

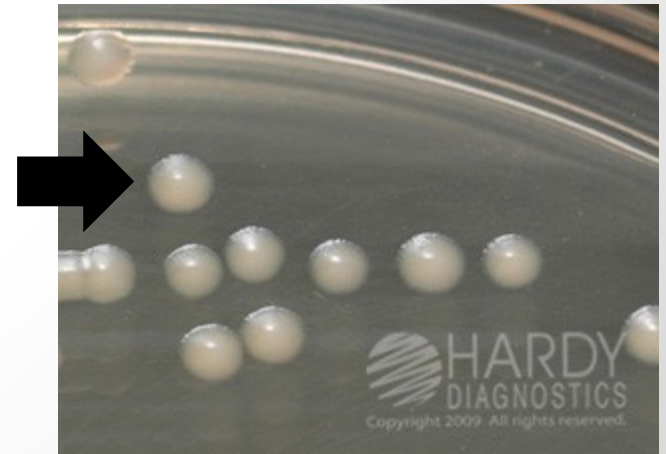
Metody sterilní práce,  
očkování a uchovávání mikroorganismů,  
technika křížového roztěru,  
očkování do tekutého media a na pevné  
medium, kultivace a její podmínky.

# Základní pojmy

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

# Kultura

- mikroorganizmy kultivované v laboratorních podmínkách na živných médiích
- **Čistá** (jeden druh) x **smíšená** (několik druhů) x **technická** (výskum, provoz)
- **Přeočkovávání** – přenos kultury na čerstvé médium (oživení, izolace, odečet vlastností, diagnostika)
- **Bakteriální kolonie** = klon jedné buňky



# Izolace bakteriálního kmene

- = získání čisté kultury
- Mohou se využít selektivní média – vyrostou jen daný taxon
- Metoda izolace = **Křížový roztěr**
  - postupné zředování původní kultury za účelem získání jednotlivých kolonií (klony jedné buňky). V místě hádku – rostou už jen jednotlivé kolonie (kmene), které pak hodnotíme



# Na jaká média kultury očkovat?

- Ve cvičení pracujeme s **čistými kulturami** získanými z České sbírky mikroorganismů, kultivujeme podle jejich podmínek
- **Kmeny z prostředí** - snažíme se dodržet pro ně přirozené podmínky (koncentrace soli, živiny, teplota)
- Zvažujeme **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 médiu a na agaru (jiná distribuce živin, kyslíku)

# Kultivace

- **Kultivace** - předstupeň izolace, identifikace, stanovení citlivosti na ATB...
- Typy kultivace – pro kultury v tekutém médiu:
  - **Kontinuálně**
    - **chemostat** - růstová rychlost kultury je v něm řízena koncentrací limitující živiny, která je přítokem nového média dodávána
  - **Staticky**
    - **Submerzní kultivace** - třepaná nebo vzdušněná (promícháváním se zvětšuje plocha fázového rozhraní a může probíhat efektivnější výměna plynů)

# Nároky na teplotu

- **termofilní** – optimum cca nad 55 °C; extrémní termofily rostou kolem 100°C
- **mezofilní mikroorganismy**
  - optimum růstu 20 - 40 °C
  - většina bakteriálních druhů; parazitické mikroorganismy
  - *Pseudomonas* (ale některé její druhy mohou růst i při nízkých teplotách v lednici (4°C)!
- **psychofilní mikroorganismy**
  - optimum růstu méně než 20 °C
  - oceány, jeskyně; mohou růst i v ledničce! – např. pseudomonády, aeromonády, listerie

- Nároky na **tlak** – barofilní, barotolerantní
- Nároky na **živiny**
  - **zdroj uhlíku**
    - **heterotrof** – organické látky
    - **autotrof** – CO<sub>2</sub>
  - **zdroj energie**
    - **fototrof** –světelná energie
    - **organotrof** – organické látky
    - **litotrof** – anorganické látky
- Nároky na **redoxpotenciál, pH**



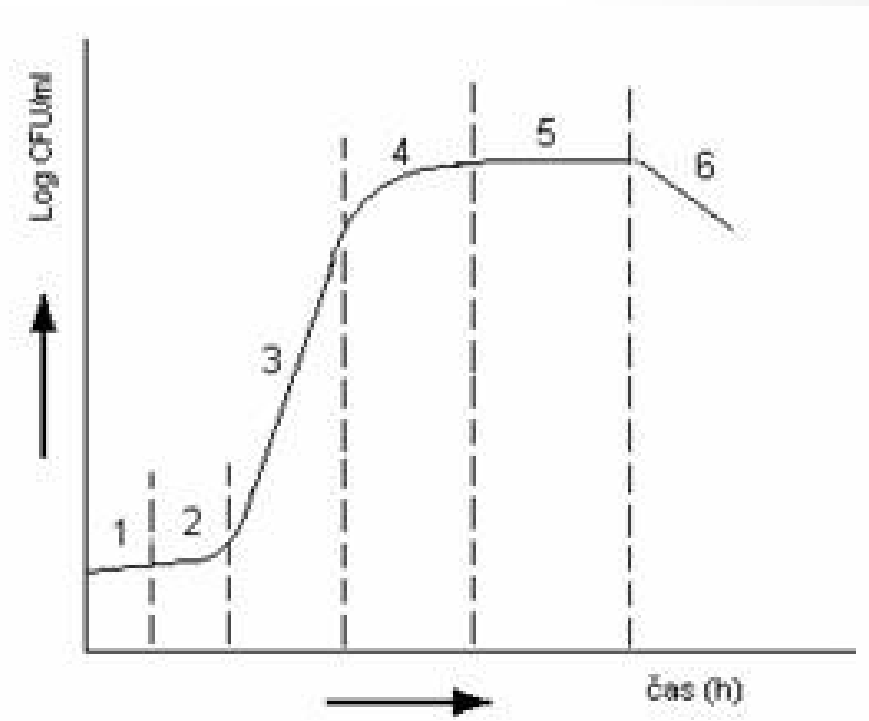
# Vztah MO ke kyslíku

- **Aerobní**
- **Fakultativne anaerobní** (aerobně je to pro ně výhodnější energeticky ale nevadí jim anaerobné prostředí)
- **Anaerobní**
  - **Striktně** – obligátně anaerobní (kyslík je zabíjí)
  - **Aerotolerantní** (přežijí nízké koncentrace, ale  $O_2$  NENÍ akceptor elektronů)
- **Mikroaerofilní** – třeba určité %  $O_2$ , je akceptor



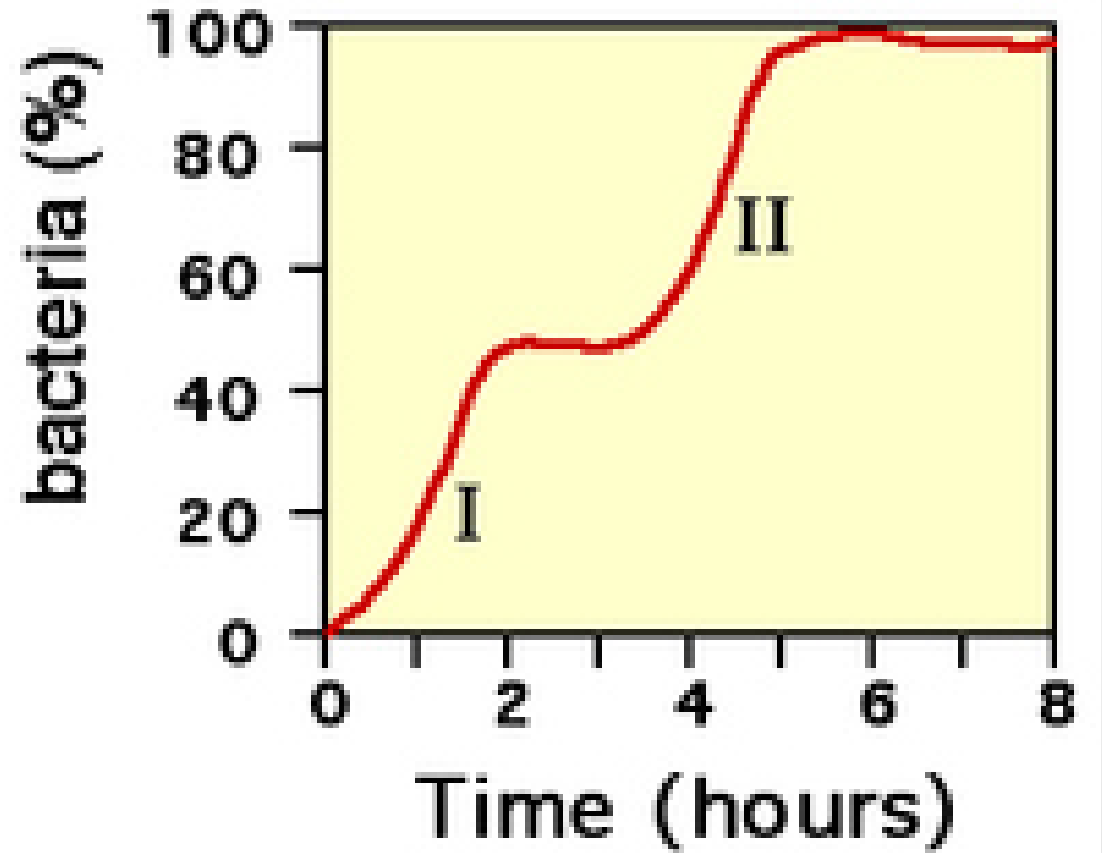
# Růstová křivka

- grafické vyjádření závislosti počtu buněk na délce statické kultivace
- **(1) Lag fáze**
- **(2) Fáze zrychleného růstu** – fáze fyziologického mládí
- **(3) Log fáze** – logaritmická – exponenciální
- **(4) Fáze zpomaleného růstu**
- **(5) Fáze stacionární**
- **(6) Fáze odumírání**



# Diauxie

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



# Uchovávání bakterií

- je nutné zajištění životaschopnosti
- na Petriho misce **při 4 °C** (krátkodobě, nutno přeočkovávat)
- ve zkumavce v agaru ve vpichu – měsíce
- na **šikmém agaru** v lednici při +4 °C – týdny
- na porézních materiálech - želatinových discích, **kuličkách**
- **lyofilizované** – lyofilizace = vymražení vody ve vakuu sublimací vody
- zmražené na **- 70 °C** po malých objemech **v hlubokomrazicím boxu** (měsíce, roky)
- boxy s pevným CO<sub>2</sub> – **suchý led (- 78 °C)**
- **Kryoprezervace** - reverzibilní anabióza, neprobíhají biochemické procesy
- zamražení kultur v **tekutém dusíku** (až - 196°C) nebo **v jiných plynech** (He, Cr, H), uchovávání neomezeně dlouho

# Postup

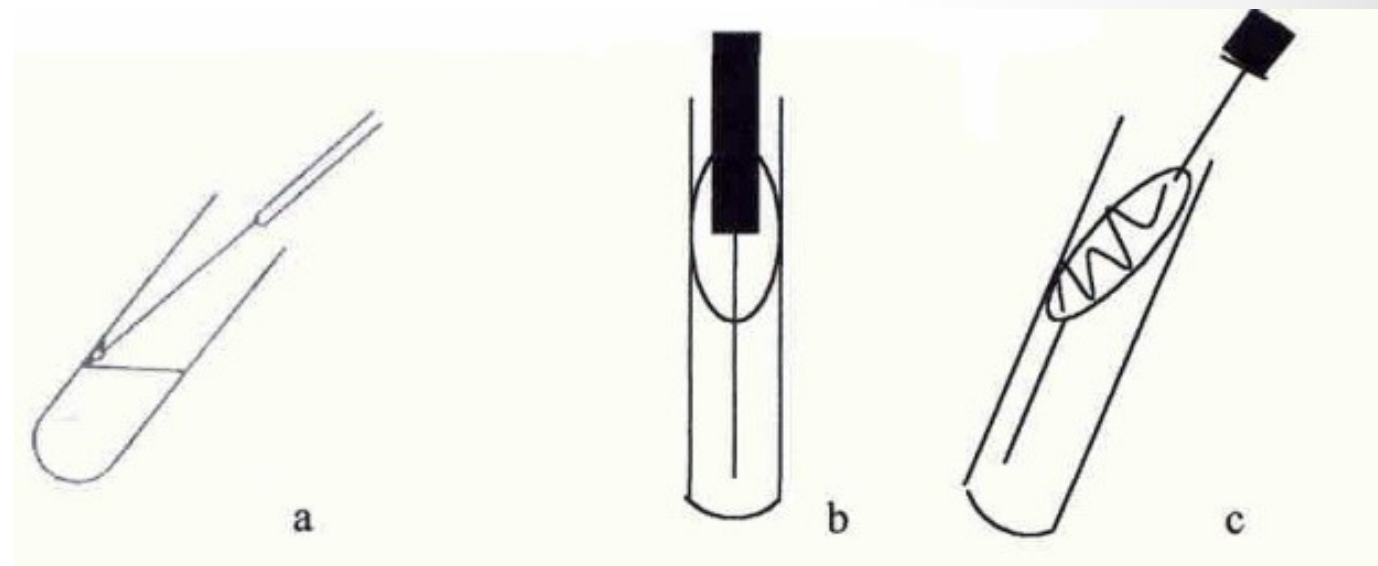
- **Všechny zkumavky i Petriho misky popíšeme fixou (druh, kmen, datum, své iniciály).**
- **Aseptická práce!! Žíhat hrdla a klíčky!!! Misky otvírat co nejméně!!!**
- **Každý pracuje sám – 3 misky, 1 šikmý agar, 1 tekuté médium.**
- **Do dvojice 6 zkumavek s 5 ml bujonu, každá zkumavka různé pH 4–9.**
- **Do dvojice 5 zkumavek s 5 ml bujonu, každá zkumavka různým podílem soli (g/L, NaCl): 1, 3, 5 (základní medium), 7, 9.**

# Tekuté půdy

- Popsat sklo
- Zapnout kahan, ožíhat kličku, nechat zchladnout
- Nabrat kulturu – tak  $\frac{1}{4}$  kličky
- Malíčkem otevřít vršek, ožíhat zkumavku
- Kličku těsně nad okraj hladiny, na stěnu zkumavky, postupně vmíchat do média
- <https://www.youtube.com/watch?v=Nv0tIN0DpPw> (od 0:30)

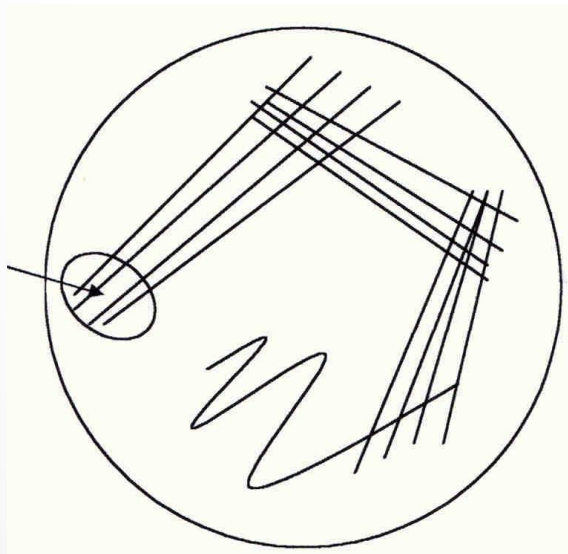
# Šikmý agar:

- Popsat sklo
- Vyžítat kličku a nechat zchládnout
- Nabrat 1/4 kličky
- Malíčkem vršek, ožítat zkumavku
- „hádek“ na šikmý agar odspodu



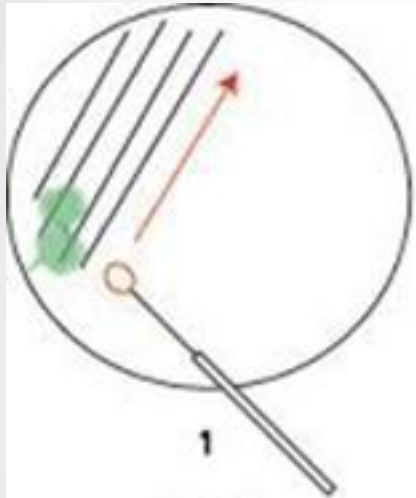
# Petriho misky

- 1. křížový roztěr - čistá kultura
- <https://www.youtube.com/watch?v=AaG3Pt3nwLQ>
- 2. křížový roztěr směsná kulura G+ a G-
- 3. misku rozdělit na čtvrtiny a hádek od okraje ke středu





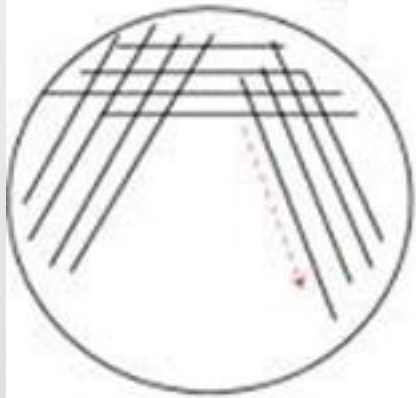
# Křížový roztěr



1



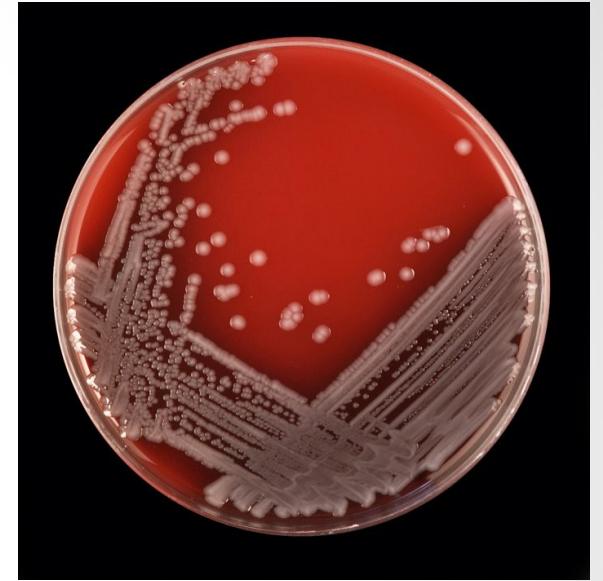
2



3



4



# Kultury

- **G-**
  - • *Escherichia coli* CCM 3954 (fakultativně anaerobní)
  - • *Pseudomonas fluorescens* (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)