

Jaro 2021

Metody sterilní práce

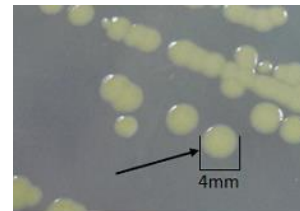
Očkování a uchovávání mikroorganismů

Bakteriální druh

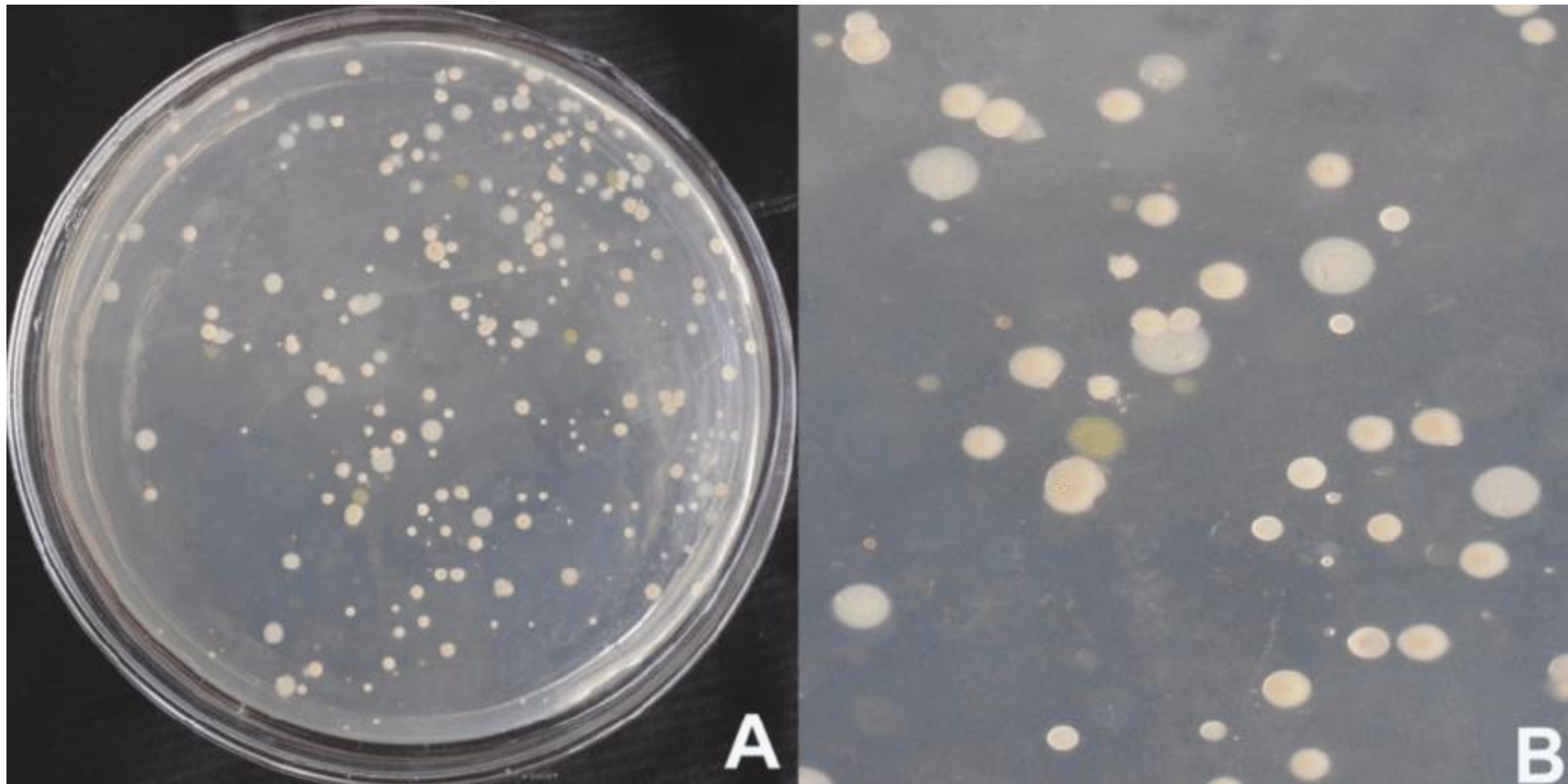
- jasně vymezená skupina **navzájem příbuzných kmenů**, zahrnujících typový kmen
- bakteriální kmeny jednoho druhu mají **průměrnou nukleotidovou identitu 95 - 96% (Average Nucleotide Identity, ANI)**
- druh vykazuje, až na výjimky, **shodné** fenotypové znaky a současně má některé **odlišné** znaky od jiných bakteriálních druhů
- <https://help.ezbiocloud.net/bacterial-species-concept-explained/>

Kultura

- odhaduje se, že pouze **2 % všech mikroorganismů** jsou kultivovatelná v laboratorních podmínkách na živných médiích
- **čistá kultura** (jeden druh) x **smíšená** (několik druhů) x **technická** (výzkum, provoz)
- **přeočkovávání** – přenos kultury na čerstvé médium (oživení, izolace, odečet vlastností, diagnostika)
- **bakteriální kolonie** = klon jedné buňky
- **Colony forming unit (CFU)** = buňka schopná vytvořit kolonii; udáváno v CFU/ml indikuje množství životaschopných buněk, které jsou schopné reprodukce a tím pádem tvorby jednotlivých kolonií

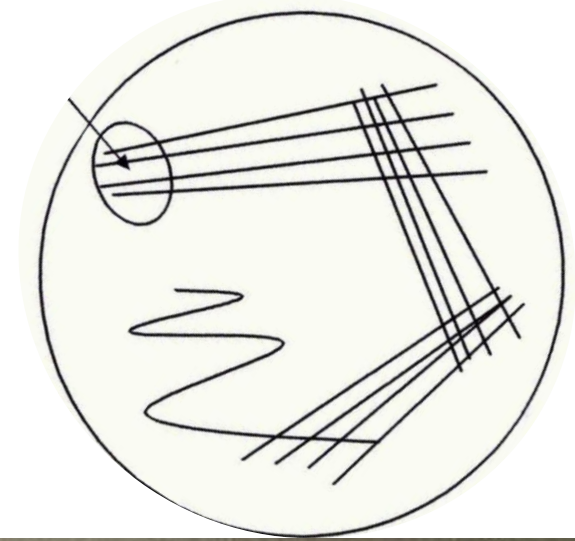


Smíšená kultura

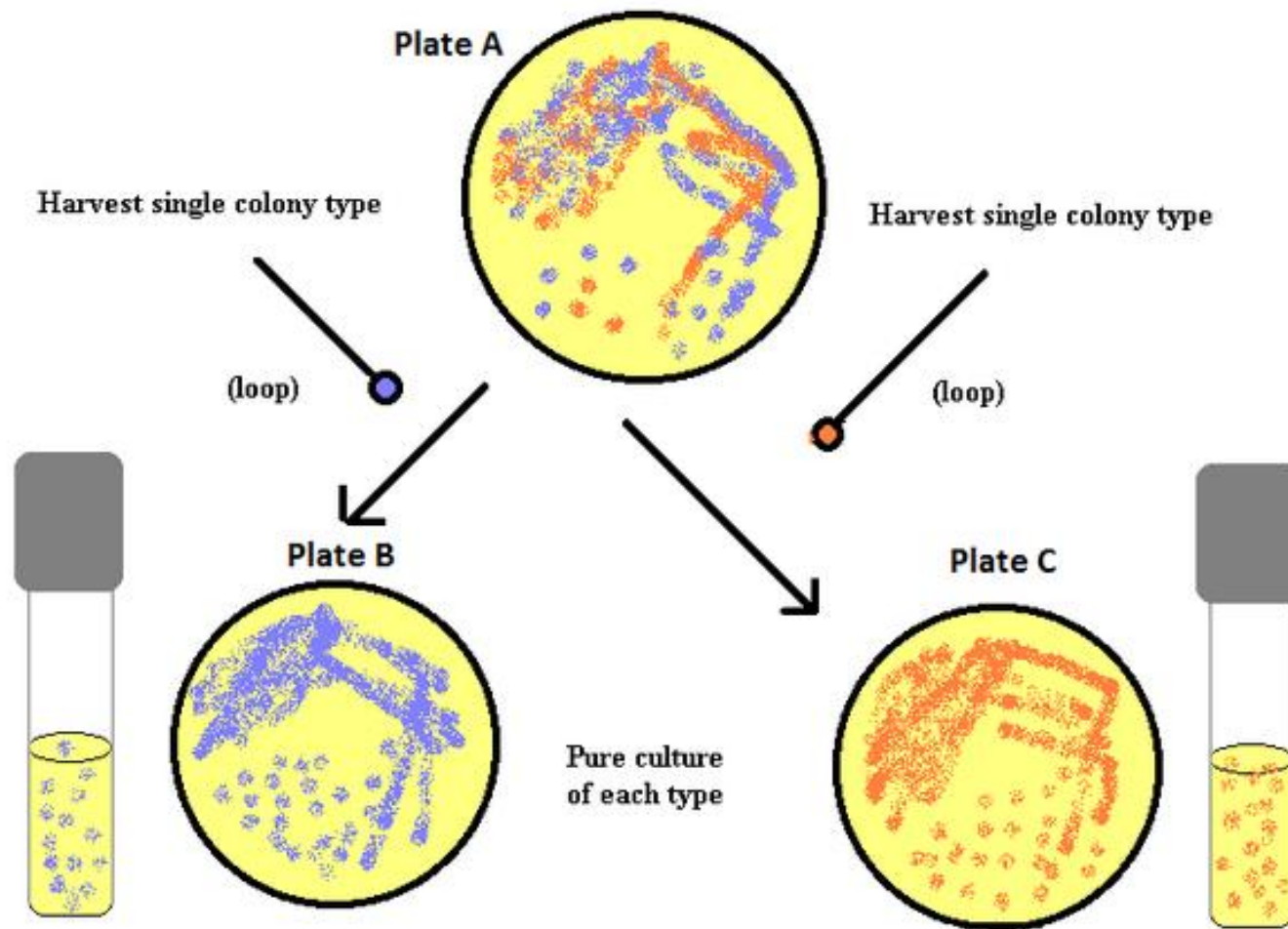


Izolace bakteriálního kmene

- = získání čisté kultury
- mohou se využít selektivní média – vyroste jen daný taxon
- metoda izolace = **Křížový roztěr**
 - = postupné zředování původní kultury za účelem zisku jednotlivých kolonií, které pak hodnotíme
 - jak udělat správný křížový roztěr?
- <https://www.youtube.com/watch?v=zfmdZ4C4SPI&feature=youtu.be>
- <https://youtu.be/qeXS92cWjw8>



Izolace čisté kultury z kultury smíšené



Média pro očkování kultury

- ve cvičení pracujeme s **čistými kulturami** získanými z České sbírky mikroorganismů (<https://www.sci.muni.cz/ccm/>), kultivujeme podle jejich doporučení
- **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 mikroorganismů na teplotu

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

Další vybrané nároky

- nároky na **tlak** – barofilní, barotolerantní
- nároky na **živiny**
 - **zdroj uhlíku**
 - **heterotrof** – organické látky (živočichové, houby,...)
 - **autotrof** – CO₂ (anorg. látky)
 - **zdroj energie**
 - **fototrof** – světelná energie (rostliny, řasy,...)
 - **organotrof** – organické látky
 - **litotrof** – anorganické látky
- nároky na **redoxpotenciál, pH**






Vztah mikroorganismů ke kyslíku

- aerobní
- **fakultativně anaerobní** (aerobní prostředí je pro ně výhodnější energeticky, ale nevadí jim anaerobní prostředí)
- anaerobní
 - **striktně/Obligátně anaerobní** (kyslík je zabíjí)
 - **aerotolerantní** (přežijí nízké koncentrace kyslíku)
- **mikroaerofilní** – potřebují určité nízké % O₂



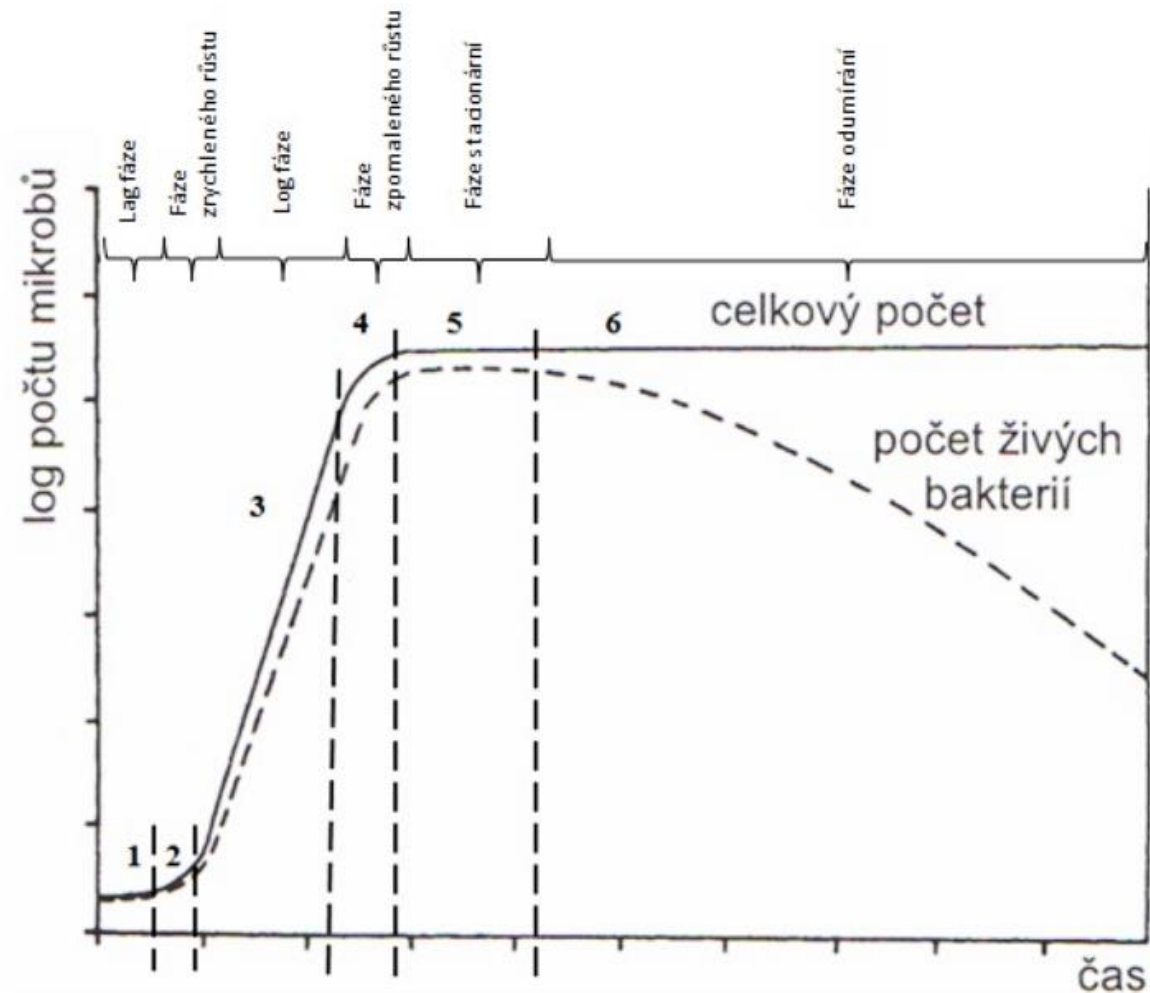
Table 6.1

The Effect of Oxygen on the Growth of Various Types of Bacteria

	a. Obligate Aerobes	b. Facultative Anaerobes	c. Obligate Anaerobes	d. Aerotolerant Anaerobes	e. Microaerophiles
Effect of Oxygen on Growth	Only aerobic growth; oxygen required	Both aerobic and anaerobic growth; greater growth in presence of oxygen	Only anaerobic growth; ceases in presence of oxygen	Only anaerobic growth; but continues in presence of oxygen	Only aerobic growth; oxygen required in low concentration
Bacterial Growth in Tube of Solid Growth Medium					
Explanation of Growth Patterns	Growth occurs only where high concentrations of oxygen have diffused into the medium	Growth is best where most oxygen is present, but occurs throughout tube	Growth occurs only where there is no oxygen	Growth occurs evenly; oxygen has no effect	Growth occurs only where a low concentration of oxygen has diffused into medium
Explanation of Oxygen's Effects	Presence of enzymes catalase and superoxide dismutase (SOD) allows toxic forms of oxygen to be neutralized; can use oxygen	Presence of enzymes catalase and SOD allows toxic forms of oxygen to be neutralized; can use oxygen	Lacks enzymes to neutralize harmful forms of oxygen; cannot tolerate oxygen	Presence of one enzyme, SOD, allows harmful forms of oxygen to be partially neutralized; tolerates oxygen	Produce lethal amounts of toxic forms of oxygen if exposed to normal atmospheric oxygen

Růstová křivka

- grafické vyjádření závislosti počtu buněk na délce statické kultivace
- 1 Lag fáze** – buňka se přizpůsobuje novým podmínkám
- 2 Fáze zrychleného růstu** (fáze fyziologického mládí) – buňky se přizpůsobily a začínají růst
- 3 Log fáze** (logaritmická/exponenciální fáze růstu) – buňky se dělí konstantní maximální rychlostí, dokud nezačnou docházet živiny v médiu
- 4 Fáze zpomaleného růstu** – hromadění metabolitů, snížení intenzity metabolismu
- 5 Fáze stacionární** – vyčerpání živin, počet nových buněk stejný jako počet odumírajících, mohou vznikat spory
- 6 Fáze odumírání** – buňky žijí ze zásob a pomalu odumírají



Diauxie

- postupné využití substrátu
- např. nejdříve využití jednoduchého zdroje energie – **glukóza**
- potom nastartován metabolismus potřebný pro využití složitějšího substrátu – **laktóza**

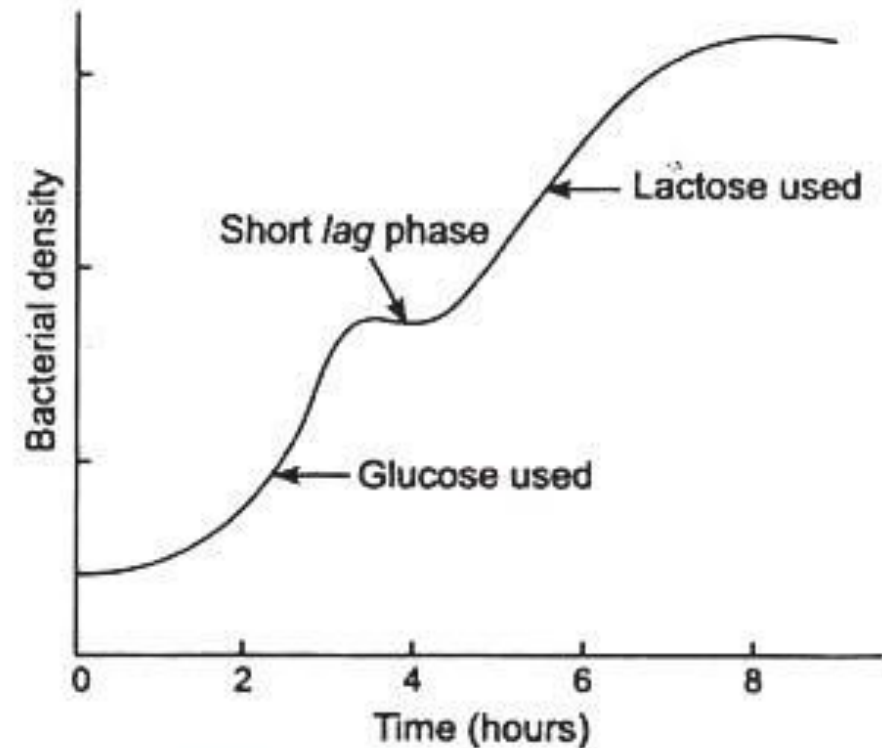
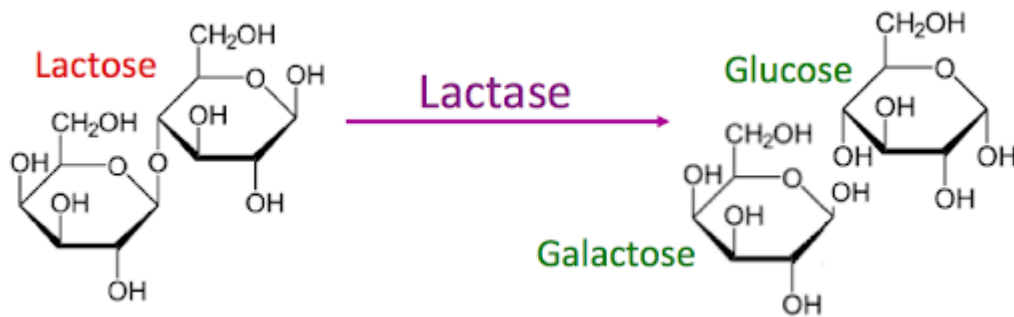


FIG. 19.3. Diauxic or diphasic growth curve of *E. coli* grown with a mixture of glucose and lactose. Glucose is first used, then lactose. A short *lag* phase in diauxic growth is present during which the bacterium synthesizes the enzymes needed for use of lactose.

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
 - **kryoprezervace** – zmražení na **- 80 °C** po malých objemech **v hlubokomrazicím boxu** (měsíce, roky)
 - boxy s pevným CO₂ – **suchý led (-78 °C)**
 - zamražení kultur v **tekutém dusíku** (až -196 °C) uchovávání neomezeně dlouho

Postup

- všechny zkumavky i Petriho misky popíšeme fixou (druh, kmen, skupina, datum, své iniciály). **POPIS NA SPODNÍ STRANU PET. MISKY!**
- ! aseptická práce
 - ! žíhat hrdla a kličky
 - ! misky otvírat co nejméně
- každý pracuje sám – 3 misky, 1 šikmý agar, 1 tekuté médium

Tekuté půdy

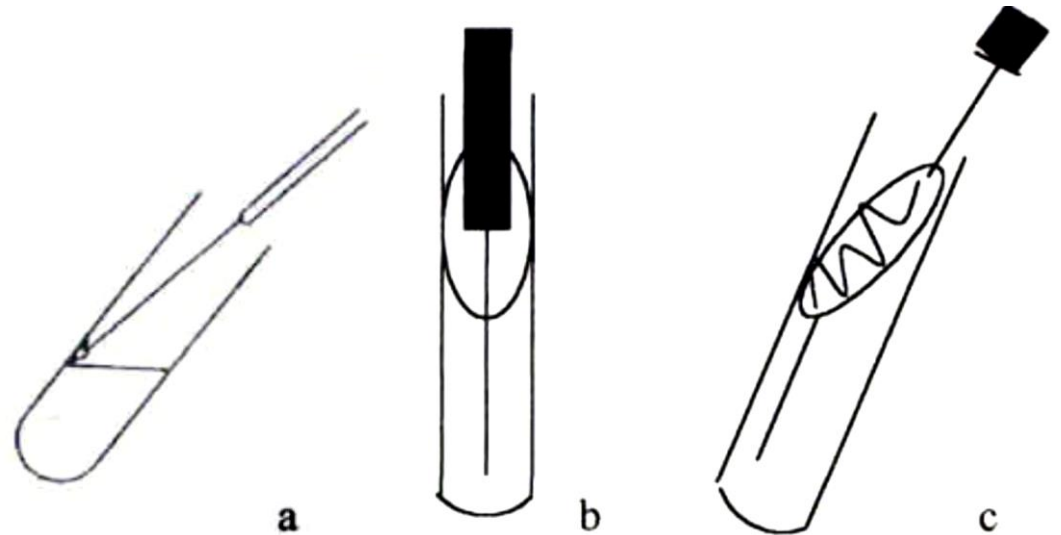
- popsat zkumavku
- zapnout kahan, ožíhat kličku, nechat vychladnout
 - nebezpečí spálení MO příliš horkou kličkou
- nabrat kulturu – cca $\frac{1}{4}$ kličky
- malíčkem otevřít vršek (malíčkem i vršek držet v dlani), ožíhat zkumavku
- kličkou nanést kulturu těsně nad okraj hladiny na stěnu zkumavky, zkumavku ožehnout, zavřít, ožíhat kličku
- postupně vmíchat kulturu ze stěny zkumavky do média (poklepáváním zkumavky)
- kultivujeme při **30 °C 24 hodin** v termostatu

- pro ukázkou tekuté půdy (mírně odlišný postup než děláme ve cvičení)

<https://youtu.be/QCgXJ8hjzs>

Šikmý agar

- popsat zkumavku
- vyžítat kličku a nechat vychladnout
- nabrat cca $\frac{1}{4}$ kličky
- malíčkem otevřít vršek (malíčkem vršek držet v dlani), ožítat zkumavku
- kličkou vytvořit „hádek“ na šikmý agar odspodu
- ožítat zkumavku, zavřít, ožítat kličku
- kultivujeme při **30 °C 24 hodin** v termostatu
- pro ukázkou zaočkování šikmého agaru
<https://youtu.be/liGGmHXLm1o>



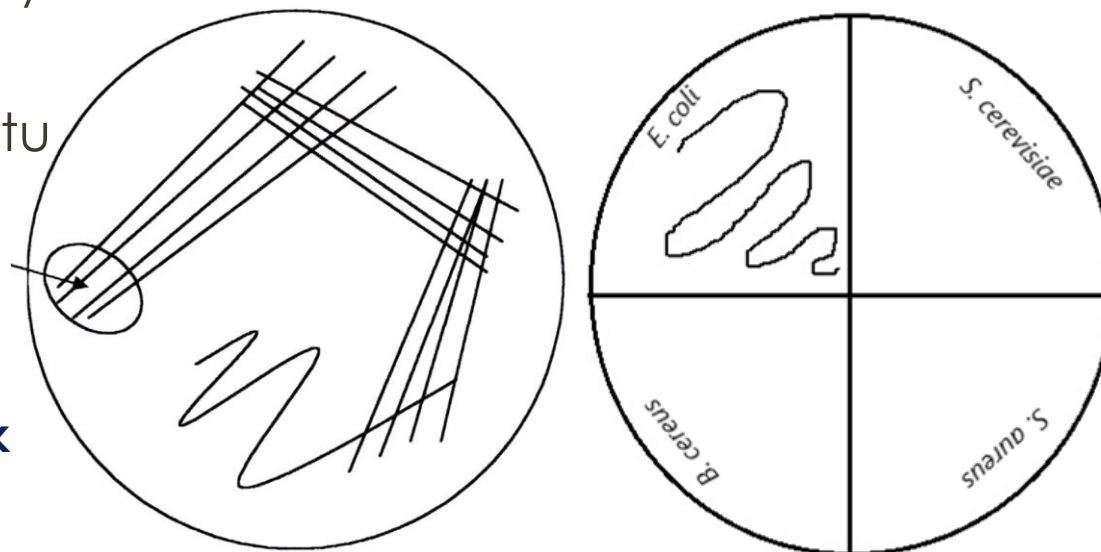
Petriho misky

- 1. křížový roztěr - čistá kultura
- 2. křížový roztěr - směsná kultura G+ a G- (zde nepoužívat *Bacillus cereus* – jeho růst je „agresivnější“ a ve smíšeném vzorku by *Bacillus* druhou kulturu „přerostl“)
- 3. misku rozdělit na čtvrtiny a pomocí kličky tvořit hádka od okraje ke středu
- kultivujeme při **30 °C 24 hodin** v termostatu

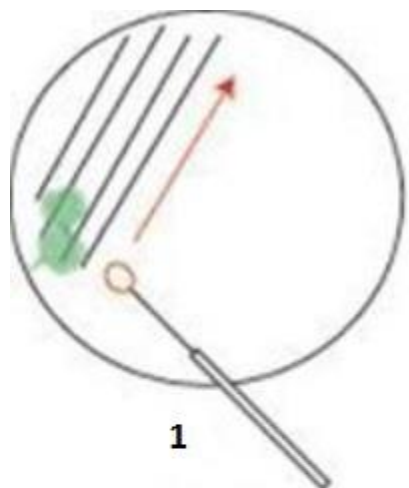
Pro ukázkou křížového roztěru

<https://youtu.be/qeXS92cWjw8>

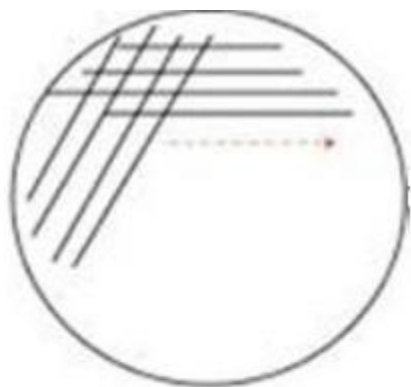
https://www.youtube.com/watch?v=_1KP9zOtfXk



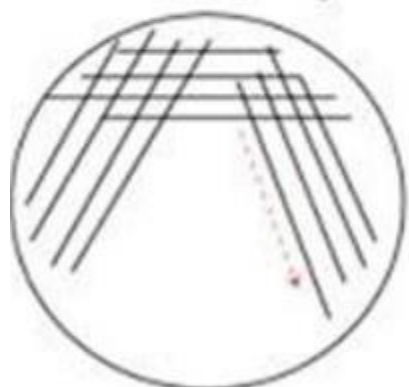
Křížový roztěr



1



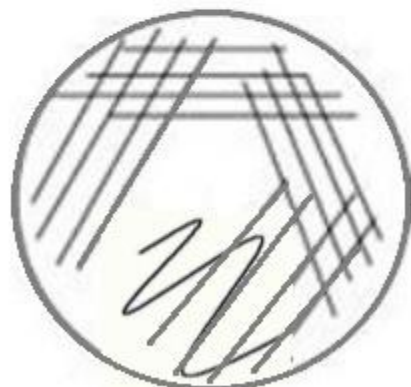
2



3



4



5



!!! Ožehnout kličku vždy mezi jednotlivými kroky

Kultury

- G-
 - *Escherichia coli* CCM 3954 (fakultativně anaerobní) 3*
 - *Pseudomonas fluorescens* (aerobní) 4*
 - *Serratia marcescens* CCM 303 (fakultativně anaerobní) 1*
- G+
 - *Kocuria rosea* CCM 839 (aerobní) 7*
 - *Micrococcus luteus* CCM 169 (aerobní) 6*
 - *Bacillus cereus* CCM 2010 (fakultativně anaerobní) 2*
 - *Staphylococcus aureus* SA 812 (fakultativně anaerobní) 5*
- kvasinky
 - *Saccharomyces cerevisiae* (fakultativně anaerobní) 8*

* označení MO na zkumavkách, Petriho miskách

Podklady pro vyhotovení protokolu

- Do protokolu podle prezentace/skript/výsledků a fotek:
 - vyplníte cíle, principy, postupy, odpovíte na dané otázky
 - vyhodnotíte makroskopické znaky, doplníte tabulku v protokolu
 - odpovíte na otázky v závěru

Teoretické podklady pro vyhodnocení protokolu

- Makroskopické pozorování

Makroskopické pozorování

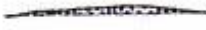



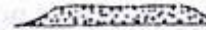














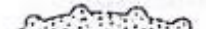
- spočívá v popisu kolonií
- liší se dle typu živného média, stáří kultury a typu kultivace



Odečítání morfologie bakteriálních kultur

- při povedeném křížovém roztěru jsou na misce viditelné jednotlivé kolonie = shluky buněk vzniklých klonováním jediné buňky
- hodnotíme jejich:
 - **tvar** (kruhový, nepravidelný, vláknitý)
 - **okraje** (hladké, zvlněné)
 - **profil** (plochý, vypouklý, kráterovitý)
 - **povrch** (lesklý, matný)
 - **zbarvení**



<u>Profil :</u>	<u>Tvar :</u>	<u>Okraje :</u>	
 plochý	 okrouhlý	 vroubkované	 myceliální
 zvýšený	 zvlněný	 zubaté	 drsne, prstovité (capul medusae)
 vypouklý	 laločnatý	 s koncentrickou stávkou	 vláknité
 vypouklý	 sektorový	 zvráštělé	 rizoidní
 pupkovitý			 hladké
 knoflíkovitý			
 bradavčitý			

Tvar



Okraje



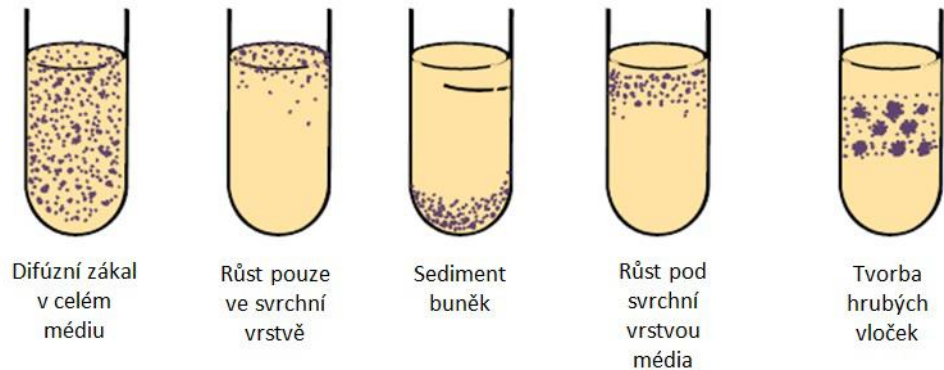
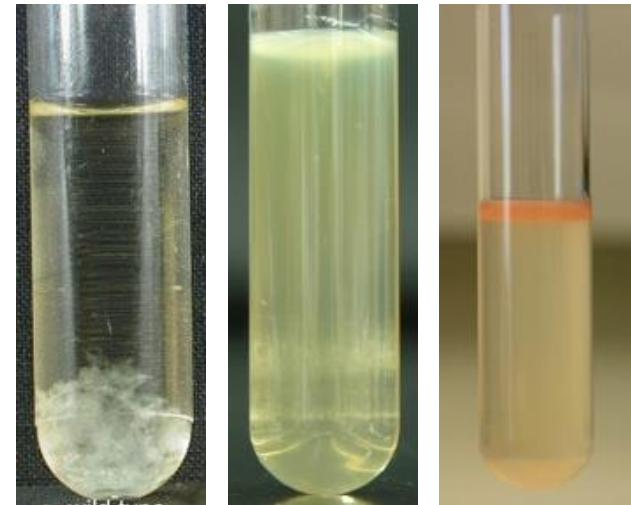
Profil



Obr. 2: Tvary bakteriálních kolonií (Rosypal, 1981)

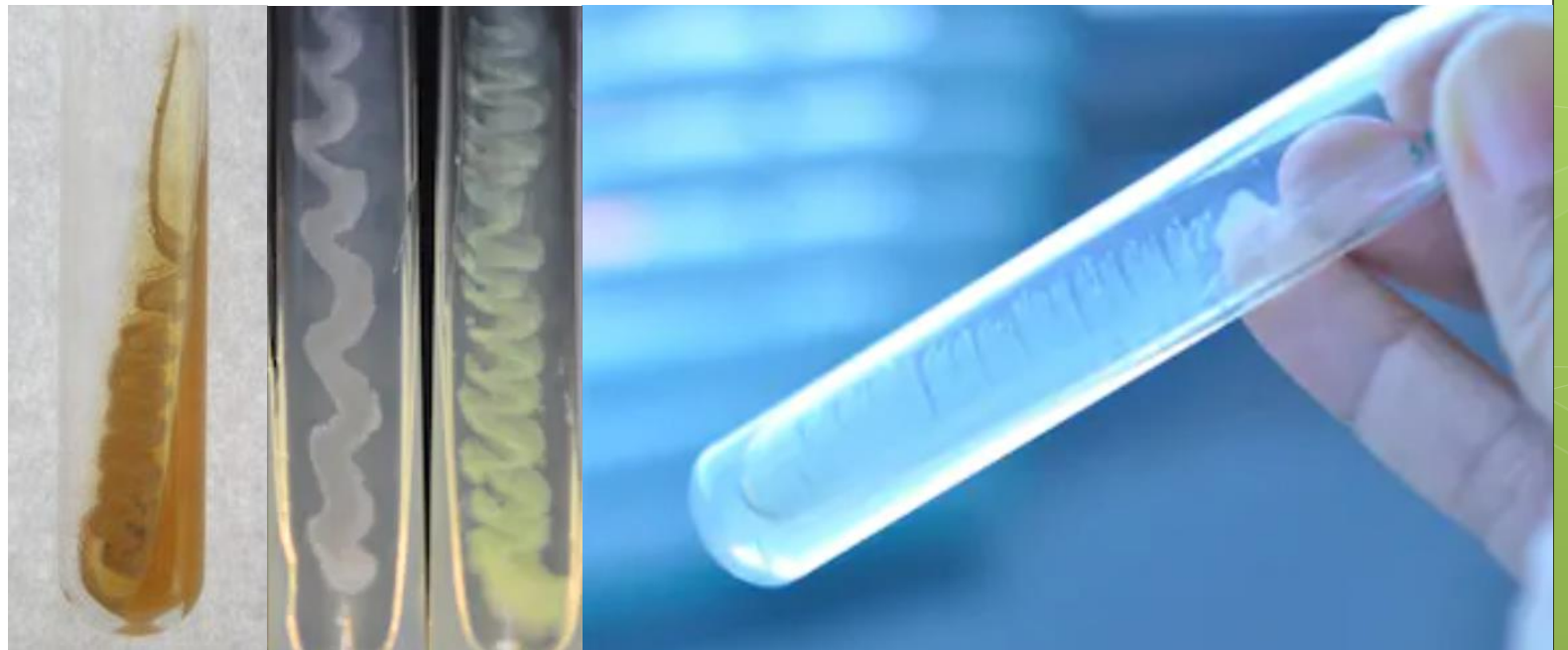
Tekuté půdy

- nevidíme jednotlivé kolonie, nelze tedy prokázat čistotu dané kultury
- hodnotíme charakter růstu
- hodnocení přítomnosti mikroorganismů:
 - **blanka** – špatná smáčivost, u většiny kultur tvořících drsné vrásčité kolonie
 - **zákal** – rovnoměrný růst v celém objemu média
 - **vločky** – aerobní kultury
 - **sediment** – fakultativně anaerobní mikroorganismy
 - **zbarvení** = tvorba pigmentu



Šikmý agar

- nezískáme jednotlivé kolonie
- hodnotíme rychlost růstu a tvar, povrch a profil nátěru či tvorbu pigmentu



Podklady pro vyhodnocení protokolu

– fotky k úkolům

Serratia marcescens



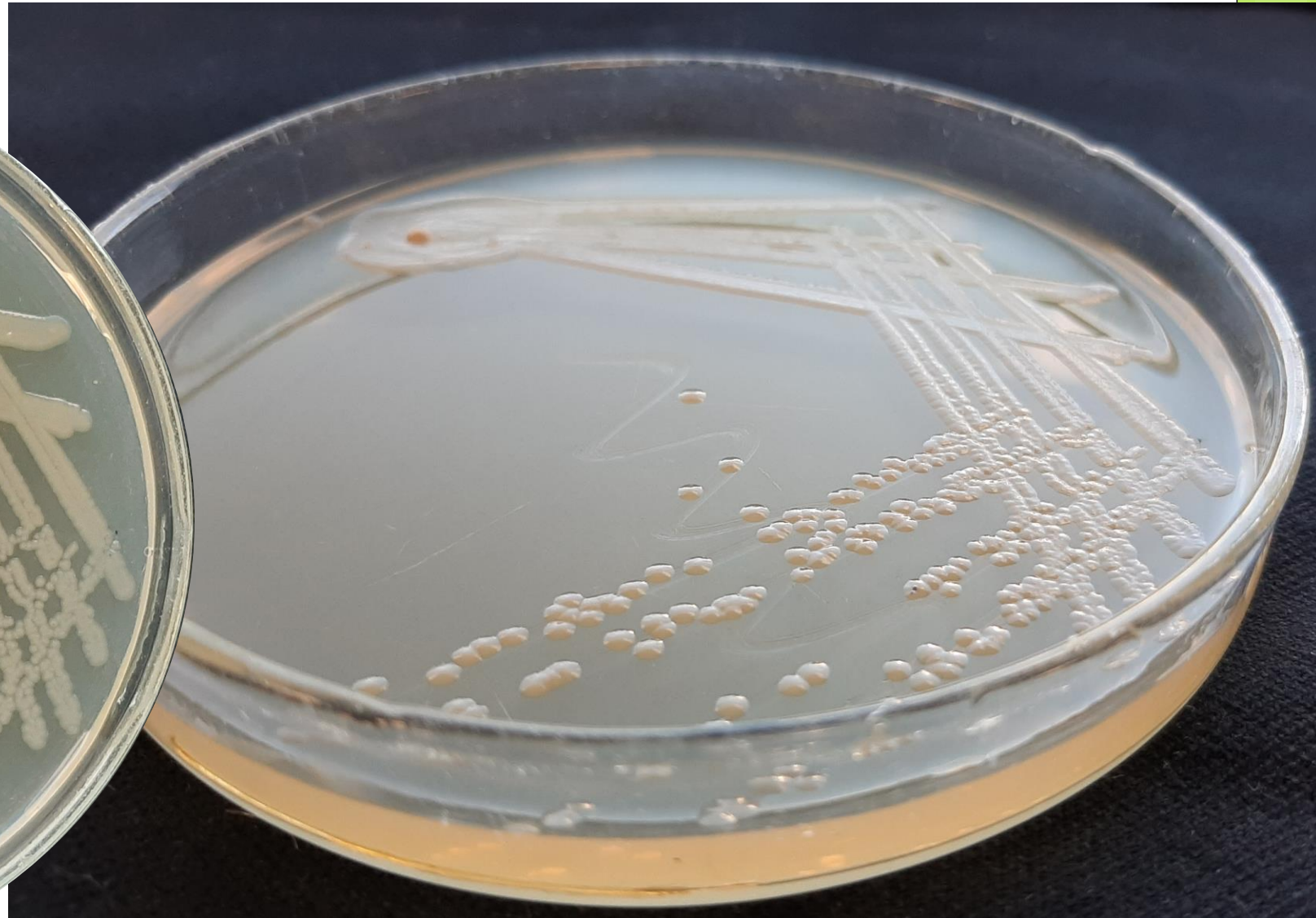
Bacillus cereus



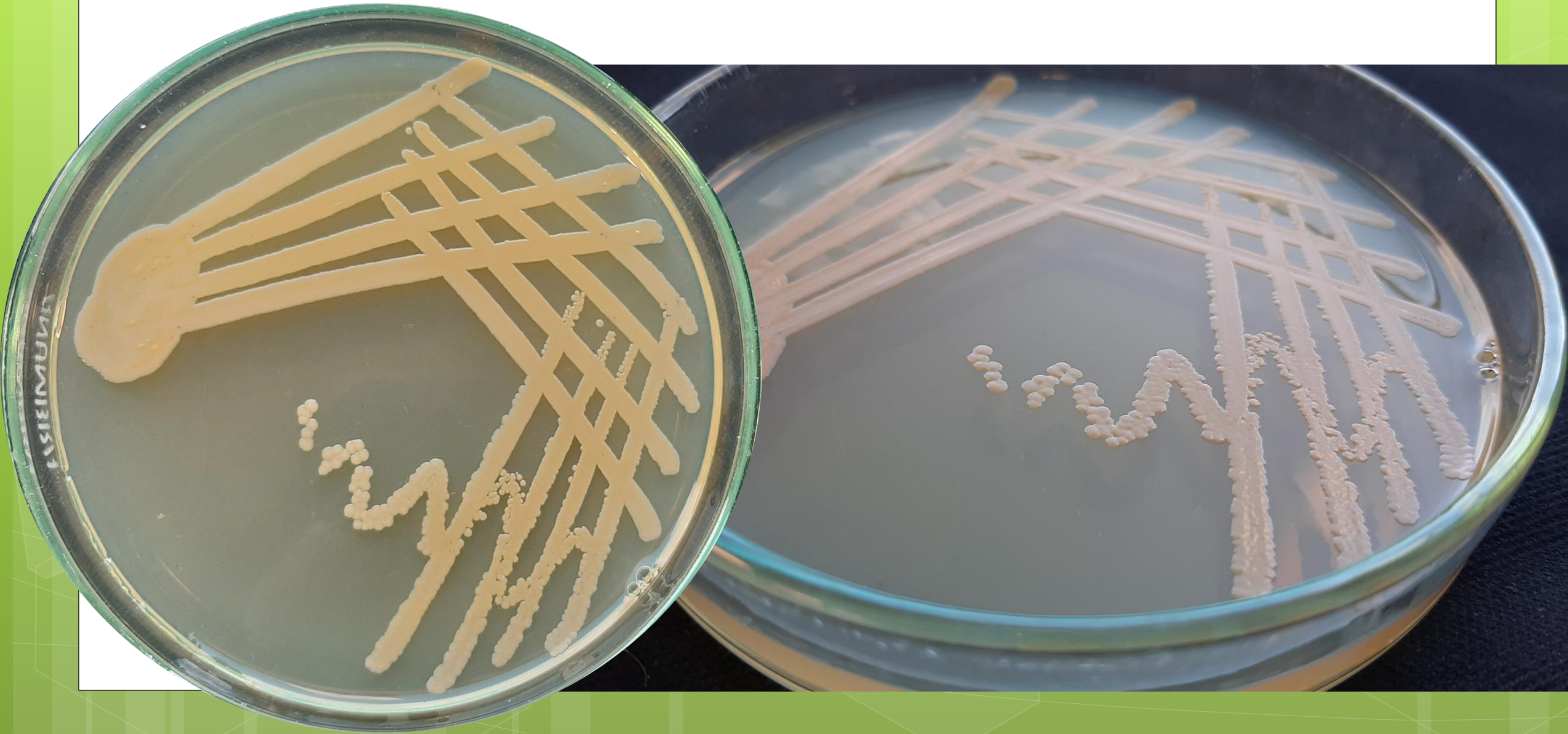
Escherichia coli



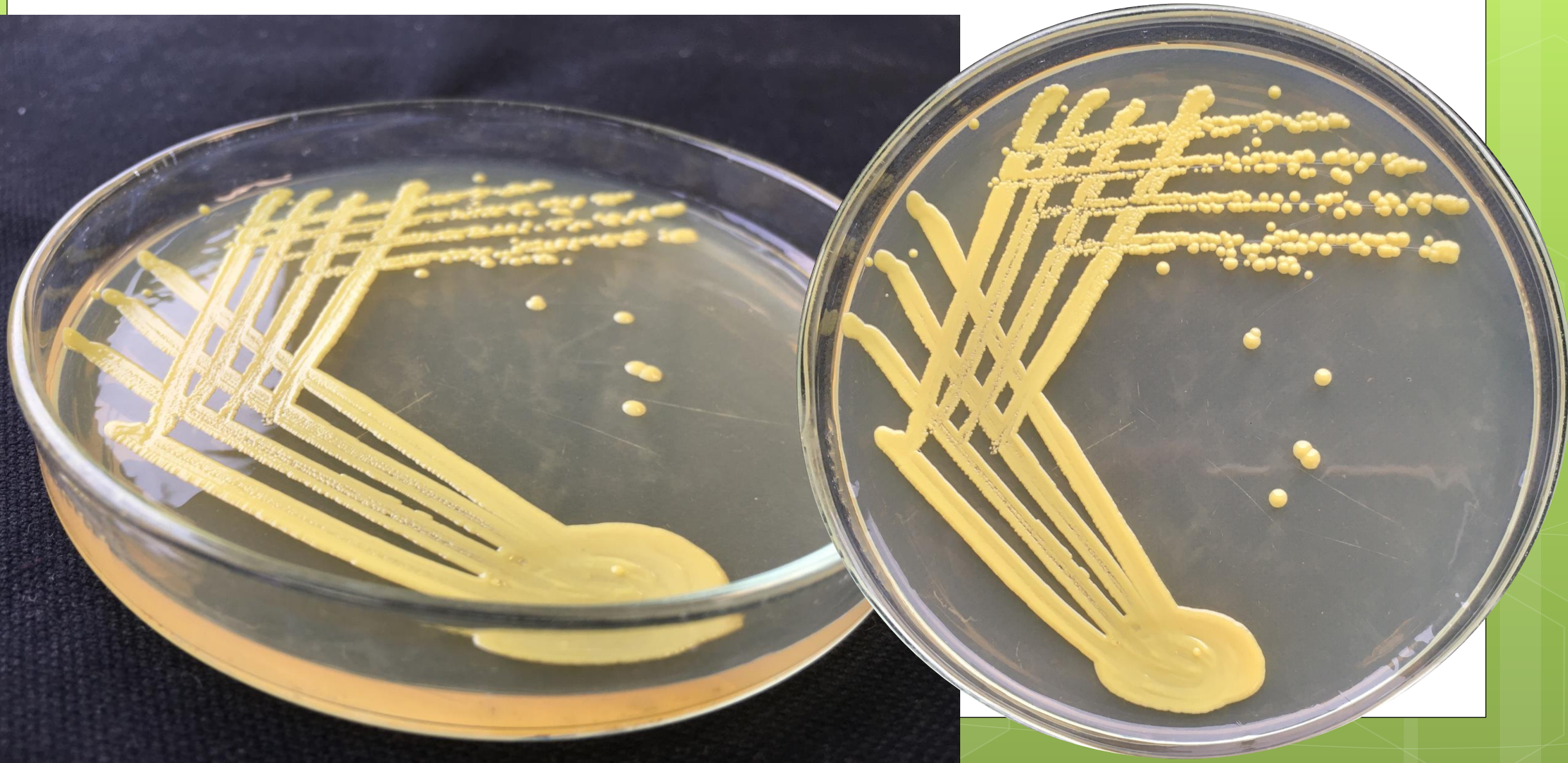
Pseudomonas fluorescens



Staphylococcus aureus



Micrococcus luteus



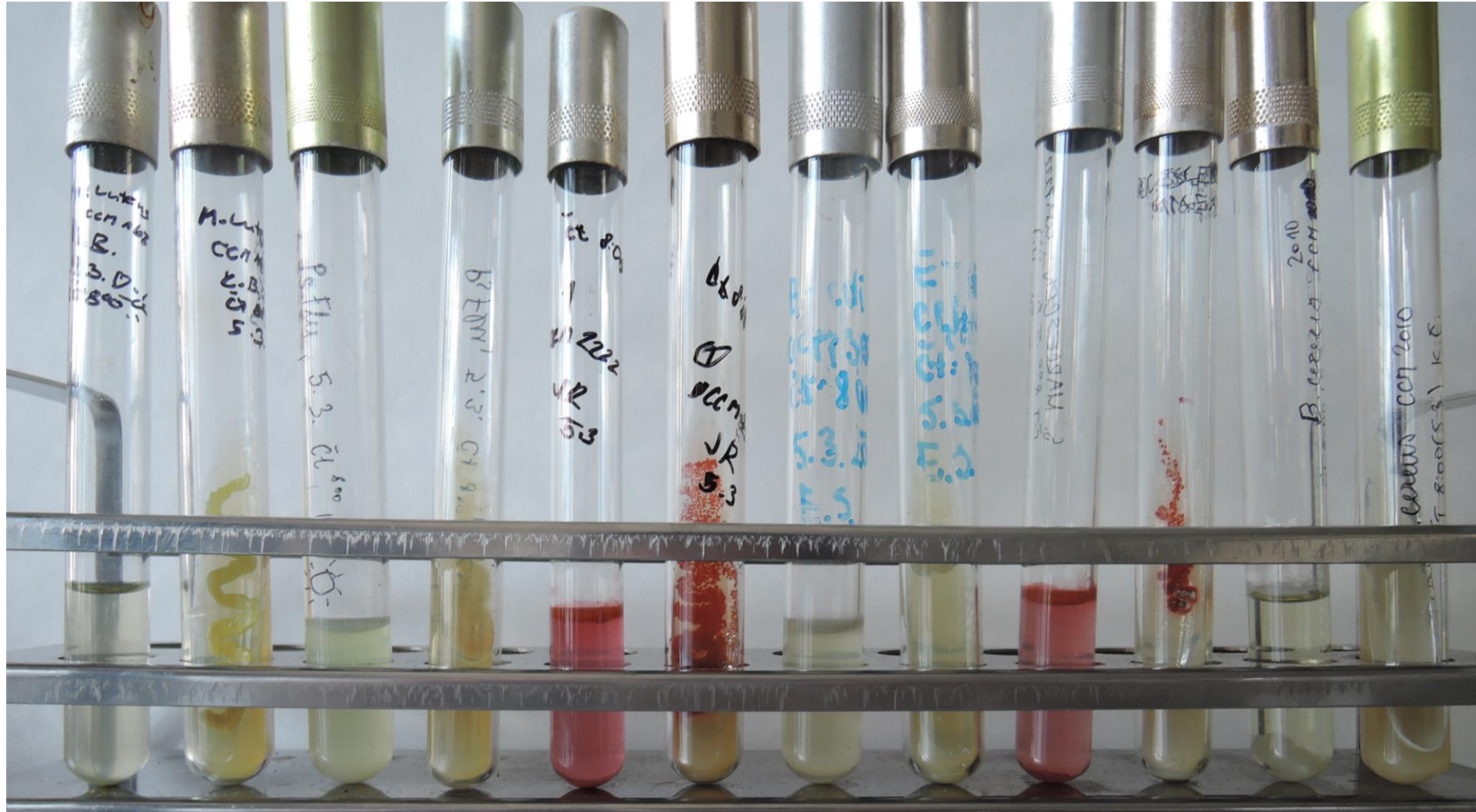
Kocuria rosea



Saccharomyces cerevisiae



Výsledky – tekuté médium a šikmý agar



*Micrococcus
luteus*

*Pseudomonas
fluorescens*

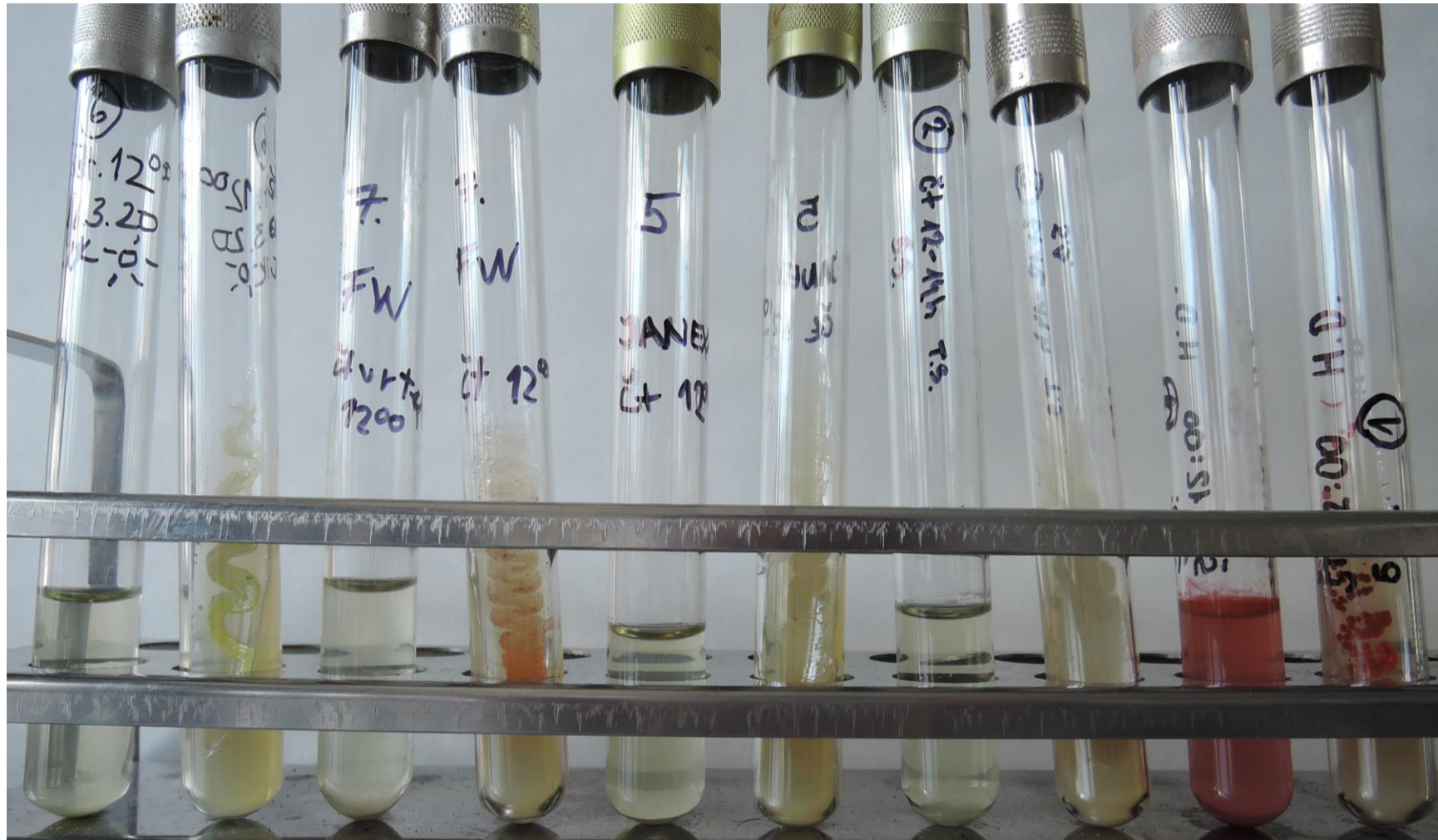
*Serratia
marcescens*

Escherichia coli

*Serratia
marcescens*

Bacillus cereus

Výsledky – tekuté médium a šikmý agar



*Micrococcus
luteus*

Kocuria rosea

*Staphylococcus
aureus*

Bacillus cereus

Serratia marcescens

Výsledky – tekuté médium a šikmý agar



Kocuria rosea

Saccharomyces cerevisiae

Serratia marcescens

Bacillus cereus

Micrococcus luteus

Serratia marcescens

Výsledky – 4 druhy MO na Petriho misce



KŘÍŽOVÝ ROZTĚR SMÍŠENÉ KULTURY

Serratia marcescens a *Saccharomyces cerevisiae*

