

**MUNI**  
**SCI**

# **Metody sterilní práce Očkování a uchovávání mikroorganismů**

Jaro 2024

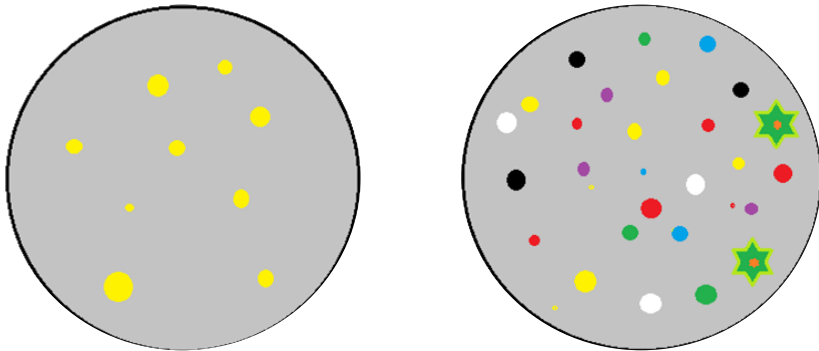
**Masarykova univerzita | Přírodovědecká fakulta**  
Ústav experimentální biologie / oddělení Mikrobiologie  
A: Kamenice 735/5 | 625 00 Brno  
T: [+420 549 49 5186](tel:+420549495186) | M: [+420 777 812 976](tel:+420777812976)  
E: [kucerovaj@sci.muni.cz](mailto:kucerovaj@sci.muni.cz) | W: [sci.muni.cz/mik](http://sci.muni.cz/mik)

# Bakteriální druh

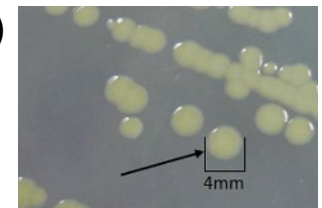
- jasně vymezená skupina **navzájem příbuzných kmenů**, zahrnujících typový kmen
- bakteriální kmeny jednoho druhu mají **průměrnou nukleotidovou identitu 95 - 96% (Average Nucleotide Identity, ANI)**
- druh vykazuje, až na výjimky, **shodné** fenotypové znaky a současně má některé **odlišné** znaky od jiných bakteriálních druhů

# Kultura

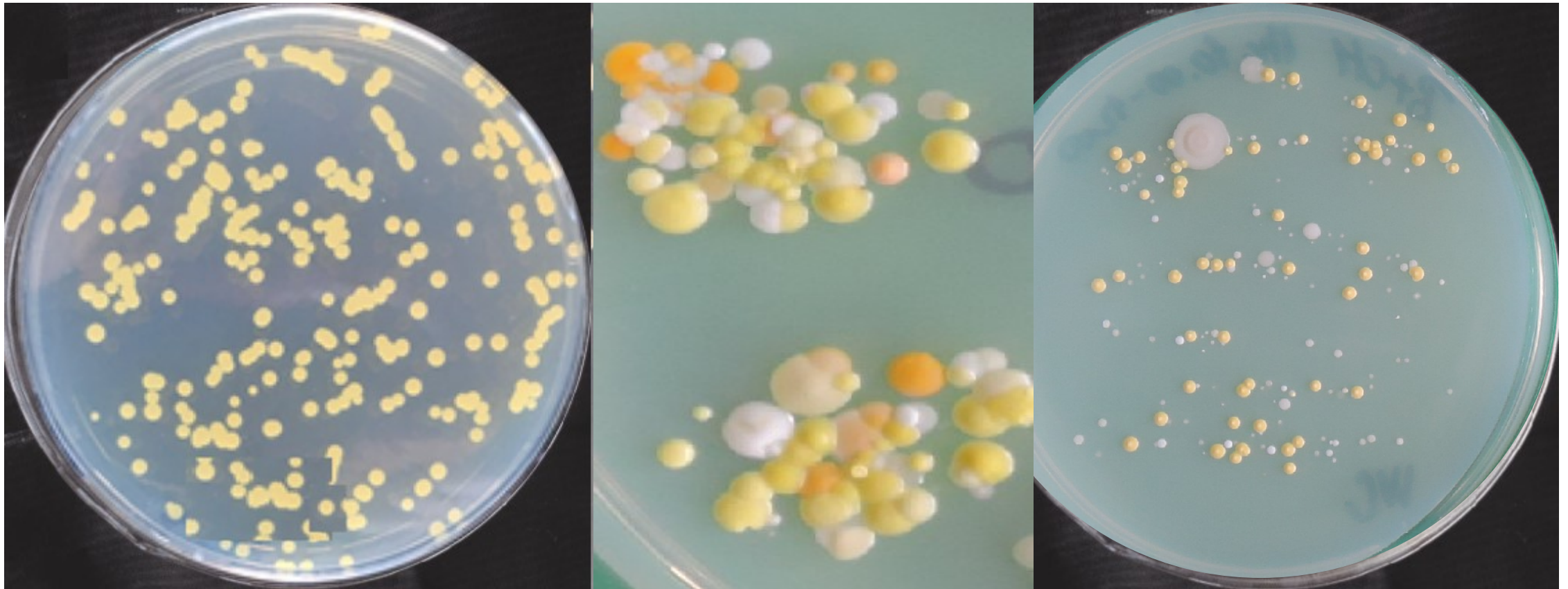
- odhaduje se, že pouze **2 % všech mikroorganismů** jsou kultivovatelná v laboratorních podmínkách na živných médiích
- **čistá kultura** (jeden druh) x **smíšená** (několik druhů) x **technická** (výzkum, provoz)



- **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



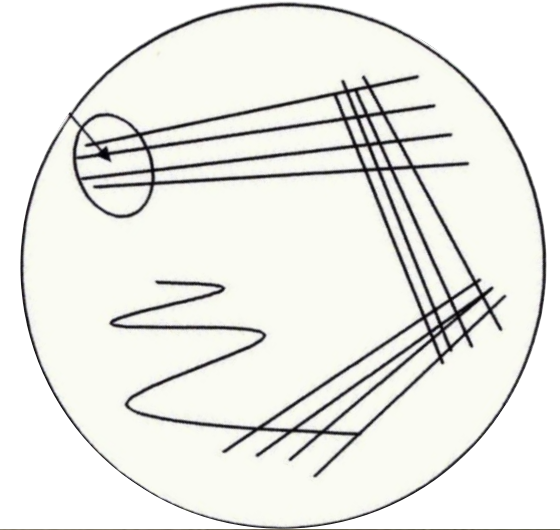
# Čistá kultura x smíšená kultura



# 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



# 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**

# 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)
- **Viry** – kultivace na **tkáňových kulturách**, fágy na nárůstu bakterií
- Intracelulární **paraziti** – buněčné kultury

# Půdy pro růst mikroorganismů

- **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



# Půdy pro růst mikroorganismů

- 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



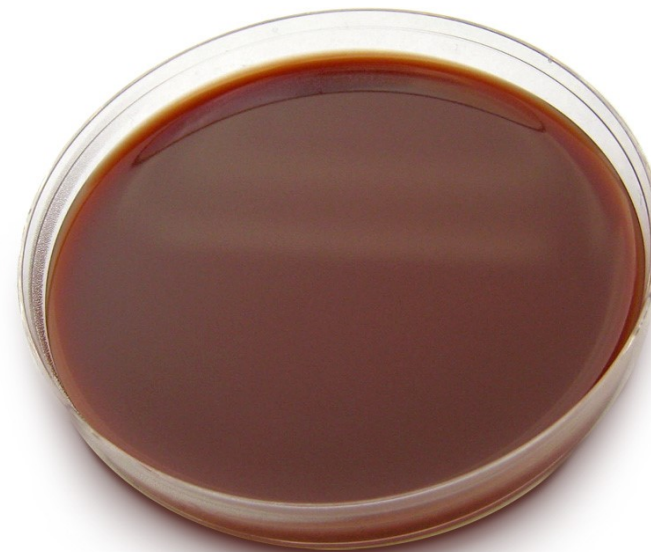
**Živný (masopeptonový) agar (ŽA, MPA)** - Základní směs - bujónem a peptonem s agarem. Pěstují se na něm nenáročné bakterie. Obvykle se používá spíše jako základ pro přípravu složitějších půd.

Krevní – 5-10% savčí krve



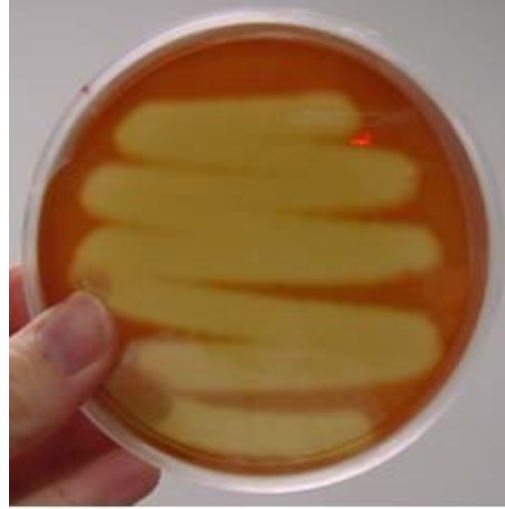
**Krevní agar (KA)** Je nejpoužívanějším pevnou půdou, vyrábí se přidáním beraních krvinek k chladnucím agaru (56°C). Slouží pro zachycení Gram + bakterií. Je částečně diagnostickou půdou - mohou se na něm projevit hemolytické vlastnosti bakterie.

Čokoládový – zlyzované krevní buňky

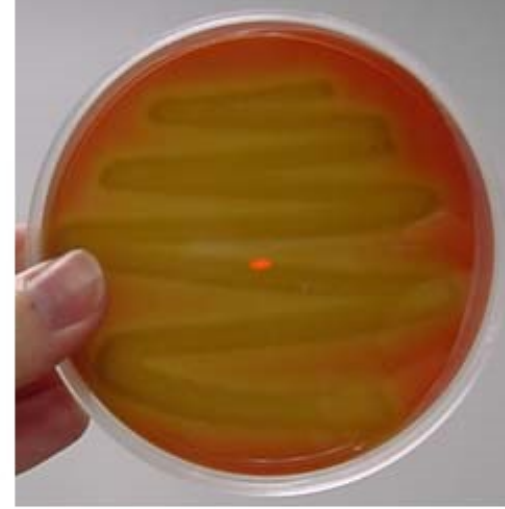


**Čokoládový agar (ČA)** Vyrábí se podobně jako KA přidáním beraních krvinek k agaru (ten má však vyšší teplotu 80°C) - a tak dojde k hemolýze. Ta způsobí čokoládové zbarvení. Používá se pro pěstování náročnějších bakterií jako jsou *Neisserie* a *Hemofily*. Hemolýza je porušení cytoplazmatické membrány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

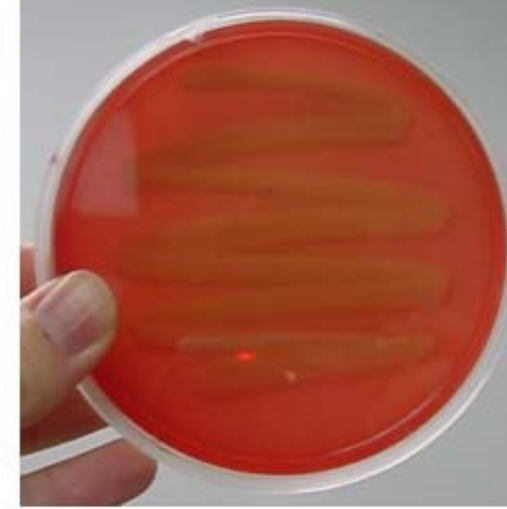
# Hemolýza



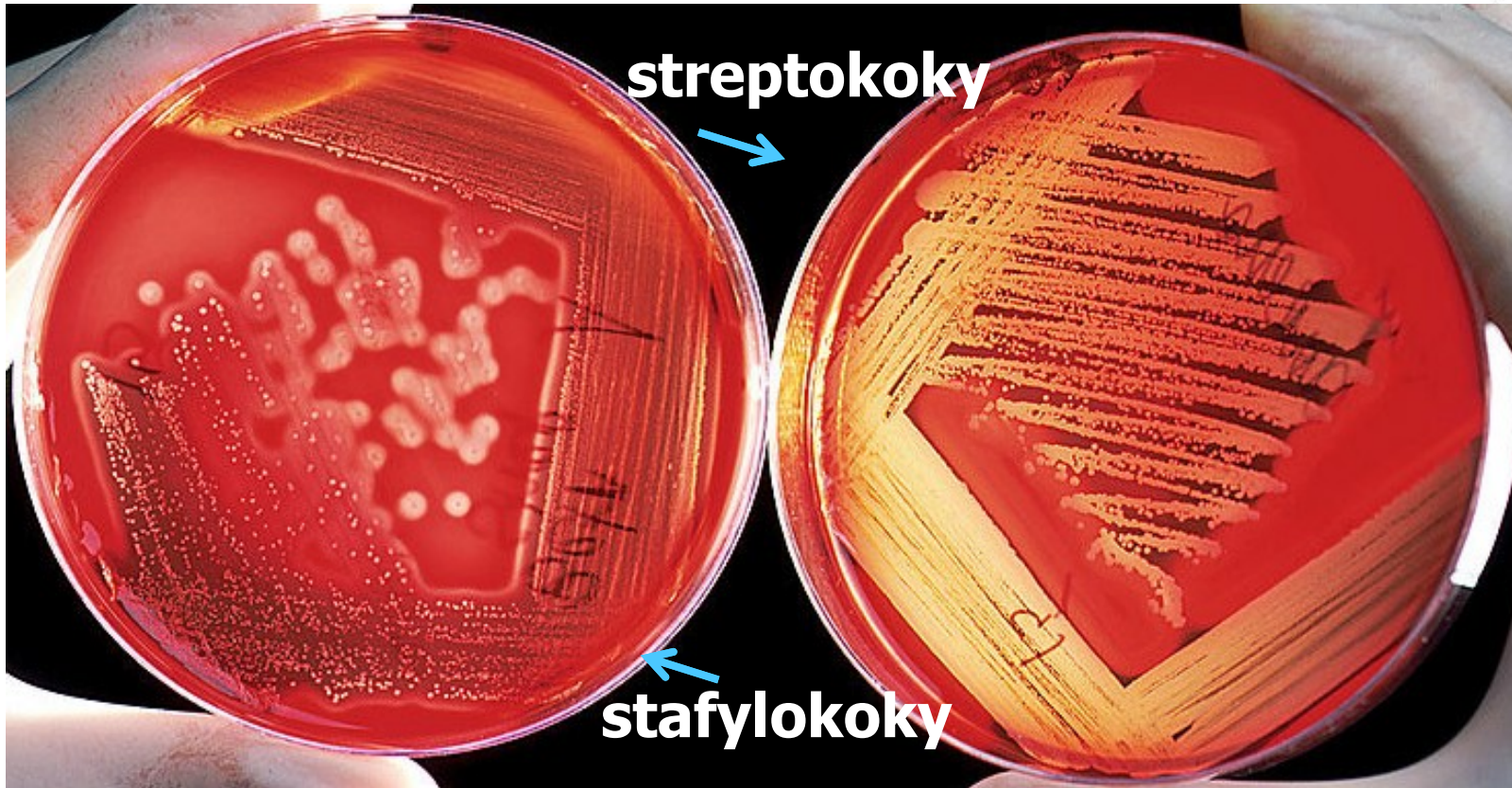
Beta Hemolysis



Alpha Hemolysis



Gamma Hemolysis



streptokoky

stafylokoky

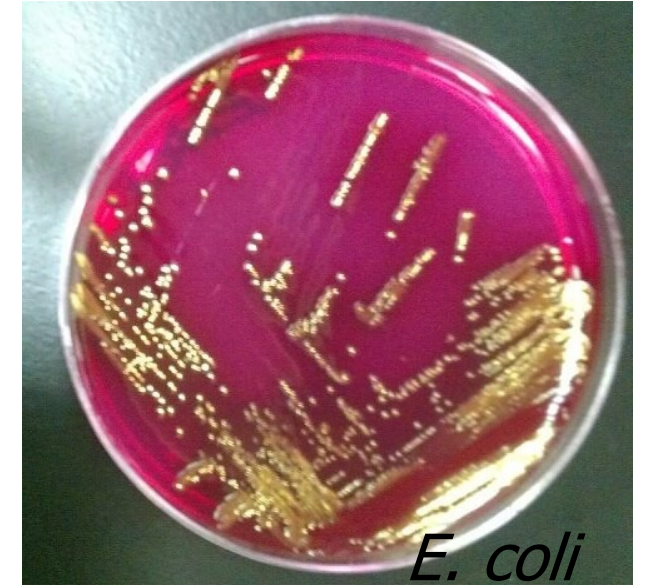


# Endův agar

## Endova půda

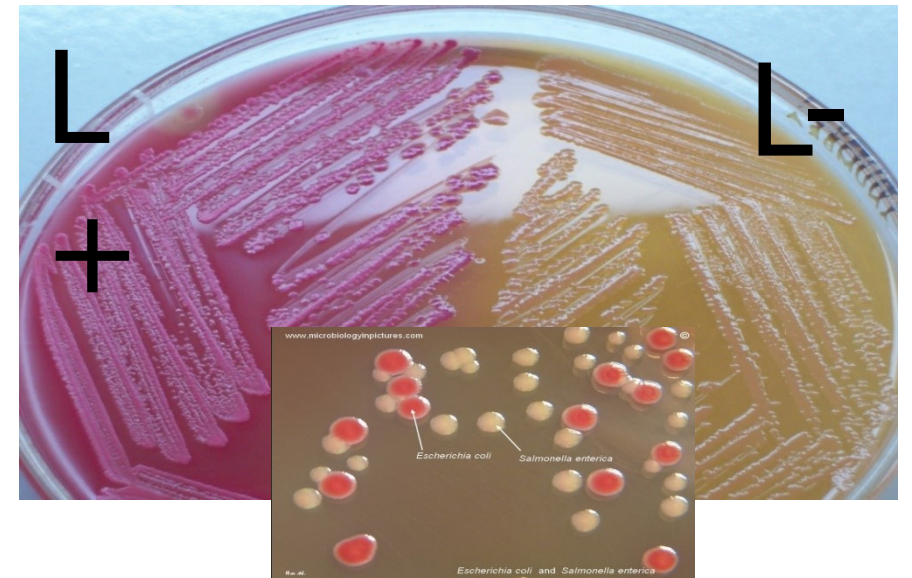
je světle růžová a na světle dále růžoví, **nerostou** na ní **G+** bakterie

► Pro koliformní bakterie



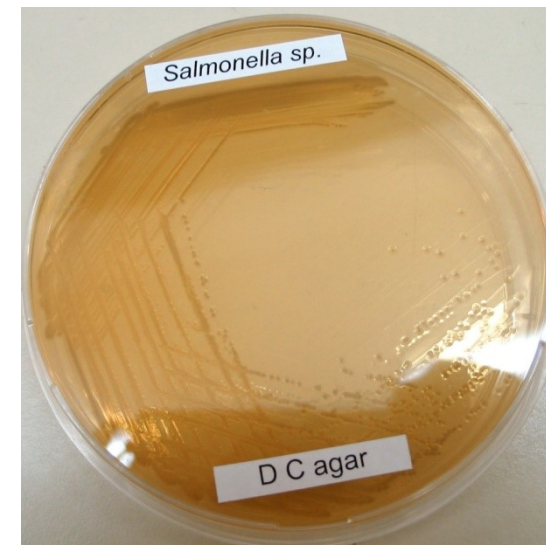
# MacConkey agar

- 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*



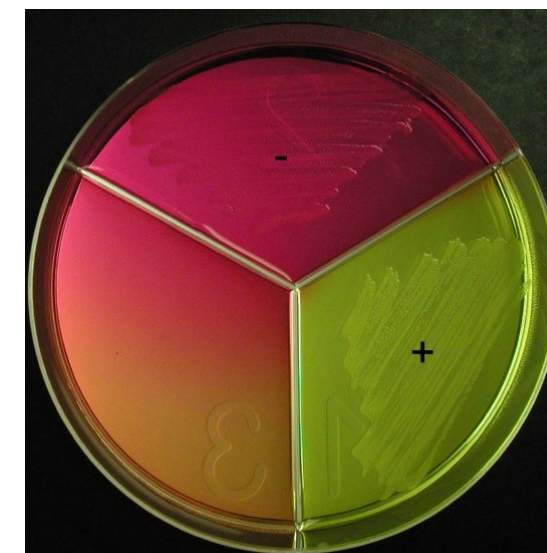
# Deoxycholát – citrátový agar

- Inhibiční složku v médiu tvoří **žlučové soli**, avšak ve vyšší koncentraci než v MCA.
- DCA je zvláště vhodný **pro izolaci salmonel a yersinií**. Podobný je Salmonella-Shigella agar



# Agar s brilantovou zelení

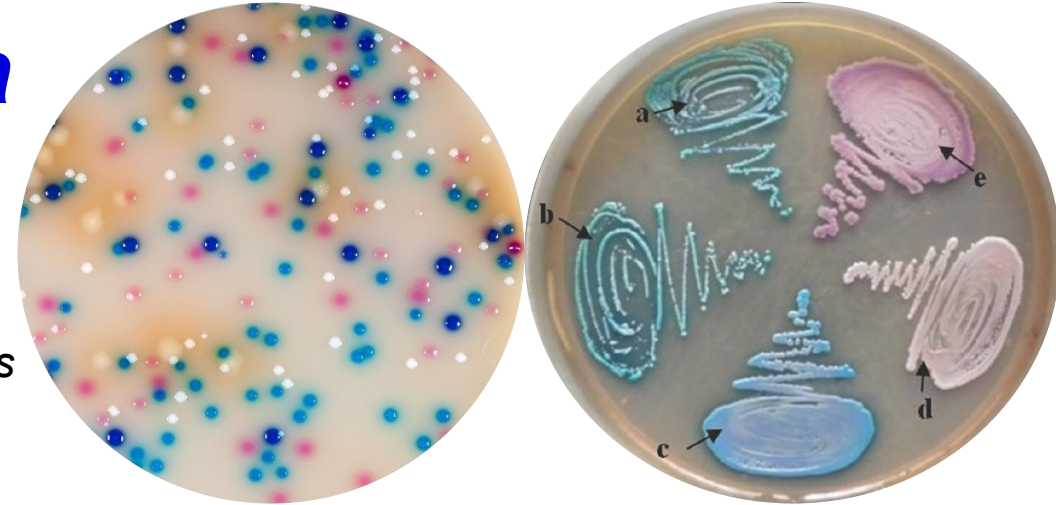
- Inhibiční složkou je **brilantová zeleň**, indikátorem pH **fenolová červeň**.
- Používá se hlavně pro selektivní izolaci **salmonel**.



# Chromogenní půdy - *Candida*

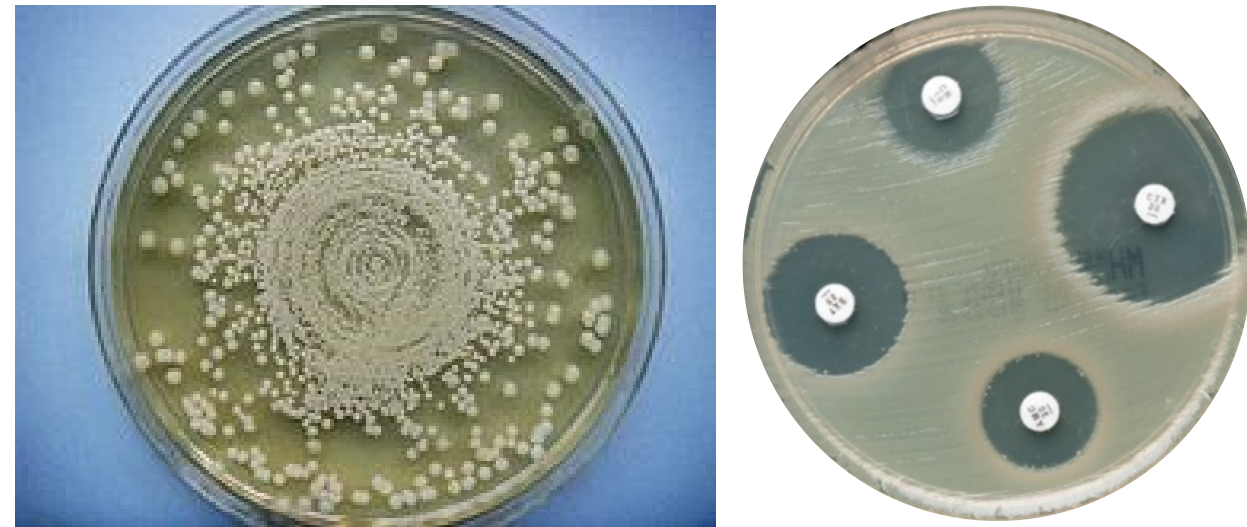
- Chromogenní půdy dokáží odlišit jednotlivé mikroby na základě specifické barvy jejich kolonií

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.



# Polotuhý agar, *Proteus*

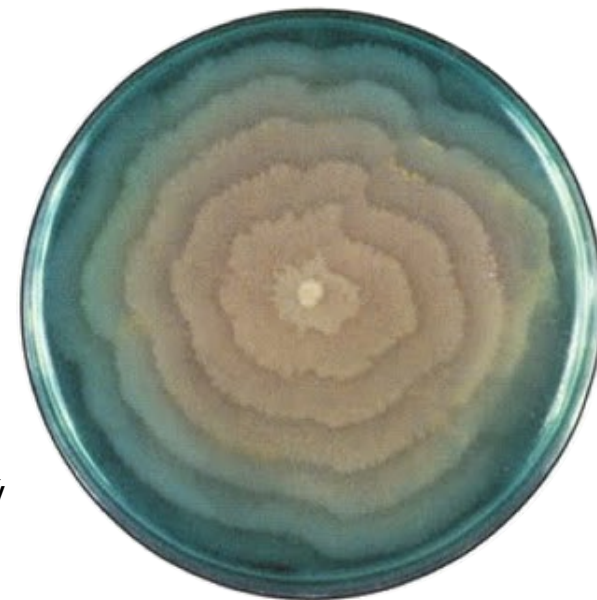
Polotuhé médium vhodné pro *Proteus mirabilis*

*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 CO<sub>2</sub>** a **sirovodíku**
- Substrátem pro tvorbu H<sub>2</sub>S je **tiosulfát sodný** a indikátorem **citrát železito-amonný**. Sirovodík vytvořený redukcí tiosulfátu reaguje s ionty železa za vzniku sulfidu železitého.
- **Produkce H<sub>2</sub>S se projeví zčernáním spodní části půdy.**



# 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
  - *Pseudomonas* (např. *Pseudomonas fluorescens*)

# Další vybrané nároky

- nároky na **tlak** – barofilní, barotolerantní
- nároky na **živiny**
- **zdroj uhlíku**
  - **heterotrof** – organické látky (živočichové, houby,..)
  - **autotrof** – CO<sub>2</sub> (anorg. látky)
- **zdroj energie**
  - **fototrof** –světelná energie (rostliny, řasy,..)
  - **organotrof** – organické látky
  - **litotrof** – anorganické látky
- nároky na **redoxpotenciál, pH**

# Vztah mikroorganismů ke kyslíku

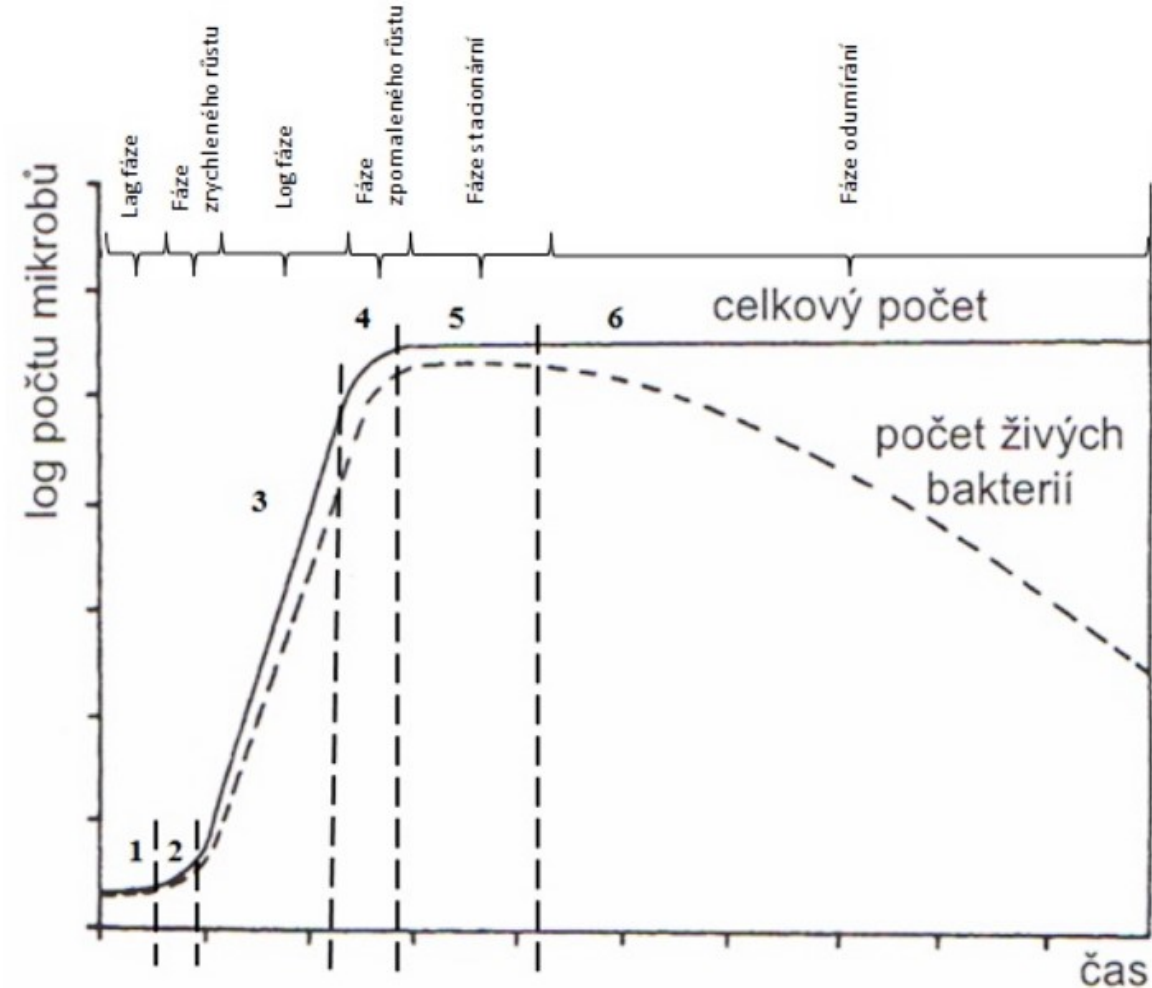
- aerobní
- **fakultativně anaerobní** (aerobní prostředí je pro ně výhodnější energeticky, ale nevadí jim anaerobní prostředí)
- **anaerobní**
  - **striktně/Obligátně anaerobní** (kyslík je zabíjí)
  - **aerotolerantní** (přežijí nízké koncentrace kyslíku)
- **mikroaerofilní** – potřebují určité nízké % O<sub>2</sub>



# 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**
- polyauxie (I.,II.,III.,....)

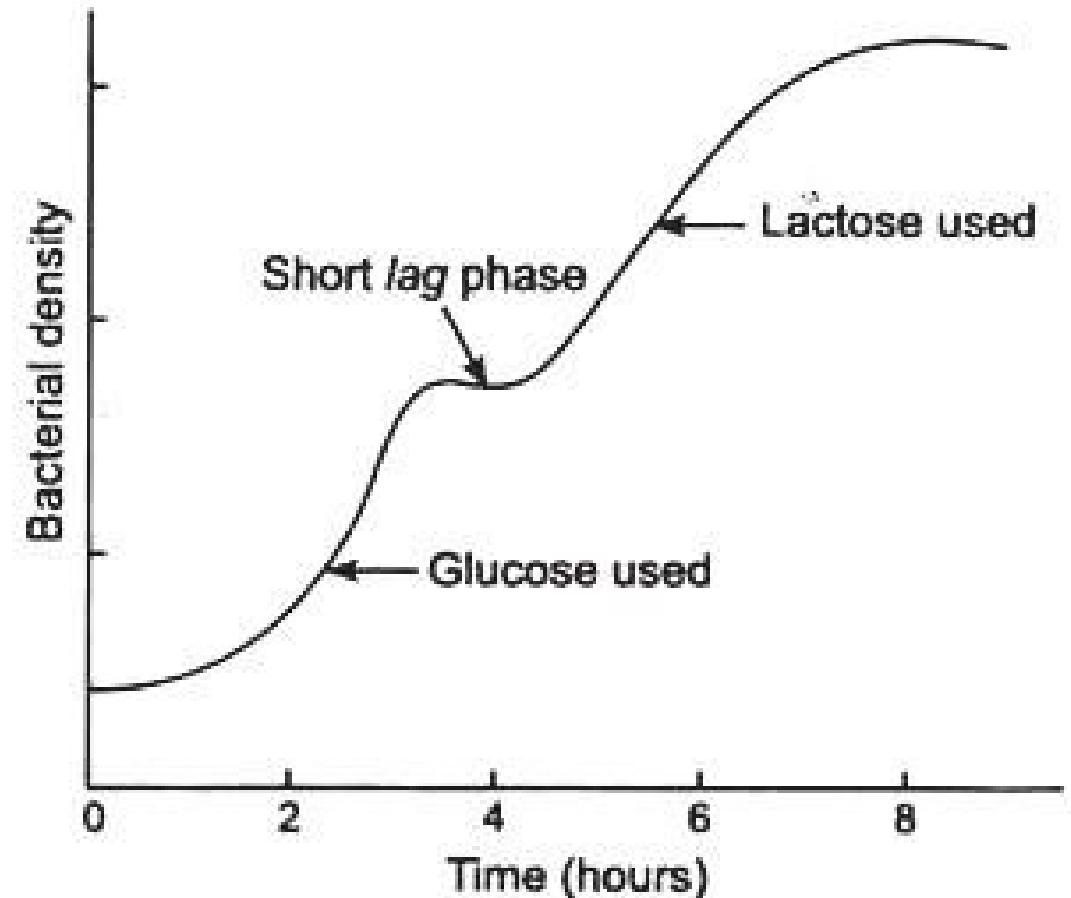


FIG. 19.3. Diauxic or diphasic growth curve of *E. coli* grown with a mixture of glucose and lactose. Glucose is first used, then lactose. A short lag phase in diauxic growth is present during which the bacterium synthesizes the enzymes needed for use of lactose.

# Uchovávání bakterií

- je nutné zajištění životaschopnosti
- Petriho miska (4 °C: 1t – 2m)
- ve zkumavce na šikmém agaru (4 °C: týdny, ve vpichu: měsíce)
- **lyofilizované** – lyofilizace = vymražení vody ve vakuu sublimací vody
- **kryoprezervace** – zmražení na – 80 °C po malých objemech v **hlubokomrazicím boxu** (měsíce, roky)
  - boxy s pevným CO<sub>2</sub> – **suchý led (-78 °C)**
  - zamražení kultur v **tekutém dusíku** (až -196 °C) uchovávání neomezeně dlouho

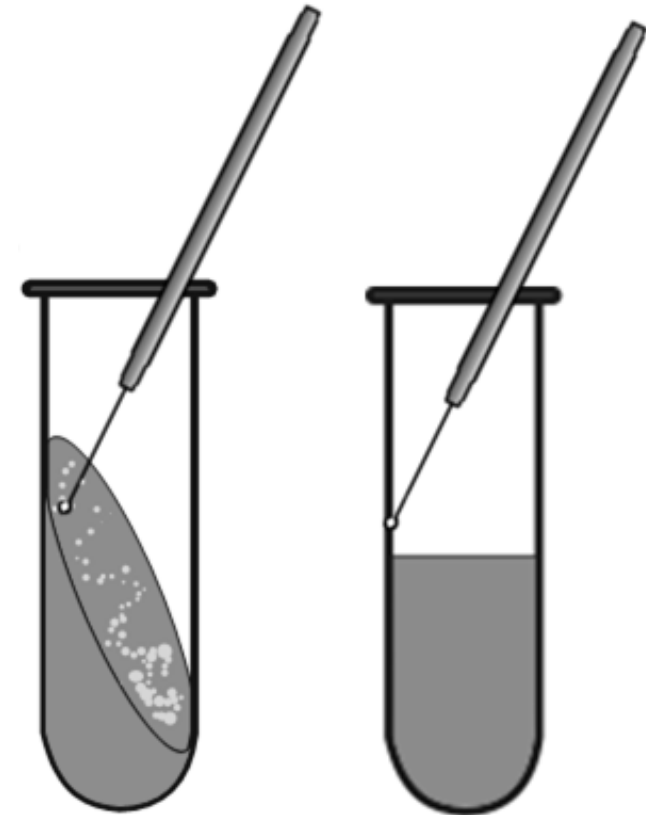


# Postup

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

# Tekuté půdy

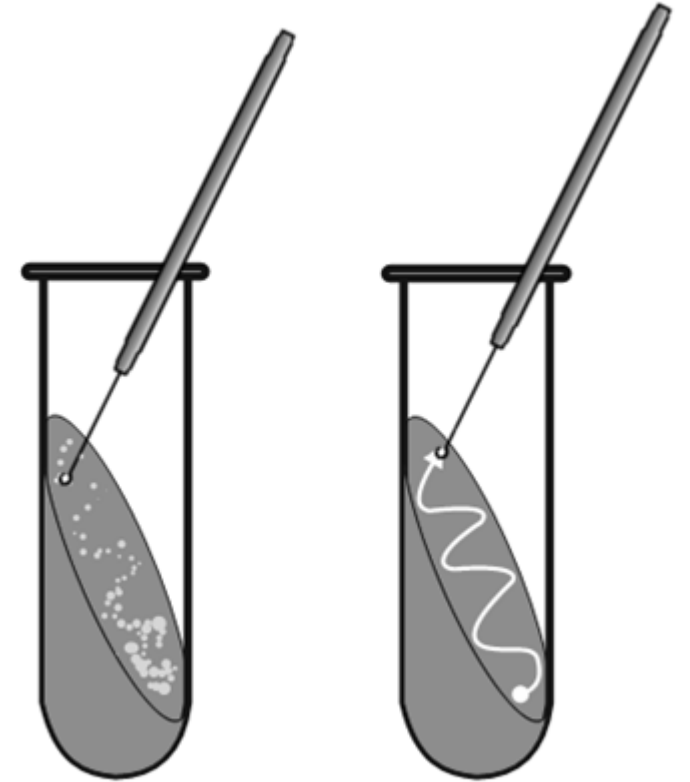
- **popsat** zkumavku
- zapnout **kahan**, ožíhat **kličku**, nechat vychladnout
  - ! nebezpečí spálení MO příliš horkou kličkou
- **nabrat** kulturu – cca ¼ kličky
- malíčkem **otevřít** vršek (malíčkem i vršek držet v dlani), **ožíhat** zkumavku
- kličkou **nanést** kulturu těsně nad okraj hladiny 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





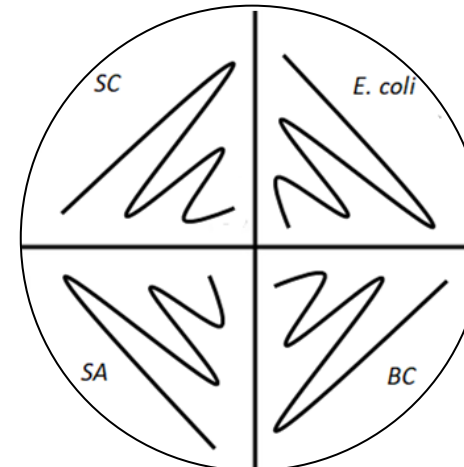
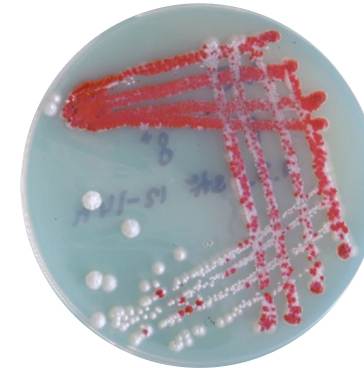
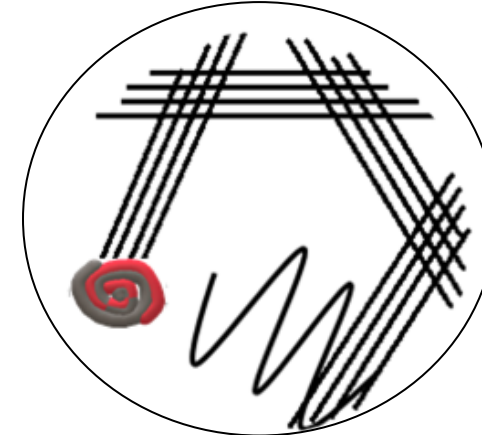
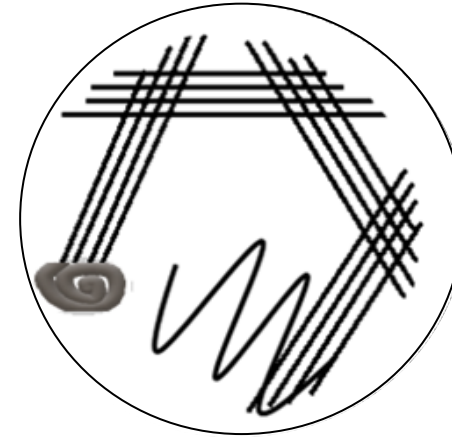
# Šikmý agar

- **popsat** zkumavku
- **vyžít** kličku a nechat vychladnout
- **nabrat** cca  $\frac{1}{4}$  kličky
- malíčkem **otevřít** vršek (malíčkem vršek držet v dlani), **ožít** zkumavku
- kličkou vytvořit „**hádek**“ na šikmý agar odspodu
- ožít zkumavku, zavřít, ožít kličku
- kultivujeme při **30 °C 24 hodin** v termostatu



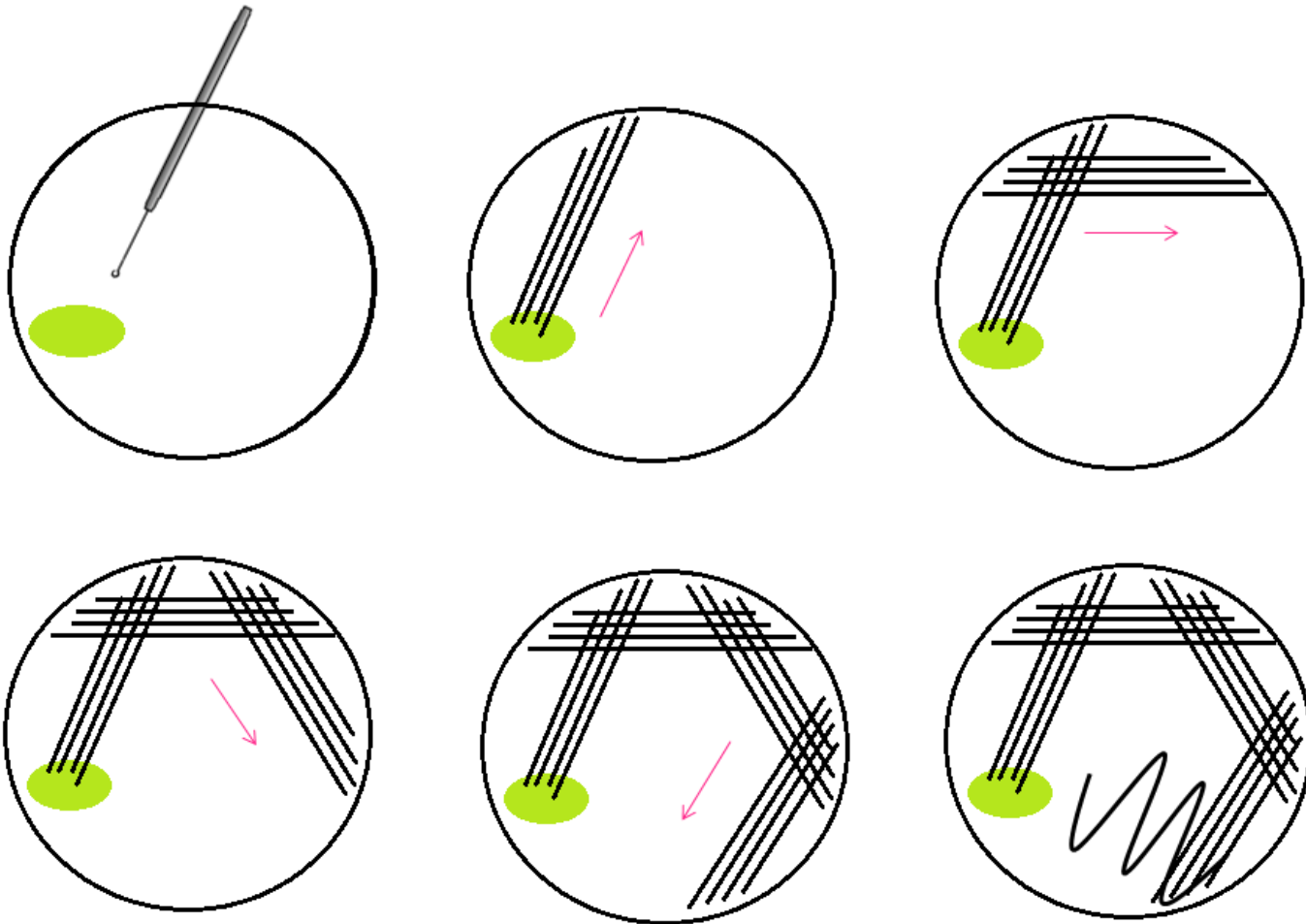
# Petriho misky

- 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



# Křížový roztěr

!!! Ožehnout kličku vždy mezi jednotlivými kroky



# Kultury

- **G-**
  - *Escherichia coli* CCM 3954 (fakultativně anaerobní)
  - *Pseudomonas fluorescens* CCM 2115 (aerobní)
  - *Serratia marcescens* CCM 2222 (fakultativně anaerobní)
- **G+**
  - *Kocuria rosea* CCM 839 (aerobní)
  - *Micrococcus luteus* CCM 169 (aerobní)
  - *Bacillus cereus* CCM 2010 (fakultativně anaerobní)
  - *Staphylococcus aureus* CCM 4028 (fakultativně anaerobní)
- **kvasinky**
  - *Saccharomyces cerevisiae* CCM 8381 (fakultativně anaerobní)