

Ukázky: CCM katalog
Anaerostat
+ generátor anaerobní atmosféry
Plastové klíčky
Termostat se třepačkou

Očkování a kultivace

Bakteriální druh

- = jasně vymezená skupina navzájem příbuzných kmenů, zahrnujících typový kmen
- = sdílí 70% a vyšší DNA-DNA homologii komplementárních párů bazí (DNA reasociace)
- = vykazuje, až na výjimky, shodné fenotypové znaky a současně má některé odlišné znaky od jiných skupin

Kultura = MO kultivované za laboratorních podmínek

Přeočkování = přenos inokula do čerstvého média za účelem pomnožení, izolace, oživení, přečištění, ...

Izolace – pomocí křížového roztěru, selektivních médií

Bakteriální kolonie = klon jedné buňky

Kultivace – různé podmínky (izolát, sbírkový či průmyslový kmen)

- Statická x kontinuální (ubývání živin, přibývání metabolitů,..) x submerzní=třepaná, vzdušněná
- Anaerobní



- Kultura – čistá x smíšená x technická či průmyslová
- Zisk čisté kultury → selektivní médium, křížový roztěr
- **Křížový roztěr** = postupné zředování původní kultury za účelem zisku jednotlivých kolonií
(<http://old.lf3.cuni.cz/mikrobiologie/bak/uceb/obsah/ockovani/ockovani.htm>)
- Kultivace – co nejrychlejší (zejména klinické izoláty, epidemiologie) či za účelem zisku biomasy
- odběr vzorků (sterilita x půda x vody) – záleží i na zpracování vzorku

- CFU – colony forming units = KTJ – kolonie tvořící jednotky
= životaschopná buňka schopná vytvořit kolonii

- Názvosloví – stafylokok x *Staphylococcus*
- Izolace – Proč? Jak?

- Pivovarské kvasinky

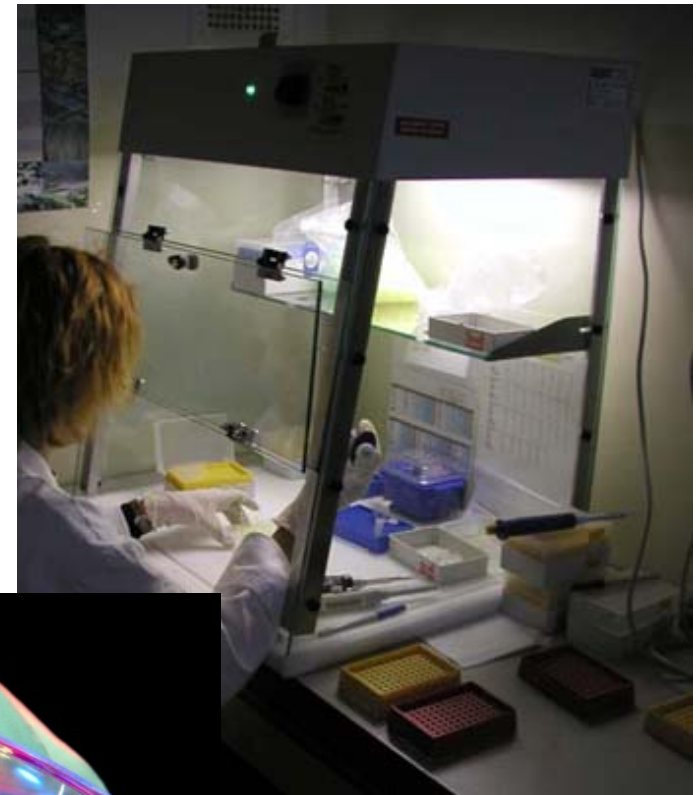


- Mlékárenské kultury



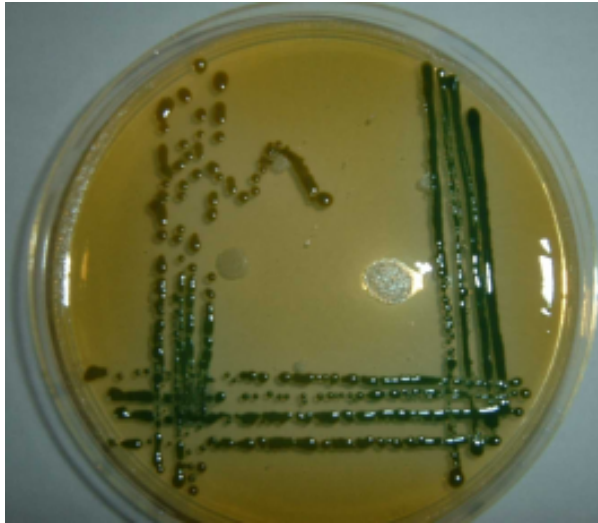
Očkování – čerstvé médium → pomnožení, přečištění, izolace, oživení kultury

• **STERILITA!!!!** Vzduch, ruce, dech, pracovní plocha

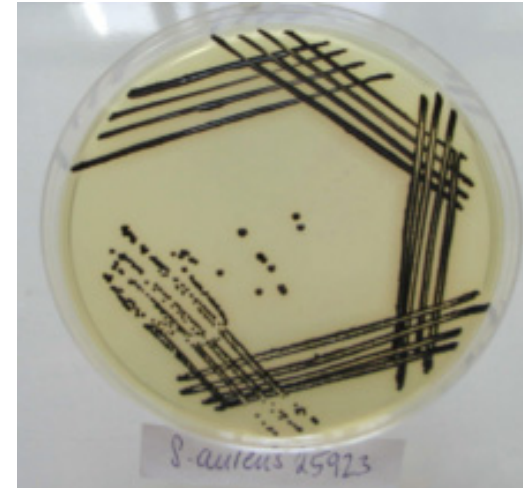


Křížový roztěr → získání jednotlivých kolonií

- *Oenococcus oeni* - laktobacily



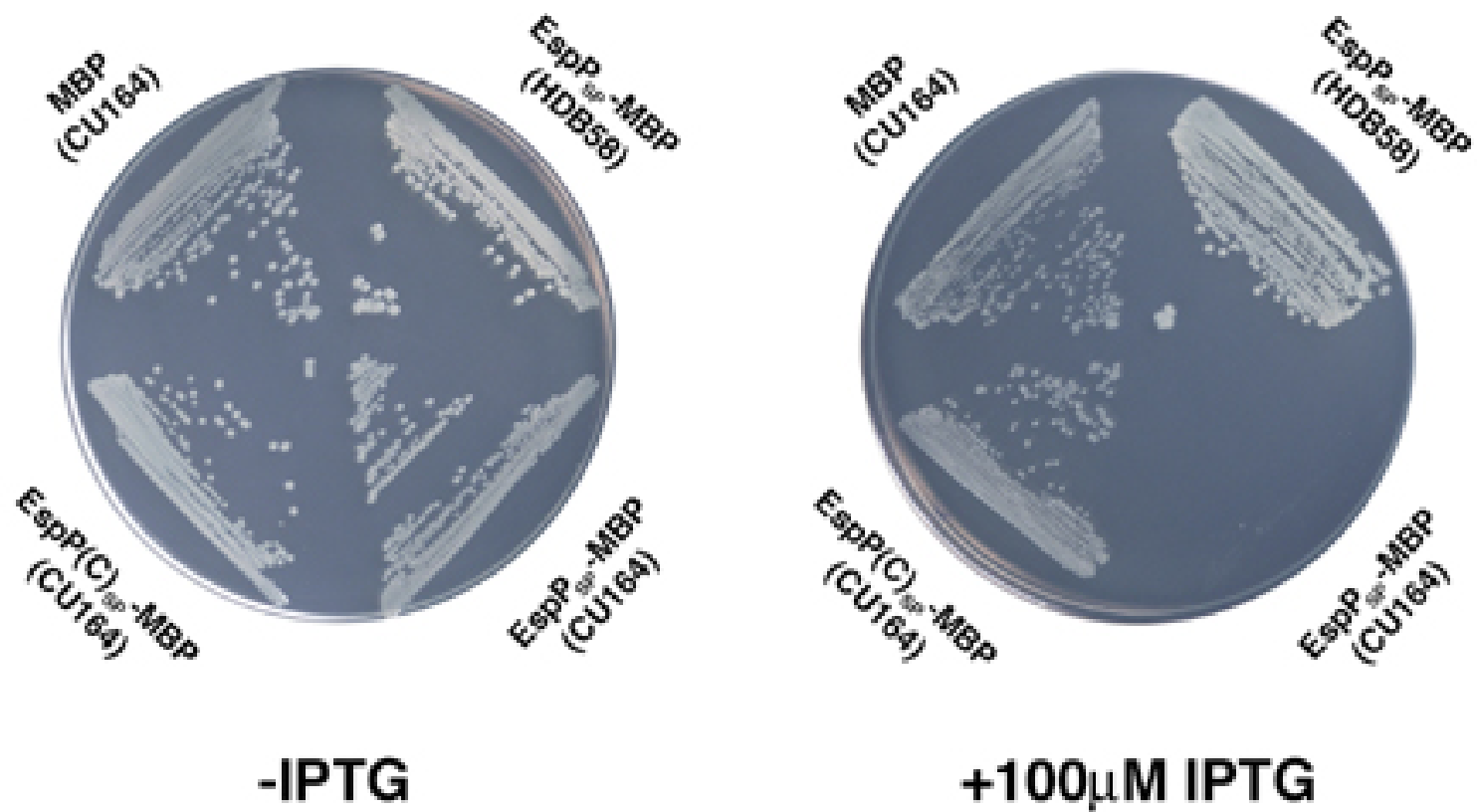
- *Staphylococcus aureus*
na agaru Baird-Parker



- „Mikrobiologický perník“ z Tvrdého 14

(aneb jak baví mikrobiologové pře Vánocemi)



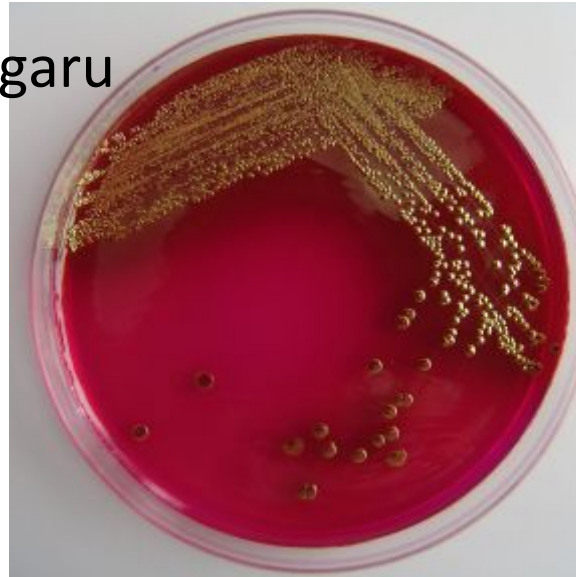


jiný příklad izolace jednotlivých kolonií

Kultivace – získání kolonií MO = klony jedné buňky

→ vzhled je závislý **na typu média, kultivaci, stáří kultury**

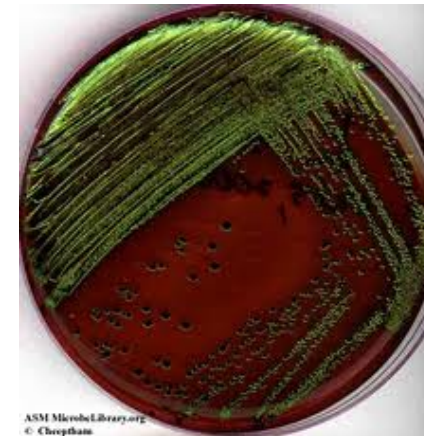
• *E. coli* na ENDO agaru



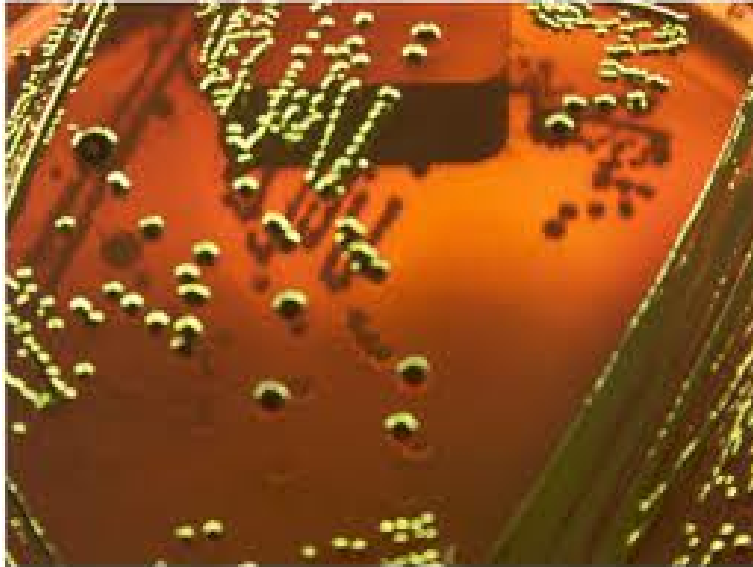
• *E. coli* na krevním agaru



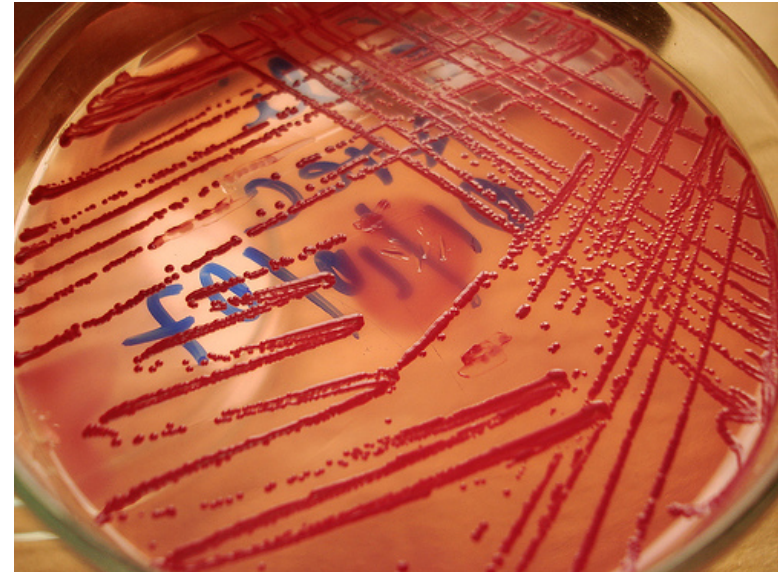
E. coli na EMB agaru



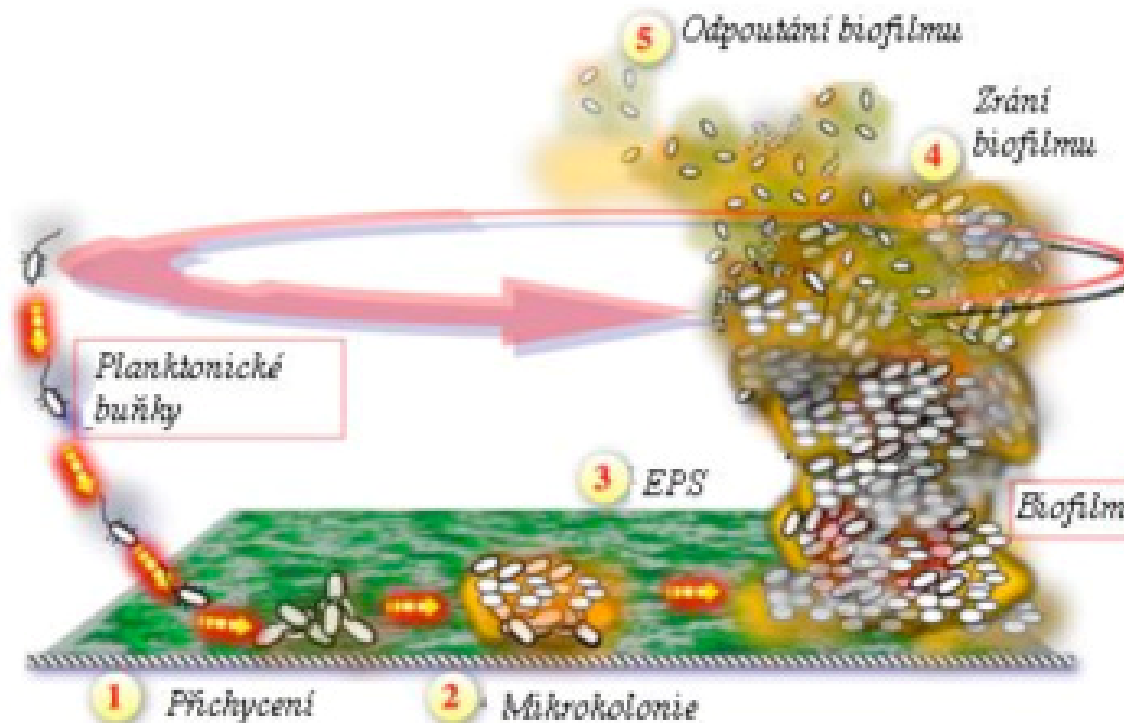
- *E.coli* na L-EMB



E. coli na McConkey agaru

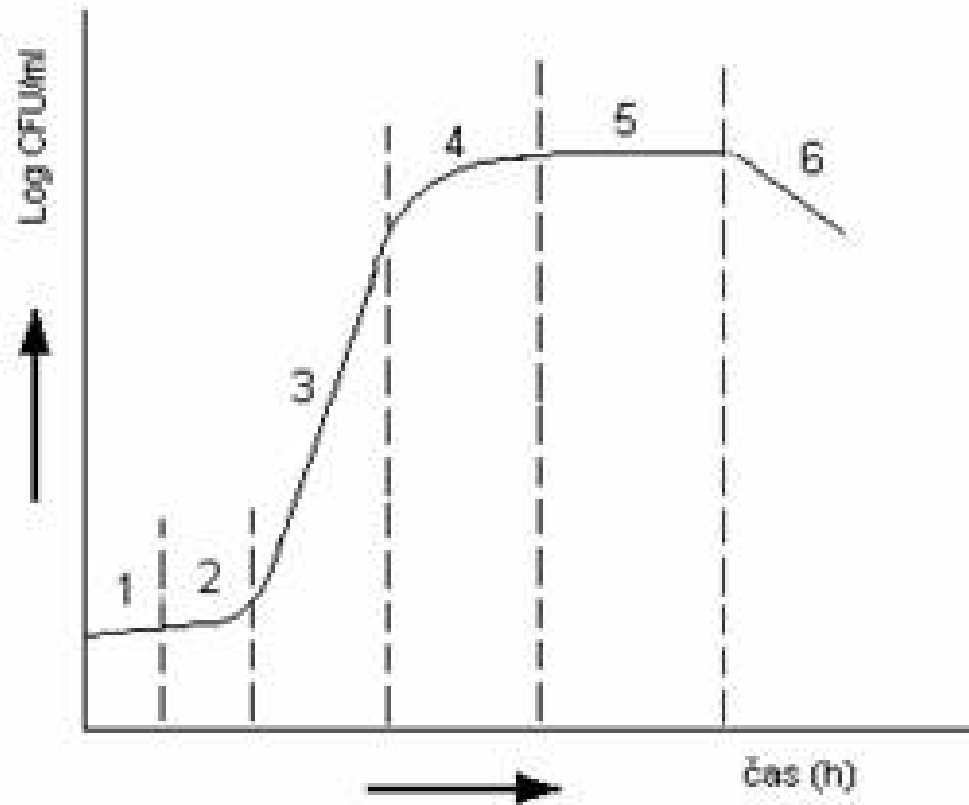


- Kultivace - je předstupěň izolace, identifikace, stanovení citlivosti na ATB, atd.
- většina vzorků je nekultivovatelných
- CCM – z katalogu; izolát – odvodit podmínky pro růst – **LIŠÍ SE** od přirozeného výskytu (charakter růstu i vzhled)



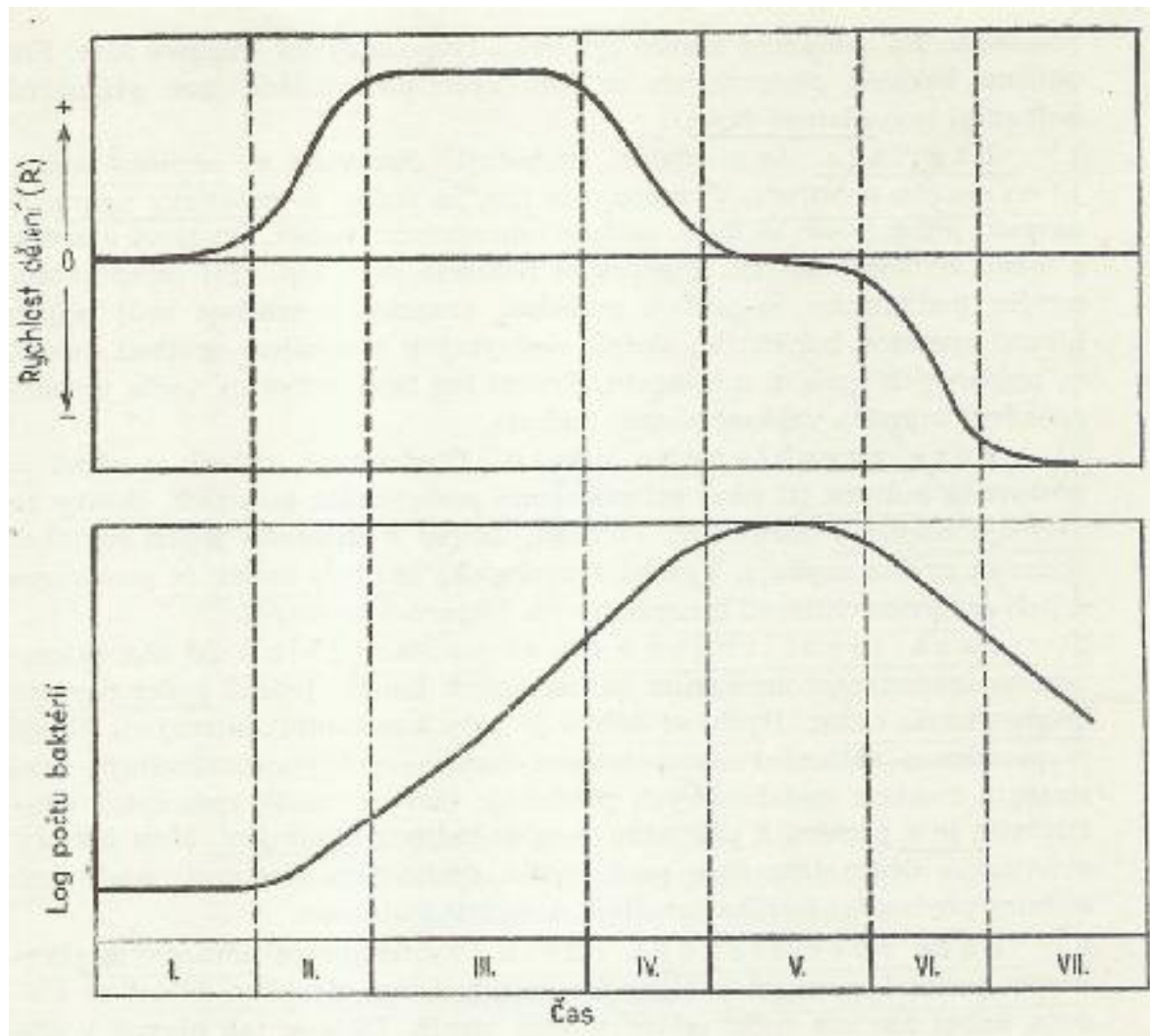
- na misce/ v médiu – buňky v různé fázi růstu
→ **růstová křivka** (i DIAUXIE)

Počet buněk/délka růstu

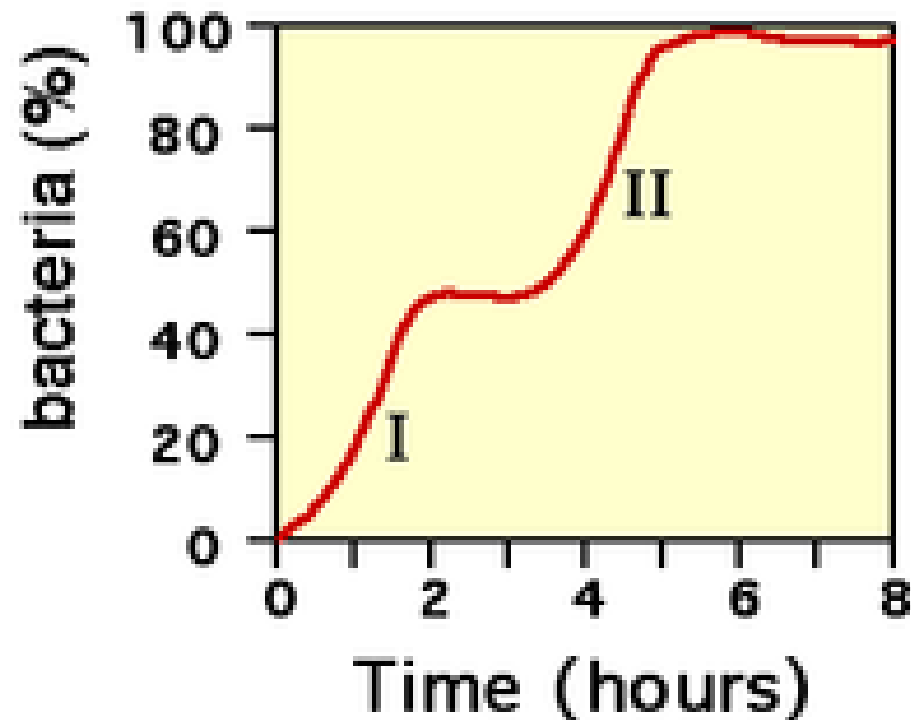


- 1 – lag fáze; 2 – fáze zrychlujícího se růstu; 3 – exponenciální fáze růstu;
4 – fáze zpomaleného růstu; 5 – stacionární fáze růstu; 6 – fáze odumírání

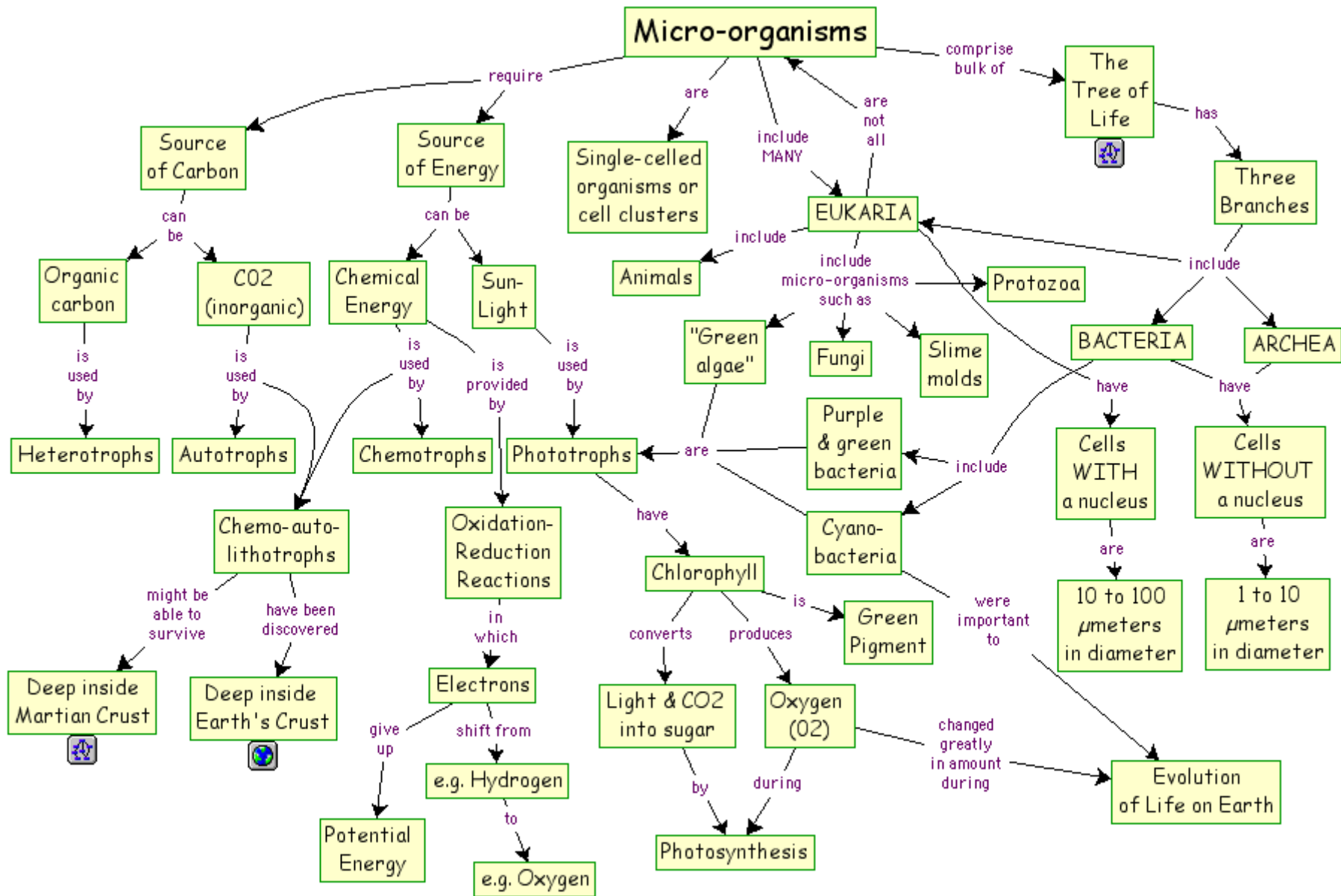
- Srovnání růstové křivky a rychlosti dělení.



- **Diauxie** – postupné využití substrátu (např. nejdříve využije jednoduchý zdroj - glukóza → první vrchol; potom teprve nastartuje metabolismus k využití složitějšího substrátu – laktóza → druhý vrchol)



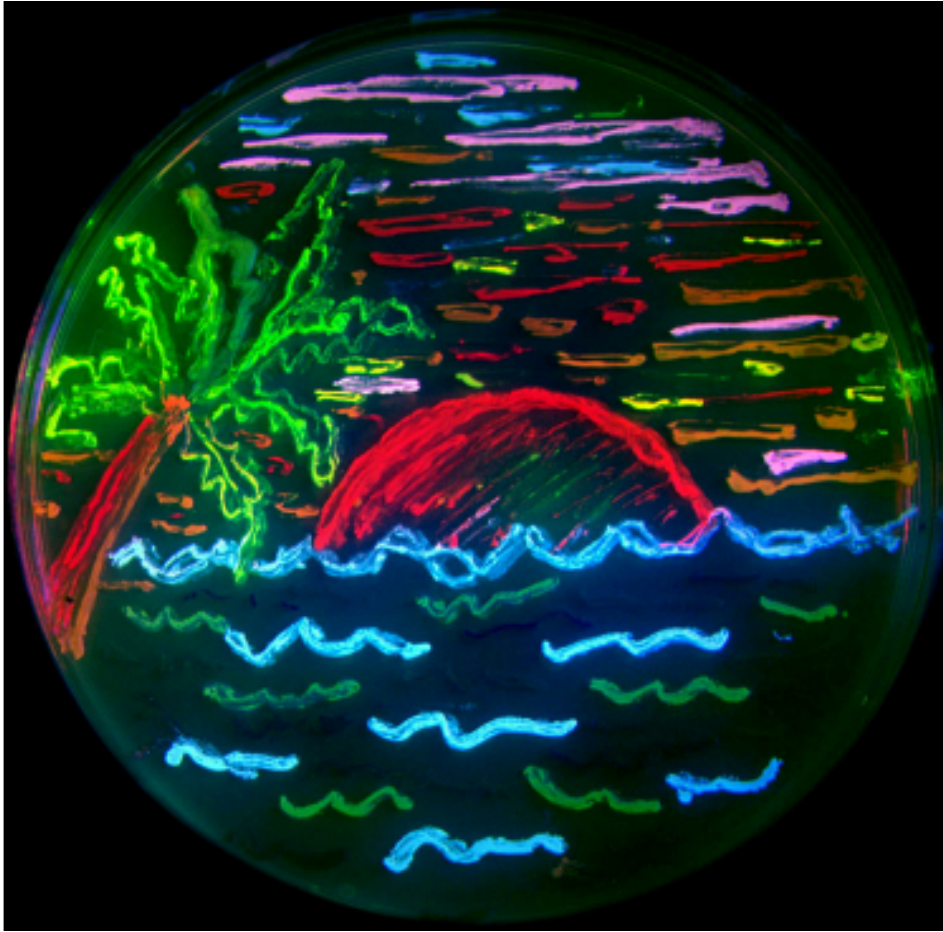
- **!!!! STRIKTNÍ X TOLERANTNÍ !!!!**
- nároky na **O₂** aerofilní
 - mikroaerofilní
 - fakultativně anaerobní
 - anaerobní (anaerostat, vrstva parafínu, svíčka,..)
 - kapnofilní
 - aerotolerantní
- nároky na **teplotu**
 - psychrofilní (pod 20°C)
 - mezofilní (20 – 40°C)
 - termofilní (nad 40°C, optimum cca 50°C, extrém až 100°C)
- nároky na **tlak** – barofilní, barotolerantní
- nároky na **redoxpotenciál, pH**
- nároky na **živiny**
 - zdroj uhlíku
 - heterotrof – organické látky
 - autotrof – CO₂
 - zdroj energie
 - fototrof – světelná energie
 - organotrof – organické látky
 - litotrof – anorganické látky



Uchování – šikmé agary, misky (4°C)– vysychání,
kondenzující voda – kultivace dnem vzhůru!

- glycerol, lyofilizáty (prášek vzniklý mražením
kultury ve vakuu), zamražené v glycerolu

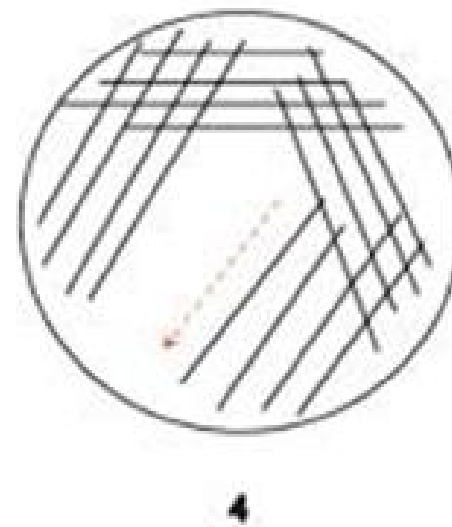
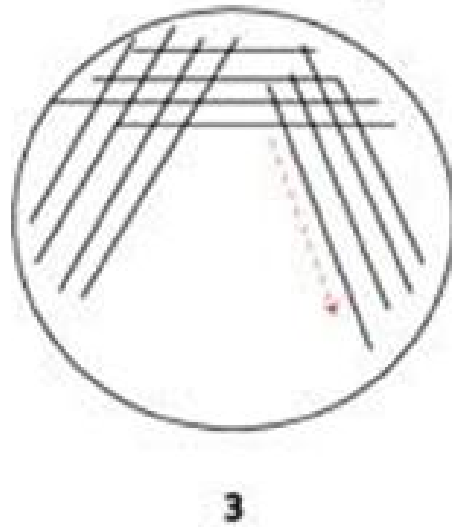
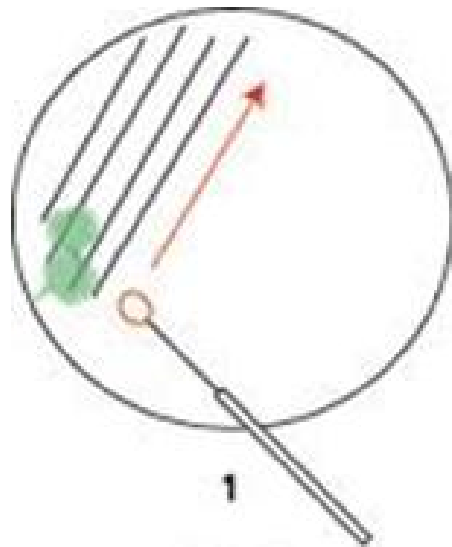




Postup

- !!Vyhodnocení z minulého cvičení (kontaminace ano x ne??)!!
- Aseptická práce!! Žíhat hrdla a kličky!!! Misky otvírat co nejméně!!!**
- POPSAT SI SKLO (datum,jméno,kultura)**
- Vyžíhat kličku a nechat zchladnout
- „hádek“ na šikmý agar odspodu
- Tekuté půdy – těsně nad okraj hladiny, na stěnu zkumavky, postupně vmíchat do média (osmotický šok)
- Petriho miska – křížový roztěr
(1x čistá + 1x směsná kultura G+ a G-)
- Petriho miska – rozdělit na čtvrtiny → „hádkem“ od okraje ke středu
- Kultivace v termostatu 30°C po dobu 24-48 hod (do příštího cvičení se nechají při pokojové teplotě)

Křížový roztěr (Streak Plate)



Kultury ve cvičení

G-

- *Escherichia coli* CCM 3954 (fakultativně anaerobní)
- *Pseudomonas putida* (aerobní)
- *Serratia marcescens* CCM 303 (fakultativně anaerobní)

G+

- *Kocuria rosea* CCM 839 (aerobní)
- *Micrococcus luteus* CCM 169 (aerobní)
- *Bacillus cereus* CCM 2010 (fakultativně anaerobní)
- *Staphylococcus aureus* SA 812 (fakultativně anaerobní)

kvasinky

- *Saccharomyces cerevisiae* (fakultativně anaerobní)