

Praktické cvičení 1

Mikrobiologie I, BSP LF MUNI

Distanční výuka, LS 2020/2021

doc. MVDr. Šárka Bursová, Ph.D.

Obsah cvičení

- Kultivace mikroorganismů
- Kvalitativní stanovení
- Kvantitativní stanovení
- Stanovení celkového počtu mikroorganismů
- Stanovení počtu bakterií čeledi *Enterobacteriaceae*
- Stanovení počtu *Escherichia coli*
- Stanovení počtu enterokoků

Kultivace mikroorganismů

Základní informace

Kvalitativní stanovení

- přítomnost / nepřítomnost MO
- vztaheno k navážce analytického vzorku (např. negativní v 25 g)

- pomnožení (jednostupňové x dvoustupňové)
- izolace (kličkou, tyčinkou)
- konfirmace
- definitivní výsledek

Kvantitativní stanovení

- přesný počet MO
- KTJ v 1 g či ml vzorku
- KTJ = kolonie tvořící jednotka

- desetinasobné ředění vzorku
- inokulace (zalití x roztěr)
- počítání suspektních kolonií
- konfirmace
- definitivní výsledek

Kvalitativní stanovení (průkaz)

Pomnožení

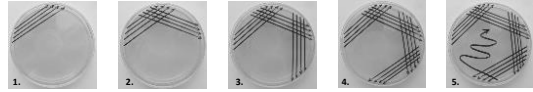
- **tekuté médium**, cíleně zvyšujeme počet buněk daného MO
- neselektivní x selektivní pomnožovací média
- **Postup**: dané množství upraveného vzorku či suspenze přeneseme do daného množství tekutého živného média a promícháme



Izolace

- **pevné médium**
- **Postup:** pomnožený vzorek nanese na povrch agarů, kde ho cíleně ředíme tak, aby došlo k nárůstu izolovaných kolonií
- **Metody:** vyočkování sterilní kličkou (křížový roztěr) nebo tyčinkou (had)

Křížový roztěr kličkou



<https://web.microsoftstream.com/video/f5c221bc-5fe1-496b-91e6-5fbd21a0368d?list=studio>

Zdroj obrázku: <https://sz.clipartigo.com/stock/camcorder-symbol-flat-vector-1548272.html>

Vyočkování sterilní tyčinkou (had)



<https://web.microsoftstream.com/video/154c94ed-97e8-4cac-8d58-d6bcf0ec691c?list=studio>

Zdroj obrázku: <https://sz.clipartigo.com/stock/camcorder-symbol-flat-vector-1548272.html>

Konfirmace

- **potvrzení, že se skutečně jedná o sledovaný mikroorganismus**
- fenotypová **x** genotypová
- **konfirmujeme** suspektní (typické) kolonie z dané živné půdy
- **povinné** fenotypové konfirmační metody jsou vždy definovány příslušnou metodikou (norma ČSN EN ISO) popisující stanovení daného MO

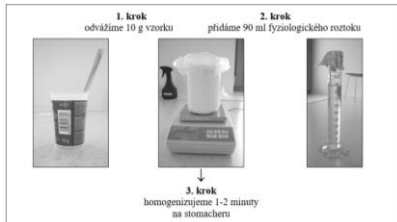
Kvantitativní stanovení (počet)

Zpracování vzorku

tekuté lze přímo

navážka vzorku	10 g (počet) × 25 g (průkaz, není-li dáno jinak)
přídavek ředícího média	vždy 9× více než navážka (10 g → 90 ml)
homogenizace	stomacher (1,5 až 2 min) = primární ředění
další desetinašobná ředění	9 ml ředícího média + 1 ml suspenze z předchozího kroku

Zpracování vzorku – pevné, kašovité



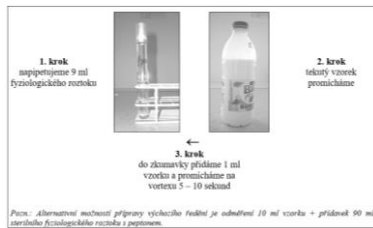
Výchozí ředění – pevné, kašovité



<https://web.microsoftstream.com/video/0969a89f-447f-4ca1-890b-27eb6ec84377?list=studio>
<https://web.microsoftstream.com/video/8fa81085-6419-445a-8036-e3a49f1218f0?list=studio>

Zdroj obrázku: <https://i.digipartigo.com/stock/camcorder-symbol-flat-vector-1548272.html>

Zpracování vzorku – tekuté



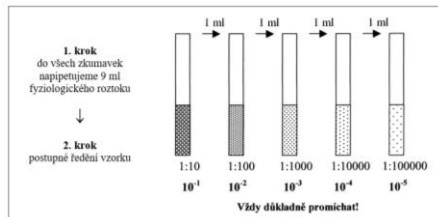
Výchozí ředění – tekuté



<https://web.microsoftstream.com/video/d30df57f-d2af-4e6f-886a-8b4afb5a8545?list=studio>

Zdroj obrázku: <https://i.digipartigo.com/stock/camcorder-symbol-flat-vector-1548272.html>

Ředění vzorku



Další desetinasobná ředění



<https://web.microsoftstream.com/video/a52a877d-1bf5-4506-b63f-89605a2c9aa7?list=studio>

Zdroj obrázku: <https://i.digipartigo.com/stock/camcorder-symbol-flat-vector-1548272.html>

Kvantitativní techniky



ZALITÍ

- vždy 1 ml inokula
- prázdná Petriho miska
- do středu pipetujeme inokulum
- zalijeme cca 15 ml agarů (max. 50 °C)
- promícháme krouživými pohyby
- necháme ztuhnout
- inkubace dnem vzhůru

ROZTĚR

- obvykle 0,2 ml (příp. 0,1 či 1 ml)
- Petriho miska s živnou půdou
- na povrch pipetujeme inokulum
- roztěr sterilní hokejkou
- zaschnutí max. 15 minut
- inkubace dnem vzhůru

Metoda zalití



<https://web.microsoftstream.com/video/80e4c001-eee8-44a1-96a8-47622f07dfba?list=studio>

Zdroj obrázku: <https://cz.clipartlogo.com/stock/camcorder-symbol-flat-vector-1548272.html>

Metoda roztěru



<https://web.microsoftstream.com/video/6621ad9f-bbe1-4a75-a98f-57c949ef79fc?list=studio>

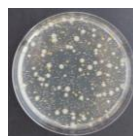
Zdroj obrázku: <https://cz.clipartlogo.com/stock/camcorder-symbol-flat-vector-1548272.html>



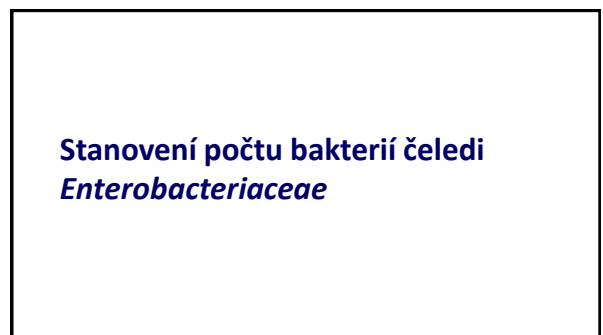
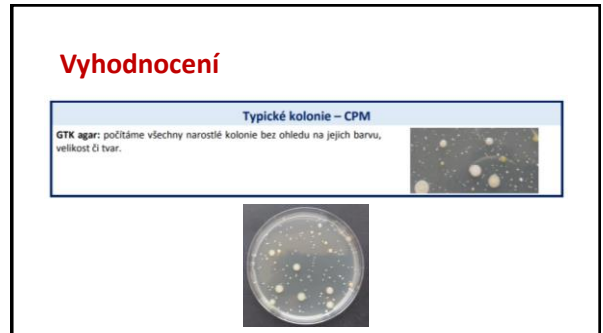
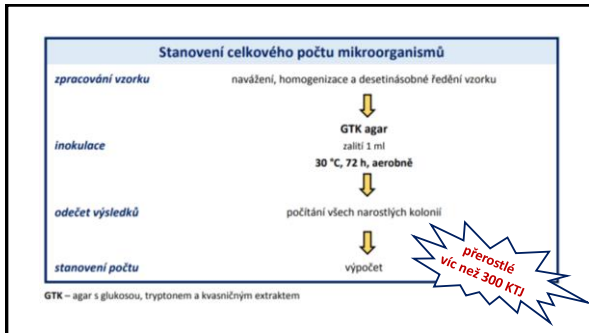
**5 minut
přestávka**

Stanovení celkového počtu mikroorganismů (CPM)

Celkový počet mikroorganismů (CPM)



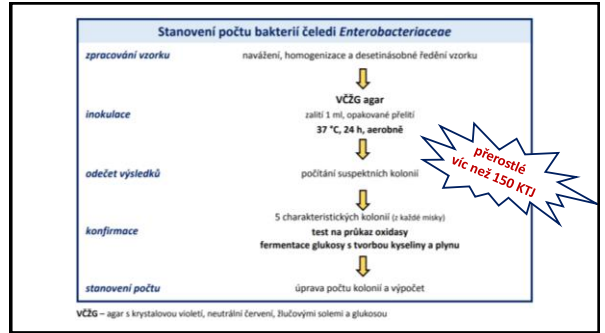
Počet **mezofilních aerobních** a **fakultativně anaerobních** mikroorganismů (bakterie, kvasinky a plísně), které rostou v **neselektivních nutričně bohatých** médiích nebo tvoří kolonie na nutričně bohatých agarových půdách za aerobních podmínek během inkubace při 30 °C po dobu 72 hodin.



čeled' *Enterobacteriaceae*

EB

- gramnegativní
- nesporující tyčinky
- oxidáza negativní
- fermentace glukózy s tvorbou kyseliny a plynu
- významný indikátor fekální kontaminace či nedostatečně provedeného tepelného ošetření



Typické kolonie bakterií čeledi *Enterobacteriaceae*

vČŽG agar: kolonie růžovočervené, červené nebo fialové barvy, velikost 0,5 – 2 mm, mohou být obklopeny růžovou zónou precipitované žuště.

Interpretace konfirmačních testů		
průkaz oxidázy	fermentace glukosy	tvorba plynu
-	+	+

Pozn. Teplota 37 °C se používá tehdy, kdy stanovení počtu *Enterobacteriaceae* slouží jako hygienický indikátor. Lze využít i alternativní kulturační teplotu 30 °C, pokud se stanovení počtu *Enterobacteriaceae* provádí pro technologické účely a chceme zahrnout i psychrotrofní *Enterobacteriaceae*.

Enterobacteriaceae

vČŽG agar

OXI test – průkaz oxidázy

Princip metody
Enzym cytochromoxidáza je detekován barevnou reakcí N,N-dimethyl-1,4-fenylendiaminu s α-naftolem za vzniku indolofenolové modři.

2 minuty

Gramnegativní bakterie

pozitivní
negativní

Průkaz glykozidáz

Princip metody
K průkazu se používají tekuté půdy obsahující testovaný cukr a indikátor pH (bromthymolová modř, fenolová červeně). Zkvašuje-li testovaná kultura daný cukr, dojde ke změně barvy média z původní zelené, resp. červené, na žlutou. Přidání plynovky umožňuje současně sledovat tvorbu plynu.

Escherichia coli

L = laktóza
G = glukóza

Salmonella spp.

negativní
pozitivní

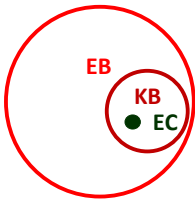
Stanovení *Enterobacteriaceae* v syrovém mléce



<https://web.microsoftstream.com/video/cfe49bd6-94ce-4ac3-bf1e-cc992891188c?list=studio>

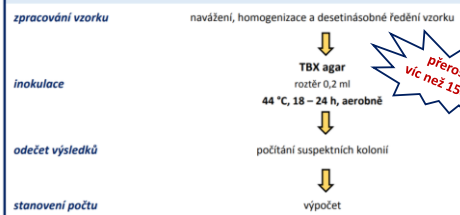
Stanovení počtu *Escherichia coli*

Escherichia coli



- gramnegativní
- nesporující tyčinky
- oxidáza negativní
- fermentace glukózy s tvorbou kyseliny a plynu
- fermentace laktózy s tvorbou kyseliny a plynu
- indol pozitivní
- β -D-glukuronidáza pozitivní

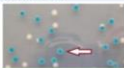
Stanovení počtu β -glukuronidázopozitivních *Escherichia coli*



TBX – agar s tryptonem, žlučovými solemi a glukuronidem

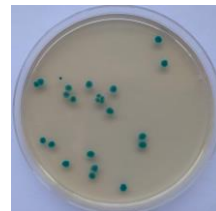
Typické kolonie β -glukuronidázopozitivních *Escherichia coli*

TBX agar: kolonie modré nebo modrozelené barvy, velikost 0,5 – 2 mm.



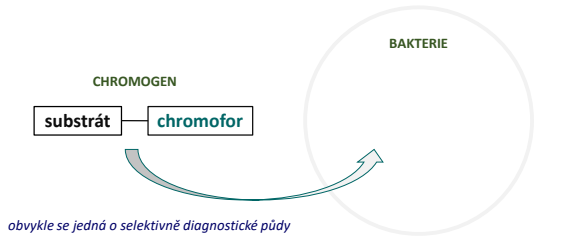
Pozn. Při použití chromogenního TBX agaru není konfirmace normou vyžadována. Pro potvrzení výsledků lze použít test na průkaz indolu (*E. coli* je indol pozitivní). Dále, touto metodou nezachytíme kmeny *E. coli*, které nerostou při 44 °C a ty, které jsou β -glukuronidasa negativní (například *E. coli* O157).

Escherichia coli

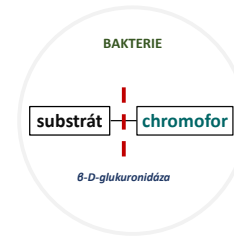


TBX agar

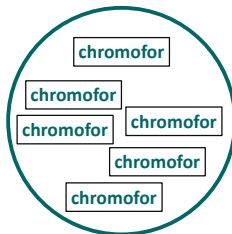
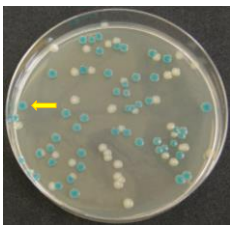
Princip chromogenních médií



Princip chromogenních médií



Princip chromogenních médií



COLI test

Tvorba indolu

Princip metody

Přítomnost indolu se indikuje přidávkem Kováčova činidla (p-dimethylaminobenzaldehydu). V pozitivním případě vzniká sytý růžový až červený reakční produkt.

Escherichia coli

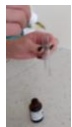
Aktivita β -D-glukuronidázy

Princip metody

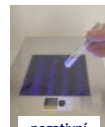
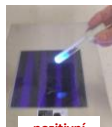
Enzym β -D-glukuronidasa štěpí 4-methylumbelliferyl- β -D-glukuronid, vzniklý 4-methylumbelliferon vykazuje pod UV modrou fluorescence.

COLI test

Tvorba indolu



Aktivita β -D-glukuronidázy



Escherichia coli je v obou znacích pozitivní

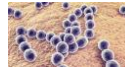
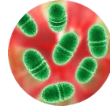
Stanovení počtu *E. coli* v majonézovém salátu



<https://web.microsoftstream.com/video/fcc8e884-821d-431f-9226-b211028bbb80?list=studio>

Stanovení počtu enterokoků

Enterococcus spp.

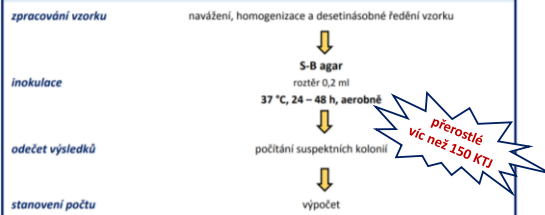


- grampozitivní koky (často diplokoky, krátké řetízky)
- kataláza negativní
- vysoce odolné (6,5 % NaCl, pH 9,6 a 40 % žluči)
- termorezistentní 60 °C po dobu 30 minut
- hydrolyza eskulinu

- indikátory fekální kontaminace
- *Enterococcus faecalis*, *E. faecium* a další druhy

Zdroje obrázků: <https://euroclean.cz/problemy-vody/bakterie/>;
<http://www.zdravie.sk/clanok/57496/crenie-enterokoky-ale-choroby-mozu-sposobit>

Stanovení počtu enterokoků



S-B – Slanetz-Bartley agar

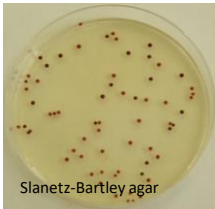
Typické kolonie enterokoků

S-B agar: kolonie červené, červenohnědé až kaštanové barvy, pravidelné, okrouhlé, velikost 0,5 – 2 mm, může se objevit kovový lesk.

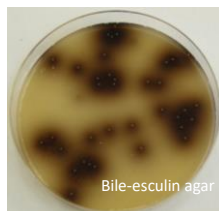


Pozn. Pro případnou konfirmaci enterokoků lze využít růst na žluč-eskulinovém agaru (růst v přítomnosti 40 % žluče, hydrolyza eskulinu).

Enterococcus spp.



Slanetz-Bartley agár



Bile-esculin agar

Stanovení počtu enterokoků v sušeném mléce



<https://web.microsoftstream.com/video/f0e916f3-dbc4-4345-9f08-c57612f89da7?list=studio>

Děkuji za pozornost