

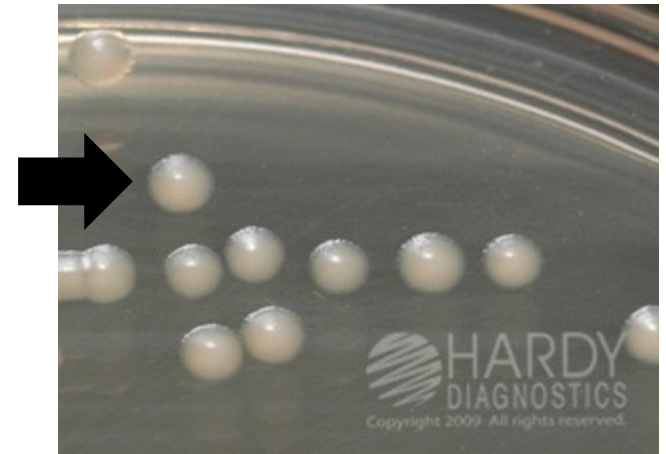
Metody sterilní práce.  
Očkování a uchovávání  
mikroorganismů.

# 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

- ▶ mikroorganismy kultivované v laboratorních podmínkách na živných médiích
- ▶ **Čistá** (jeden druh) x **smíšená** (několik druhů) x **technická** (výskum, provoz)
- ▶ **Přeočkování** – 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 – vyroste jen daný taxon
- ▶ Metoda izolace = **Křížový roztěr**
  - ▶ postupné zředování původní kultury za účelem zisku jednotlivých kolonií (klony jedné buňky). V místě hádku – rostou už jen jednotlivé kolonie (kmény), 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**



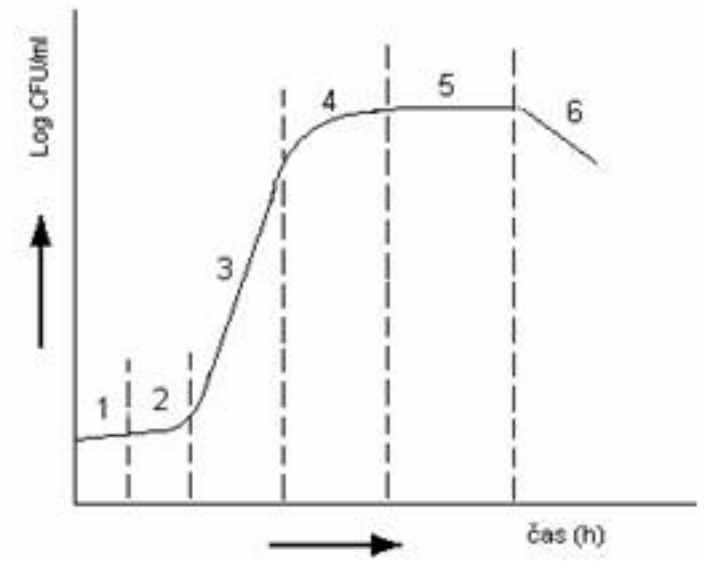
# Vztah MO ke kyslíku

- ▶ **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



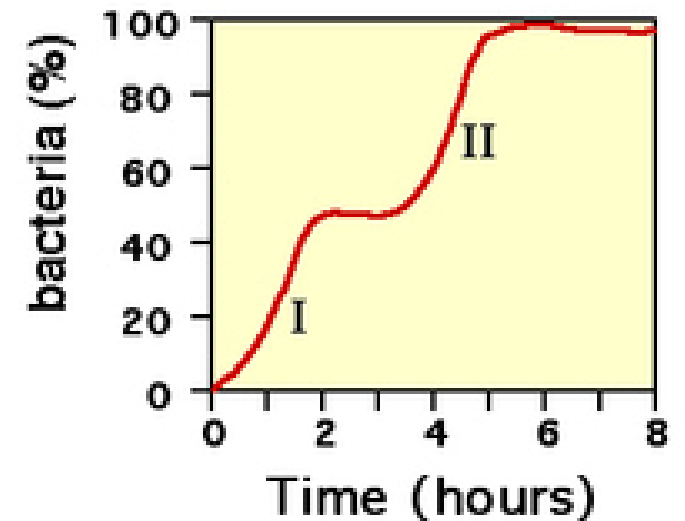
# Růstová křivka

- ▶ 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

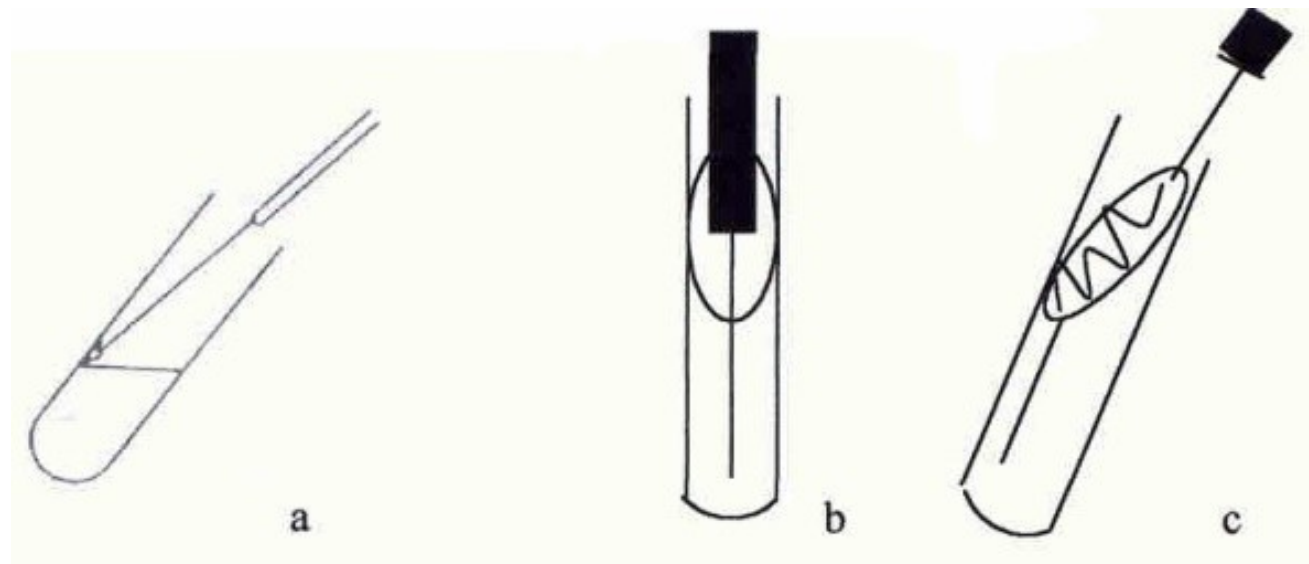
- ▶ **Všechny zkumavky i Petriho misky popíšeme fixou (druh, kmen, datum, své iniciály).**
- ▶ **Aseptická práce!! Žíhat hrdla a kličky!!! Misky otvírat co nejméně!!!**
- ▶ **Každý pracuje sám – 3 misky, 1 šikmý agar, 1 tekuté médium**

# 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)

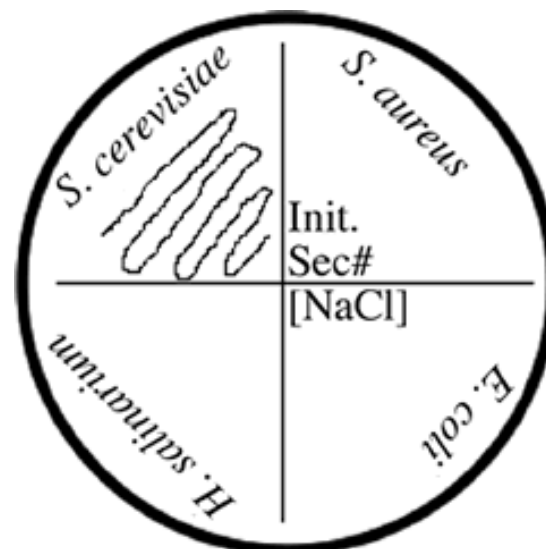
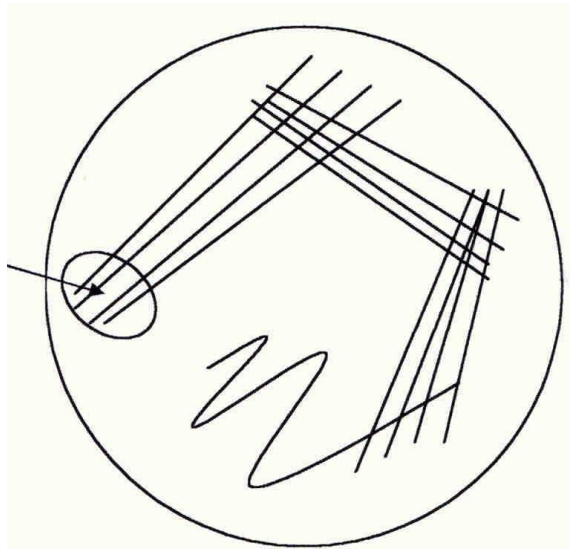
# Šikmý agar:

- ▶ Popsat sklo
- ▶ Vyžíhat kličku a nechat zchladnout
- ▶ Nabrat  $\frac{1}{4}$  kličky
- ▶ Malíčkem vršek, ožíhat zkumavku
- ▶ „hádek“ na šikmý agar odspodu



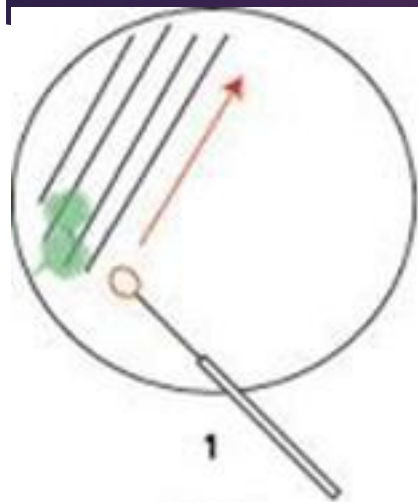
# Petriho misky

- ▶ 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

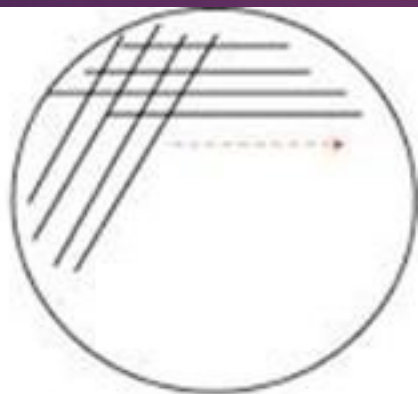




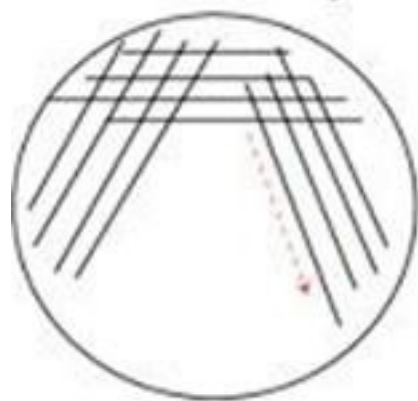
# Křížový roztěr



1



2



3



4



# Kultury

## ▶ G-

- ▶ • *Escherichia coli* CCM 3954 (fakultativně anaerobní)
- ▶ • *Pseudomonas putida* (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)