

Jaro 2021

# ÚVOD

Bezpečnost práce

**Kultivační půdy**

---

# Bezpečnost práce

- **Příchod a odchod z laboratoře**
- **MYTÍ RUKOU, DEZINFEKCE PLOCHY**
- Kahany pouze pokud jsou používány a jste v místnosti
- Nesahat na kultury do misky
- Na stole 3 nádobky – dezinfekce, kelímek na použité špičky, kelímek na použité sirky
- Lékárnička, hasicí přístroj, hasicí deka
- Laboratorní sklo a pomůcky (misky, klíčky, sklo x umělá hmota)
- KONTAMINACE (sebe i kultur) - snažit se jí předcházet!!!

**Pokud by se něco rozbilo či rozlilo (miska/bujon s kulturou), NEJPRVE MÍSTO DEZINFIKUJEME!!**

# Zásady bezpečné práce v mikrobiologické laboratoři

- 1. Vstup do laboratoře je povolen pouze osobám vykonávajícím cvičení.
- 2. V laboratoři vykonávejte pouze práci stanovenou obsahem cvičení.
- 3. V laboratoři je zakázáno jíst, pít a kouřit.
- 4. V laboratoři je nutné používat laboratorní plášť a přezůvky.
- 5. V laboratoři je zakázáno otevírat okna. Větrání je zajištěno pomocí větracího zařízení.
- 6. Před příchodem do laboratorního cvičení se seznamte s jeho obsahem.
- 7. Před započítím a po ukončení práce je třeba desinfikovat pracovní plochu (Incidur).

# Zásady bezpečné práce v mikrobiologické laboratoři

- 8. Na pracovní plochu pokládejte co nejméně osobních věcí. Na pracovní ploše může snadno dojít k jejich kontaminaci. Oblečení, batohy a tašky odkládejte v šatně.
- 9. Pracujte pečlivě a opatrně. Zabráňte tím kontaminaci materiálu a náhodnému potřísnění pracovní plochy a sebe bakteriálními kulturami.
- 10. Nedotýkejte se zbytečně rukama obličeje, nenanášejte v laboratoři kosmetiku, nemanipulujte s kontaktními čočkami.
- 11. Při barvení mikroorganismů používejte jednorázové ochranné rukavice a pracujte v digestoři. Při fixaci preparátů používejte ochranné brýle. Ochranné rukavice není nutné používat při manipulaci s mikroorganismy, pokud se však budete cítit bezpečněji, použijte je. Výjimkou je příprava nativního preparátu pro mikroskopii, v tomto případě určitě použijte rukavice.

# Zásady bezpečné práce v mikrobiologické laboratoři

- 12. Kahany nechávejte hořet pouze po dobu, kdy je užíváte.
- 13. Použité sklo a zbytky bakteriálních kultur odkládejte na určená místa. V žádném případě nevylévejte kultury do odpadu! Veškerý kontaminovaný materiál je před likvidací a mytím nutno desinfikovat nebo sterilizovat (týká se i rozbitého skla), případně vyhodit do koše na nebezpečný odpad (např. buničitá vata použitá k likvidaci rozlité kultury).
- 14. Dojde-li k náhodnému potřísnění pokožky bakteriální kulturou či poranění pokožky, oznamte tuto skutečnost ihned školiteli. Pokožku je nutno ošetřit vhodným desinfekčním prostředkem (ajatin, Spitaderm), aby nedošlo k infekci.

# Zásady bezpečné práce v mikrobiologické laboratoři

- 15. Stejně zásady jako v bodě 14 platí i v případě znečištění pracovní plochy nebo pracovního oděvu.
- 16. V případě jakékoli nejistoty se informujte o správném postupu u svého školitele.
- 17. Označte všechna média a kultury ve zkumavkách, baňkách a Petriho miskách názvem média a kultury, svým jménem a pracovní skupinou. Misky popisujte na dno! K označení používejte fixy na sklo.
- 18. Všechny pracovní postupy, obzvláště pak použité bakteriální kultury, množství pipetovaných roztoků a postupy při ředění si pečlivě zaznamenávejte.
- 19. Po ukončení práce odneste použité pomůcky na určené místo, ukliděte pracovní plochu a vydesinfikujte ji desinfekčním roztokem (Incidur ve spreji).

# Zásady bezpečné práce v mikrobiologické laboratoři

- 20. Před odchodem ze cvičení si dobře umyjte ruce a vydesinfikujte desinfekčním prostředkem (Spitaderm). V případě, že potřebujete krátkou přestávku v průběhu cvičení, umyjte a vydesinfikujte si ruce před opuštěním laboratoře.
- 21. Práce v mikrobiologické laboratoři je zakázána těhotným ženám do konce 9. měsíce. Posluchačka je povinna vedoucímu cvičení oznámit graviditu.
- 22. Připojování přístrojů do elektrické sítě je nutno provádět pod dohledem. Provádění jakýchkoliv změn na elektrickém zařízení není dovoleno. Opravovat elektrické instalace smějí jen osoby tím zvláště pověřené, s příslušnou kvalifikací. Závady v instalaci (voda, plyn, elektřina) ihned hlase.

# Pokyny k zápočtu

- Protokoly
  - pozn.: závěr = stručné shrnutí, úvaha nad výsledky pokusu, případně odpovědi na otázky
- Docházka
  - povinná účast v praktické části semestru
- Zápočet
  - docházka, protokoly, zápočtový test

**S sebou do laboratoře PLÁŠŤ, PŘEZŮVKY, PERMANENTNÍ FIX NA SKLO**



# Sylabus

## Cvičení - Základy mikrobiologie cvičení Bi2060c - JARO 2021

Cvičení	Týden	Úloha
1	1.3. - 5.3.	Metody sterilní práce, očkování a uchovávání mikroorganismů. Technika křížového roztěru. Očkování do tekutého media a na pevné medium.
2	8.3. - 12.3.	
3	15.3. - 19.3.	Makro - a mikroskopické pozorování mikroorganismů. Gramovo barvení, demonstrační pokus nativního preparátu.
4	22.3. - 26.3.	
5	29.3. - 2.4.	Přímé stanovení počtu buněk v Bürkerově komůrce, vitální test, kvasinky.
6	5.4. - 9.4.	
7	12.4. - 16.4.	Průkaz a izolace některých půdních mikroorganismů.
8	19.4. - 23.4.	
9	26.4. - 30.4.	Stanovení citlivosti bakterií k antibiotikům, stanovení koncentrace antibiotik.
10	3.5. - 7.5.	
11	10.5. - 14.5.	
	Termín vypsán zvlášť	TEST

# Půdy pro růst mikroorganismů

- **Agar x Bujon**
- **Agar – tuhý**, izolace jednotlivých kolonií, přímý průkaz MO, pozorování makroskopických znaků
- **Bujon – tekutý**, pomnožení, nerozeznáme směs MO
  
- Kultivovatelné mikroorganismy tvoří asi **1,5 – 5 %**
- Půdy si připravíme **dle cílového MO** → směs z prostředí, sbírková kultura (katalog), klinika...
  
- **Viry** – kultivace na **tkáňových kulturách**, fágy na nárůstu bakterií
- Intracelulární **paraziti** – buněčné kultury

# Média

- **Živná média** slouží ke kultivaci, přímému průkazu a izolaci MO, sledování fyziologických vlastností (vztah k O<sub>2</sub>, rychlost růstu,...)
- Jejich složení **odpovídá požadavkům MO** (pH, zdroj C, N)
- Sterilná příprava
  
- Dle účelu: univerzální x selektivní x selektivně diagnostická
- Dle složení: syntetická x přirozená x základní x obohacená
- Dle konzistence: tekutá x polotekutá x tuhá x ztužená
- Transportní

# Média

- Půdy univerzální neboli základní - slouží pouze k pomnožení mikrobů. MPB, sladinový agar
- Půdy diagnostické - obsahují indikátory, které obvykle mění barvu v závislosti na změně podmínek okolí (nejčastěji pH) v důsledku pochodů vyvolaných mikroby. Podle odlišných vlastností poté můžeme odlišovat jednotlivé mikroby. Např. na krevním agaru kolem kolonií některých druhů vzniká zóna hemolýzy; v tekuté půdě s určitým sacharidem a barevným indikátorem pH lze odhalit schopnost kmene fermentovat tento sacharid.
- Půdy selektivní - potlačují růst nežádoucích mikrobů. Ashbyho agar
- Půdy selektivně diagnostické - sdružují v sobě vlastnosti obou předchozích skupin. Příklad: MacConkey agar umožňuje růst nenáročných G- tyček a současně identifikuje jejich schopnost fermentovat laktózu. Endo agar
- Půdy speciální - slouží pro kultivaci konkrétního druhu nebo rodu bakterie. Příklad: půda BCYE pro legionely.

# MPA, krevní agar, čokoládový agar

Masopeptonový agar



**Živný (masopeptonový) agar (ŽA, MPA)**  
- Základní směs - bujónem a peptonem s agarem. Pěstují se na něm nenáročné bakterie. Obvykle se používá spíše jako základ pro přípravu složitějších půd.

Krevní – 5-10% savčí krve



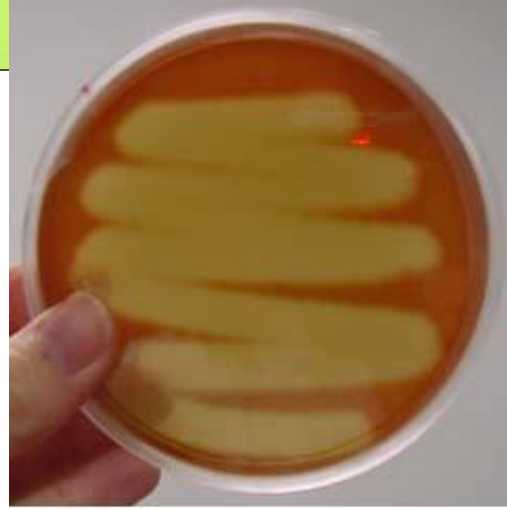
**Krevní agar (KA)** Je nejpoužívanějším pevnou půdou, vyrábí se přidáním beraních krvinek k chladnucím agaru (56°C). Slouží pro zachycení Gram + bakterií. Je částečně diagnostickou půdou - mohou se na něm projevit hemolytické vlastnosti bakterie.

Čokoládový – zlyzované krevní buňky

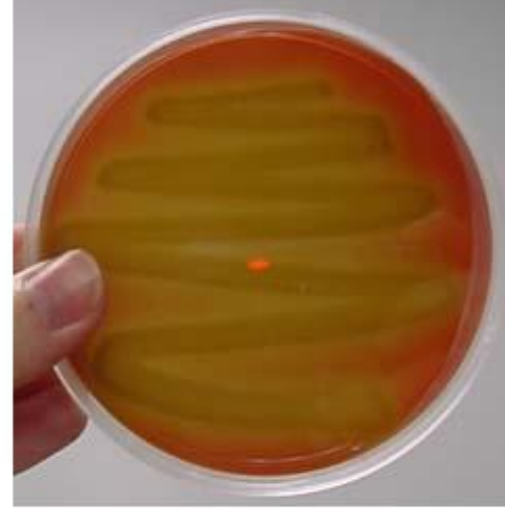


**Čokoládový agar (ČA)** Vyrábí se podobně jako KA přidáním beraních krvinek k agaru (ten má však vyšší teplotu 80°C) - a tak dojde k hemolýze. Ta způsobí čokoládové zbarvení. Používá se pro pěstování náročnějších bakterií jako jsou *Neisserie* a *Hemofily*. Hemolýza je porušení cytoplazmatické membrány červených krvinek

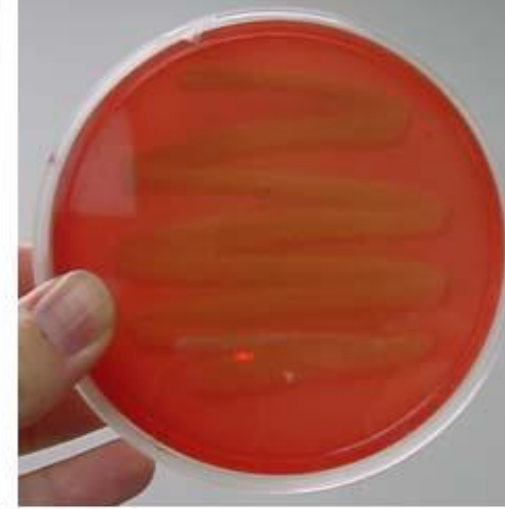
# Hemolýza



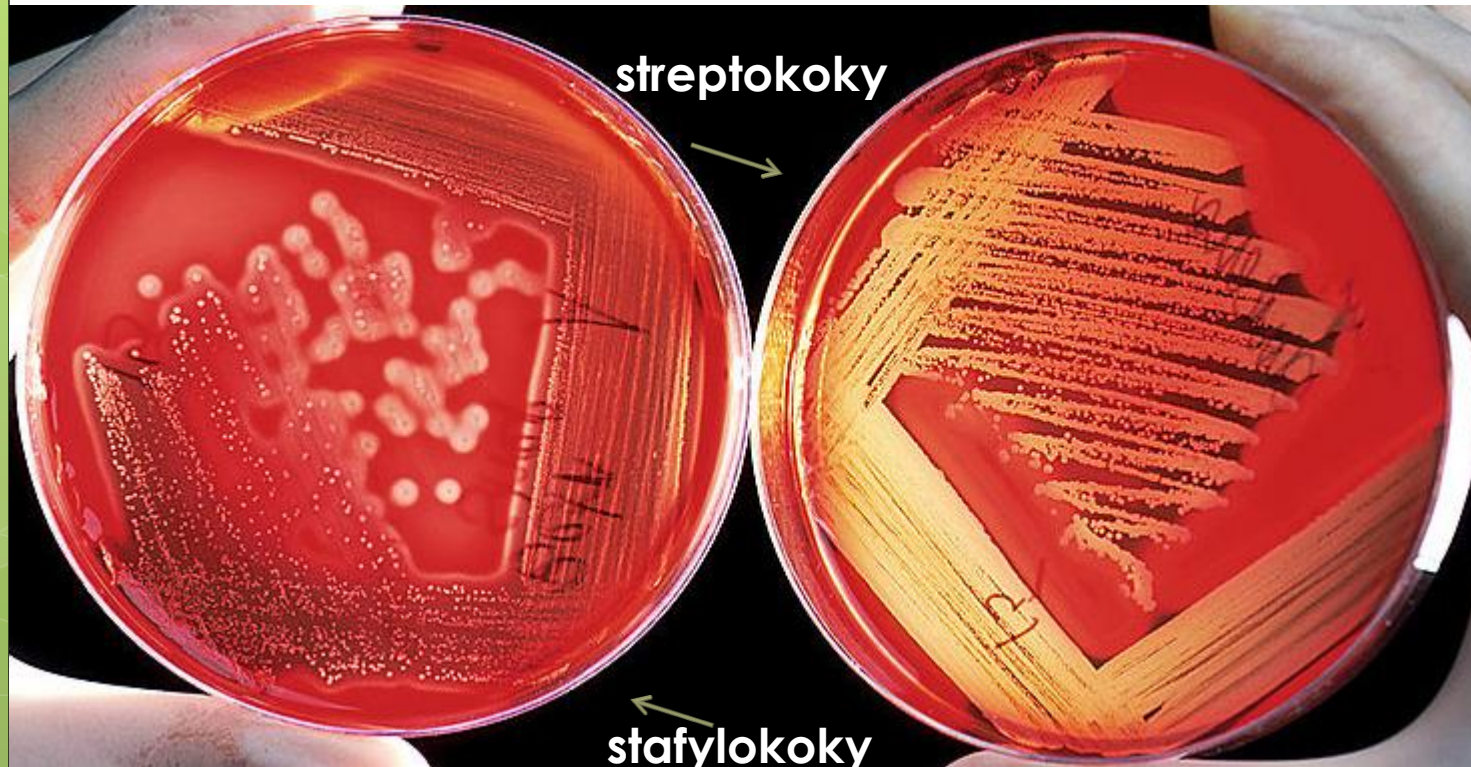
Beta Hemolysis



Alpha Hemolysis



Gamma Hemolysis



streptokoky

stafylokoky



ASM MicroLibrary.org © Buxton

# Endův agar

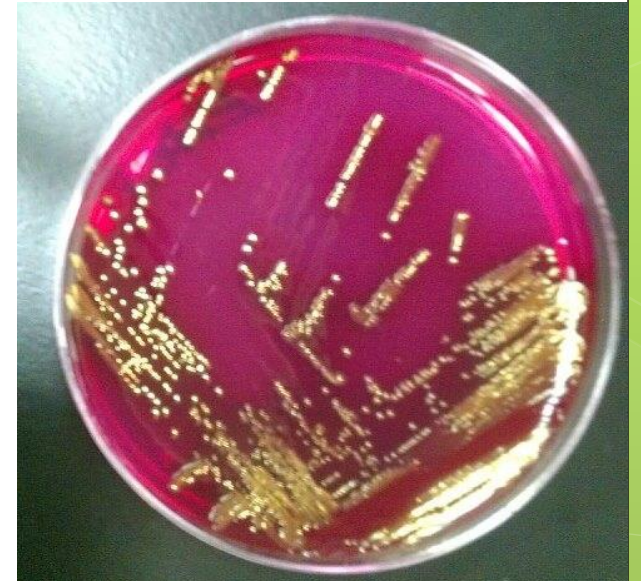
## Endova půda

je světle růžová a na světle dále růžoví, **nerostou** na ní **G+** bakterie

- ▶ dělí bakterie na **laktóza-pozitivní**, které metabolizují laktózu – tvoří se aldehydy, které reagují s **fuchsinem** obsaženým v Endově půdě za vzniku Schiffových bazí a kolonie se zbarvují **tmavorůžově** laktóza-negativní bakterie mají svou standardní barvu

- ▶ **Pro koliformní bakterie**

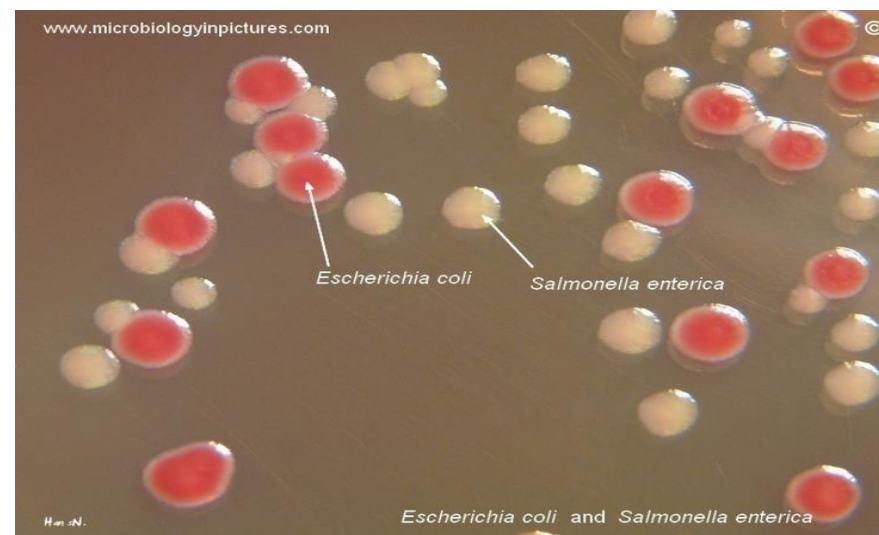
**Shifovo reagens** (vyvážená směs bazického fuchsinu s kyselým siřičitanem sodným) - selektivní složka a indikátor štěpení laktózy



# MacConkey agar

Inhibiční složkou v médiu je speciální směs **žlučových solí**. Okyselení, které vzniká rozkladem laktózy, indikuje **neutrální červeň**.

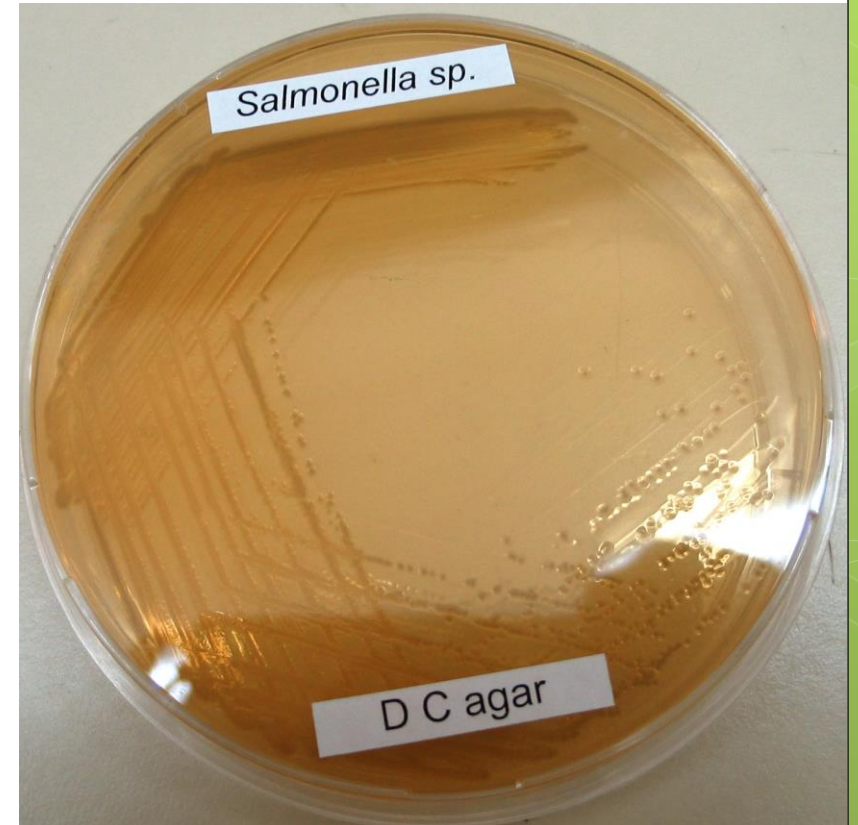
Inhibiční rozsah má téměř shodný s Endovým agarem. Obě média umožňují růst gramnegativním nenáročným bakteriím z čeledi *Enterobacteriaceae*, *Vibrionaceae*, *Aeromonadaceae* a některým dalším rodům (*Pseudomonas*, *Alcaligenes*).





# Deoxycholát – citrátový agar

- Inhibiční složku v médiu tvoří **žlučové soli**, avšak ve vyšší koncentraci než v MCA.
- Obsahuje **citronan železitý**, který indikuje tvorbu sirovodíku.
- Indikátorem okyselení je **neutrální červeň**.
- DCA je zvláště vhodný **pro izolaci salmonel a yersinií**. Podobný je Salmonella-Shigella agar



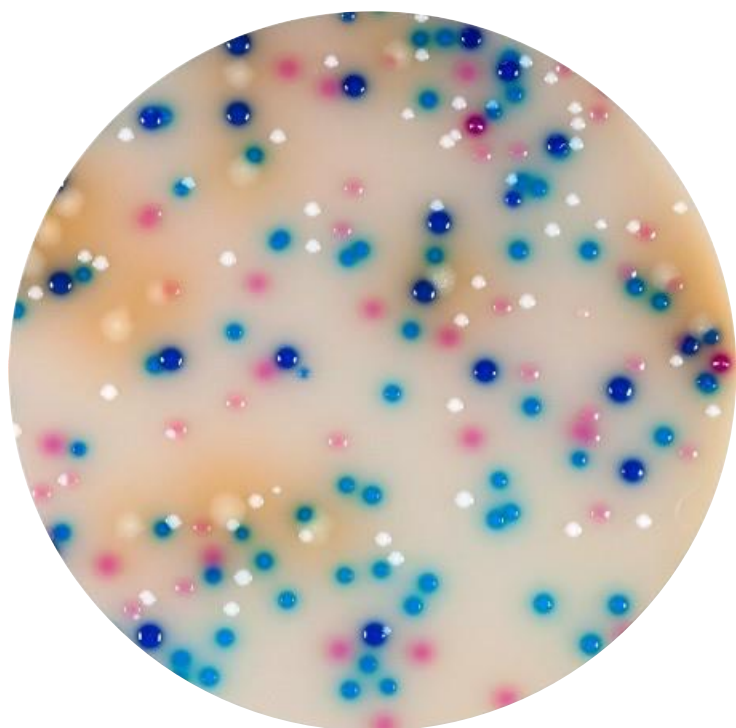
# Agar s brilantovou zelení

- Inhibiční složkou je **brilantová zeleň**, indikátorem pH **fenolová červeň**.
- Používá se hlavně pro selektivní izolaci **salmonel**.
- Dnes je průmyslově vyráběna řada tzv. **chromogenních půd**, na kterých lze rozlišit podle typického zbarvení kolonií vybrané rody z čeledi *Enterobacteriaceae*. Jako příklad lze uvést **Rambachův agar**, který je určen pro izolaci salmonel.



# Chromogenní půdy - *Candida*

Chromogenní půdy dokáží odlišit jednotlivé mikroby na základě specifické barvy jejich kolonií



- a – *Candida albicans*
- b – *Candida dubliniensis*
- c – *Candida tropicalis*
- d – *Candida glabrata*
- e – *Candida krusei*

# Mueller Hinton agar

- Používá se pro test **citlivosti na antibiotika**, sulfoamidy (disková, difuzní Kirby-Bauer metoda) a pro primární izolaci neisserií.
  - **Neisseria** je rod bakterií charakterizovaný jako **gramnegativní aerobní diplokoky**. Organismy jsou **parazitické**, ve volné přírodě se nevyskytují. Některé druhy jsou **primárně patogenní pro člověka** a nacházíme je na sliznicích respiračního a genitálního traktu. Nepatogenní druhy osídlují ústní dutinu a horní dýchací cesty.



# Polotuhý agar, *Proteus*

- **Polotuhé médium** vhodné pro *Proteus mirabilis*
- *Proteus* má typický plazivý růst = Raussův fenomén = fenomén příbojové vlny



*Proteus mirabilis* je **gramnegativní fakultativně anaerobní bakterie**, pro níž je charakteristický plazivý růst a ureázová aktivita. *Proteus mirabilis* způsobuje 90 % infekcí rodu *Proteus*, které lze považovat za komunitní získané infekce.

*Proteus mirabilis* je součástí normální gastrointestinální flóry. Vyskytuje se také v půdě, ve vodě, na rostlinách, ve stolici lidí a zvířat. *Proteus* je nalezený v mnoha ekologických stanovištích, včetně dlouhodobých zdravotnických zařízení a nemocnic.

# Kombinovaná půda dle Hajny

- Indikuje **zkvašování cukrů** a **produkce  $\text{CO}_2$**  a **sirovodíku**
- Substrátem pro tvorbu  $\text{H}_2\text{S}$  je **tiosulfát sodný** a indikátorem **citrát železito-amonný**. Sirovodík vytvořený redukcí tiosulfátu reaguje s ionty železa za vzniku sulfidu železitého.
- **Produkce  $\text{H}_2\text{S}$  se projeví zčernáním spodní části půdy.**

