

Skličkové kultury

Sterilní očkování ve FLOW-BOXU – pozor na kontaminaci

Práce s vyžíhanou kličkou, vyžíhanou pinzetou

Sledování morfologie vláknitých struktur, pozorování celé kolonie.

Pro pozorování hyf a rozpadajících se vláken u nokardioformních aktinomycet a streptomycet zhotovujeme sklíčkové kultury. Přímým přenesením kousku mycelia by došlo k porušení struktur a preparát by byl nepoužitelný.

Nokardioformní aktinomycety i streptomycety vytváří charakteristické kolonie: většinou drsný povrch (pozn.: *Rhodococcus* někdy lesklý, zejm.klinické izoláty), vrásčitý, pigmentace. Při kultivaci v tekutém mediu nutná aerace; kultury vytváří shluky (oproti ostatním druhům bakterií – které vykazují rovnoměrný růst v tekutém mediu).

Mikroorganismy:

Rhodococcus erythropolis CCM 277

Nocardia carnea CCM 2756

Streptomyces griseus ssp. *griseus* CCM 3362

Postup:

❖ **Vlhké komůrky – kultivace na podložním sklíčku**

1) Pracujeme ve FLOW-BOXU.

Použijeme sterilních Petriho misek s kuličkami a podložním sklem. Na podložní sklíčko vyžíhaným skalpelem umístíme tenký čtvereček agar (agar dle kultivovaného mikroorganismu, *Nocardia*: medium M8, *Rhodococcus*: medium M12, *Streptomyces*: medium M15). Vyžíhanou kličkou zaočkujeme podél okrajů a překryjeme sterilním krycím sklíčkem 18x18 až 22x22mm. Pod podložní sklíčko, na kuličky, sterilní pasteurkou napipetujeme cca 5ml sterilní destilované vody. Misku popíšeme a kultivujeme při 30°C 3-5dní.

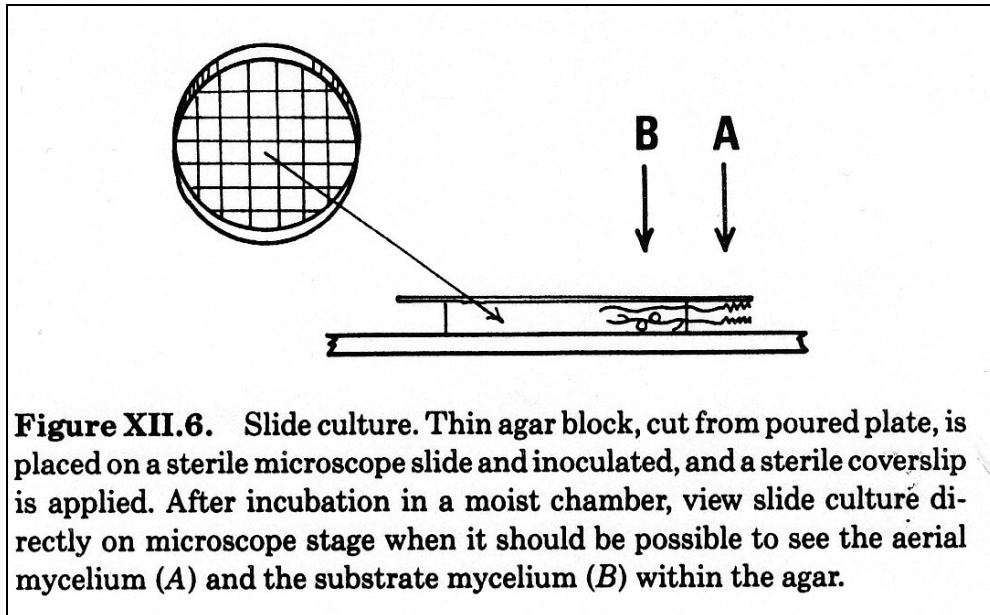
Agar je tenký – substrátové mycelium lze pozorovat pod imerzí – dostatečná průhlednost.

2) Nebo: Horký agar kápnout přímo na podložní sklíčko, po zatuhnutí zaočkovat, Kultivace bez krycího skla

Kultivace 30°C, pozorování 3-5 dní, (někdy: dobře vyvinuté V.M. 7-14dní)

Pozorování: přímo nárůst na sklíčku, zvětšení 200x nebo 400x, Nomarského kontrast

Limitováno: zvětšením



❖ **Kultivace na krycím sklíčku**

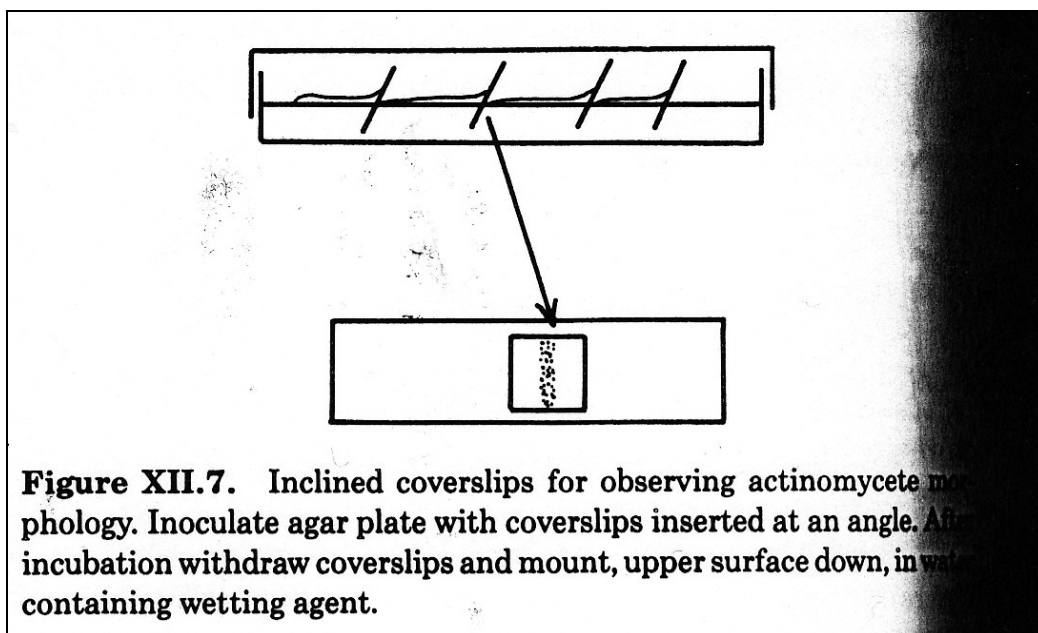
Pracujeme ve FLOW-BOXU.

Medium dle očkovaného kmene - silnější agar na Petriho misce. Do něj vyžihanou pinzetou pod úhlem 45° zapíchne sterilní krycí sklíčko. Kulturu naočkujeme z horní strany podél žlábků.

Substrátové mycelium prorůstá i agar.

Před pozorováním výsledků - po uplynutí 3-5ti dnů - vytáhneme sklíčko a označíme horní i dolní stranu – rozpoznání vzdušného a substrátového mycelia.

Pozorování: sklíčko s narostlou kulturou položíme nárustem dolů na podložní sklíčko. Pozorujeme 1000x pod imerzí, Nomarského kontrast.



❖ **Makrofoto kultivovaných kmenů**

Nokardioformní aktinomycety – skupina obsahující v PG kyselinu meso-DAP:

Nocardia, Rhodococcus, Gordonia, Tsukamurella...

Název odvozen od nestálého mycelia oddělujícího se do kokovitých částic

G+, aerobní. Acidorezistence 2.stupně (mykologové kyseliny; 1% HCl)

Starší kultury: rozpad mycelia. Někteří zástupci (*Nocardia*, některé druhy rhodokoků) tvoří vzdušné mycelium. Někteří tvoří řetízky spor.

Nocardia:

- mírně nebo silně větvená vlákna vegetativního substrátového mycelia
- mycelium se může rozpadat do tyčkovitých až kokovitých částic
- **tvoří vzdušné mycelium**

Rhodococcus:

- tyčinky, někdy silně větvené substrátové mycelium
- vlákna rozpadává do krátkých tyček, koků
- **vyjíměčně vzdušné hyfy**
- **kolonie drsné, ale i hladké, mukózní**
- **pigmentace: žlutohnědá, oranžová, smetanová**

Streptomycety

Streptomyces:

- v b.s. kyselina L-DAP a glycin
- trvalá vlákna, vzácně rozpadává
- větvené mycelium
- spory v řetízcích, nepohyblivé
- neacidorezistentní