

PROTOKOL č.2

Metody sterilní práce

Očkování a uchovávání mikroorganismů

Cíl práce:

Co je cílem přeočkování bakteriálního kmene? Jaké jsou metody očkování mikroorganismů, které pomůcky můžeme pro něj použít a co je cílem izolace mikroorganismů?

Materiál a použité kmeny:

Bakteriologické plotny s MPA agarem (meat-peptone broth)
Zkumavky se šikmým agarem MPA
Zkumavky s tekutým médiem MPB
Očkovací kličky, očkovací jehly
Stojánky
Termostat
Kahan

Příklady bakteriálních kmenů:

Escherichia coli CCM 3954
Pseudomonas putida
Serratia marcescens CCM 303
Kocuria rosea CCM 839
Micrococcus luteus CCM 169
Bacillus cereus CCM 2010
Staphylococcus aureus SA 812
Saccharomyces cerevisiae

Teoretická část:

Zásady přípravy materiálu pro očkování a kultivaci mikroorganismů

- Dodržování všech podmínek skladování a kultivace organismů
- Nutno pracovat se sterilními medii a se sterilními pomůckami
- Důležité je naplánování pokusů a práce vzhledem ke genetickým změnám v živých organismech.
- Opakování postupů
- Kontrolní pokusy – pozitivní a negativní kontrola

a) očkování

Jako **kultury** označujeme mikroorganismy kultivované v laboratorních podmínkách na živných médiích. Pracujeme-li s kulturou jednoho druhu, považujeme ji za kulturu čistou. Kultury smíšené jsou kultury několika druhů (kupříkladu izoláty z přirozeného prostředí, které je potřeba kultivací pro identifikaci oddělit = izolovat). Jako kultury technické se označují kultury používané pro výzkumné nebo provozní účely (v čistírnách odpadních vod, bakteriální filtry, bioreaktory...).

Kultury přenášíme (= přeočkováváme) na čerstvé medium z tekutého nebo z tuhého media za různými účely – například přenesení do čerstvějšího media, oživení, očkování na diagnostickou půdu, izolace kmene, očkování pro odečet fyziologických a morfologických

vlastností kultury.... Charakter růstu a podmínky následné kultivace jednotlivých kmenů se v laboratoři vždy odlišují od růstu a prospívání daného kmene v přirozeném prostředí (nutno porovnat I) růst v přirozeném prostředí, který doprovází kompetence o živiny, adaptace a neustálý boj s antibiotiky a metabolity současně přítomných dalších kmenů s II) růstem za optimálních podmínek v laboratoři – často v čisté kultuře na velmi bohatém mediu!). Rovněž je potřeba mít na paměti, že mnoho (většina) bakteriálních druhů je nekultivovatelných.

Izolace bakteriálního kmene

- rozumí se jí získání čisté kultury. Mohou k ní být využívána buďto selektivní media, na kterých nám vyrostou pouze žádaný bakteriální taxon (jednotka – čeleď, druh, rod - v klasifikaci mikroorganismů). Pokud chceme však izolovat na neselektivním (univerzálním) mediu, využíváme **metodu křížového roztěru**, kdy sice můžeme na první misce pracovat se smíšenou kulturou, ale podle vzhledu vyrostlých kolonií jsme schopni tyto různé morfologické typy kolonií rozpoznat, odizolovat a následným dalším křížovým roztěrem (odebráním buněk z dané kolonie) po narostení kmene „čistotu růstu“ potvrdit (teoreticky a při aseptické práci by měl na další misce růst pouze tento kmen, se kterým jsme se rozhodli pracovat).

- ❖ **Křížový roztěr** = postupné zředování původní kultury tak, aby na „konci růstu“ vyrůstaly na tuhém mediu jednotlivé kolonie bakterií = klony jedné buňky; klička s přenášenou kulturou se po každém kroku očkování žihá v plameni, tím na ní usmrtíme buňky a po agaru roztíráme pouze buňky setřené z následující oblasti křížového roztěru, roztíráme tedy stále menší a menší množství buněk.
- ❖ V místě tzv. **hádku** – poslední oblast křížového roztěru - již vyrůstají jednotlivé kolonie = jednotlivé kmeny, u kterých hodnotíme charakteristický profil, tvar, barvu, okraje (viz 2_Morfologie_bakt_kolonii.doc)

• Na jaká media kultury očkujeme?

Ve cvičeních pracujeme s **čistými kulturami** získanými z České sbírky mikroorganismů (<http://sci.muni.cz/ccm/>), dle jejího katalogu kultur tedy dodržujeme podmínky kultivace (vždy je v něm uvedeno doporučené medium definovaného složení, teplota a podmínky kultivace). Pokud však izolujeme **kmeny z prostředí**, snažíme se dodržet podmínky, které jsou pro ně v daném prostředí přirozené (koncentrace soli, živiny, teplota – př: u izolace oceánských mikroorganismů dodržujeme přibližné koncentrace solí, živin, většinou nižší kultivační teploty než kupříkladu při záchytu patogenních mikrobů).

Zvažujeme-li aspekty růstu kultury (pracujeme s čistou či smíšenou kulturou?), zvažujeme limit živin, kyslíku, typ kultivace (stacionární, kontinuální), homogenitu růstu; odlišně bude probíhat růst v tekutém mediu a na agaru (jiná distribuce živin, kyslíku..). Charakter růstu je samozřejmě *in vitro* odlišný než v přirozeném prostředí.

b) kultivace

• Jaké typy kultivace rozeznáváme?

Do tekutého media naočkované kultury můžeme kultivovat

1) **kontinuálně** (takto se kupříkladu pracuje ve větších objemech media s průmyslovými kmeny). **Příkladem je chemostat**. Růstová rychlost kultury je v něm řízena koncentrací limitující živiny, která je přítokem nového media dodávána. Naočkujeme-li medium a toto již není dále dodáváno, jedná se o kultivaci statickou.

2) **staticky**; v tekutém mediu může být pro aerobní druhy s výhodou využita statická kultivace **submerzní = třepaná**, nebo **vzdušněná**. Těmito procesy se promícháváním zvětšuje plocha fázového rozhraní a může probíhat efektivnější výměna plynů (příkladem jsou provzdušňovací rošty v bioreaktorech).

• Jak budeme kultivovat naočkované kultury ve cvičení?

Bude se jednat o **statickou aerobní kultivaci na agarech (bakteriologické plotny a šikmé agary) a v tekutém mediu ve zkumavkách**. Kmeny budou kultivovány na doporučených mediích v termostatu při optimální teplotě růstu dané kultury.

- kultury na Petriho miskách kultivujeme dnem vzhůru vzhledem k tvorbě kondenzní vody – aby nezkapávala. Medium tak také pomaleji vysychá
- délka kultivace je závislá na typu experimentu a na očkovaném bakteriálním kmeni

• Jaká jsou rozmezí teplot kultivace?

Podle optimální teploty kultivace rozlišujeme tři základní skupiny mikroorganismů:

psychrofilní mikroorganismy – optimum růstu méně než 20 °C (př: oceány, jeskyně...; mohou růst i v chladničce! – např. pseudomonády, aeromonády, listerie)

mezofilní mikroorganismy – optimum růstu se pohybuje mezi 20 - 40 °C

- většina bakteriálních druhů; parazitické mikroorganismy
- rod *Pseudomonas* je příkladem této skupiny, ale některé její druhy mohou růst i při chladničkových teplotách (4°C)!

termofilní – optimum cca nad 55 °C; extrémní termofili rostou kolem 100°C

• Jak můžeme mikroorganismy rozdělit podle jejich vztahu ke kyslíku?

Bakteriální druhy kultivované za přístupu vzduchu označujeme jako **aerobní**. Aerobní kultivace je zajištěna nátěrem a kultivací buněk na agaru na Petriho misce či ve zkumavce na agaru šikmém nebo v nízké vrstvě tekutého media – okolo 5ml; kultivujeme v termostatu. Větší objemy tekutého media by již musely být syceny kyslíkem (aerace, submerzní kultivace)!

Některé střevní bakterie jsou příkladem **fakultativních anaerobů**, kterým nevadí anaerobní prostředí (regulace anaerobních drah), ale v prostředí s kyslíkem přepínají na energeticky výhodnější aerobní metabolismus. V tekutém mediu se projevují růstem v celém jeho sloupci (zákal media).

Anaerobní organismus se vyskytuje v prostředí s nulovou či nízkou koncentrací kyslíku, kyslík působí jako jed či inhibitor růstu. Stav anaerobiózy jako první definoval LOUIS PASTEUR (1861), který zavedl do mikrobiologie termíny pro aerobní a anaerobní organismus. V závislosti na **stupni tolerance vůči molekulárnímu kyslíku**, lze **anaerobní mikroorganismy** dělit na: **striktně anaerobní mikroorganismy** (vyžadují úplnou absenci kyslíku, koncentrace více než 0,5 % na ně působí toxicky a odumírají); **obligátně anaerobní mikroorganismy** (neutilizují kyslík jako konečný akceptor elektronů a mají schopnost tolerance kyslíku v koncentracích maximálně do 2 – 3 %); **aerotolerantní mikroorganismy** (nevyužívají kyslík jako konečný akceptor elektronů (!!!), ale rostou v jeho nízkých koncentracích = mají schopnost tolerance kyslíku). Konečně **mikroaerofilní mikroorganismy** vyžadují určité nízké procento kyslíku; mají schopnost jeho utilizace jakožto konečného akceptoru elektronů, ale nerostou za přítomnosti vzdušného kyslíku za normálního tlaku.

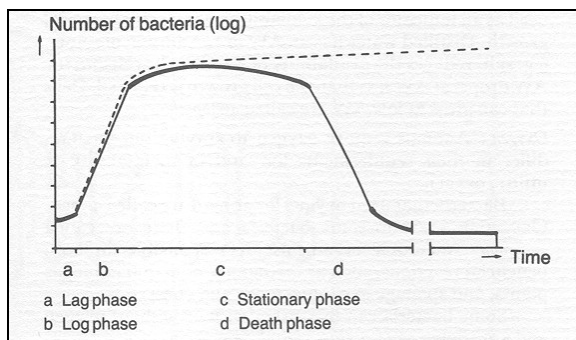
Prakticky se anaerobní nebo mikroaerofilní kultivace provádí vpichem do agaru nebo zaočkováním do vysoké vrstvy kapalin. Je nutno snížit oxidoredukční potenciál přidáním redukujících látek (kyselina askorbová, thioglykolát, thiosíran..). Pokud anaerobní prostředí pro kultivaci vytváříme, využíváme tzv. anaerostatu (v nádobě je sáček obsahující směs chemikálií (železný prášek, kyseliny vinná, citronová..), která po ovlhčení uvolňuje vodík, který v přítomnosti katalyzátoru (Pt, Pd) reaguje s přítomným vzdušným kyslíkem za jeho odčerpání a vzniku molekul vody).

- Když bychom chtěli vyjádřit růst námi naočkovaných buněk při **statické kultivaci na Petriho misce**, jak bude tzv **růstová křivka** vypadat? (neplatí pro kontinuální kultivaci!!)

- **jedná se o grafické vyjádření závislosti počtu buněk na délce statické kultivace**

Průběh růstové křivky:

- **Lag fáze** – je část křivky, kdy probíhá přizpůsobování a růst samotné buňky, aktivace vhodných enzymů, organizace metabolismu. V činnosti jsou adaptivní enzymy, v buňce je přítomno mnoho RNA (zvýšená syntéza enzymů), řada ještě neadaptovaných buněk ale odumírá – v této fázi jsou velmi citlivé
Při přeočkování do čerstvého media určitou dobu trvá, než začne biomasa růst – to je rozdíl mezi růstem a množením; při přeočkování buněk ze stejného media do čerstvého se stejným složením tato lag fáze chybí – buňky jsou již metabolicky adaptované.



obr: růstová křivka

- **Fáze fyziologického mládí** – bod mezi lag a log fází; jsou nasyntetizovány již všechny potřebné enzymy a kultura vykazuje maximální rychlost růstu. Ta je závislá jen na frekvenci transkripce informace pro enzymy, roste objem buňky.
- **Log fáze** – logaritmická – exponenciální, intenzivní růst buňky a metabolismus, trvá, dokud není koncentrace živin limitující, všechny buňky se dělí konstantní rychlostí. Proto se právě z této části křivky využívají parametry pro srovnávání! Buňka se dá z této fáze nejlépe charakterizovat, protože je adaptovaná, má již vše, co potřebuje a dělí se konstantní rychlostí. Charakter růstu se odečítá vždy v log fázi!
(měří se suchá a mokrá hmotnost buněk, nárůst metabolitu, N, C, zákal, stanovení váhy DNA, RNA)
- **Fáze zpomaleného růstu** – snížení intenzity metabolismu, hromadění metabolitů
- **Fáze stacionární** – snížení rychlosti množení, počet nově vzniklých buněk se vyrovnává s počtem odumřelých, dochází k vyčerpání živin, délka života závisí na citlivosti k hladovění, mohou vznikat endospory
- **Fáze odumírání** – medium je spotřebováno a buňka odbourává své zásobní látky, čelí kyselosti prostředí (ze svých zplodin), nestačí reparační systémy

Dvojitá růstová křivka – objevuje se při postupném využívání dvou substrátů, tzv. „diauxie“

- | |
|--|
| <ul style="list-style-type: none">• <u>Když bychom chtěli naočkované kmeny v budoucnu použít, jak je můžeme uchovávat?</u> |
|--|

Pro uchovávání bakterií je nutné zajištění životaschopnosti, často vznikají fenotypové varianty a mutanty. Typ uchovávání volíme podle jeho zamýšlené délky.

- na Petriho misce při 4 °C (krátkodobě, nutno přeočkovávat – laktokoky například po týdnu, bacily po 2-3 měsících)
- ve zkumavce v agaru ve vpichu - měsíce
- na **šikmém agaru** v lednici při +4 °C – týdny, nebo v místnosti, termostatu při 25 °C - dny
- na porózních materiálech - želatinových discích, kuličkách
- pod sterilním minerálním olejem (houby, bakterie)
- v destilované vodě
- **lyofilizované** – lyofilizace = vymražení vody ve vakuu sublimací vody, lyofilizace je méně šetrná než kryoprezervace, nelze lyofilizovat všechny bakterie, houby například vůbec, snížení viability, kratší uchovávání ve srovnání s kryoprezervací, ale nese tu výhodu, že lyofilizované kultury jsou připravené ihned k odeslání, lépe se s nimi manipuluje
- laboratoř -20 °C až -30 °C – taková teplota ale škodí buňce
- zmrazené na - 70 °C po malých objemech v **hlubokomrazicím boxu** (měsíce, roky)
- boxy s pevným CO₂ – **suchý led (- 78 °C)**
- kryogenní mrazáky (- 150 °C)
- **kryoprezervace** (sensu stricto pod - 139 °C) – reverzibilní anabióza, neprobíhají biochemické reakce; zamražení kultur v tekutém dusíku (až - 196°C) nebo v jiných plynech (He, Cr, H), uchovávání neomezeně dlouho; postupným zmrazováním (kontrolovaná rychlost zamražení: ideál 1 °C/min pro snížení osmotické disbalance a proti nevhodnému formování krystalů v buňce; některé odolné bakterie snesou rychlejší nebo okamžité zamražení – dle rigidity buňky), vhodné kryoprotektanty v mediu – dimethylsulfoxid, glycerol...
(tato metoda se používá od r.1965)

Pravidla odběru vzorku před jeho kultivací - mikrobiologické rozbory

VZORKOVÁNÍ

Nádoby na vzorky musí být z průhledného a nezabarveného materiálu (sklo, polyetylén nebo polypropylen). Aby se předešlo neúmyslné kontaminaci vzorku, musí osoba odebírající vzorek použít aseptický postup, aby se zachovala sterilita nádob na vzorky.

STERILIZACE NÁDOB NA VZORKY

Nádoby na vzorky musí:

- být sterilizovány v autoklávu při 121 °C po dobu nejméně 15 minut nebo
- projít suchou sterilizací při 160 °C až 170 °C po dobu nejméně 1 hodiny nebo
- být ozářené nádoby na vzorky odebrané přímo od výrobce.

USKLADNĚNÍ A DOPRAVA VZORKŮ PŘED ROZBOREM

Vzorky je nutno chránit během celé přepravy před vystavením světlu, zejména přímému slunečnímu záření. Vzorek je třeba až do příjezdu do laboratoře uchovávat v chladicím boxu nebo chladničce (podle klimatických podmínek) při teplotě okolo 4 °C. Potrvá-li přeprava do laboratoře pravděpodobně déle než 4 hodiny, je nutná přeprava v chladničce. Doba mezi odběrem vzorku a provedením rozboru musí být co nejkratší. Doporučuje se provést rozbor vzorku tentýž pracovní den. Není-li to z praktických důvodů

možné, musí být vzorky zpracovány nejpozději do 24 hodin. Mezitím musí být uchovány v temnu při teplotě $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$. Dojde-li k prodlení mezi odběrem vzorků a provedením rozboru, upraví se naměřená koncentrace bakterií podle známých vzorců rozkladu T-90, aby byla stanovena koncentrace bakterií v okamžiku odběru.

Postup:

Při kultivaci mikroorganismů je potřeba přenést do sterilní živné půdy živé buňky (= **inokulum**) žádaného kmene (= **očkování**). Do kultury ani půdy nesmí vniknout cizí mikroorganismy ze vzduchu, z pomůcek, vlastní flory (= **aseptická práce**). Proto pracujeme v zavřené místnosti, omytými rukama a na desinfikovaném stole, blízko plamene kahanu, co nejrychleji. Hrdla nádob i zátek před a po práci ožehneme plamenem. **Zátky nikdy nepokládáme**, ale držíme mezi malíčkem a prsteníčkem. Nádoby s kulturou necháváme otevřené jen po nezbytně dlouhou dobu a s hrdlem poblíž plamene.

1. **Všechny zkumavky i Petriho misky popíšeme fixou (druh, kmen, datum a označení seminární skupiny, své iniciály).**
2. **Očkování kultur z tuhých medií**
 - bakteriologickou kličkou z Petriho misky/ze šikmého agaru na tuhé či do tekutého media, při očkování nemluvíme, pracujeme na stolech otřených Incidurem.
 - a) ze šikmého agaru na šikmý agar
 - do levé ruky uchopíme obě zkumavky se šikmým agarem, malíčkem pravé ruky vytáhneme zátku ze zkumavky s kulturou
 - hrdlo zkumavky ožihneme
 - sterilní (ožihnutou a vychladlou) kličku vsuneme do zkumavky s kulturou, nabereme nárůst do očka kličky
 - kličku vytáhneme, ožihneme hrdlo zkumavky i zátku a zkumavku zazátkujeme
 - malíčkem pravé ruky vytáhneme zátku ze sterilní zkumavky s čistým šikmým agarem
 - ožihneme hrdlo zkumavky
 - kličkou naočkujeme šikmý agar hádkem
 - ožihneme **hrdlo zkumavky i zátku** a uzavřeme zkumavku
 - vyžiháme kličku
 - b) ze šikmého agaru na Petriho misku
 - ze zkumavky s kulturou odebereme nárůst na bakteriologickou kličku výše uvedeným postupem
 - mírně odklopíme víčko Petriho misky a nanese kulturu na agar cca 1 cm od stěny, nanesení kultury do plošky 0,5 cm
 - přiklopíme víčko a vyžiháme kličku
 - c) do tekutého media
 - kulturu odebereme z tuhého media kličkou (z Petriho misek odebíráme jednu kolonii)
 - zkumavku s tekutým mediem uchopíme do levé ruky, malíčkem pravé ruky vytáhneme zátku
 - ožihneme hrdlo zkumavky

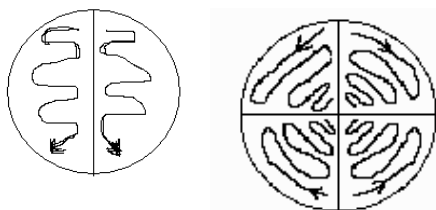
- odebraný vzorek rozetřeme po stěně zkumavky nad hladinou media a postupně buňky převádíme do objemu media
- ožihneme **hrdlo zkumavky i zátku** a uzavřeme
- vyžiháme kličku

3. Očkování kultur z tekutých medií

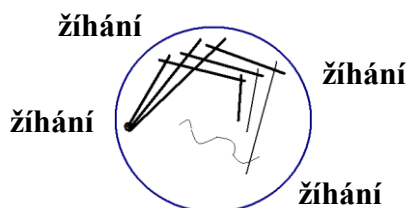
- většinou sterilními pipetami známého objemu do tekutého nebo na tuhé medium
- a) do tekutého media
 - uchopíme sterilní pipetu do pravé ruky, malíkem vytáhneme zátku z Erlenmyerovy baňky nebo zkumavky
 - hrdlo baňky/zkumavky ožihneme a pipetou s nástavcem odebereme objem kultury
 - ožihneme zátku a uzavřeme baňku
 - malíkem pravé ruky vytáhneme zátku z baňky se sterilním tekutým mediem a ožihneme hrdlo
 - vypustíme kulturu z pipety do sterilního media, ožihneme zátku i hrdlo a baňku/zkumavku uzavřeme
 - kulturu protřepeme
- b) na Petriho misku
 - tento postup se používá například při zjištění počtu bakteriálních buněk metodou ředění
 - sterilně odebereme pipetou kulturu
 - daný objem vypustíme do středu Petriho misky s agarem
 - sterilní hokejkou (má širokou plochu pro roztírání po Petriho misce, zaručí se tak rozetření všech buněk od sebe, každá kolonie je pak klon jedné buňky) kulturu rozetřeme po povrchu misky, ihned přiklopíme víčko misky

Každý očkuje:

- 1 kmen do tekutého media
- 1 – 2 kmeny na šikmé agary
- dva nebo čtyři různé kmeny na 1 misku do 2 nebo 4 „hádků“



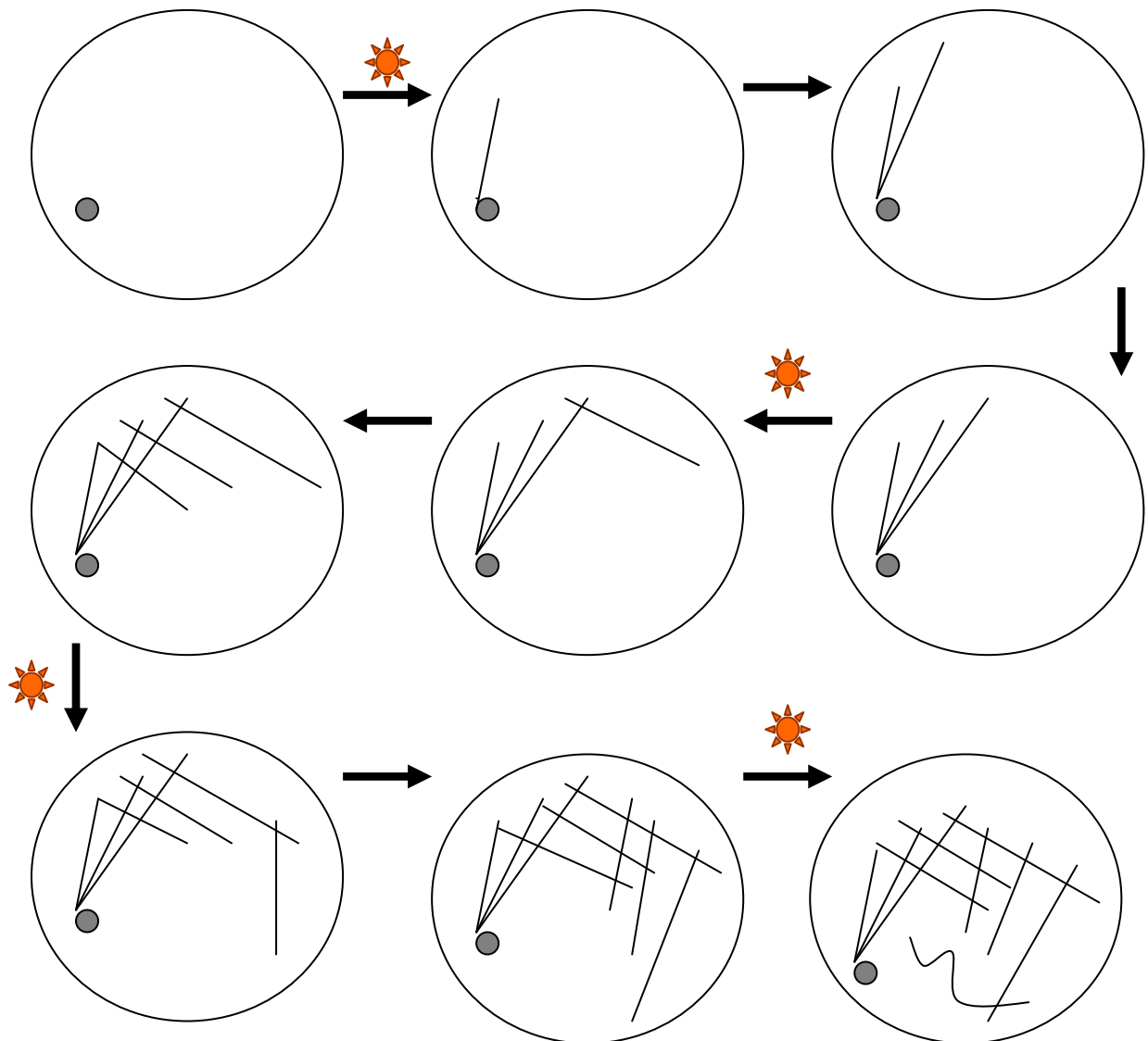
- 1 kmen na Petriho misku křížovým roztěrem



- směs dvou kmenů na Petriho misku křížovým roztěrem – cílem je izolace 2 typů kolonií (pro budoucí pozorování je výhodné naočkovat směs dvou různě pigmentovaných kmenů)

Nákres postupu křížového roztěru na Petriho misce:

bod na misce = první nanesení kultury kličkou; čáry = tahy kličkou; plamínek = žíhání kličky



Další metody křížového roztěru – viz

3_metody_krizoveho_rozteru_tzn_izolace_kolonii.doc

Závěr:

Prokázala se sterilita práce při přípravě medií v minulém cvičení? Do jakých typů medií a jakým způsobem byly kmeny očkovány? Co je účelem křížového roztěru? Při jaké teplotě budou kmeny kultivovány? Jak odvodíme správné podmínky kultivace? Závisejí morfologie kolonií na podmínkách kultivace?

Vyhodnocení růstu kultur v příštím cvičení.