzorku (nebo filtrace) vždy část buněk odstraní
- respirometrické techniky jsou rovněž zkreslené manipulací se vzorkem a neodliší skutečně aktivní mikroorganismy bez závislosti na jejich fyziologickém stavu



**Barvicí techniky a mikroskopování jsou jednou z možností**

### 1) Pozorování aktivně respirujících bakterií (ve vzorcích vody)

- barvení: 2-(p-indophenyl)-3-(p-nitrophenyl)-5-phenyltetrazolium chlorid (INT)
- barvivo představuje kompetitor pro reakci s kyslíkem - vznikají nerozpustné krystaly INT-formazan, které se akumulují v metabolicky aktivních bakteriích
- sledování lze provádět mikroskopicky (červené depozity uvnitř buněk) nebo lze formazan extrahovat ethanolem z přefiltrovaných buněk (pouze ve vodním prostředí) a měřit spektrofotometricky

### 2) Kombinace barvení AO a INT

- Acridine orange umožní stanovení celkových počtů, INT barvení dále stanovení počtů aktuálně respirujících bakterií



### 3) Technika inkubace vzorků (voda) v přítomnosti asimilovatelných zdrojů uhlíku a nalidixové kyseliny: „Krogurova metoda“

- nalidixová kyselina je specifický inhibitor DNA gyrázy a interaguje s dělením buněk u mnoha gram negativních bakterií
- rostoucí exponované buňky nabývají protáhlého tvaru nebo jsou vypouklé - mohou být přímo mikroskopovány

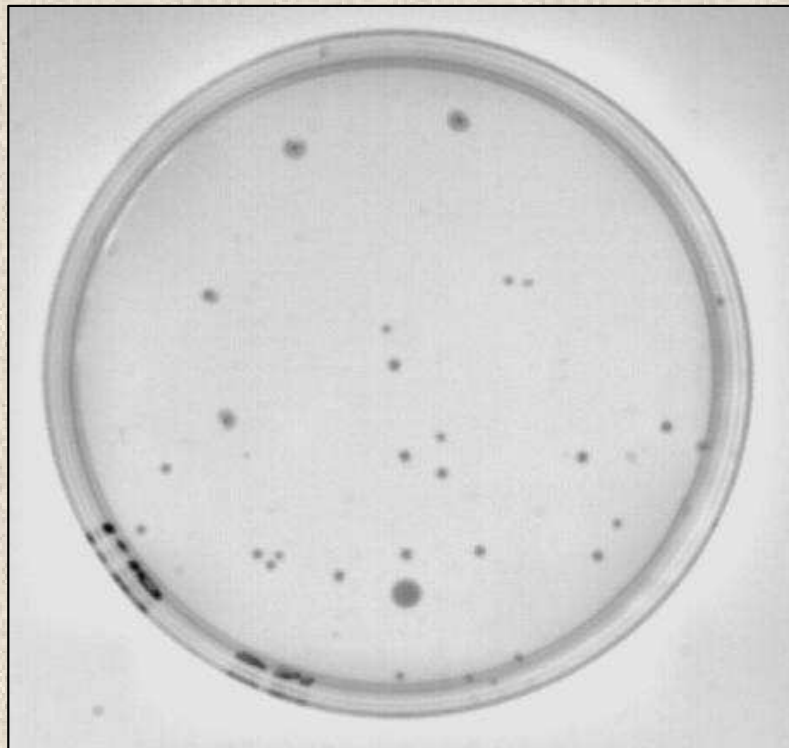
### 4) Metoda založená na enzymatické hydrolýze fluorescein diacetátu:

- metoda diskutabilní u bakterií (otázka transportu barviva do buňky)
- reakce je primárně závislá na celulární esterázové aktivitě, a tedy není v přímém vztahu k celkové aktivitě

### 5) Moderní postupy využívající redoxreakce s pomocí ditetrazoliových barev, např. 5-cyano-2,3-ditotyl tetrazolium chlorid (CTC)

- metoda vhodná k vizualizaci aktivně respirujících bakterií v environmentálních vzorcích
- reakce má stejnou podstatu jako INT, ale výsledný formazan je lépe detekovatelný vzhledem k jasně červené fluorescenci

# Izolační a kulturační techniky



## Izolační a kultivační techniky

- potřeba pro různé účely, např. identifikace specifických mikroorganismů, měření diverzity atd.
- počítání mikroorganismů - tzv. viable / indirect counts - použití metod MPN (most probable number) a počítání CFU (colony forming units)

## Izolace a stanovení počtu izolovaných mikroorganismů - vzorky půdy a vody - obecná kritéria

- u půdy vhodná extrakce (např. použití surfaktantu Tween 80 s disperzním činidlem pyrofosfát sodný) následuje násobné ředění (vodou, fyziologickým roztokem či pufrem ...)
- u vzorků vod je většinou potřeba zahuštění - technika membránové filtrace

Následují obecné kultivační techniky - metoda agarových ploten: poured a spread plate counts

**Výstupem jsou:** CFU na jednotku hmotnosti nebo objemu vzorku



## Inkubační techniky na miskách z ekotoxikologického hlediska:

### Výhody

1. Snadnost a dostupnost materiálu
2. Relativně nízká cena
3. Inkubační zdroj živých mikroorganismů - izolace z reálných vzorků
4. Možnost komparativního porovnání různých kompartmentů prostředí
5. Možnost specificky posuzovat určité fyziologické skupiny (selektivní média pro fixátory dusíku, houby, anaeroby, nitrifikátory, denitrifikátory apod.)

### Nevýhody

1. Vliv typu vybraného média na úspěšnost inkubace (pouze 0,1-10% skutečného počtu mikroorganismů v prostředí - zejména r stratégů)
2. Žádné médium není zcela univerzální
3. Inkubace často odrážejí pouze počty aktuálně živých (aktivních) buněk ve vzorcích
4. Prakticky neřešitelný problém související se shlukováním buněk na miskách (CFU neodráží počty „mateřských“ buněk)

## Izolace a stanovení počtu izolovaných mikroorganismů - obecné schéma viable counts

Alternativní  
označování:  
10 mL; 1 mL atd.

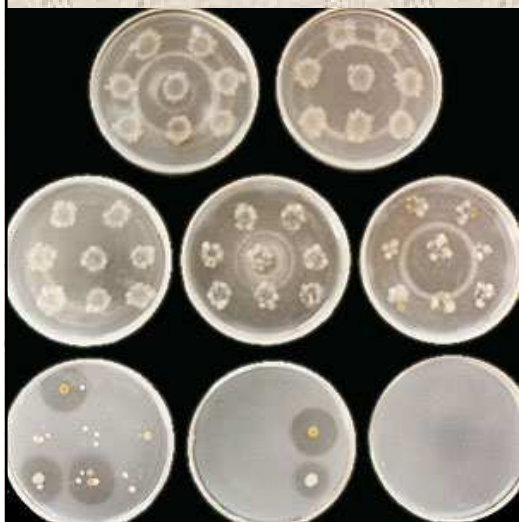
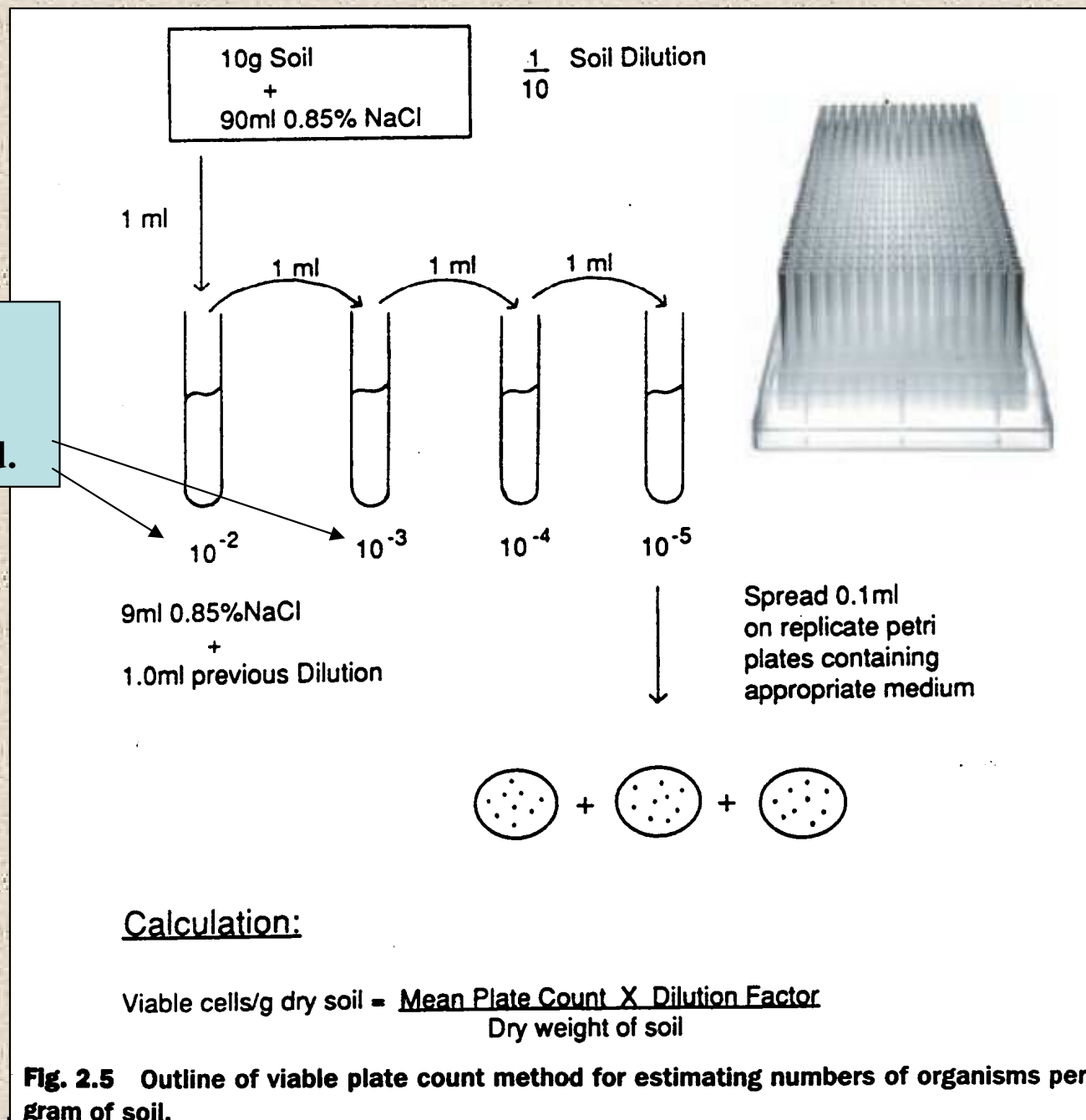


Fig. 2.5 Outline of viable plate count method for estimating numbers of organisms per gram of soil.

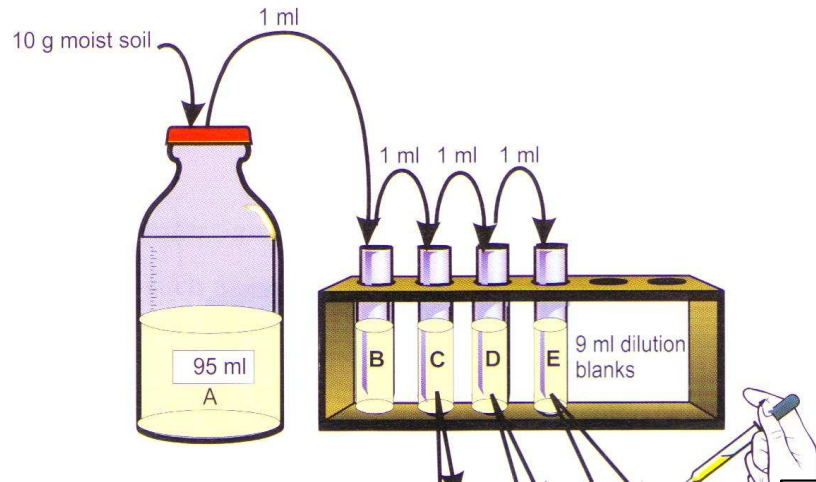


## 1. Poured plate counts:

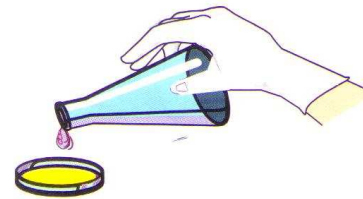
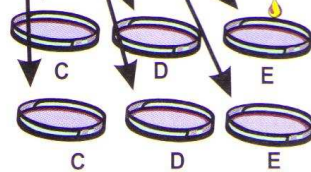
- agar nebo obohacené médium ochlazené na 35 - 50 °C je nalito na Petriho misku s 1 ml inokula (použita rozumná řada ředění)
- následně je opatrným kroužením miska dokonale promíchána
- po inkubaci (pro celkové počty mikroorganismů většinou 25 - 30 °C, ve tmě, 5 - 7 dní) jsou spočítány kolonie
- objeví-li se nárůst plísní a hub (jde o vzorky reálného prostředí) a pokryjí-li 15-20 % povrchu ploten, je tyto nutné vyloučit pro možnou inhibici růstu bakterií
- rozvoj hub může výrazně omezit přídavek mycostatinu (2 µg/ml)

# Metodiky a postupy mikrobiální ekotoxikologie

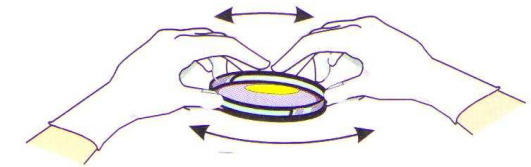
Step 1. Make a 10-fold dilution series.



Step 2. For each dilution, transfer 1.0 ml of soil dilutions to replicate agar plates.



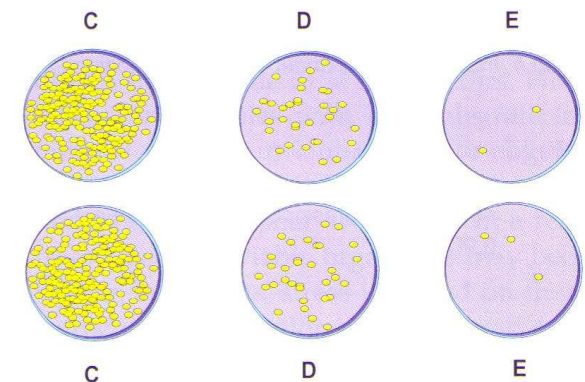
Step 3a. Add molten agar cooled to 45°C to the dish containing the soil suspension.



Step 3b. After pouring each plate, replace the lid on the dish and gently swirl the agar to mix in the inoculum and completely cover the bottom of the plate.

Step 4. Incubate plates under specified conditions.

Step 5. Count dilutions yielding 30-300 colonies per plate. Express counts as CFUs per g dry soil.



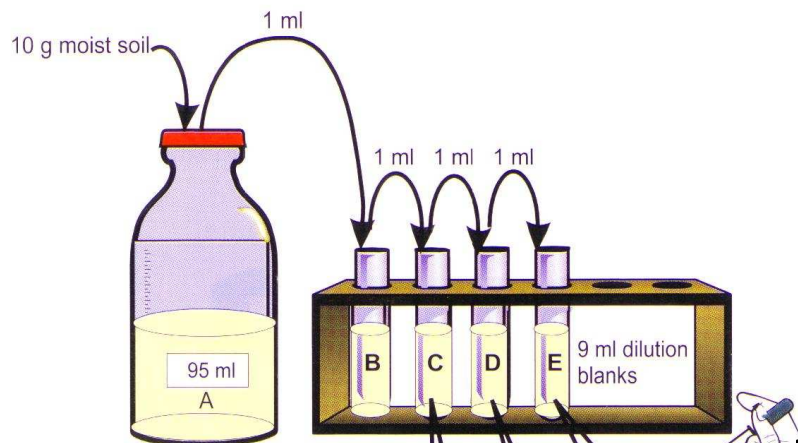
## Schéma poured plate counts

**FIGURE 10.2** Dilution and pour plating technique. Here, the diluted soil suspension is incorporated directly in the agar medium rather than being surface applied as in the case of spread plating. (Adapted from Pepper *et al.*, 1995).

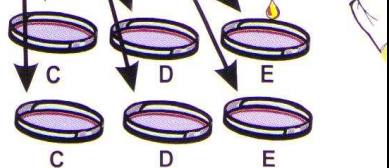


# Metodiky a postupy mikrobiální ekotoxikologie

Step 1. Make a 10-fold dilution series.



Step 2. For each dilution, transfer 0.1 ml of soil dilutions to replicate agar plates.

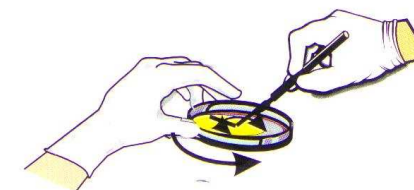
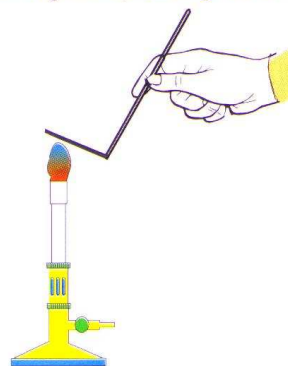


## 2. Spread plate counting technique

- při analýzách mnoha materiálů je účelné nanášet inokulum na povrch tuhé agarové plotny a roztírat sterilní hokejkou (při rozumné řadě ředění vzorku)

- je diskutabilní přesnost a míra ztrát při této proceduře

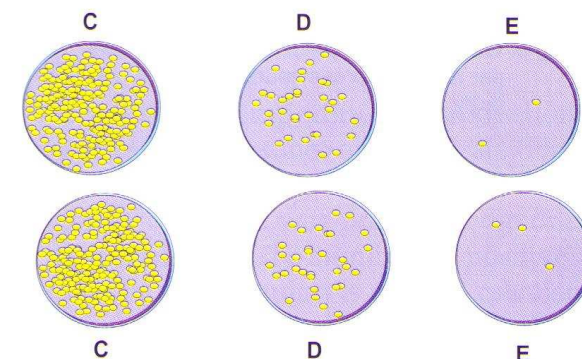
Step 3a. A glass spreading rod is flame sterilized.



Step 3b. Sample is spread on the surface of the agar. This is done by moving the spreader in an arc on the surface of the agar while rotating the plate.

Step 4. Incubate plates under specified conditions.

Step 5. Count dilutions yielding 30-300 colonies per plate. Express counts as CFUs per g dry soil.



**FIGURE 10.1** Dilution and spread plating technique. Here, soil that initially contains billions of microbes is diluted prior to being spread plated to enable discrete colonies to be seen on each plate. Numbers of colonies on each plate can be related to the original soil microbial population. (Adapted from Pepper *et al.*, 1995). 35

## Celkové počty mikroorganismů - výpočty

### Information Box 1 Dilution and Plating Calculations

A 10-gram sample of soil with a moisture content of 20% on a dry weight basis is analyzed for viable culturable bacteria via dilution and plating techniques. The dilutions were made as follows:

| Step            | Dilution  |
|-----------------|---|
| 10 g soil       | 95 ml saline (solution A) $10^{-1}$ (weight/volume) |
| 1 ml solution A | 9 ml saline (solution B) $10^{-2}$ (volume/volume)  |
| 1 ml solution B | 9 ml saline (solution C) $10^{-3}$ (volume/volume)  |
| 1 ml solution C | 9 ml saline (solution D) $10^{-4}$ (volume/volume)  |
| 1 ml solution D | 9 ml saline (solution E) $10^{-5}$ (volume/volume)  |

1 ml of solution E is pour plated onto an appropriate medium and results in 200 bacterial colonies.

$$\begin{aligned} \text{Number of CFU} &= \frac{1}{\text{dilution factor}} \times \text{number of colonies} \\ &= \frac{1}{10^{-5}} \times 200 \text{ CFU/g moist soil} \\ &= 2.00 \times 10^7 \text{ CFU/g moist soil} \end{aligned}$$

But, for 10 g of moist soil,

$$\text{Moisture content} = \frac{\text{moist weight} - \text{dry weight (D)}}{\text{dry weight (D)}}$$

Therefore,

$$0.20 = \frac{10 - D}{D} \quad \text{and}$$

$$D = 8.33 \text{ g}$$

$$\text{Number of CFU per g dry soil} = 2.00 \times 10^7 \times \frac{1}{8.33} = 2.4 \times 10^7$$



### Celkové počty bakterií - plate counts

- dostupná kultivační média jsou vhodná k vykultivování bakterií z velmi širokého spektra vzorků (voda, sedimenty, půda, kompost, atd.)
- existují nutričně obohacená média, která stimulují růst bakterií a vedou k vytvoření kolonie do 3 dnů
- **obecně platí, že média určená k izolaci mikroorganismů ze vzorků reálného prostředí jsou spíše velmi obohacená - tedy vedoucí k rychlému nárůstu rychle rostoucích mikroorganismů a k potlačení růstu pomalu rostoucích druhů**
- obohacení živinami může vést i k druhotným komplikacím jako je příliš vysoký osmotický tlak, okyselení (glukóza, sacharóza) nebo alkalizace (v důsledku deaminace peptonu, aminokyselin nebo masových extraktů)
- obecně lze tedy **doporučit spíše jednoduchá media bez výrazného obohacení živinami**

## Celkové počty bakterií - total plate counts - příklady medií pro "plate counts"

Plate count agar media used to quantify the total number of bacteria.

| <i>Acronym for agar*</i> | <i>Characteristic ingredients of the media†‡</i>                       | <i>References</i>  |
|--------------------------|--|--|
| PGY agar                 | Peptone–glucose–yeast extract agar (pH 7.0)                            | Hirsch and Rades-Rohkoh (1983); Marxsen (1988)             |
| AlbGY agar               | Albumin–glucose–yeast extract agar (pH 7.2)                            | Hattori (1982); Sato et al (1984)                          |
| PG agar                  | Peptone–glucose agar (pH 7.2)  | Kölbel-Boelke et al (1988)                                 |
| PMA agar                 | Peptonized milk–actidione agar (pH 7.0)                                | Larkin (1972)  |
| PYGG agar                | Proteose peptone–yeast extract–glycerol–glycerophosphate agar (pH 7.5) | Litchfield et al (1975)                                    |
| PYS agar                 | Peptone–yeast extract–soil extract agar (pH 6.8–7.0)                   | Singh-Verma (1968); Jager and Bruins (1975); Martin (1975) |
| DPM agar                 | Diluted peptone–meat extract agar, (pH 7.0–7.2)                        | Ohto and Hattori (1983)                                    |

\* For routine examinations commercially available dehydrated media such as bacto nutrient agar or bacto tryptic soy agar (Difco Laboratories, Detroit), casein peptone–yeast extract–dextrose agar (Oxoid, Unipath GmbH, Wesel), standard meat extract–peptone plate count agar (Merck, Darmstadt), plate count agar (bioMérieux, Nürtingen) or nutrient agar (Kyohuto Seiyaku Co., Tokyo) may be used.

† In order to facilitate the enumeration of red-coloured bacterial colonies, each medium can be supplied with 0.001% aqueous triphenyltetrazoliumchloride (TTC) solution just prior to pouring the plates (Unger 1958).

## Celkové počty bakterií - total plate counts - příklady medií pro namnožení bakterií

Survey of the composition of media used to enumerate bacteria.

| Acronym    | Ingredients (in g l <sup>-1</sup> distilled water), final pH and comments on preparation*†  |
|------------|---|
| PGY agar   | Glucose 0.25, peptone 0.25, yeast extract 0.25, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0.1, MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 0.05, FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 0.02, agar 15, pH 7.0  |
| AlbGY agar | Glucose 0.1, egg albumin (Difco) 0.25, yeast extract 0.05, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0.5, MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 0.4, Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> ·7H <sub>2</sub> O (trace), agar 15, pH 7.2   |
| PG agar    | Glucose 0.1, peptone 1.0, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0.1, FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 0.02, agar 15, pH 7.2   |
| PMA agar   | Peptonized milk (Difco) 1.0, actidione (= cyclohexamide) 0.1, agar 15, pH 7.0   |
| PYGG agar  | Proteose peptone 1.0, yeast extract 1.0, glycerol 5 ml, sodium glycerophosphate 0.5, agar 15, pH 7.4  |
| PYS agar   | Glucose 1.0, peptone 0.2, yeast extract 0.1, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0.4, MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 0.05, 100 ml soil extract, agar 15, pH is adjusted to 6.8–7.0.<br>Preparation of soil extract: 1 kg of dried sieved top soil is mixed with 1 l tap water and autoclaved (30 min at 121°C). The suspension is settled and the supernatant filtered through a gauze and subsequently through a paper filter in a Buchner funnel (with vacuum pump) and made up to 1 l. |
| DPM agar   | Peptone 0.01, meat extract 0.01, NaCl 5.0, agar 15, pH adjusted to 7.0–7.2  |

\* Compared to original literature, small modifications in the composition may occur.

† Fanny Angelina Hesse introduced agar agar into microbiology (Hesse 1992).



## Celkové počty hub - plate counts

- metoda inkubace na agarových plotnách je méně vhodná pro kvantitativní stanovení, protože jako CFU lze odečítat kolonie vzniklé ze spor i mycélií fragmentovaných v průběhu ředění vzorku
- je nezbytné inhibovat rozvoj rychle rostoucích bakterií: **streptomycin, aureomycin a chloramfenikol**
- RBSCN agar představuje médium vhodné pro současné odečítání kolonií hub i aktinomycet; v tomto případě jsou kolonie aktinomycet indikovány ve vyšších ředěních než kolonie hub

Common agar media used for counting and isolating fungi from soil and other natural substrates.

| Acronym           | Characteristic composition of the medium*                               | Comments and references |
|-------------------|---|-------------------------|
| ME agar†          | Malt extract agar (pH 5.5)  | Commercially available  |
| REME agar         | Rose bengal–malt extract agar (pH 6.0)                                  | Ottow and Glathe (1968) |
| <b>RBSCN agar</b> | Rose bengal–starch–casein–nitrate agar (pH 7.0)                         | Ottow (1972)            |
| Czapek-Dox agar†  | Sucrose–nitrate–mineral salt agar (pH 7.3)                              | Warcup (1960)           |
| PDRB agar         | Peptone–dextrose–rose bengal–streptomycin (or aureomycin) agar (pH 7.0) | Martin (1950)           |
| Sabouraud agar†   | Peptone–dextrose (or maltose) agar (pH 6.5)                             | Commercially available  |
| PGBRC agar        | Peptone–glucose–rose bengal–chloramphenicol agar (pH 7.0–7.2).          | Jarvis (1973)           |

\* The ingredients are specified in Table 4.10 and may have small modifications compared to their original composition.

† These media (in various modifications) are commercially available in dehydrated form from bioMérieux (Nürtingen), Difco (Detroit), Merck (Darmstadt) or Oxoid (Unipath GmbH, Wesel).

### Celkové počty aktinomycet - plate counts

- pro aktinomycety jsou **nezbytná speciální media** - pomalu rostou (10 -14 dní / 25 - 30 °C)
- tvoří malé myceliální kolonie na povrchu agaru a částečně i v něm
- preferují neutrální prostředí pH: 6 - 7
- je nezbytné používat **inhibitory růstu hub a bakterií** - kromě bakteriostatik (bengal rose) lze doporučit antibiotika proti houbám: **cycloheximid, piramicin, anfotericin**
- kultivace by měla probíhat při dvou rozdílných teplotách
  - a) pro mezofilní druhy: 25 - 30 °C
  - b) pro termofilní druhy: 45 - 55 °C
- mnoho vzniklých kolonií je vzniká ze spor, a tato technika tudíž **neposkytuje relevantní informaci** ve smyslu růstových charakteristik aktinomycet ve zkoumané matrici

## Celkové počty aktinomycet - total plate counts - příklady médií

### Survey of the composition of agar media for actinomycetes.

| <i>Acronym</i> | <i>Ingredients (in g l<sup>-1</sup> distilled water), final pH and comments on preparation*</i>  |
|----------------|--|
| SCN agar       | Starch 10, casein (Difco, vitamin free) 0.3, KNO <sub>3</sub> 2.0, NaCl 2.0, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2.0, MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 0.05, CaCl <sub>2</sub> and FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (traces), agar 15, pH adjusted to 7.2 before autoclaving   |
| RBSCN agar     | SCN agar with rose bengal (Fluka) 0.035, pH 7.0–7.2  |
| RBME agar      | Malt extract 20, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0.5, rose bengal 0.067, agar 17–20, pH adjusted to 6.0–6.2  |
| CCMS agar      | Colloidal chitin (Callbiochem Corp.) 2.5, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0.7, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.2, MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 0.5, FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 0.01, ZnSO <sub>4</sub> 0.001, MnCl <sub>2</sub> 0.001, agar 15, after autoclaving the pH is adjusted with 1 M NaOH solution to 8.0.<br>Preparation: 20 g of the ground chitin (Waring blender) is dissolved in c. 200 ml concentrated HCl, filtered through a glass filter wool and poured subsequently into 1 l water (at 5–10°C). The reprecipitated chitin is washed with sterile water until pH neutral and 2.5 g (dry weight) is added to the mineral agar. |

\* Compared to the original composition, small modifications may occur.



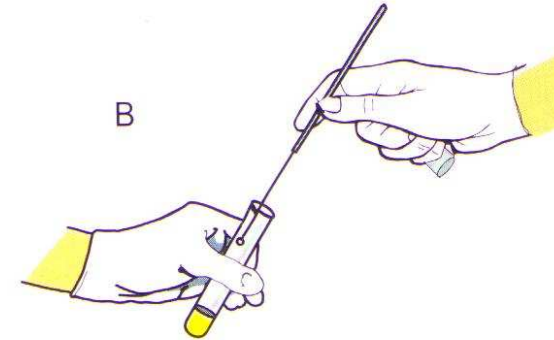
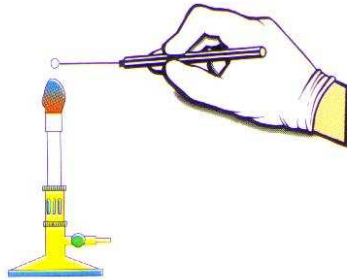
### Inkubace zaměřená na stanovení počtu vybraných fyziologických skupin mikroorganismů

- tyto analýzy mohou velmi vhodně doplnit stanovení celkových počtů, mohou však být i základním cílem analýzy
- izolace hlavních skupin mikroorganismů je především problematická z hlediska výběru vhodných médií
- pokud analýza směřuje k průzkumu jednotlivých rodů bakterií lze doporučit izolaci jak Grampozitivních, tak Gramnegativních bakterií, neboť mohou reagovat rozdílně, především na kontaminaci těžkými kovy
- nejběžnější půdní zástupce obou těchto skupin lze relativně snadno izolovat na společném médiu
- v dosud publikovaných pracech se nejčastěji vyskytují analýzy s následujícími izolovanými rody půdních bakterií: *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Corynebacter*, *Nocardia*, *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Arotobacter*
- s využitím speciálních médií lze rovněž cíleně izolovat a dále studovat růst vybraných půdních hub (např. *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Trichoderma*, *Penicillium*), aktinomycet (např. *Nocardia*) a kvasinek (např. *Torulopsis*, *Rhodotorula*, *Cryptococcus*)
- jako standardní analýzy lze jmenovat cílené izolace zaměřené na celulózu rozkládající bakterie, oligotrofní bakterie, fixátory vzdušného dusíku, *Pseudomonaceae* atd.

## Izolační techniky - spread plate

- využití při potřebě izolovat jednotlivé mikroorganismy, například při analýze biodiverzity či při identifikacích např. systémem BIOLOG apod.

Step 1 Sterilize inoculating loop

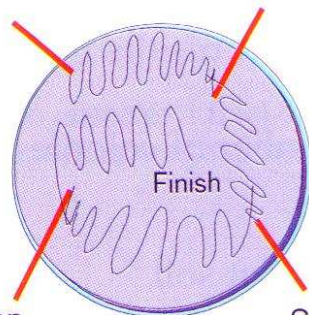


Step 2 Obtain culture from an agar plate (A) or from broth (B).

Step 3 Make successive streaks on an agar plate to isolate single colonies

Start here with inoculation loop full of culture from step 2 (a or b)

Sterilize loop, start new streak

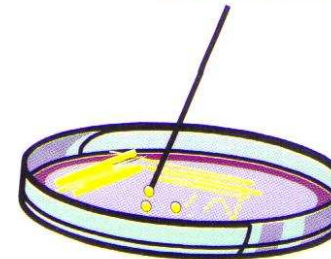


Sterilize loop, start new streak

Sterilize loop, start new streak

Step 4 Incubate agar plate producing isolated colonies

Isolated colony



**FIGURE 10.3** Isolation of a bacterial colony using the streak plate technique.

## Metoda Most probable number (MPN)

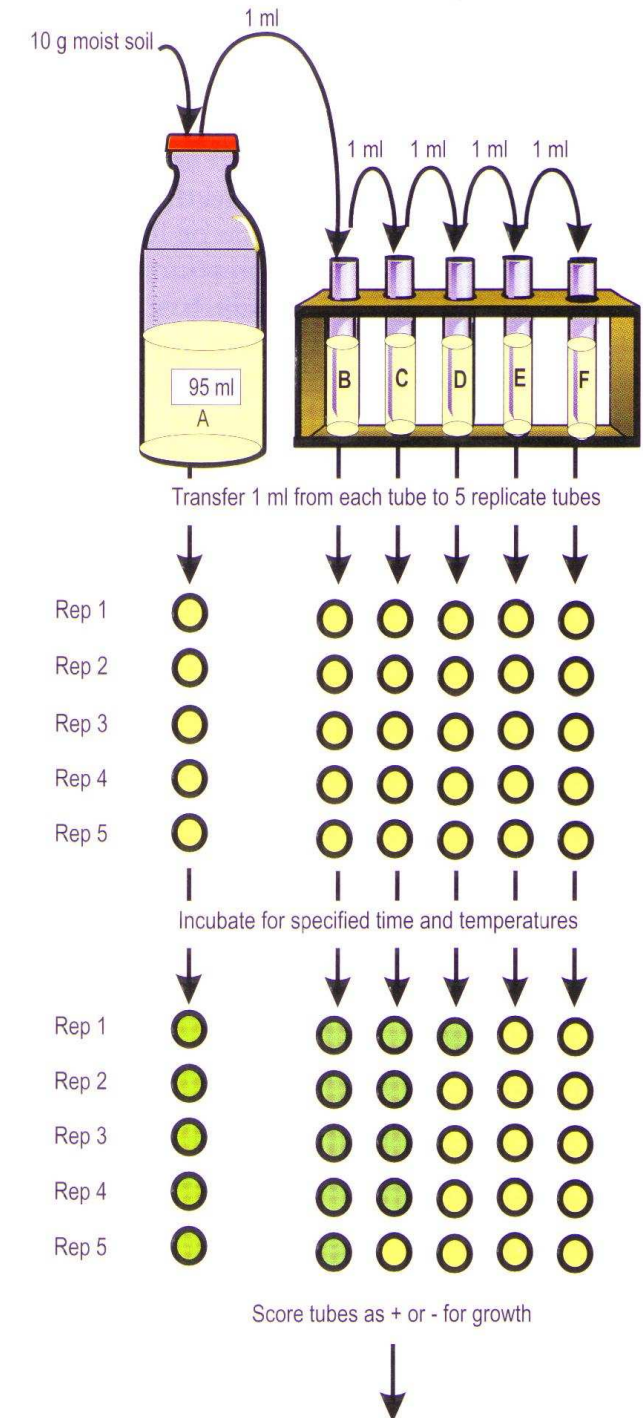
- jde o techniku nezastupitelnou při stanoveních počtu (nebo přítomnosti) mikroorganismů, které jsou za jiných okolností velmi obtížně zjistitelné

**Příklady úspěšných aplikací:** anaerobní bakterie nebo nitrifikační bakterie zodpovědné za autotrofní nitrifikaci

**Předpoklad:** existuje marker (produkce plynu, produkce urč. metabolitu), který je jednoznačně identifikovatelný a specifický pro určenou skupinu bakterií (např. tvorba  $\text{Fe}^{2+}$  nebo produkce dusitanů)

### Podstata a hodnocení:

- založeno na sériovém ředění vzorku, většinou přenášením 1 ml podílů
- ředěné vzorky jsou inokulovány do několika opakování zkumavek
- v jednotlivých ředěních je u provedených opakování vyhodnocován pouze pozitivní průkaz přítomnosti specifické reakce nebo produktu či mikroorganismu
- matematickou podstatu tvoří aparát Poissonova rozložení
- využití existujících tabulek





## MPN - příklady sledovaných parametrů

Celkové počtu mikroorganismů: odečítán zákal (vizuálně nebo turbidimetricky)

Potenciální denitrifikátoři nebo fermentující bakterie: sledována produkce plynů

Produkce amonných iontů, dusitanů, dusičnanů,  $Fe^{2+}$ : zbarvení po přidání reakčního činidla

Sulfát redukující bakterie: zčernání

## Vyhodnocování

- závisí na počtu a odstupu ředění a dále na objemu použitých roztoků:

1. Speciální tabulky pro MPN hodnoty: jednodušší případ, kdy je využit pouze jeden ředěný objem dávkovaného vzorku
2. Speciální tabulky pro MPN hodnoty: případ, kdy jsou aplikovány vzorky ve třech (decimálně odstupňovaných - např. 10 mL, 1mL, 0,1mL) ředěních; je-li aplikováno více ředění, pro hodnocení jsou využívány pouze tři poslední, které ještě poskytují pozitivní výsledky
3. Kalkulátor na webu: <http://www.i2workout.com/mcuriale/mpn/index.html>

## Speciální tabulky pro MPN hodnoty - jednoduché

**MPN INDEX AND 95% CONFIDENCE LIMITS FOR  
VARIOUS COMBINATIONS OF POSITIVE AND NEGATIVE RESULTS  
WHEN FIVE 20-mL PORTIONS ARE USED**

| No. of Tubes<br>Giving Positive<br>Reaction Out of<br>5 of 20 mL Each | MPN<br>Index/<br>100 mL | 95% Confidence Limits<br>(Approximate) |          |
|---|-------------------------|--|----------|
|   |                         | Lower                                  | Upper    |
| 0   | <1.1                    | 0                                      | 3.0      |
| 1   | 1.1                     | 0.05                                   | 6.3      |
| 2   | 2.6                     | 0.3                                    | 9.6      |
| 3   | 4.6                     | 0.8                                    | 14.7     |
| 4   | 8.0                     | 1.7                                    | 26.4     |
| 5   | >8.0                    | 4.0                                    | Infinite |

**MPN INDEX AND 95% CONFIDENCE LIMITS FOR  
VARIOUS COMBINATIONS OF POSITIVE AND NEGATIVE RESULTS  
WHEN TEN 10-mL PORTIONS ARE USED**

| No. of Tubes<br>Giving Positive<br>Reaction Out of<br>10 of 10 mL Each | MPN<br>Index/<br>100 mL | 95% Confidence Limits<br>(Approximate) |          |
|--|-------------------------|--|----------|
|  |                         | Lower                                  | Upper    |
| 0  | < 1.1                   | 0                                      | 3.0      |
| 1  | 1.1                     | 0.03                                   | 5.9      |
| 2  | 2.2                     | 0.26                                   | 8.1      |
| 3  | 3.6                     | 0.69                                   | 10.6     |
| 4  | 5.1                     | 1.3                                    | 13.4     |
| 5  | 6.9                     | 2.1                                    | 16.8     |
| 6  | 9.2                     | 3.1                                    | 21.1     |
| 7  | 12.0                    | 4.3                                    | 27.1     |
| 8  | 16.1                    | 5.9                                    | 36.8     |
| 9  | 23.0                    | 8.1                                    | 59.5     |
| 10   | >23.0                   | 13.5                                   | Infinite |

## Speciální tabulky pro MPN hodnoty - složitější

MPN INDEX AND 95% CONFIDENCE LIMITS FOR VARIOUS COMBINATIONS OF POSITIVE RESULTS WHEN FIVE TUBES ARE USED PER DILUTION (10 mL, 1.0 mL, 0.1 mL)

| Combination of Positives | MPN Index/ 100 mL | 95% Confidence Limits |       | Combination of Positives | MPN Index/ 100 mL | 95% Confidence Limits |       |
|--------------------------|-------------------|-----------------------|-------|--------------------------|-------------------|-----------------------|-------|
|                          |                   | Lower                 | Upper |                          |                   | Lower                 | Upper |
| 0-0-0                    | < 2               | —                     | —     | 4-2-0                    | 22                | 9.0                   | 56    |
| 0-0-1                    | 2                 | 1.0                   | 10    | 4-2-1                    | 26                | 12                    | 65    |
| 0-1-0                    | 2                 | 1.0                   | 10    | 4-3-0                    | 27                | 12                    | 67    |
| 0-2-0                    | 4                 | 1.0                   | 13    | 4-3-1                    | 33                | 15                    | 77    |
|                          |                   |                       |       | 4-4-0                    | 34                | 16                    | 80    |
|                          |                   |                       |       | 5-0-0                    | 23                | 9.0                   | 86    |
| 1-0-0                    | 2                 | 1.0                   | 11    | 5-0-1                    | 30                | 10                    | 110   |
| 1-0-1                    | 4                 | 1.0                   | 15    | 5-0-2                    | 40                | 20                    | 140   |
| 1-1-0                    | 4                 | 1.0                   | 15    | 5-1-0                    | 30                | 10                    | 120   |
| 1-1-1                    | 6                 | 2.0                   | 18    | 5-1-1                    | 50                | 20                    | 150   |
| 1-2-0                    | 6                 | 2.0                   | 18    | 5-1-2                    | 60                | 30                    | 180   |
| 2-0-0                    | 4                 | 1.0                   | 17    | 5-2-0                    | 50                | 20                    | 170   |
| 2-0-1                    | 7                 | 2.0                   | 20    | 5-2-1                    | 70                | 30                    | 210   |
| 2-1-0                    | 7                 | 2.0                   | 21    | 5-2-2                    | 90                | 40                    | 250   |
| 2-1-1                    | 9                 | 3.0                   | 24    | 5-3-0                    | 80                | 30                    | 250   |
| 2-2-0                    | 9                 | 3.0                   | 25    | 5-3-1                    | 110               | 40                    | 300   |
| 2-3-0                    | 12                | 5.0                   | 29    | 5-3-2                    | 140               | 60                    | 360   |
| 3-0-0                    | 8                 | 3.0                   | 24    | 5-3-3                    | 170               | 80                    | 410   |
| 3-0-1                    | 11                | 4.0                   | 29    | 5-4-0                    | 130               | 50                    | 390   |
| 3-1-0                    | 11                | 4.0                   | 29    | 5-4-1                    | 170               | 70                    | 480   |
| 3-1-1                    | 14                | 6.0                   | 35    | 5-4-2                    | 220               | 100                   | 580   |
| 3-2-0                    | 14                | 6.0                   | 35    | 5-4-3                    | 280               | 120                   | 690   |
| 3-2-1                    | 17                | 7.0                   | 40    | 5-4-4                    | 350               | 160                   | 820   |
|                          |                   |                       |       | 5-5-0                    | 240               | 100                   | 940   |
| 4-0-0                    | 13                | 5.0                   | 38    | 5-5-1                    | 300               | 100                   | 1300  |
| 4-0-1                    | 17                | 7.0                   | 45    | 5-5-2                    | 500               | 200                   | 2000  |
| 4-1-0                    | 17                | 7.0                   | 46    | 5-5-3                    | 900               | 300                   | 2900  |
| 4-1-1                    | 21                | 9.0                   | 55    | 5-5-4                    | 1600              | 600                   | 5300  |
| 4-1-2                    | 26                | 12                    | 63    | 5-5-5                    | ≥ 1600            | —                     | —     |



## Příklad:

použity čtyři dávky vzorku (1 mL, 0,1 mL, 0,01 mL, 0,001 mL) a lze využít tabulky následujícím způsobem:

| Příklad | 1ml | 0,1ml | 0,001ml | 0,001ml | Kombinace pozitivních výsledků | MPN index/100ml |
|---------|-----|-------|---------|---------|--------------------------------|-----------------|
| 1       | 5/5 | 5/5   | 2/5     | 0/5     | 5-2-0                          | 5000            |
| 2       | 5/5 | 4/5   | 2/5     | 0/5     | 5-4-2                          | 2200            |
| 3       | 0/5 | 1/5   | 0/5     | 0/5     | 0-1-0                          | 20              |

Pro vlastní hodnocení jsou vybrány pouze tři varianty

Následující příklad ukazuje, jak je možné inkorporovat do analýz i výsledek kdy pozitivní je i nejvyšší řada ředění

| Příklad | 1ml | 0,1ml | 0,001ml | 0,001ml | Kombinace pozitivních výsledků | MPN index/100ml |
|---------|-----|-------|---------|---------|--------------------------------|-----------------|
| 4       | 5/5 | 3/5   | 1/5     | 1/5     | 5-3-2                          | 1400            |
| 5       | 5/5 | 3/5   | 2/5     | 0/5     | 5-3-2                          | 1400            |

**Výpočet MPN indexu pro experimenty, jejichž výsledek není v tabulkách:**

$MPN/100ml = (\text{počet pozitivních výsledků} \times 100) / (\text{ml vzorku v negativních zkumavkách} \times \text{ml vzorku ve všech zkumavkách})^{-1/2}$

## Média pro namnožení různých funkčních skupin pro MPN metodu

Liquid media for enumerating some functional groups of bacteria by the MPN method.

| Functional group   | Broth composition and acronyms*   | References and comments                             |
|--|---|---|
| Saprophytes  | Casein peptone–starch broth (CPS)   | Collins (1963)                                      |
|  | Protease peptone–yeast extract–glycerol–glycerophosphate broth (PYGG)   | Litchfield et al (1975)                             |
|  | Casein peptone–lactate–acetate–glycerol–glucose broth (CLAGG)   | Lorch et al (1990)                                  |
| Prototrophic bacteria  | Synthetic acetate–glutamate broth (AG) with bromothymol blue indicator (blue colouring = positive)                        | Lorch et al (1990)                                  |
| Fermenting bacteria  | (Gas in Durham vials of CPS or PYGG broth from starch or glycerol, respectively = positive)                               |   |
| Enterobacteriaceae   | Dextrose–peptone–brilliant green broth (DP) (gas in Durham vial = positive)   | Mossel et al (1974)                                 |
| Coliforms  | MacConkey broth (MC) (gas and acid after 48 h, 37°C = total coliforms) (gas and acid after 48 h, 44°C = faecal coliforms) | commercially available                              |
| Faecal streptococci ( <i>S. faecalis</i> - <i>faecium</i> )                | Kanamycin–aesculine–azide broth (KAA) (black colouring after 48 h, 37°C = positive)                                       | Mossel (1977)                                       |
| Aerobic spore forming bacilli ( <i>Sacillus</i> spp.)                      | Growth in PYGG broth after pasteurization, 15 min, 80°C   | Ottow et al (1984)                                  |
| Pseudomonads ( <i>P. aeruginosa</i> - <i>fluorescens</i> - <i>putida</i> ) | Cetrimide–peptone–sulphate broth (CPSB)   | Brown and Lowbury (1965); Schmider and Ottow (1981) |

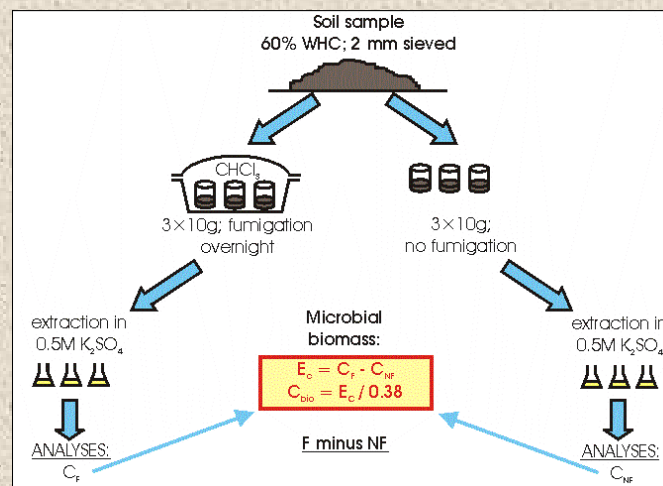
## Média pro namnožení různých funkčních skupin pro MPN metodu

Liquid media for enumerating some functional groups of bacteria by the MPN method.

| Functional group   | Broth composition and acronyms*   | References and comments  |
|--|---|--|
| Nitrifiers (chemolitho-autotrophic)                                | Ammonium or nitrite–mineral salt–solution (MS),<br>incubation 28 days, 25°C   | Abellovich (1987)  |
| Denitrifiers†  | Casamino acid–yeast extract broth (CY)<br>(gas in Durham vial = positive)<br>Lactate–peptone–yeast extract broth (LPY)<br>(gas in Durham vial = positive)<br>Citrate–asparagine broth (CA)<br>(gas in Durham vial = positive)<br>AG broth (gas in Durham vial = positive) | Tomlinson and Hochstein (1972)<br>Malek et al (1974)<br>Bollag et al (1970)<br>Lorch et al (1990)<br>Oberzill (1970) |
| Sulphate-reducing bacteria   | Lactate–thioglycolate–sulphate broth (LTS),<br>incubation 28 days, 25°C<br>(black colouring = positive)   | Ottow (1969)   |
| Fe(III)-reducing bacteria  | Glucose–asparagine–Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> broth (GAF) (Fe(II)<br>/detected by red colouring after addition of 2,2-<br>dipyridyl solution)   | Hammann and Ottow (1976)   |
| Fe(III)-reducing, N <sub>2</sub> -fixing, saccharolytic clostridia | Nitrogen-free glucose–Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> broth (NGF)<br>(Fe(II) detected by red colour after adding<br>2,2-dipyridyl solution)  | Sato et al (1984)  |
| Cellulolytic bacteria  | Cellulose (filter paper strip)–mineral salt broth (CM),<br>incubation 35 days, 28°C   | Okon et al (1977); Jagnow (1982)   |
| N <sub>2</sub> -fixing bacteria‡<br>( <i>Azopirillum</i> spp.)     | Semi-solid malate–yeast extract–glucose broth<br>(MYG)<br>(positive tubes show clear pellicle formation<br>and ethylene formation after 3 days, 30°C)   |  |



## Měření mikrobiální biomasy



## Měření biomasy

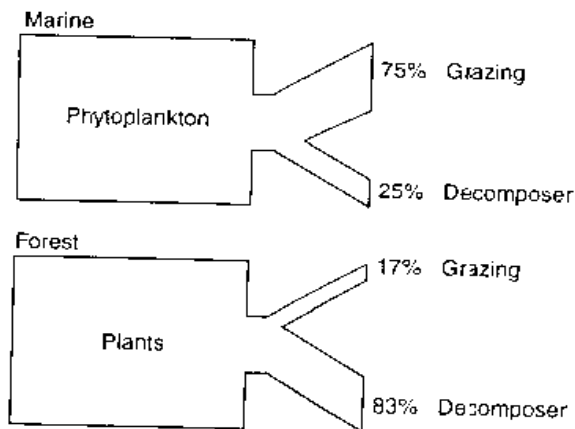
- definována (zejména pro půdu) jako žijící část organické hmoty, jako organismy menší než  $10\mu\text{m}^3$
- nejčastěji se vyjadřuje v jednotkách hmotnosti např.  $\mu\text{g } C_{\text{bio}}/\text{g}_{\text{suš.}}$
- tyto parametry mají zastřešující povahu - "overall parameters" - tzn. stanovujeme mikrobiální biomasu a nevíme co se děje uvnitř ("black box of microbial biomass")
- nevychází ze separace či izolace mikroorganismů, stanovují přímo ve vzorcích prostředí
- hlavně u půd, méně u vod; u půdy je  $C_{\text{bio}}$  cca 1 - 5%  $C_{\text{org}}$

### Dva hlavní typy využití parametrů:

- 1) stanovení in situ mikrobiální biomasy - posouzení biologické kvality půd - bioindikace půdní kvality
  - 2) stanovení v kontrolovaném laboratorním pokuse - změny pod vlivem kontrolovaného faktoru (testy toxicity)
- mezi 1 a 2 jsou logické přechody (mikrokosmy apod.)

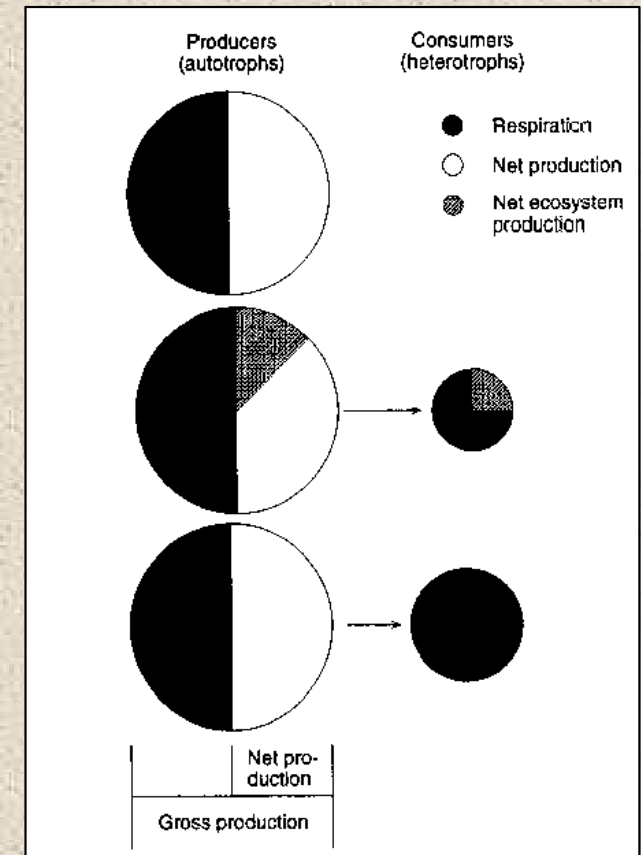
## Produkce biomasy ===== Biochemické cykly ===== Potravní sítě

- primární produkce se rozděluje na gross a net
- biomasa = uhlík; 1g sušiny biomasy = 21 kJ
- zcela odlišný model pro terestrický a mořský ekosystém: v oceánech mají hlavní úlohu v produkci, v terestrických ekosystémech v degradaci
- navíc v oceánech tzv. heterotrofická produkce = vychytávání zředěných organických látek a produkce biomasy



**Figure 10.5**

Relative proportion of energy entering grazing and decomposer food chains in marine and terrestrial habitats. Dominant producers in marine habitat are phytoplankton; in terrestrial habitat they are plants. A higher proportion of energy goes into the grazing food chain in the marine habitat; in the terrestrial habitat a higher proportion enters the decomposer food chain. (Source: Odum 1962. Reprinted courtesy of Ecological Society of Japan.)





### Mikrobiální biomasa v půdě:

- zejména funkce množství dostupných živin, půdního využívání (OP, TTP, LP a AP), vliv půdního typu, abiotických faktorů (hlavně obsah jílu, dusíku, pH,  $C_{org}$  ...)
- lze stanovovat i barvicími a počítacími technikami přepočtem (např. hustota  $1,3\text{g/cm}^3$  a průměrný objem jedné buňky  $1\mu\text{m}^3$ )
- lze odvozovat i na základě empirických korelací s aktivitou (princip metody SIR - substratem indukované respirace)
- nejčastěji ovšem spočívá ve stanovení komponenty mikrobiální biomasy (buď prvek - nejčastěji uhlík, dusík - až "biomarker" biomasy specifických skupin)
- tato komponenta musí být přítomna ve všech živých buňkách a po jejich smrti musí být buď rychle degradována (tomu ideálně vyhovuje např. ATP), nebo se alespoň stává lehce extrahovatelnou (princip fumigačně - extrakční metody)
- pro půdu zejména fumigační metody (fumigant = chloroform):
  - 1) Fumigačně - inkubační metoda (FIM)
  - 2) Fumigačně - extrakční metoda (FEM)

### Mikrobiální biomasa v půdě - Chloroform-fumigační inkubační metoda (metoda FI)

- historický první metoda navržená pro skutečně kvantitativní analýzu obsahu mikrobiální biomasy v půdě, do té doby byly užívány pouze mikroskopické techniky a metody založené na korelaci s aktivitou (SIR od roku 1978)
- jedná se o metodu založenou na předpokladu vzniku nově se tvořící biomasy v půdě zasažené fumigačním prostředkem (redestilovaný chloroform), především z mikrobiálních buněk usmrcených fumigací
- mineralizace organických látek z usmrcených buněk mikroorganismů je měřena jako celkový  $\text{CO}_2\text{-C}$  uvolněný během inkubace (7-10 dní) následující po fumigaci, přičemž produkce  $\text{CO}_2\text{-C}$  z nefumigovaných vzorků je považována za kontrolu
- analýzu lze provést v infúzních láhvích, do kterých je naváženo 10 g půdy ovlhčené standardně na 60 % maximální vodní kapacity (WHC - Water holding capacity); vzorky určené k fumigaci jsou přemístěny do exsikátoru, na jehož dně je uložena miska s chloroformem; po evakuaci nádoby probíhá fumigace po dobu 24 hodin (25 °C)
- po ukončení fumigace jsou páry chloroformu dokonale odstraněny opakovaným odsáváním (8-11 cyklů); fumigované vzorky půdy jsou následně inokulovány vodní suspenzí nefumigované půdy téhož vzorku (asi 1 % hmotnosti); nefumigované vzorky se inokulují stejným způsobem a též se upraví na 60 % WHC; po ukončení těchto procedur se všechny vzorky přemístí do termostatu (25 °C)

### Mikrobiální biomasa v půdě - Chloroform-fumigační inkubační metoda (metoda FI) - pokračování

- pokud je k analýze produkce CO<sub>2</sub> použita plynová chromatografie, lze doporučit po 3, 6 a 9 dnech stanovit obsah CO<sub>2</sub> ve vzduchu nad povrchem půdy a následně zcela vyměnit vzduch v baňkách
- celková produkce CO<sub>2</sub> představuje sumu těchto dílčích stanovení
- z hlediska reprodukovatelnosti se jako nejlepší výpočet pro stanovení mikrobiální biomasy C<sub>bio</sub> jeví vztah:

$$C_{\text{bio}} = ( (\text{CO}_2\text{-C})_{\text{F}} - (\text{CO}_2\text{-C})_{\text{NF}} ) / k_{\text{C}}$$

$$\text{kde } k_{\text{C}} = 0,41$$

- metodu lze užít i pro stanovení N<sub>bio</sub> a to tak, že měříme sumu NH<sub>4</sub><sup>+</sup> a NO<sub>3</sub><sup>-</sup> uvolněnou během inkubace jako produkty mineralizace dusíku biomasy uvolněného fumigací; opět existuje konverzní faktor k<sub>N</sub>



## Mikrobiální biomasa v půdě - Chloroform-fumigační extrakční metoda (FE metoda, CFEM)

- ISO 14240-2:1997 Soil quality -- Determination of soil microbial biomass -- Part 2: Fumigation-extraction method

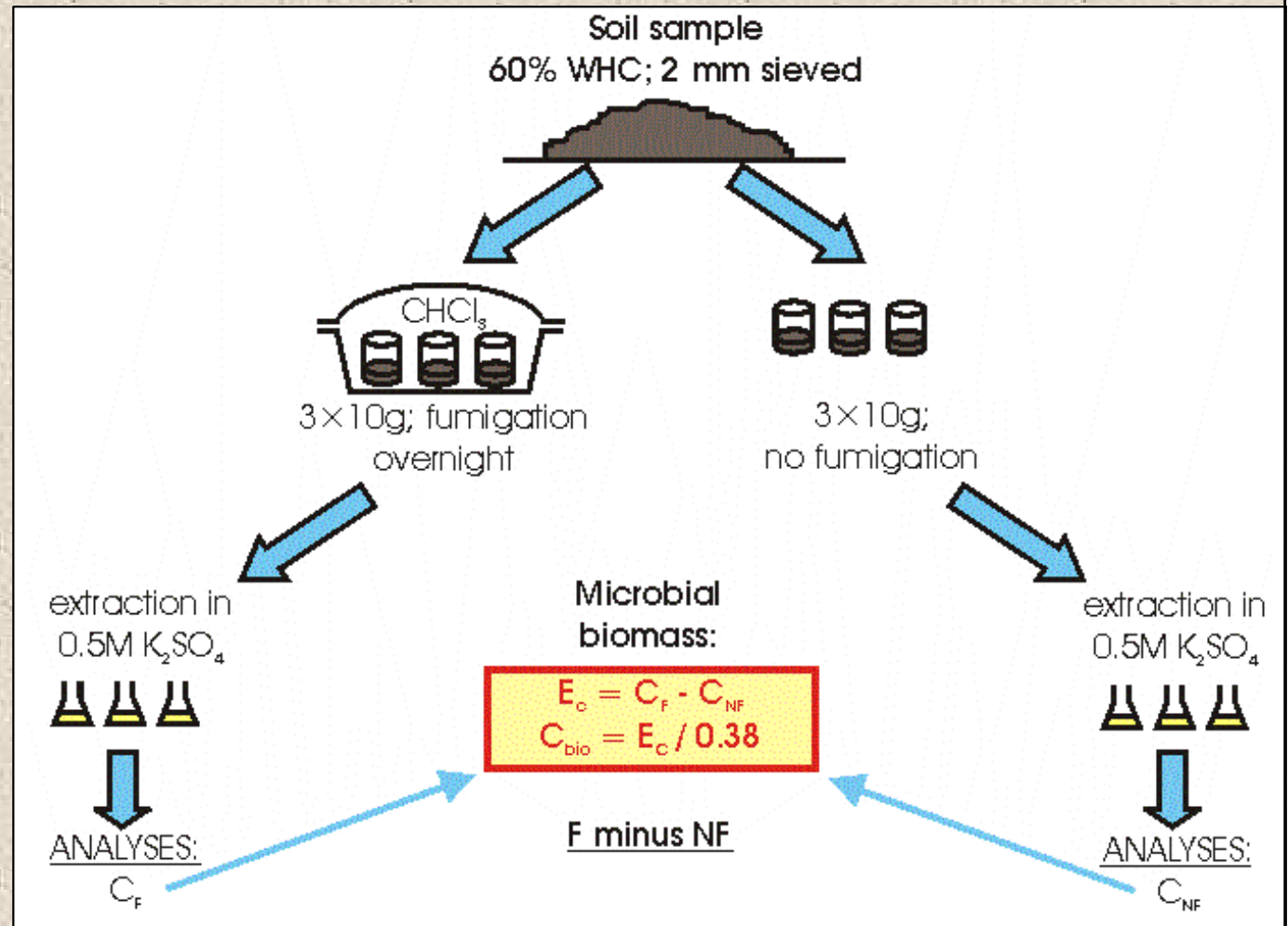
- opět probíhá fumigace, ale vzniká extrakt z obou variant (F a NF), který je analyzován na obsah uhlíku; výhodou je, že extrakt může být analyzován prakticky na cokoli

- pokud je analyzován uhlík, lze to provést:

- dichromanovou oxidací a následnou titrací či spektrofotometricky

- oxidací působení  $K_2S_2O_8$  (persulfátu) a UV vznikne  $CO_2$  a ten je měřen IRGA

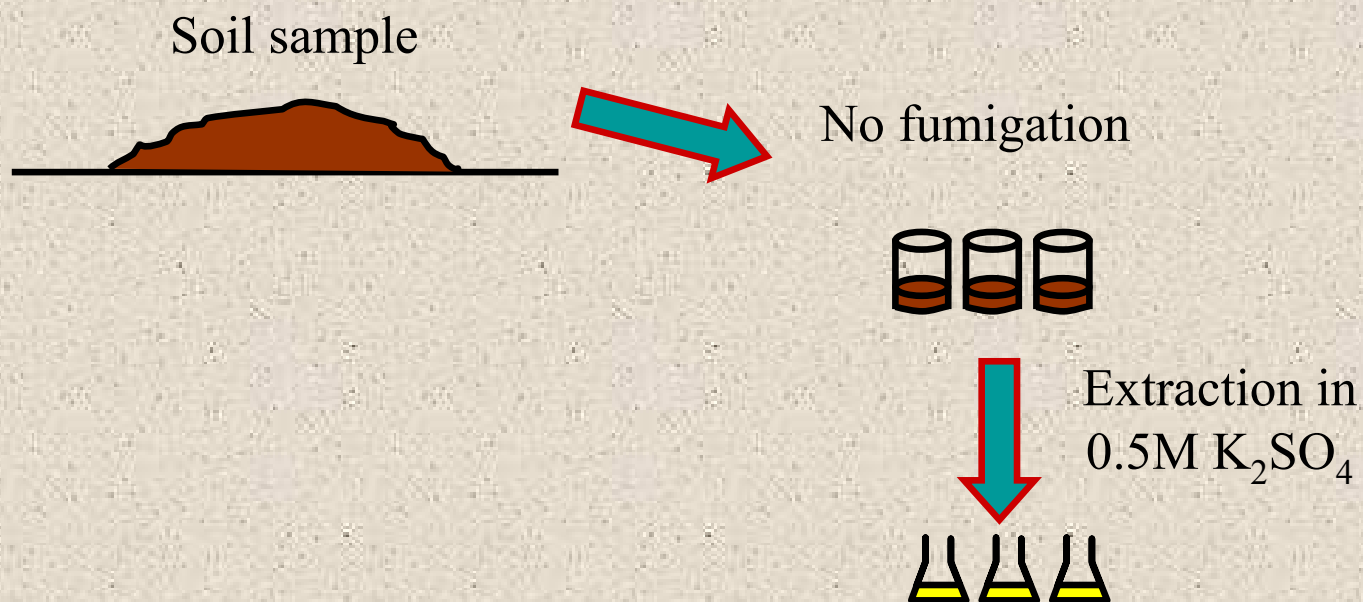
- výsledek je udáván v  $\mu g \cdot g_{suš.}^{-1}$



## Extracelulární uhlík v půdě stanovený během FE metody

- nefumigovaná varianta extrahuje lehce extrahovatelný mimobuněčný uhlík = lehce dostupný zdroj uhlíku pro mikrobiální aktivity = available soil carbon = ekologicky významný parametr

- VÝHODA: během jedné metody stanovíme jak mikrobiální biomasu, tak velikost dostupného zdroje uhlíku v půdě



Analyses:

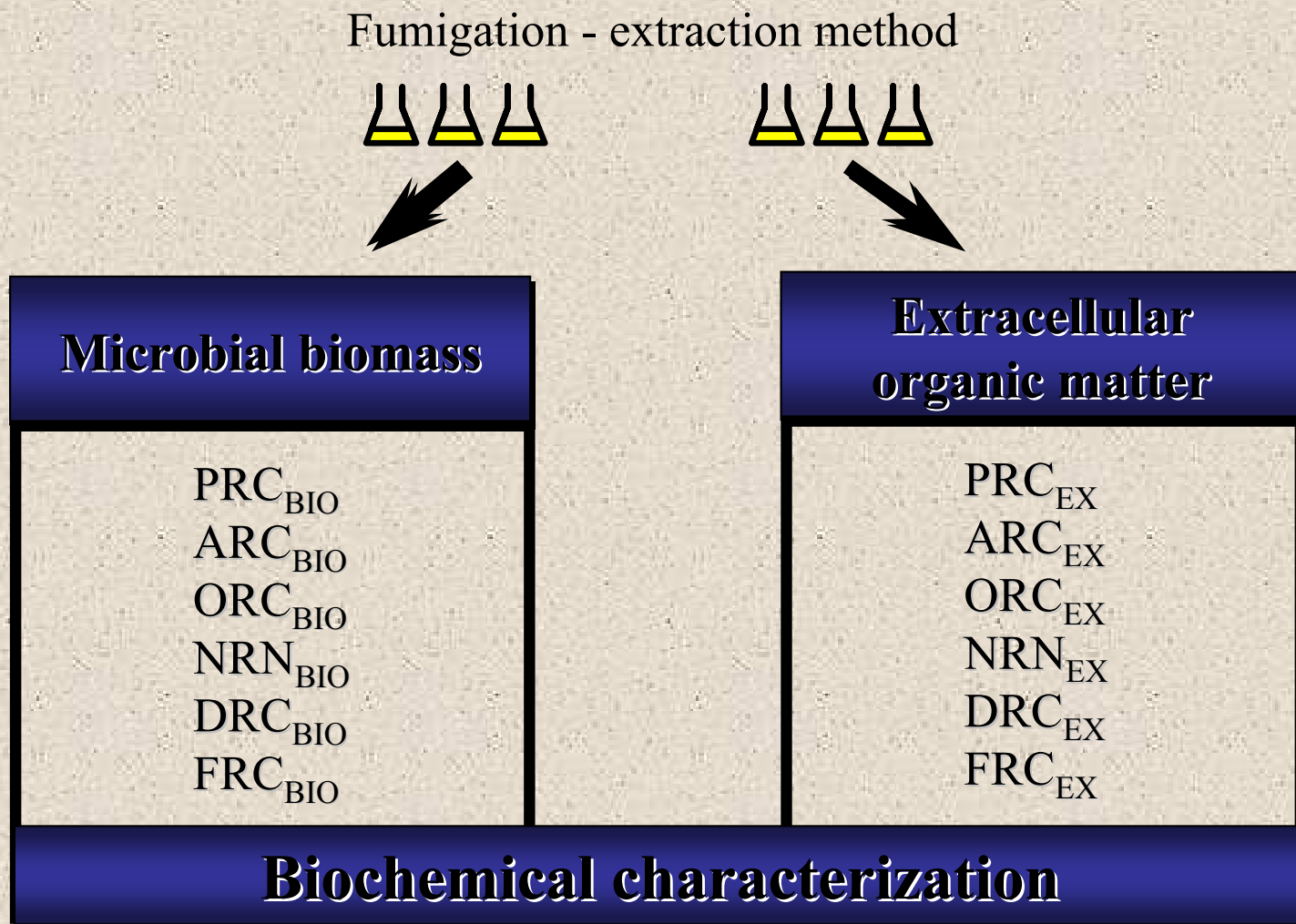
$C_{NF}$

**Extracellular organic matter**

$$(C_{NF} = EX-C = C_{ex})$$

## Mikrobiální biomasa v půdě - Chloroform-fumigační extrakční metoda (FE metoda, CFEM) - pokračování

- možnost rozšířených analýz: N - Kjeldahlovou mikrotitrací; P - extrakce  $\text{NaHCO}_3$  (pH 8,5) a stanovení spektrofotometricky (882 nm) po reakci s heptamolybdenátem amonným; stanovení PRC, ARC, FRC, DRC, ORC, NRN:





## Mikrobiální biomasa v půdě - Chloroform-fumigační extrakční metoda (FE metoda, CFEM) - pokračování

| METHOD:   | DETERMINES WHAT:  | UNIT:  |
|---|---|--|
| Phenol - reactive carbon ( <b>PRC</b> )                       | <i>total reducing carbohydrates</i> (hexoses, pentoses, mono-, di- and polysaccharides) | $\mu\text{g C} \cdot \text{g}_{\text{d.w.}}^{-1}$      |
| Anthrone - reactive carbon ( <b>ARC</b> )                     | <i>hexoses and their polymers</i>   | $\mu\text{g C} \cdot \text{g}_{\text{d.w.}}^{-1}$      |
| Orcinol - reactive carbon ( <b>ORC</b> )                      | <i>pentoses</i>   | $\mu\text{g C} \cdot \text{g}_{\text{d.w.}}^{-1}$      |
| Ninhydrin - reactive nitrogen ( <b>NRN</b> )                  | <i><math>\alpha</math>-amino-N and aminoacids</i>                                       | $\mu\text{g N} \cdot \text{g}_{\text{d.w.}}^{-1}$      |
| Diphenylamine - reactive compounds ( <b>DRC</b> )             | <i>DNA</i> (deoxyribose)  | $\mu\text{g DNAeq} \cdot \text{g}_{\text{d.w.}}^{-1}$  |
| Folin-Ciocalteu's reagent - reactive compounds ( <b>FRC</b> ) | <i>proteins</i> (Tyr, Trp)  | $\mu\text{g BSAsEq} \cdot \text{g}_{\text{d.w.}}^{-1}$ |

## Mikrobiální biomasa v půdě - Metoda substrátem indukované respirace (SIR)

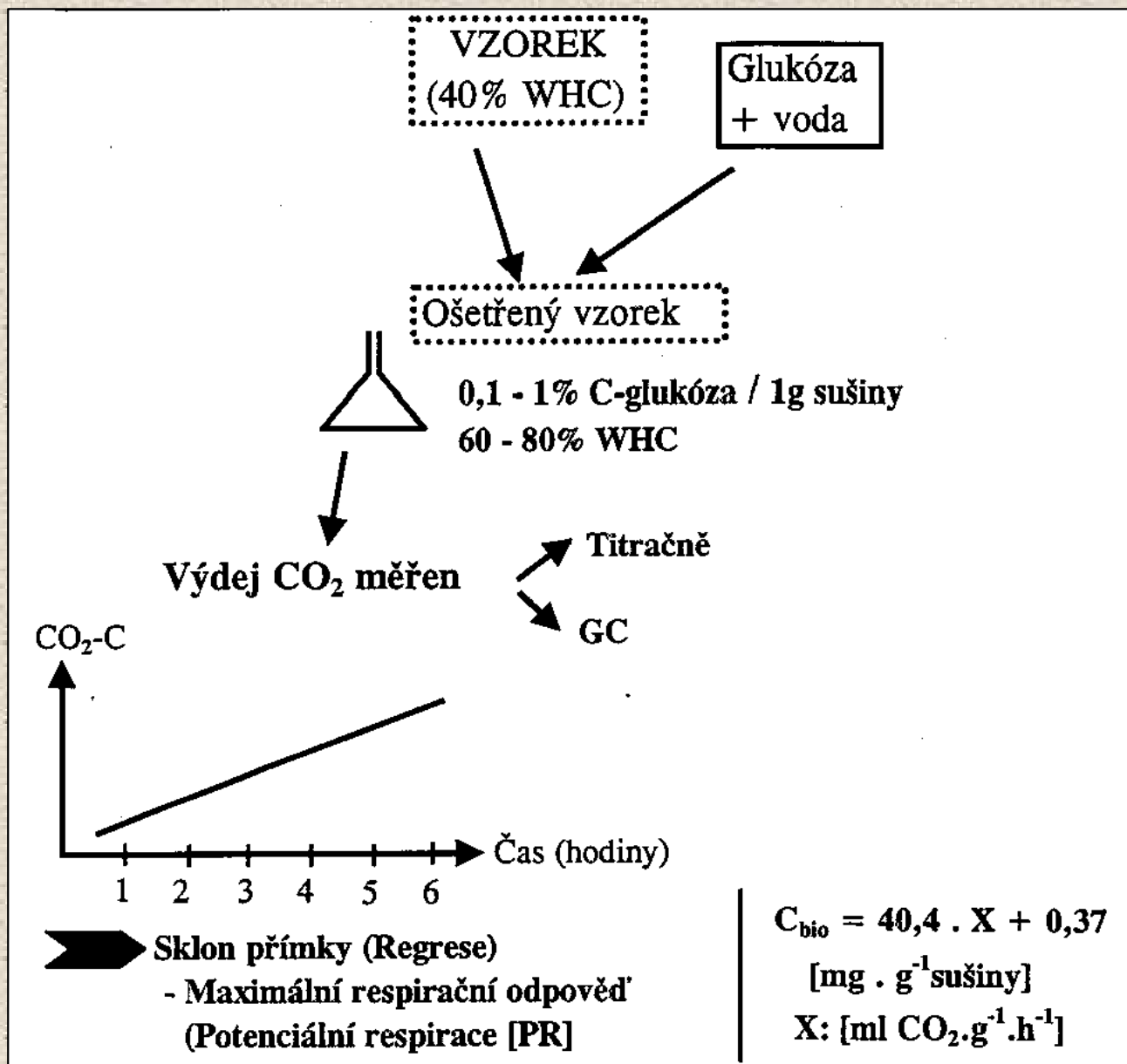
- ISO 14240-1:1997 Soil quality -- Determination of soil microbial biomass -- Part 1: Substrate-induced respiration method

- založena na empirickém vztahu mezi mikrobiální biomasou a potenciální respirací (respirační rychlost během prvních hodin po přidání maximálně využitelného substrátu - glukózy - v saturující koncentraci)

- někdy využívána jako údaj o aktivní složce mikrobiální biomasy

- rozsah empirického koeficientu ve validačních studiích: 15 - 54!!

=> lépe používat pouze pro měření potenciální respirace - PR



## Mikrobiální biomasa v půdě

### Chloroform - fumigační extrakční metoda

- Jednoduchá technika pro větší množství vzorků
- Chemická metoda neanalyzující fyziologický stav
- Možno stanovovat i jiné prvky (N,S,P)

- Pouze kvantitativní údaj
- Práce s chloroformem
- Kalibrace metody

### Metoda indukce substrátem

- Fyziologická technika odrážející okamžitou reakci na substrát
- Informuje o aktivitě celého společenstva
- Automatizovatelná

- Kalibrace metody - nutná opatrná interpretace
- Závislost na fyziologickém stavu společenstva
- Nutná přesná standardizace vstupních podmínek

Výhody

Nevýhody



## Mikrobiální biomasa v půdě - stanovení specifických látek

- látky specifické pouze pro některé skupiny; povaha až biomarkerů

### Stanovení složek buněčné stěny

- kyselina muramová - rozkladem se uvolní laktát a ten se stanovuje buď enzymaticky či chemicky
- lipopolysacharidy - enzymatické stanovení - určují G- bakterie
- chitin - určuje biomasu hub

### Chlorofyl

- extrakce methanolem či acetonem a měření absorpance 665 nm (či 850 nm pro stanovení "purple photosynthetic bacteria")

### DNA

- použití barvení např. ethidium bromide a následná spektrofotometrie

### Ergosterol

- biomarker biomasy hub

### Proteiny

### PLFA atd.

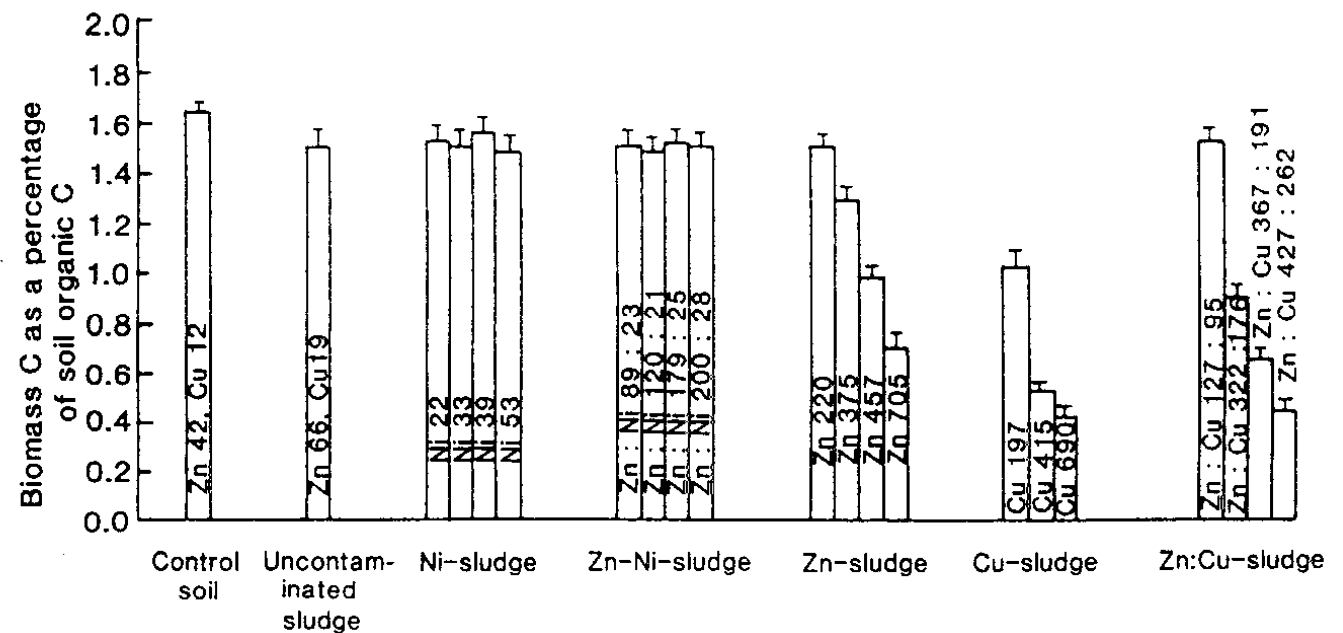


## Příklad:

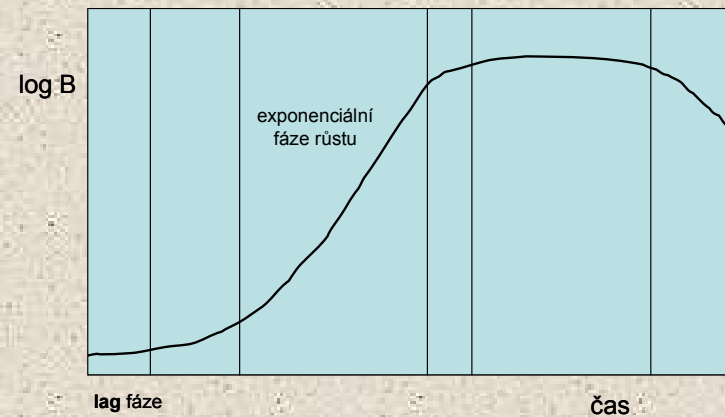
Effects of Zn, Cu, and Ni in sewage sludge on microbial biomass in a sandy loam soil.

- Zejména C<sub>bio</sub>/C<sub>org</sub> v půdě je citlivý indikátor dlouhodobých degradací půdní organické hmoty, neboť C<sub>bio</sub> se snižuje daleko rychleji než celkový organický uhlík
- Toxicita pro C<sub>bio</sub> v pořadí Cu > Zn >> Ni > Cd

**Fig. 4** Microbial biomass C expressed as a percentage of total soil organic C in Gleadthorpe soils (SEM shown). Values given in boxes are the total soil metal concentrations ( $\mu\text{g g}^{-1}$  soil). From Chander and Brookes (1993). Reproduced by permission of the publisher



## Sledování růstu mikroorganismů





### Měření růstu mikroorganismů (kinetika, růstové strategie)

- významný integrovaný parametr mikrobiální ekotoxikologie
- měření růstu bakterií v čistých kulturách a v reálných vzorcích vod, půd a sedimentů
- aerobní a anaerobní inkubace ve vztahu k biodegradaci persistentních látek

#### Proč sledovat růst mikroorganismů a jeho kinetiku?

1. Integrující parametr vlivu toxických látek
2. Lze studovat na úrovni jednotlivých (např. imobilizovaných) buněk, u populací rostoucích v podmínkách *in vitro* nebo u populací v reálném prostředí půdy (vody, sedimentů)
3. Jde o ukazatel umožňující prognózu vývoje společenstva
4. Jde o parametr informující o schopnosti zkoumané populace (buněk) využívat různé substráty
5. Jde o parametr spjatý s biodegradací různých organických látek (např. POPs) v laboratorních podmínkách nebo v podmínkách *in situ*

## Kinetika růstu, modelování růstu - připomenutí

### 1. Obecná rovnice růstu (platí pro exponenciální fázi růstu):

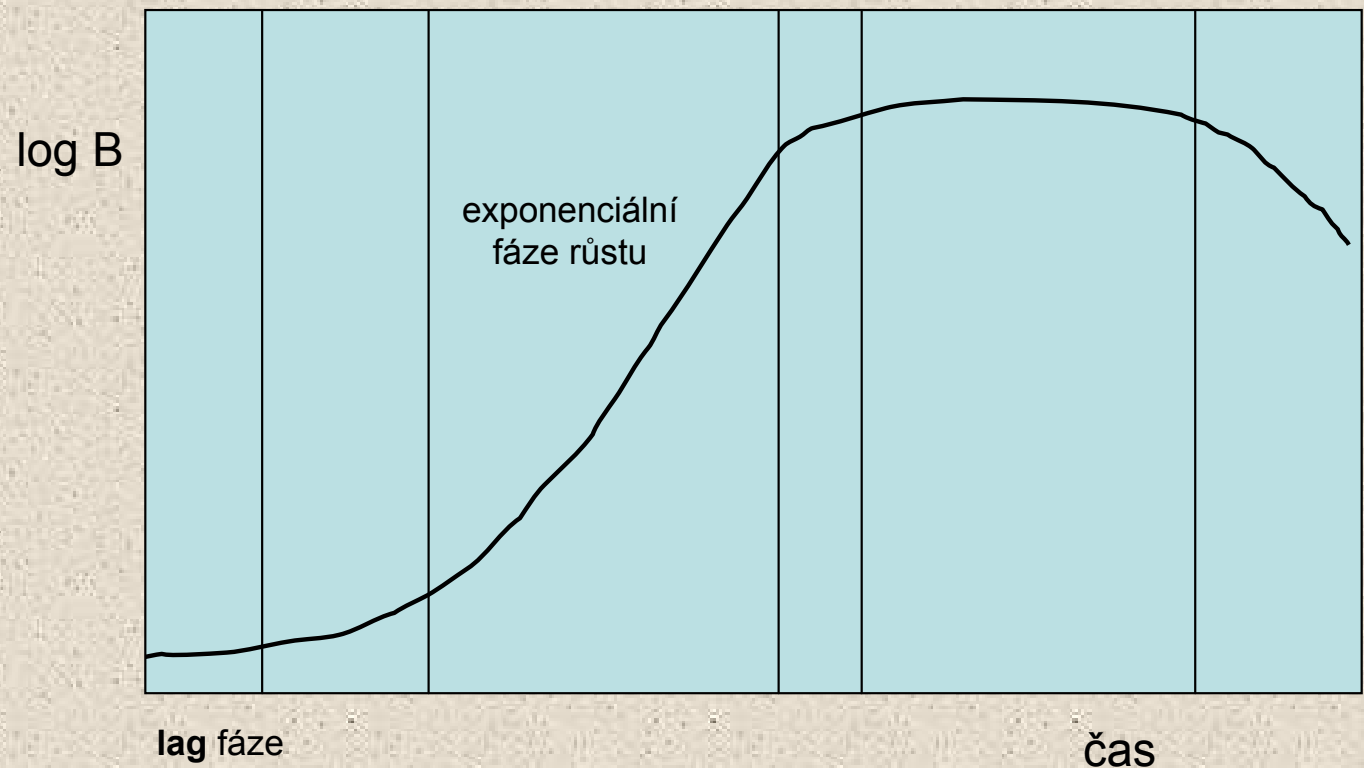
$$\frac{dB}{dt} = \mu \cdot B$$

B .... biomasa či počty jedinců  
 $\mu$  .... specifická růstová rychlost (růstová rychlost na jednotku biomasy)  
t .... čas

### Růstová křivka

Modelově musí být splněno:

- čistá kultura mikroorganismů
- růst v tekutém médiu
- definovaný živný roztok
- nelimitující koncentrace živin
- optimální podmínky



## Kinetika růstu, modelování růstu - připomenutí

### 2. uvažujeme-li proměnlivé koncentrace substrátu:

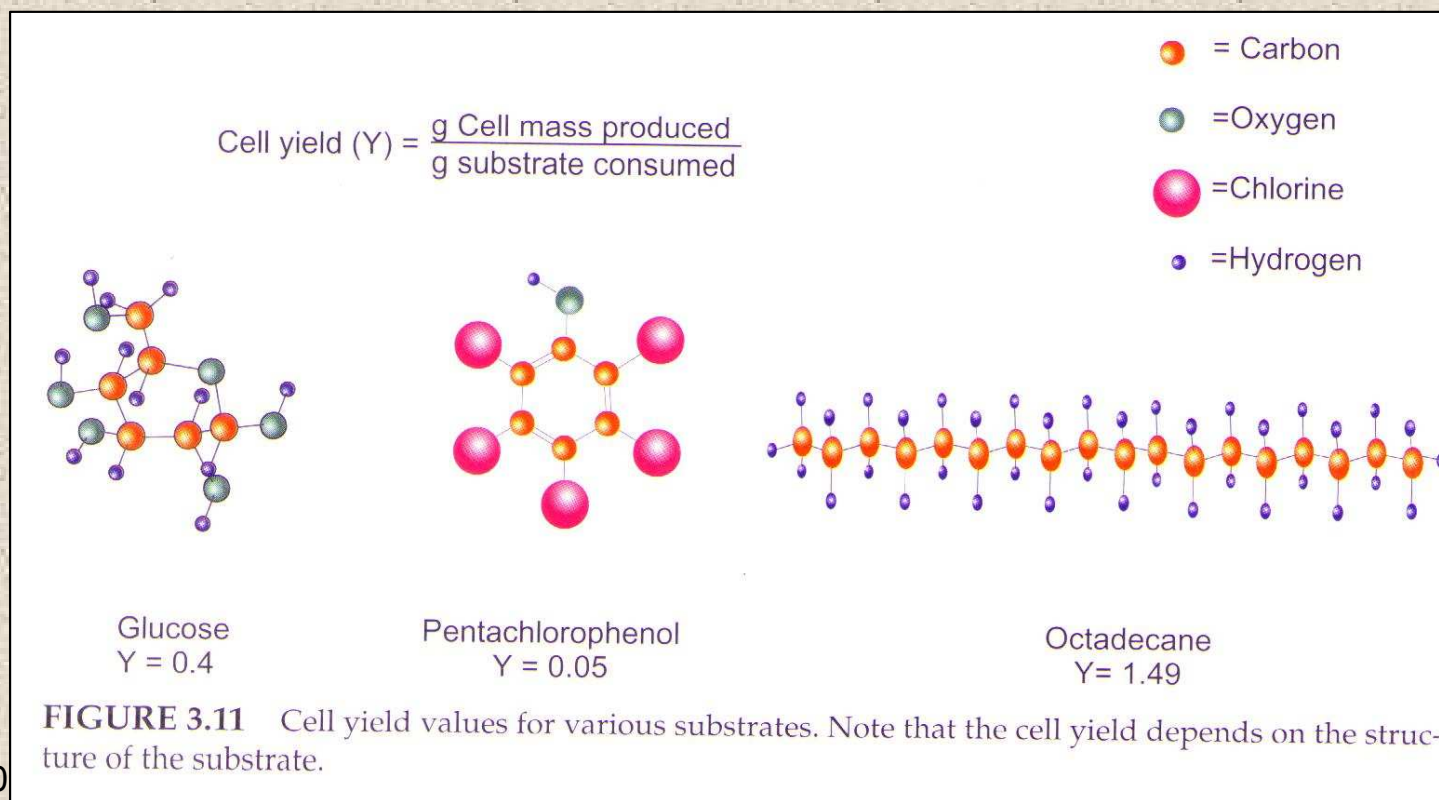
růstový výtěžek - změna biomasy z definovaného množství substrátu:

$$Y = \frac{dX}{-ds}$$

$$q = \frac{\mu}{Y} \Rightarrow q = \frac{-ds}{dt} \cdot \frac{1}{X}$$

$$\frac{-ds}{dt} = q \cdot X$$

tento vztah vyplývá z toho, že úbytek substrátu je přímo úměrný množství biomasy v daném okamžiku



## Kinetika růstu, modelování růstu - připomenutí

### 3. Navíc ještě: kinetika využitelnosti substrátu (obdoba enzymové kinetiky) - Monodova rovnice

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{S}{K_s + S}$$

$K_s$

- taková koncentrace substrátu, kdy specifická růstová rychlost je  $1/2 \mu_{\max}$
- je to parametr pro substrát (obdoba Michaelisovy konstanty)
- vyšší  $K_s$  značí nižší afinitu (využitelnost) substrátu => důležité při biodegradacích

Both  $\mu_{\max}$  and  $K_s$  are constants that reflect:

- The intrinsic properties of the degrading microorganism
- The limiting substrate
- The temperature of growth

The following table gives some representative values of  $\mu_{\max}$  and  $K_s$  for growth of different organisms on a variety of substrates.

| Organism                        | Growth temperature | Limiting nutrient | $\mu_{\max}$ ( $hr^{-1}$ ) | $K_s$ (mg/l) |
|---------------------------------|--------------------|-------------------|----------------------------|--------------|
| <i>Escherichia coli</i>         | 37°C               | Glucose           | 0.8-1.4                    | 2-4          |
| <i>Escherichia coli</i>         | 37°C               | Glycerol          | 0.87                       | 2            |
| <i>Escherichia coli</i>         | 37°C               | Lactose           | 0.8                        | 20           |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 30°C               | Glucose           | 0.5-0.6                    | 25           |
| <i>Candida tropicalis</i>       | 30°C               | Glucose           | 0.5                        | 25-75        |
| <i>Candida sp.</i>              | 0                  | Oxygen            | 0.5                        | 0.045-0.45   |
| <i>Candida sp.</i>              |                    | Hexadecane        | 0.5                        |              |
| <i>Klebsiella aerogenes</i>     |                    | Glycerol          | 0.85                       | 9            |
| <i>Aerobacter aerogenes</i>     |                    | Glucose           | 1.22                       | 1-10         |



## Kinetika růstu, modelování růstu - připomenutí

Růstová křivka je nejjednodušší systém měření růstu bakterií

### 1) Stacionární kultury

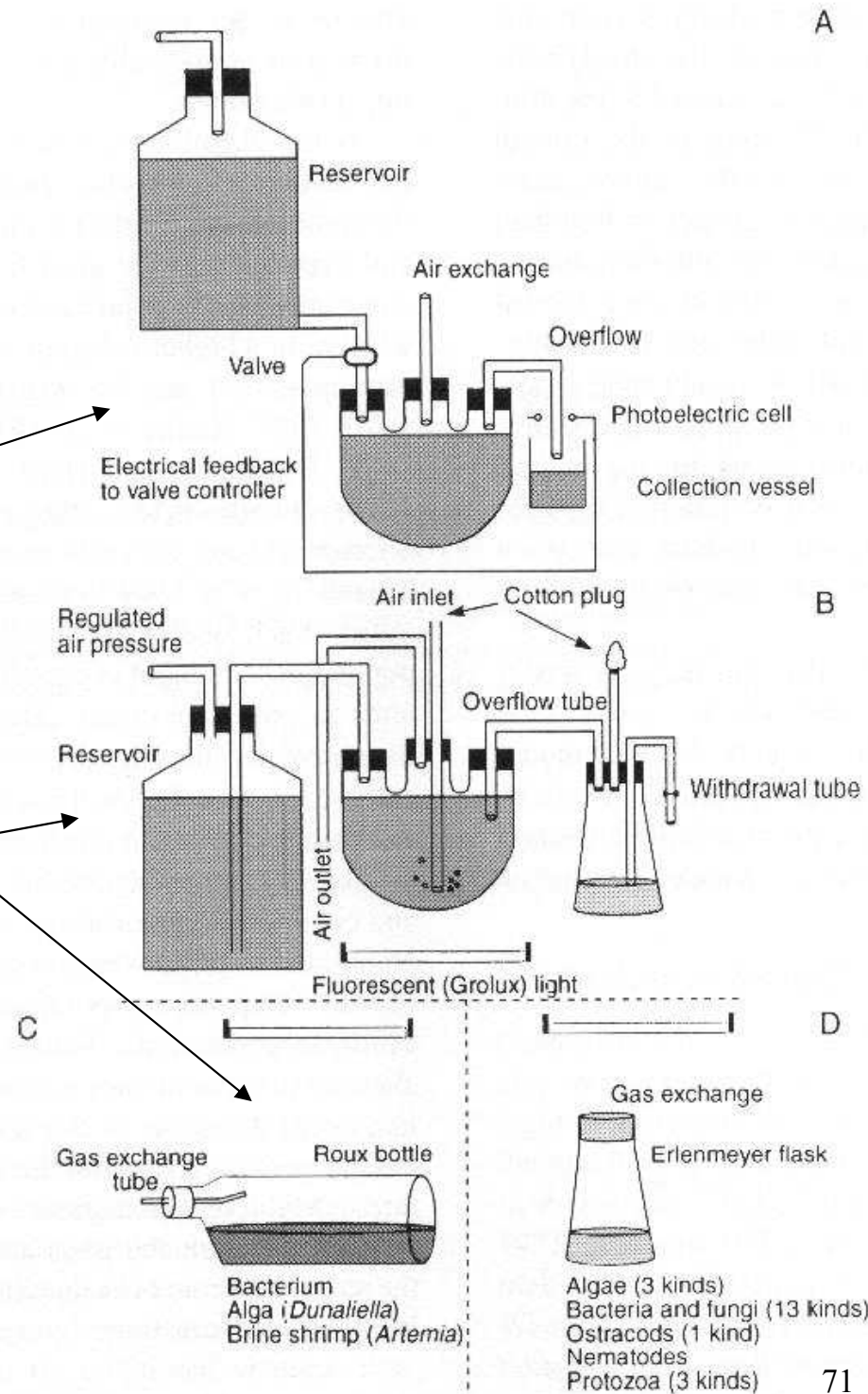
### 2) Kontinuální kultury

- turbidostat

růstová rychlost je vždy na maximu  
kontrola přes turbiditu kultury

- chemostat

růstová rychlost je kontrolována přes koncentraci  
limitující živiny



### Jako endpoint je růst využíván v řadě normovaných ekotoxikologických testů

- ISO 10712:1995 Water quality -- Pseudomonas putida growth inhibition test (Pseudomonas cell multiplication inhibition test; má i ČSN EN ISO 10712 Jakost vod - Zkouška inhibice růstu na Pseudomonas putida (zkouška inhibice rozmnožování buněk Pseudomonas))
- ISO 8692:1989 Water quality - Fresh water algal growth inhibition test with Scenedesmus subspicatus and Selenastrum capricornutum
- ISO 14442:1999 Water quality - Guidelines for algal growth inhibition tests with poorly soluble materials, volatile compounds, metals and waste water
- ISO 15522:1999 Water quality -- Determination of the inhibitory effect of water constituents on the growth of activated sludge microorganisms
- OECD 201: Alga, growth inhibition test
- modifikovaná metoda agarových ploten

## Jako endpoint je růst využíván v řadě normovaných ekotoxikologických testů

- růstově inhibiční test



### **Turbidimetrický test – EN ISO 10712, ČSN 75 7730**

|                           |   |
|---------------------------|---|
| <b>Organismus</b>         | <i>Pseudomonas putida</i> (případně <i>fluorescens</i> ) G-.  |
| <b>Princip</b>            | <p>Principem tohoto testu je kultivace bakteriálního inokula v tekuté živné půdě se vzorkem. Se zvyšující se rychlostí růstu vzniká intenzivnější zákal. Průběh testu se sleduje měřením tohoto zákalu turbidimetricky (Dutka et Kwan, 1982).</p> <p>18 hodinové bakteriální inokulum se naředí na požadovanou hustotu a nasazuje se do testovaných vzorků a kontroly ve zkumavkách. Po 16 hodinové kultivaci v termostatu se měří absorbance při <b>560 nm</b> a vypočte se % inhibice mikrobiálního růstu ve srovnání s kontrolou. (Alternativní <math>\lambda</math> je 650 nm, která je optimální pro <i>Pseudomonas fluorescens</i>) (Dočkal et Soldán, 1988).</p> |
| <b>Reakční směs (V)</b>   | 100 ml dle ČSN, případně nižší.   |
| <b>Předkultivace</b>      | 18 hodin.   |
| <b>Trvání testu</b>       | 16 ± 1 hodin (6).   |
| <b>Teplota</b>            | 23 ± 1 °C.  |
| <b>Třepání</b>            | Urychluje průběh testu (není podmínkou).  |
| <b>Pozitivní kontrola</b> | 3, 5 – dichlorfenol.  |
| <b>Aseptická práce</b>    | Velmi limitující pouze při zakládání testu a při uchovávání kultury.  |
| <b>Doporučení</b>         | Finančně velmi výhodný test. Vhodný k testování odpadů – toxických vzorků bez vysokého zákalu a zabarvení.  |

### Jako endpoint je růst využíván v řadě normovaných ekotoxikologických testů

- modifikovaná metoda agarových ploten:

| <b>Modifikovaná metoda agarových ploten</b> |   |
|---|---|
| <b>Organismus</b>                           | <i>Bacillus cereus</i> (nebo jiné bakterie - Diaz-Baez a Roldan 1996) G+  |
| <b>Princip</b>                              | <i>Hustota předkultivované kultury mikroorganismu je upravena tekutým živným médiem na požadovanou konstantní koncentraci. Buněčná suspenze se přenesse na povrch předsušené agarové plotny (živné médium a agar) a nechá se absorbovat. Jednotlivé koncentrace testované látky (chemikálie jsou rozpuštěny ve směsi 80% DMSO a 20% glycerolu) a kontrola se nanášejí na plotny, které se dále inkubují. Inhibiční zóna kolem testovaného vzorku se měří a používá se pro hodnocení toxicity (Liu et al. 1989, Dutka 1988).</i> |
| <b>Reakční směs (V)</b>                     | <i>Dle velikosti použité petriho misky.</i>   |
| <b>Předkultivace</b>                        | <i>Specifická dle druhu mikroorganismu (např. <i>Bacillus cereus</i> 16 – 18 hodin).</i>  |
|   |   |



## Modelování růstu mikroorganismů pod vlivem stresujících faktorů

stres je selekční faktor, rostou jen rezistentní druhy

### 1) modely pro biomasu nebo pro počet jedinců

- společenstvo s  $10^{10}$  jedinců může mít sušinu  $< 1\text{g}$ ; poměr biomasy k četnosti buněk závisí na jejich velikostech, která může být proměnlivá i vlivem měnících se fyziologických podmínek

### 2) modely v čistých kulturách a jejich platnost / interpretace v reálném prostředí půdy nebo vody

- vliv měnícího se spektra živin a jejich dostupnosti

### 3) modely pro jevy, které se mohou objevovat skokovitě a mohou ovlivňovat růstovou strategii celého společenstva

- např. periodický výskyt mutantů určitého typu:

