

**Otázka:** Kultivace mikroorganismů

**Předmět:** Biologie

**Přidal(a):** weru13

### 1) Živné půdy

Živné půdy (media) používaná pro kultivaci MIO musí vyhovovat všem nárokům daného mikroorganismu na výživu, pH, osmotický tlak a další fyz.-chem. podmínky.

#### Vlastnosti ŽP:

- Dostatek vody – životní pochody probíhají ve vodném prostředí
- Zdroj energie – shodný se zdrojem uhlíku, u fototrofních MIO je nahrazen světlem
- Zdroj uhlíku:
  - cukry
  - organické kyseliny
  - alkoholy
  - CO<sub>2</sub> pro autotrofy
  - bílkoviny
- Zdroj dusíku: NH<sub>4</sub><sup>+</sup>
  - NO<sub>3</sub><sup>-</sup>
  - aminokyseliny
  - peptony (částečně hydrolyzované bílkoviny)

- bílkoviny
- Ostatní biogenní prvky - ve formě solí
- Specifické látky:
  - nadbytek  $\text{SO}_4^{2-}$  pro bakterie redukující sírany
  - vitaminy, aminokyseliny,...

### Druhy ŽP:

- **Přírodní** - mléko, plátky mrkve nebo brambor, kokosové mléko,...
- **Umělé** - obsahují výtažky přírodních látek:
  - sladový výtažek
  - výluh ze sladových klíčků
  - kvasničný autolyzát (yeast extract)
  - zahuštěné máčecí vody z výroby kukuřič.škrobu (corn steep liquor)
  - masový výtažek (beef extract)
  - hydrolyzát kaseinu
- **Syntetické**: používají se chemikálie s vysokým stupněm čistoty,
  - je známo přesné chemické složení,
  - k rozpuštění složek se používá destilovaná voda

### Podle konzistence dělíme ŽP:

- **Tekuté** - mléko, masopeptonový bujon, sladina
- **Ztužené** - agarem, želatinou
- **Tuhé** - mrkev, brambor

### Podle účelu ŽP dělíme na:

- **Všeobecné** - rozmnožují se na nich velké skupiny MIO (Př. Masopeptonový agar pro bakterie, sladinný agar pro kvasinky a plísňe)
- **Selektivní** - zvýhodňují růst určité skupiny MIO - obsahují látky potlačující růst

doprovodné mikroflóry

- **Diagnostické** – kromě látek potlačující růst nežádoucích MIO obsahují ještě indikátor, který barevnou změnou umožní určit druh MIO (Př.: X-glukuronid – modrá barva kolonií *Escherichia coli*, acidobasické indikátory – mění barvu při tvorbě kyselin či amoniaku, ...)

### **Příprava živných půd:**

K přípravě ŽP z přírodního materiálu se používá **vodovodní voda**, která nesmí

1. být příliš tvrdá
2. nesmí obsahovat větší množství železa
3. nesmí být příliš chlorovaná

K přípravě syntetických a speciálních ŽP používáme **destilovanou vodu**, pro analytické stanovení vitaminů a aminokyselin pomocí MIO se používá **redestilovaná voda**. Pro přípravu ŽP se nehodí voda upravená přes **iontoměniče**, je příliš kontaminovaná MIO.

ŽP se připravuje rozpuštěním jejích součástí ve vodě, je-li třeba zahřeje se za neustálého míchání, pak se upraví pH, zfiltruje, rozplní do sterilních nádob (zkumavek, baněk, lahví) a ihned steriluje.

Dnes jsou na mikrobiologické kontroly kladeny přísné požadavky a je třeba pracovat se standardními ŽP, proto se většinou kupují hotové sušené ŽP nebo práškové, u nichž se po rozpuštění pouze upraví pH (dnes je většinou v ŽP pufr, který pH udržuje v deklarované hodnotě) a provede se sterilace.

**Úprava pH** se provádí – 1M NaOH, 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pro bakterie na hodnotu 7 – 7,3 a pro kvasinky a plísně na 4,5 – 6. **Pozor!** Sterilací klesne pH o 0,1 – 0,3!

**Filtrace** se provádí skládaným filtrem, u silně vyvločkových půd se použije vata a první podíl filtrátu se vrátí do nálevky a ještě jednou se přefiltruje.

**Ztužování** se provádí **agarem** v koncentraci 1,5 – 3% podle jeho želírovací schopnosti. (Agar je polysacharid z mořských řas), Je ve formě proužků, „hoblinek“, mletý. Obsahuje malé množství jiných organických látek, v případě potřeby (při testech asimilace N kvasinkami) lze

vymýt destilovanou vodou. Rozváření se provádí na vodní lázni nebo v autoklávu při sterilaci. Při kyselém pH (5 – 5,5) dochází při zahřátí k částečné hydrolyze agarů a tím ke snížení rosolovací schopnosti, proto se musí zvýšit jeho množství na 2,5 až 3%. Má-li půda pH nižší než 5, pH se upravuje až po sterilaci za aseptických podmínek. Po rozváření agarů je nutno půdu dobře rozmíchat (krouživými pohyby), dát pozor na kypění půdy! Bod tání agarů je 96°C, bod tuhnutí 37 – 42°C, vylučuje se kondenzační voda.

Další látkou používanou ke ztužení půdy je **želatina**. Jde o bílkoviny (převažuje kolagen, vyrábí se ze šlach a kostí). Taje při 22 – 25°C, nelze na této půdě kultivovat v termostatu, ani sterilovat v autoklávu, navíc řada MIO produkuje proteolytické enzymy, které želatinu rozloží a ztekutí. Z těchto důvodů se dnes želatina používá pouze k důkazu extracelulárních proteolytických enzymů u bakterií.

Želatina se přidává do půdy v množství 10 – 20%, během rozpouštění na vodní lázni se musí neustále kontrolovat a upravovat pH na 6,9 – 7,0. Želatina je sama kyselá, ale při zahřátí v kyselém pH ztrácí želírovací schopnost (kyselá hydrolyza).

Pro pěstování autotrofních MIO nesnášejících organické látky se používá ke ztužení **gel kyseliny křemičité**, který se připravuje z vodního skla a HCl. Po vymytí vodou se napojí živnými roztoky.

### **Rozlévání ŽP:**

Půdy se ihned po roztavení plní do sterilních baněk, zkumavek pomocí nálevky, neztužené půdy lze i byretou. Nesmí se potřísnit okraj nádoby ani zátka! Pomnožily by se MIO ze vzduchu a prorostly dovnitř. Množství půdy v nádobě nesmí být větší než 2/3 objemu (kypění při sterilaci). Po rozlité se ihned steriluje.

**Šikmé agary** se připravují tak, že se zkumavky naplní do 1/3 a po sterilaci se nechají utuhnout v šikmé poloze – opřené o tyčinku.

Lití do **Petriho misek** se provádí asepticky po sterilaci, okraje a víčka misek nesmí být potřísněny půdou, zátka nádobky během lití neodkládáme. Bublíny odstraníme ještě za tekutého stavu plamenem kahanu. Po naočkování inkubujeme v obrácené poloze (zavěšený agar). Předsušení desek lze provést uložením desek do termostatu na 2 – 3 dny v obrácené poloze, kontaminované desky se před očkovaním vyřadí. Rychlé předsušení lze provést v sušárně při 50 – 70°C, doba sušení otevřených misek položených dnem vzhůru je 5 – 30

minut. U plastových misek teplota nesmí přesáhnout 60°C.

### **Sterilace nádobí, živných půd a pomůcek:**

Sterilace – výkon, kterým materiál zbavujeme živých mikroorganismů usmrcením nebo odstraněním. Nejpoužívanější metody:

- teplem
- UV zářením
- filtrací
- chemickými prostředky

### **Teplem:**

- **ožeháváním** – používá se u hrdla zkumavek a baněk, skleněných tyčinek, očkovacích jehel a jiné skleněné a kovové pomůcky. Očkovací jehly ožehujeme v oxidačním plameni po celé délce jehly až do žhnutí drátku a krátce ožehneme i tu část držáku, která bude zasahovat do kultivační nádoby. Ožehujeme těsně před očkováním a jehlu zchlazujeme na nezaočkované půdě, ve sterilní vodě nebo na okraji kultury. Po použití je nutno jehlu opět řádně vyžítat, aby se nezanesly MIO do prostředí laboratoře. Chromniklové jehly se nejdříve vypalují v redukčním plameni, teprve potom v oxidačním. Platinové pouze v oxidační části plamene, jinak vzniká křehký karbid platiny.
- **suchým teplem** – skleněné kultivační nádoby, pipety, vatové filtry, Petriho misky a jiné pomůcky zabalené do papíru při teplotě 160 – 180°C/2 hodiny. Nelze použít pro gumové hadice, tkaniny, živné půdy.
- **vlhkým teplem** – používá se pro živné půdy, vodu, roztoky, tkaniny, gumové hadice, likvidaci kultur.

1. tlakovou parou – při 0,1 – 0,15 Mpa, což je 121 – 128°C v autoklávu
2. proudící parou – při 99 – 100°C/20 – 30 minut 3x po 24 hodinách tzv. **frakcionovaná (přerušovaná) sterilace**. Spory po první sterilaci vyklíčí a vegetativní buňky se zničí po druhém varu. Třetí den popřípadě čtvrtý den se sterilace opakuje pro jistotu. Používá se

u ŽP nesnášejících autokláv. U ŽP nesnášejících ani teplotu varu se používá tzv. **tyndalizace** - 57°C/1 hodinu 8x po 24 hodinách

**Filtrací** - pro čiré kapaliny, které nesnáší zahřívání, používá se membránová filtrace, velikost pórů u filtrů je 0,1 - 05 mm.

**Chemickými prostředky** - pro sterilaci či dezinfekci pracovních ploch, do nádob pro ukládání použitých pipet, likvidaci zbytků kultur, např. náhodně rozlitých na pracovní ploše. Nejčastěji používané prostředky:

Ajatin, Septonex, aj. kvarterní amoniové base

Persteril 40% - ředí se 1:80, působí i na kvasinky a plísně, i zředěný je silně korozivní

Ethanol - nejúčinnější je 50 - 70%

Formaldehyd 40% - pro dezinfekci termostatů se v nich nechá odpařovat až 24 hodin, k urychlení se přidává k 25 ml 40% formaldehydu 12,5 ml horké vody a 25 g manganistanu draselného a promíchá se. Páry se začnou vyvíjet po několika minutách.

Krystalek manganistanu draselného položeného do středu kolonie zastaví její růst.

## 2) Očkování mikroorganismů

Očkování (inokulace) mikroorganismů je přenesení živých buněk (inokula) žádaného druhu do sterilní živné půdy za aseptických podmínek.

Aseptická práce zabraňuje průniku cizích mikroorganismů ze vzduchu a pracovních pomůcek do kultury a naopak brání úniku mikroorganismů z kultury ven. Vyžaduje řadu zvláštních opatření i značnou zručnost.

### Zásady aseptické práce:

1. v místnosti se nesmí vířit prach, být průvan a musí zde být dokonalá čistota
2. ruce si omýt před prací mýdlem a otřít dezinfekčním prostředkem
3. dezinfikovat před prací pracovní plochu, pracovat v blízkosti plamene, plamen protáhnout několikrát pracovním prostorem
4. pracovat opatrně, co nejrychleji
5. hrdla nádob i zátky před i po práci ožehnout plamenem
6. zátky nikdy neodkládat, držet je během celé práce mezi dlaní a malíkem, malíkem a prsteníkem pravé ruky, nedotýkat se rukou nebo jiným nesterilním předmětem části zátky, která se bude zasunovat do kultivační nádoby
7. nádoby s kulturou nebo sterilním roztokem či živnou půdou nechávat otevřené jen po nezbytně nutnou dobu a držet je otevřené hrdlem v blízkosti plamene v silně nakloněné poloze

### **Očkování kličkou:**

1. ze zkumavky do zkumavky
2. ze zkumavky na Petriho misku a naopak
3. z misky do misky

Ve zkumavce můžeme mít tuhou ŽP (šikmý, pološikmý agar) nebo tekutou ŽP. Očkujeme čárkováním nebo vlnovkou.

### **Očkování jehlou:**

Jehla se používá při očkování vpichem do ztužené ŽP ve zkumavce. Tuto metodu používáme při kultivaci anaerobních nebo mikroaerofilních MIO, pro sledování nároků na kyslík nebo při sledování typu ztekucování želatiny.

Vpich se provádí rovnou očkovací jehlou, dovnitř i ven se musí táhnout stejnou stopou, aby se netvořily krátery. Při očkování je vhodné držet zkumavku vodorovně a ruce opírat lokty o stůl nebo svisle dnem vzhůru. Vpich zasahuje 0,5 cm nad dno zkumavky.

### **Očkováním pomocí pipety:**

Sterilní pipetu používáme při očkování většího objemu tekutého inokula. Pipeta se vyjme z obalu těsně před použitím v blízkosti plamene, dotýkáme se jí pouze v horní části, která nebude zasahovat do kultivační nádoby. (Pipetu a nádoby s kulturou a živnou půdou držíme v pravé ruce, levá ruka sundá víčka a nádoby – většinou zkumavky – se přendají do levé ruky. **Nic se neodkládá na stůl !!!**). Použitou pipetu odložíme do válce s dezinfekčním roztokem! Hrdla nádob i víčka ožehneme a uzavřeme.

### 3) Inkubace

Po zaočování půdy se musí nechat mikroorganismy růst (kultivovat) při jejich optimální teplotě. Kvasinky a plísňe při 25°C, mezofilní při 30 – 37°C, psychrofilní při 6 nebo 20°C a termofilní při 55°C. Agarové desky inkubujeme převrácené víčkem dolů (tzv. zavěšený agar), aby na kulturu nekapala kondenzační voda. Inkubační doba je pro bakterie a kvasinky 24 – 48 hodin, pro plísňe 2 – 5 dnů.

#### **Aerobní kultivace.**

Aerobní MIO očkujeme na povrch agaru na Petriho miskách, na šikmý či pološikmý agar nebo je můžeme kultivovat v malém objemu kapaliny. Chceme-li pěstovat aerobní MIO ve větším objemu tekuté půdy, musíme půdu neustále okysličovat – třepáním na automatické třepačce (dochází rovněž k lepšímu rozptylu buněk a jejich přístupu k živinám), turbinovým míchadlem, které u hladiny zároveň „nasává“ vzduch a vmíchává ho do živné půdy nebo přiváděním stlačeného vzduchu ke dnu nádoby. Vzduch se v tomto případě se vzduch steriluje průchodem přes filtr nebo promývačku s dezinfekčním roztokem.

#### **Anaerobní kultivace.**

Anaerobních podmínek dosahujeme několika způsoby, často se navzájem kombinují.

1. vypuzení kyslíku z půdy varem, po zaočování půdy převrstvíme tuhým nebo tekutým parafínem nebo 3% sterilním rozehrátým agarem 3 – 4 cm vysokou vrstvou
2. odstranění kyslíku ze vzduchotěsně uzavřené nádoby odsáváním, chemickou reakcí, náhradou inertním plynem – oxidem uhličitým, dusíkem, vodíkem – zde je nutno zabránit



styku s plamenem nebo elektrickým jiskřením. Příklad chemické směsi k odstranění kyslíku z kultivační nádoby: práškové železo s uhličitanem sodným a kyselinou citronovou. Jaké reakce budou po ovlhčení této směsi probíhat? Další směs je na 1 l vzduchu: 7g pyrogallolu a 50 ml 20% KOH

3. snížení oxidoredukčního potenciálu živné půdy přidáním redukujících látek: thioglykolát sodný, kyselina askorbová, siřičitany, thiosířany, cystein

#### 4) Izolace mikroorganismů

**Izolace** je získávání čisté kultury určitého mikroorganismu ze směsi, používá se:

1. k získání čistých kultur z přírodního materiálu
2. k čištění infikovaných kultur

Princip izolace spočívá v dostatečném naředění směsi mikroorganismů a naočkování na živnou půdu tak, aby vzniklé kolonie pocházely od jediné buňky.

**Selekce** (výběr) je získávání vhodných kmenů, tedy získávání buněk určitých vlastností z kultury, která je druhově jednotná, ale fyziologicky není homogenní (některé buňky se biochemicky i tvarově liší).

#### Izolační techniky kontrolované makroskopicky.

1. Izolace litím desek – mikrobiální směs se rozmíchá v roztavené živné půdě (sladinová želatina pro kvasinky, masopeptonový agar pro bakterie), do půdy se může přidat látka, která potlačí doprovodnou mikroflóru – například antibiotika.
2. Izolace roztěrem – 0,1 ml zředěné směsi MIO ve fyziologickém roztoku se nanese pipetou na povrch agarů a rozetře skleněnou tyčinkou – používá se hlavně u kvasinek a plísní
3. Čárkováním na desky (křížovým roztěrem)

Vyvíjející se kolonie sledujeme pouhým okem a jejich čistotu zjišťujeme mikroskopicky až po jejich dostatečném nárůstu. Ke kontrole se připravuje fixovaný preparát barvený podle Grama.

### **Izolační techniky kontrolované mikroskopicky.**

Tyto metody dovolují sledování celého izolačního postupu pomocí mikroskopu a skýtají záruku, že narostlá kolonie vznikla skutečně z jedné buňky. Nejčastěji se dnes používá:

Izolace pomocí mikromanipulátoru – řidká suspenze buněk se nanese na tenkou vrstvu agaru na krycím sklíčku, které se překlopí na zvláštní komůrku, a pomocí jehly mikromanipulátoru se jednotlivé buňky přenesou na vhodné místo tohoto agaru. Zde se kultivují.

**Propagace** – je přenesení nakultivované a zkontrolované kolonie vypěstované z jedné buňky do tekuté živné půdy. Podle velikosti kultivační nádoby rozlišujeme propagaci laboratorní a provozní. Slouží k velkému pomnožení kulturních mikroorganismů – výrobě čistých technologických kultur (pivovarské, lihovarské kvasinky, čisté mlékařské kultury,...)

## **5) Identifikace mikroorganismů**

**Identifikací** mikroorganismu se rozumí stanovení příslušnosti studovaného mikroorganismu k určité taxonomické skupině (čeleď, rod, druh). Postup:

1. zajistit si čistou kulturu – naředit a naočkovat křížovým roztěrem, k identifikaci se vybírá typická kolonie
2. popsat makroskopický vzhled kolonií
3. připravit mikroskopický preparát – nativní, fixovaný a barvený – dle druhu MIO
4. řádně popsat mikroskopické znaky
5. provést biochemické testy – zkvašování cukrů, tvorba plynu, indolu, sirovodíku, kyselin,...
6. pomocí klíče určit rod, druh