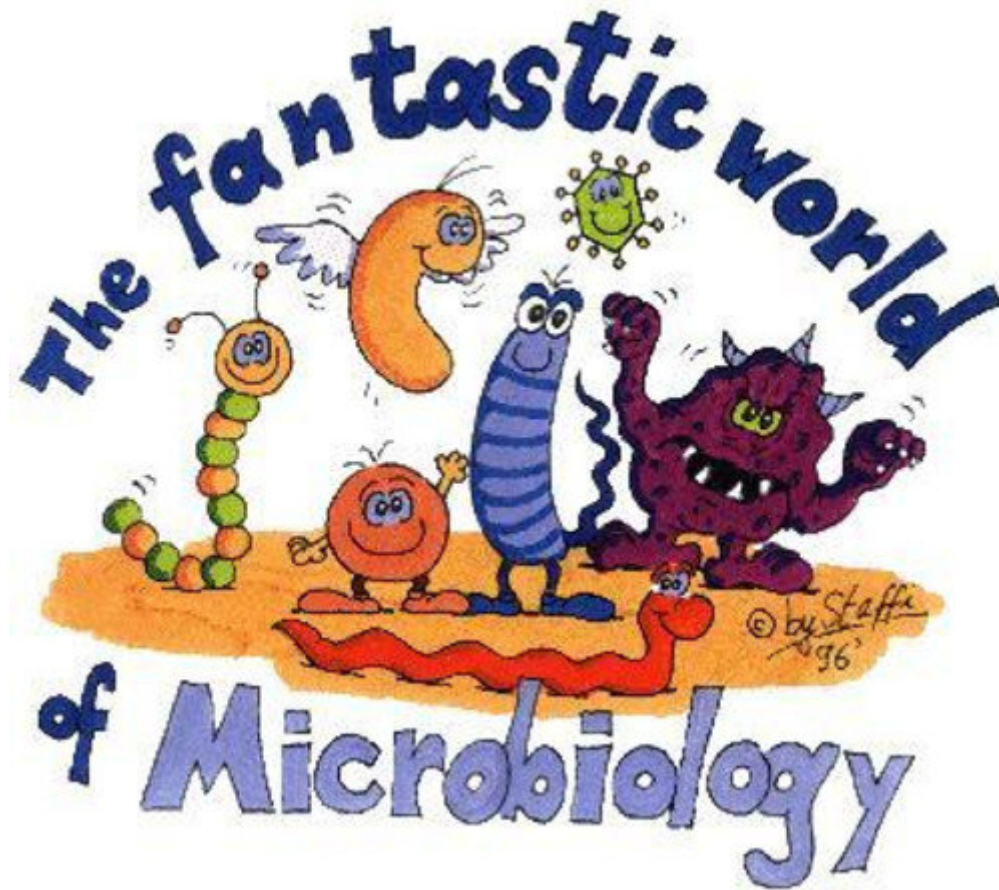
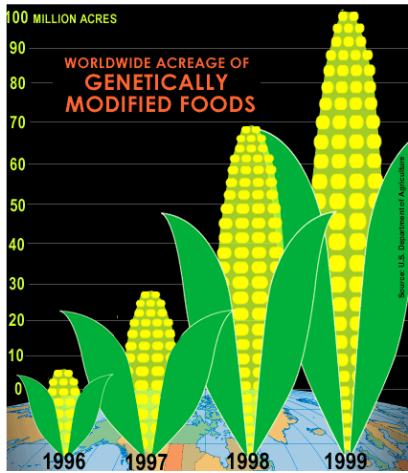


# Cvičení z obecné mikrobiologie





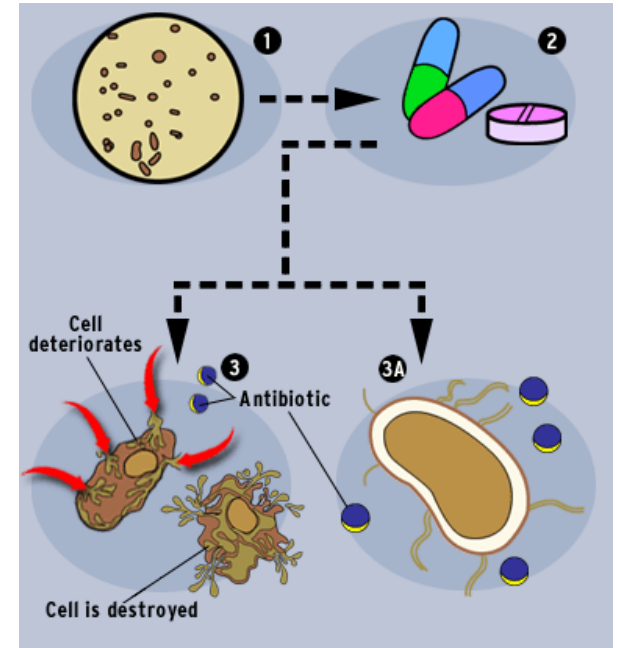




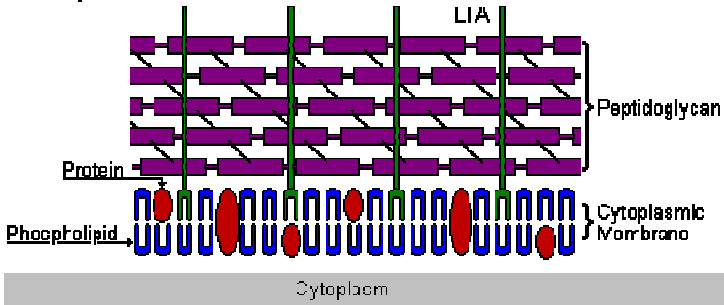
*FOOD for THOUGHT*



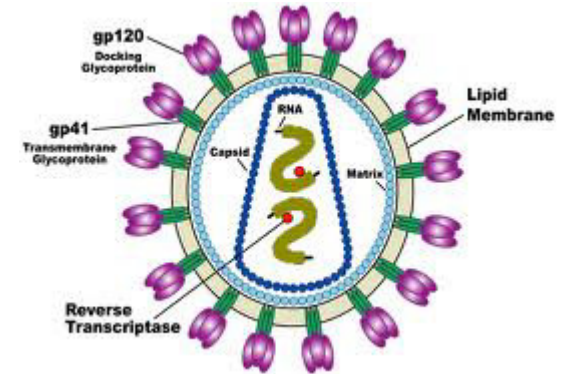
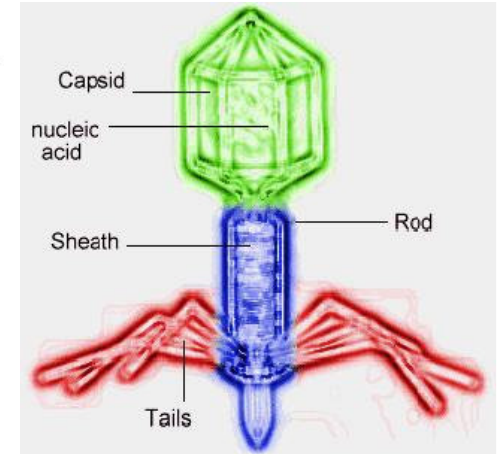
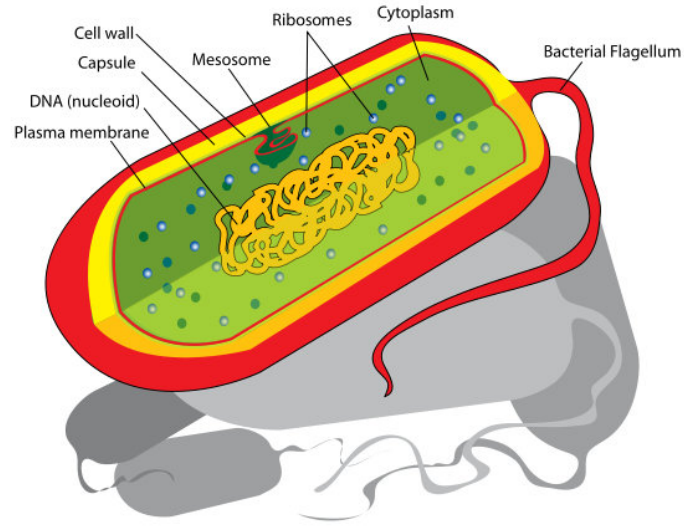
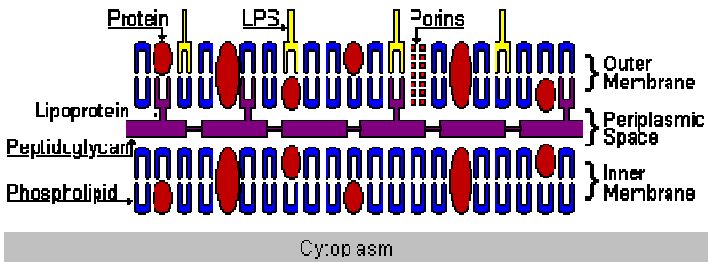
It's perfectly natural



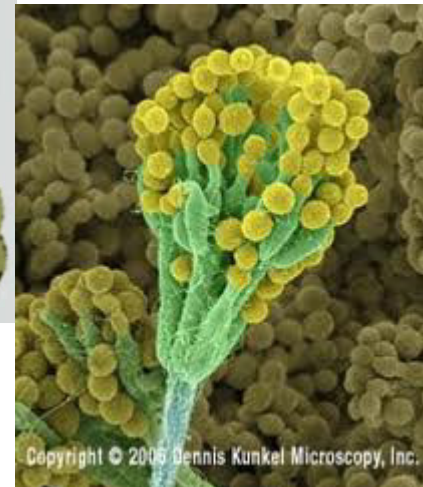
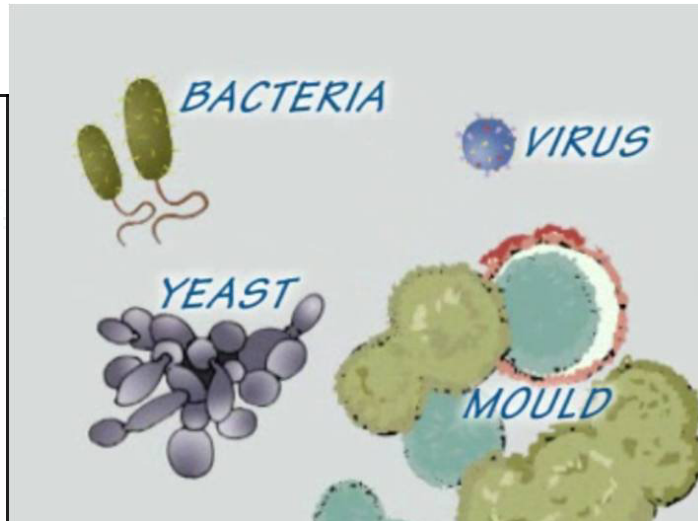
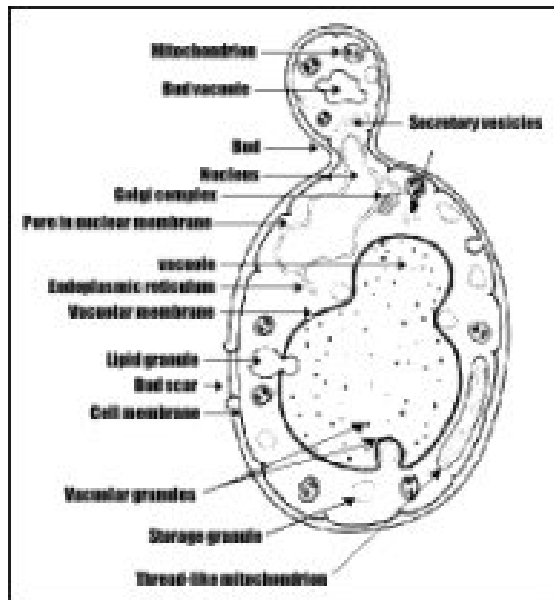
**Gram-positive Cell Wall**



**Gram-negative Cell Wall**



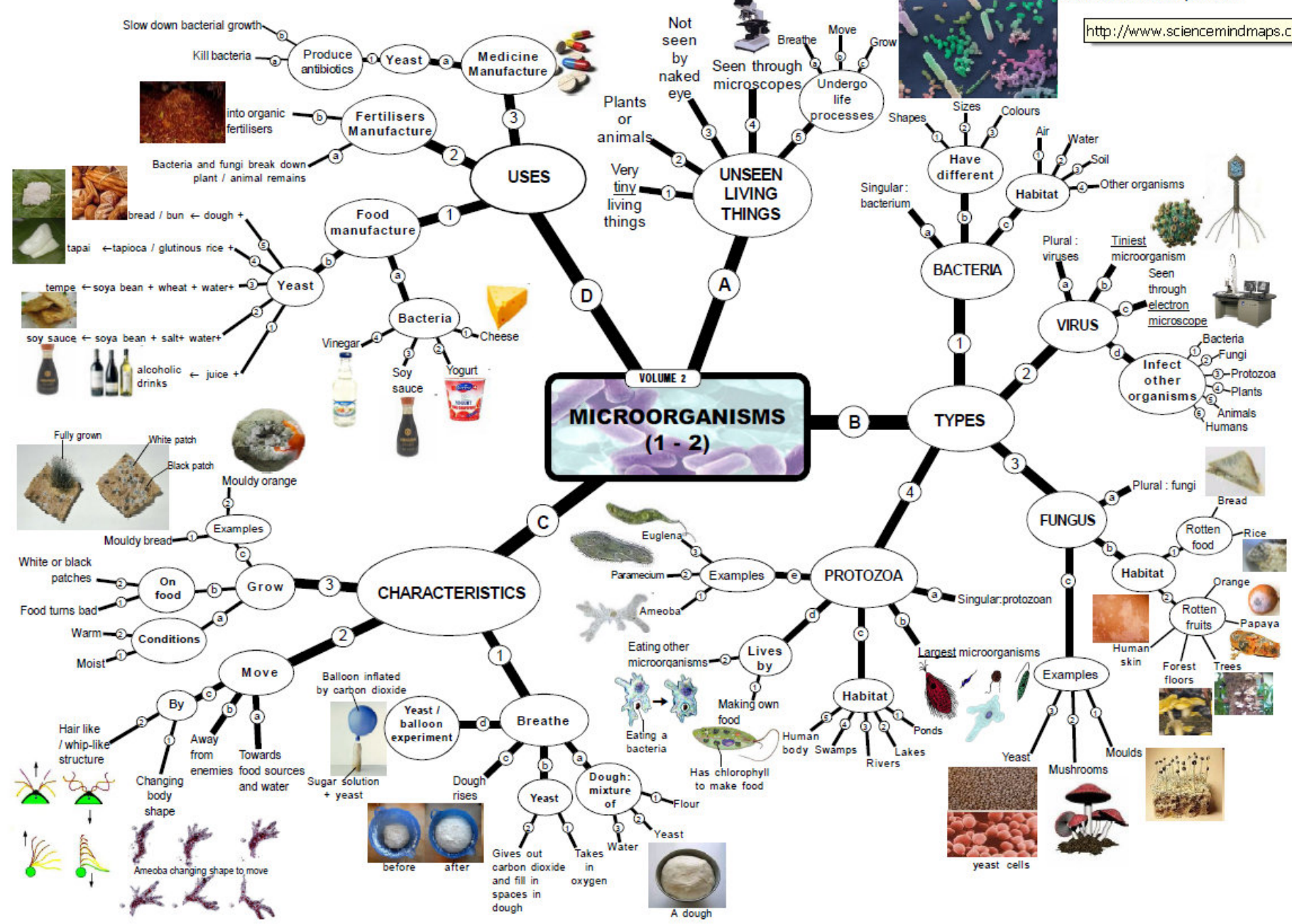
**Eukaryota, prokaryota, viry**



Copyright © 2005 Dennis Kunkel Microscopy, Inc.



# MICROORGANISMS (1 - 2)



- Patogeni
- Epidemie (mor, chřipka,..)
- Nemocniční mikroflóra



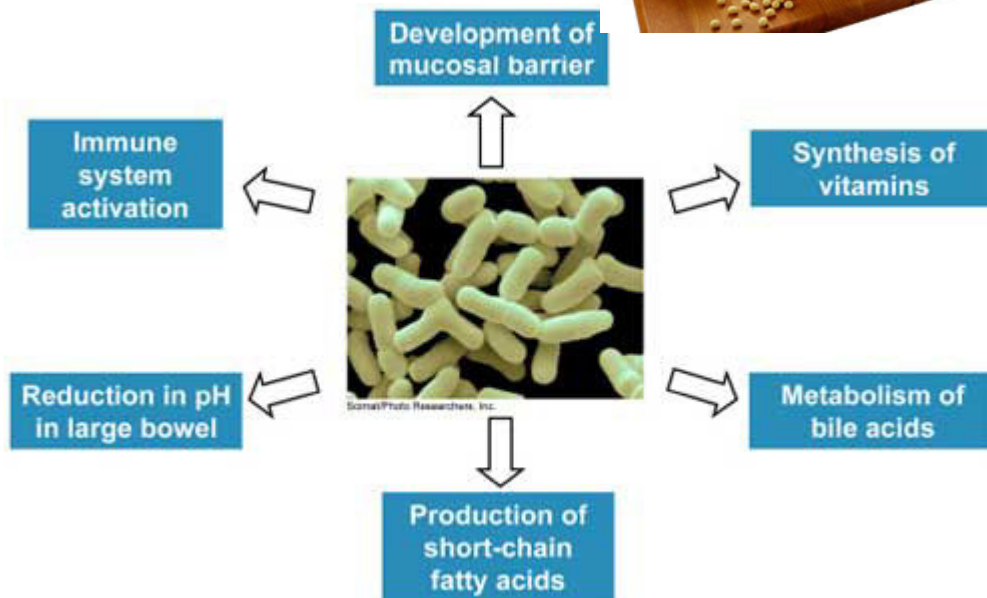
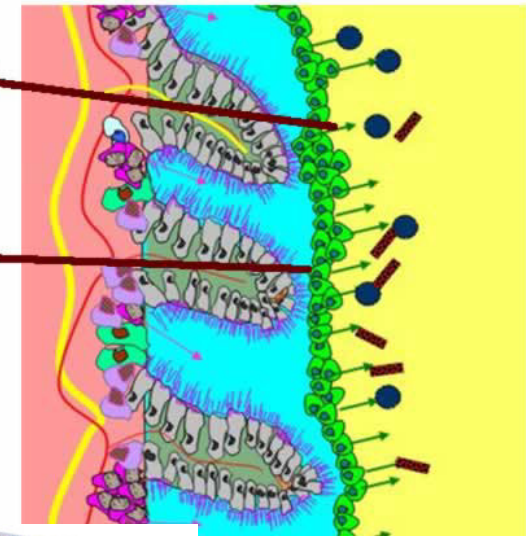
- Probiotika
- Přirozená mikroflóra
- Symbiotické mikroorganismy
- Technologie

#### Probiotic Benefits

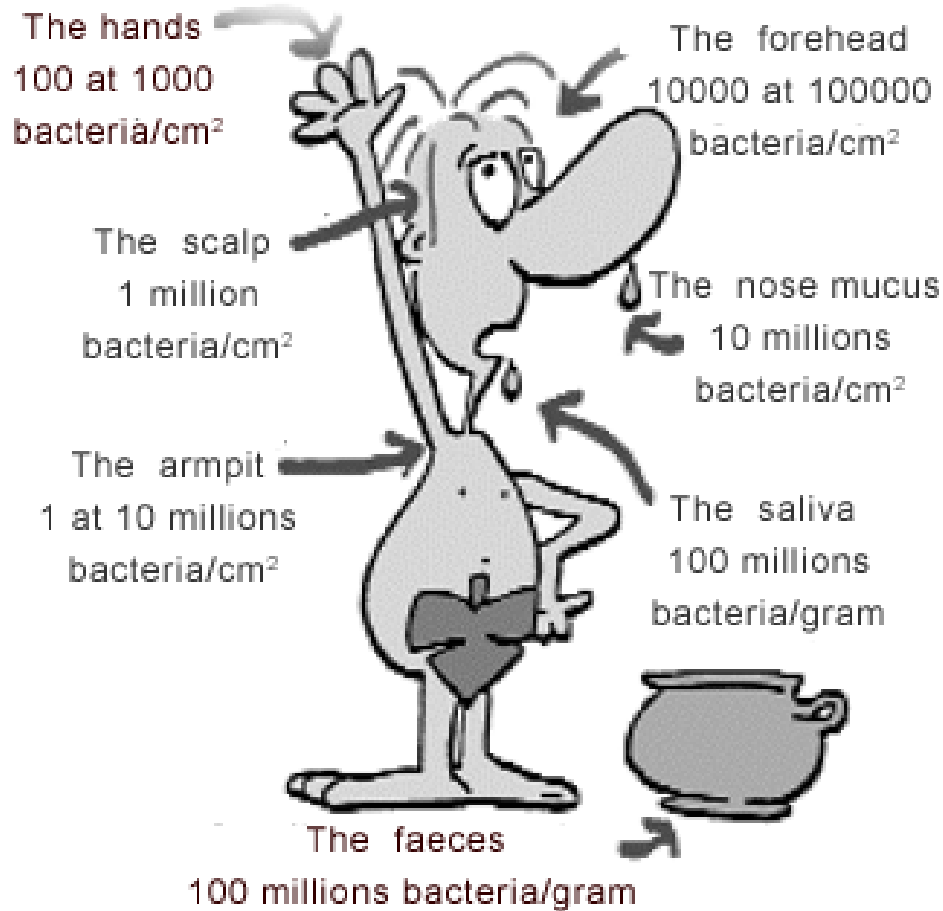
ACIDOPHILUS AND OTHER PROBIOTIC BACTERIA SECRETE: ANTIVIRAL ANTIBACTERIAL AND ANTIFUNGAL CHEMICALS.

PROBIOTICS FORM A PHYSICAL BARRIER TO HINDER INVASION OF BACTERIA AND YEASTS

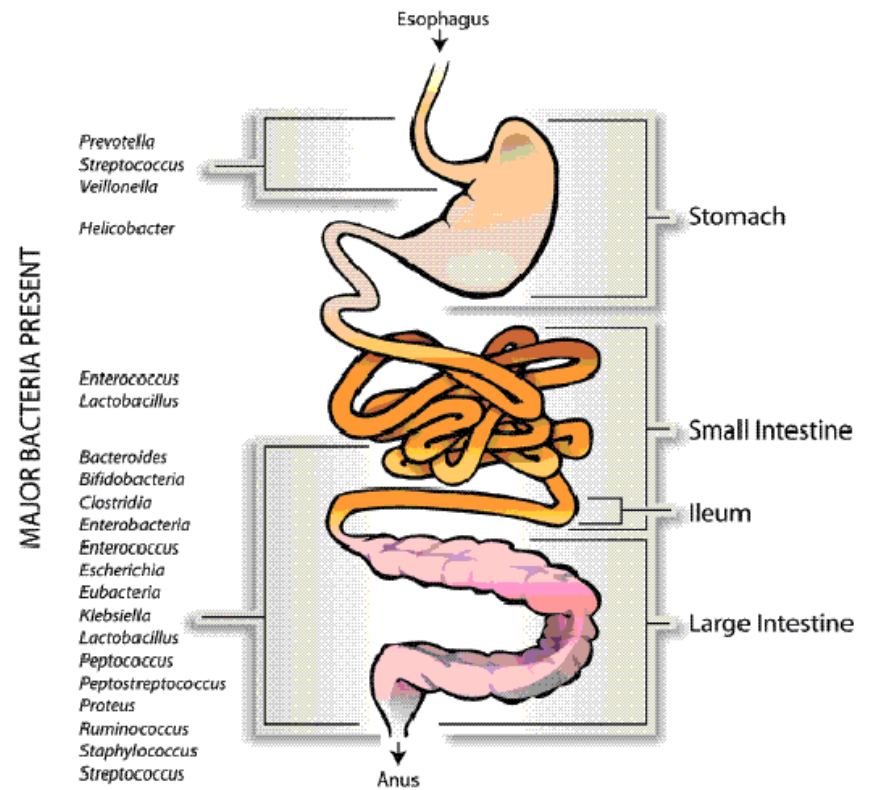
PROBIOTICS LIKE ACIDOPHILUS CREATE AN ACIDIC MICROENVIRONMENT WHICH PROMOTES IRON AND OTHER MINERAL ABSORPTION.







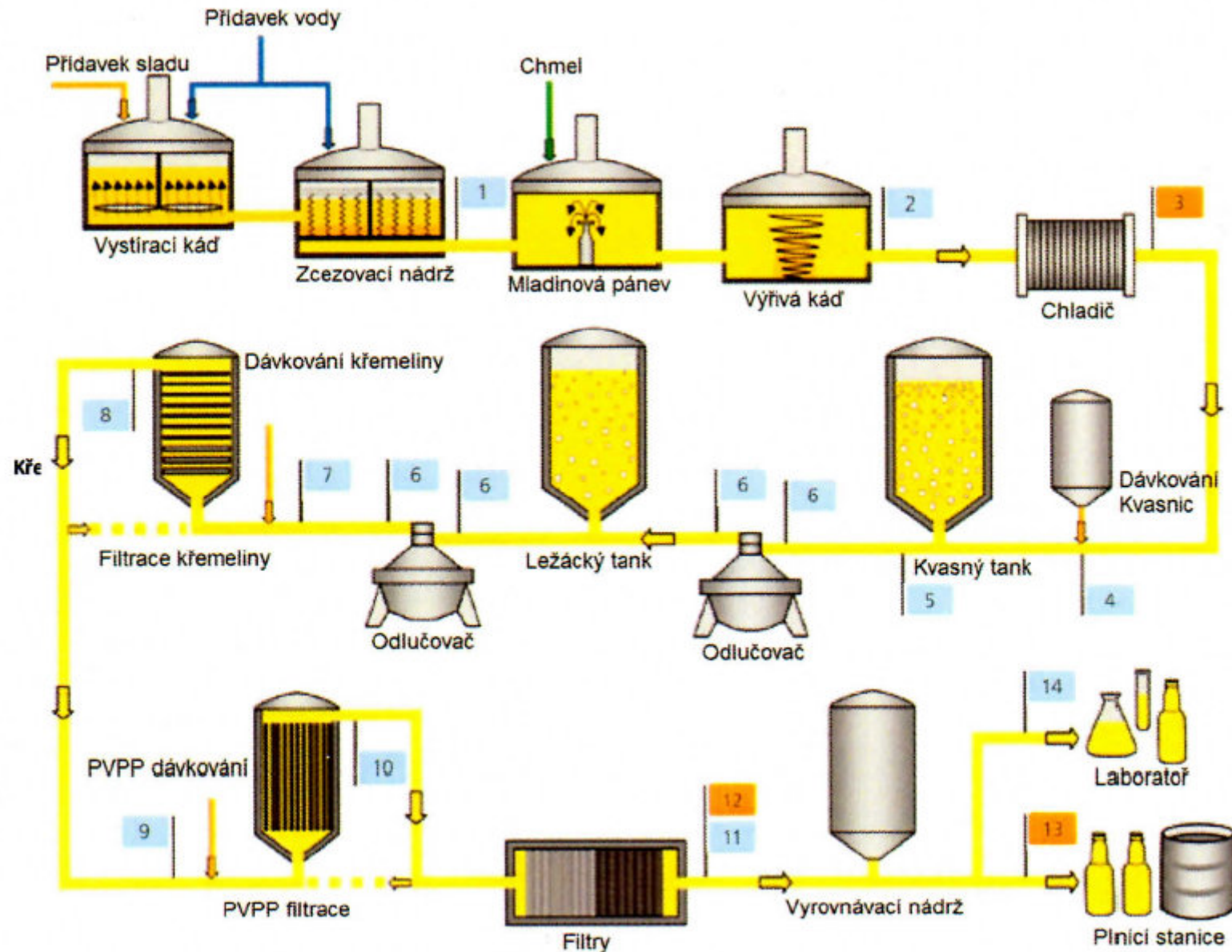
Distribution of Nonpathogenic Microorganisms in Healthy Humans.  
Many of These Bacteria Possess Enzymes That Can Cleave  $\beta$ -glycosidic Linkages



\* Microbial Interactions with Humans, Chapter 21: 700-725. In: Madigan MT, Martinko JM. *Brock Biology of Microorganisms*. Pearson Prentice Hall, 2005.

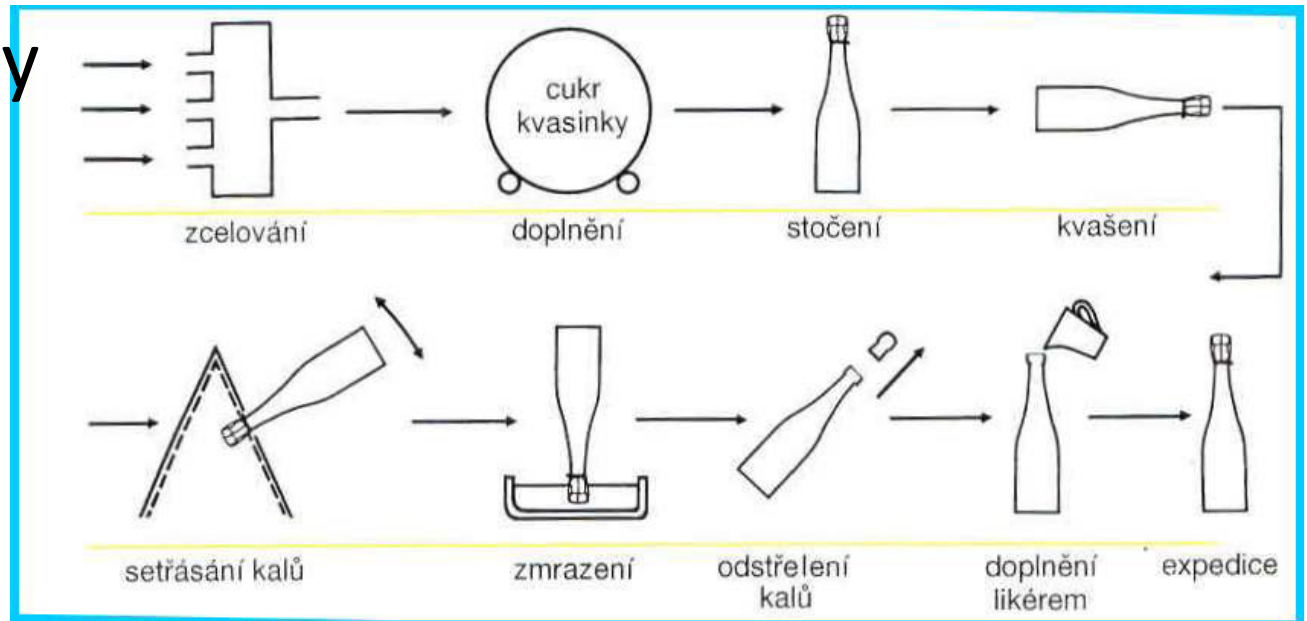
Reprinted with permission of Jane Ramberg. *GlycoScience & Nutrition*. Vol 6, No 6, 2005.

# Výroba piva

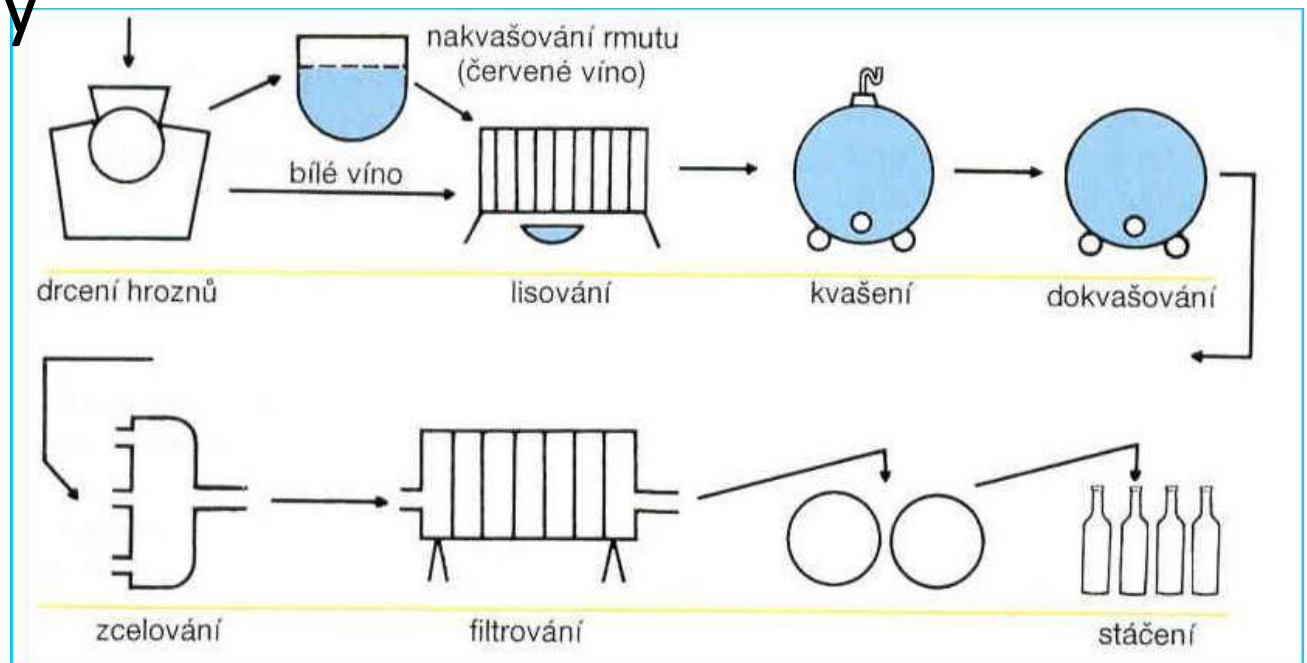




- Schéma výroby přírodních vín



- Schéma výroby šumivých vín

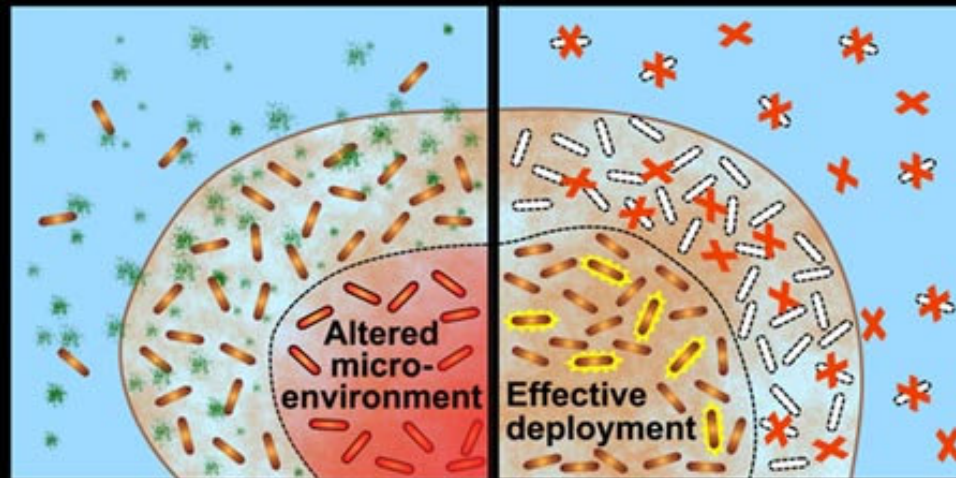


- Genové inženýrství – inzulin, ATB
- *E. coli* – přirozená mikroflóra x patogenní kmeny
- Quorum sensing, biofilm, sociální chování MO
- Technologie – pivo, víno, destiláty, SCP, pečivo, kyseliny, odpadní vody, bioremediace
- Komposty, degradace materiálu, bioplynové stanice
- Koloběh prvků (de- a sulfurikace, fixace dusíku,...)
- Symbióza – člověk, rostliny, zvířata  
(trávicí trakt, dodávání živin,...)
- Patogeni  
(epidemie, ATB, léčba, prevence, infekční dávky, očkování,...)
- Atd.



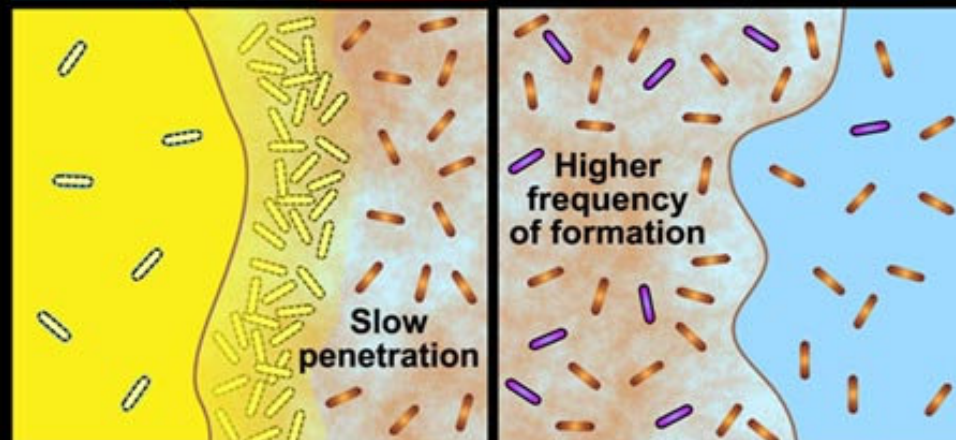
## Biofilm multicellularity results in better bacterial defenses

Nutrient depletion creates zones of altered activity.



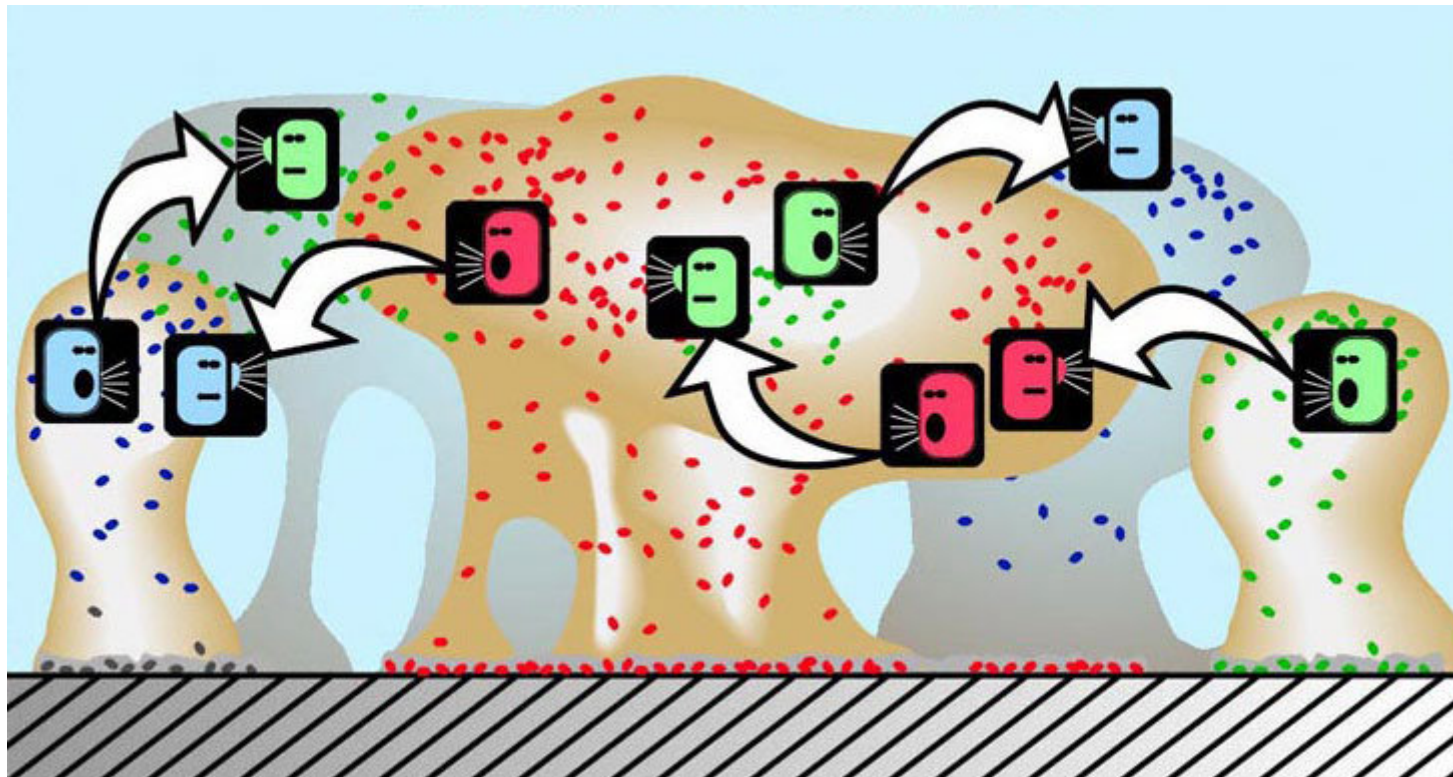
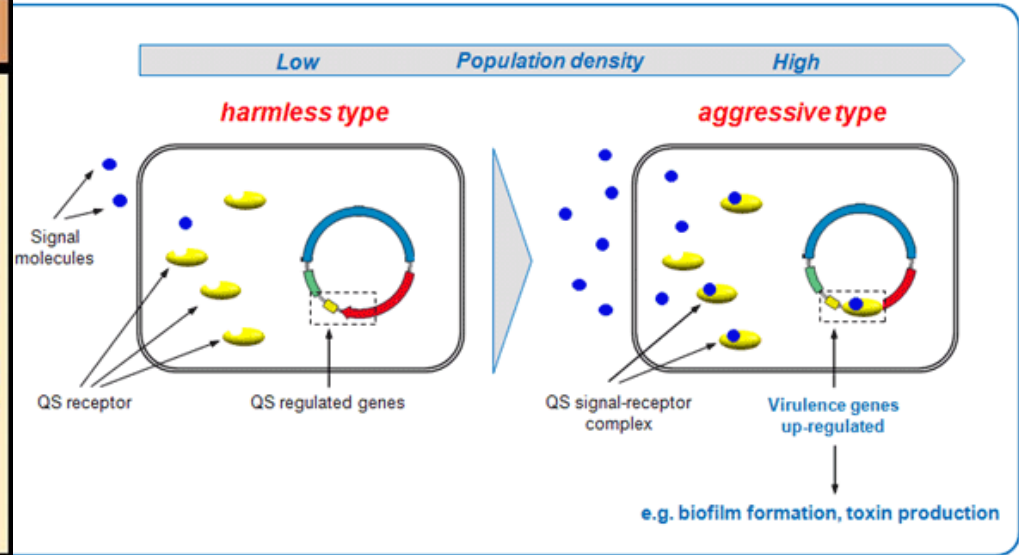
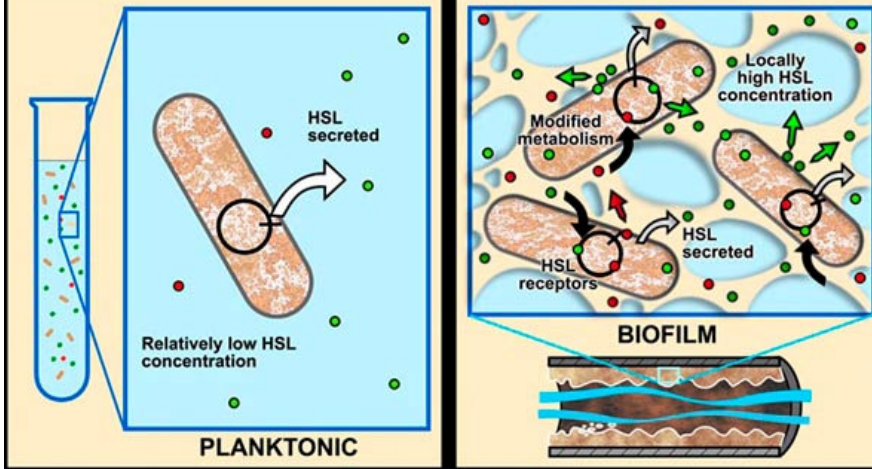
Inner layers of biofilm cells have more time to initiate stress response.

Outer layers of biofilm cells absorb damage.



“Persister” cells may be present in higher numbers.

# Quorum Sensing





# CCM (Česká sbírka mikroorganismů)

- CCM je specializované vědecko-servisní pracoviště Ústavu experimentální biologie PŘF MU
- uchovává kultury MO pro potřeby základního a aplikovaného výzkumu, průmyslové využití, biotechnologii a výuku. Mnoho kultur dále slouží jako referenční vzorky pro klinické laboratoře humánního a veterinárního zaměření
- více než 3 200 kmenů bakterií (asi 1 400 druhů)
- 800 kmenů vláknitých hub (přibližně 550 druhů)
- specializovaná sbírka vodních hyfomycetů - asi 500 kmenů (60 rodů se 130 druhy)
- od roku 2011 i sbírka stafylokokových bakteriofágů a jejich hostitelských kmenů
  
- Katalog kultur X vlastní izoláty
- Označení kmenů – latinské jméno kurzívou!!!

## Bezpečnost práce

- **Příchod a odchod z laboratoře**
- **MYTÍ RUKOU, DEZINFEKCE PLOCHY!!!!**
  
- Kahany pouze pokud jsou používány a jste v místnosti
- Nasahat na kultury do misky,
- Na stole 3 nádoby – dezinfekce, kelímek na špičky, kelímek na sirky
- Lékárnička, hasicí přístroj, hasicí deka
- Laboratorní sklo a pomůcky (misky, kličky, sklo x umělá hmota)
- **KONTAMINACE (sebe i kultur) – snažit se jí předcházet!!!**



## 1. ZÁSADY PRÁCE V MIKROBIOLOGICKÉ LABORATOŘI

---

1. Vstup do laboratoře je povolen pouze osobám, které tam pracují.
2. V laboratoři mohou být prováděny pouze práce přikázané vedoucím cvičení.
3. Při práci v laboratoři je nutno používat pracovní oděv a obuv.
4. V laboratoři není dovoleno jíst, pít a kouřit.
5. Je nutno zvýšenou měrou dodržovat bezpečnost práce a hygienu, řídit se pokyny vyučujícího.
6. Pracovní plochu je nutno před započatím práce i po jejím ukončení dezinfikovat.
7. Použité sklo a nástroje odkládáme na vyhrazené místo, v žádném případě nevykládáme živé kultury do odpadu! Před umytím je nutno sklo sterilizovat autoklárováním nebo ponořením do dezinfekčního roztoku.
8. Rozbité sklo je nutno odkládat do určených nádob a před likvidací sterilizovat.
9. Dojde - li během práce k potřísnění oděvu či pracovní plochy, je třeba okamžitě vyrozumět vyučujícího a zasažené místo ihned ošetřit dezinfekčním roztokem.
10. Každé poranění je nutno ihned hlásit vyučujícímu. I nejmenší oděrky musí být pečlivě dezinfikovány a ošetřeny, aby nedošlo k infekci rány.
11. Dojde - li k potřísnění pokožky, je nutno zasažené místo okamžitě opláchnout 1% roztokem ajatínu.  
Při vniknutí mikroorganismu do poraněné kůže dezinfikujeme postižené místo jódovou tinkturou.  
Při zasažení oka kulturou mikroorganismů okamžitě oko vypláchneme 3% roztokem kyseliny borité a dezinfikujeme ophthalmoseptonem.  
Pokud dojde k nasátí kultury do úst, materiál je třeba vyplivnout, ústní dutinu vypláchnout ředěným roztokem  $\text{KMnO}_4$ .
12. Před odchodem z laboratoře je nutno uklidit pracovní plochu, kultury uložit do termostatu příp. do chladničky, zkontrolovat, zda jsou uzavřeny plynové kohouty.
13. Po ukončení práce je třeba ruce důkladně umýt teplou vodou a mýdlem, dezinfikovat roztokem ajatínu.

## Zásady bezpečné práce v mikrobiologické laboratoři

1. Vstup do laboratoře je povolen pouze osobám vykonávajícím cvičení.
2. V laboratoři vykonávejte pouze práci stanovenou obsahem cvičení.
3. V laboratoři je zakázáno jíst, pít a kouřit.
4. V laboratoři je nutné používat laboratorní plášť a přezůvky.
5. V laboratoři je zakázáno otevírat okna. Větrání je zajištěno pomocí přísavného větracího zařízení.
6. Před příchodem do laboratorního cvičení se seznamte s jeho obsahem.
7. Před započítím a po ukončení práce je třeba desinfikovat pracovní plochu (Incidur).
8. Na pracovní plochu pokládejte co nejméně osobních věcí. Na pracovní ploše může snadno dojít k jejich kontaminaci. Oblečení, batohy a tašky odkládejte v šatně.
9. Pracujte pečlivě a opatrně. Zabráňte tím kontaminaci materiálu a náhodnému potřísnění pracovní plochy a sebe bakteriálními kulturami.
10. Nedotýkejte se zbytečně rukama obličeje, nenanášejte v laboratoři kosmetiku, nemanipulujte s kontaktními čočkami.
11. Při barvení mikroorganismů používejte jednorázové ochranné rukavice a pracujte v digestoři. Při fixaci preparátů používejte ochranné brýle. Ochranné rukavice není nutné používat při manipulaci s mikroorganismy, pokud se však budete cítit bezpečněji, použijte je. Výjimkou je příprava nativního preparátu pro mikroskopii, v tomto případě určitě použijte rukavice.
12. Lihové kahany nechávejte hořet pouze po dobu, kdy je užíváte.
13. Použité sklo a zbytky bakteriálních kultur odkládejte na určená místa. V žádném případě nevylévejte kultury do odpadu! Veškerý kontaminovaný materiál je před likvidací a mytím nutno desinfikovat nebo sterilizovat (týká se i rozbitého skla), případně vyhodit do koše na nebezpečný odpad (např. buničitá vata použitá k likvidaci rozlité kultury).



14. Dojde-li k náhodnému potřísnění pokožky bakteriální kulturou či poranění pokožky, oznamte tuto skutečnost ihned školiteli. Pokožku je nutno ošetřit vhodným desinfekčním prostředkem (ajatin, Spitaderm), aby nedošlo k infekci.
15. Stejně zásady jako v bodě 14 platí i v případě znečištění pracovní plochy nebo pracovního oděvu.
16. V případě jakékoli nejistoty se informujte o správném postupu u svého školitele.
17. Označte všechna média a kultury ve zkumavkách, baňkách a Petriho miskách názvem média a kultury, svým jménem a pracovní skupinou. Misky popisujte na dno! K označení používejte fixy na sklo.
18. Všechny pracovní postupy, obzvláště pak použité bakteriální kultury, množství pipetovaných roztoků a postupy při ředění si pečlivě zaznamenávejte.
19. Po ukončení práce odneste použité pomůcky na určené místo, ukliděte pracovní plochu a vydesinfikujte ji desinfekčním roztokem (Incidur ve spreji).
20. Před odchodem ze cvičení si dobře umyjte ruce a vydesinfikujte desinfekčním prostředkem (Spitaderm). V případě, že potřebujete krátkou přestávku v průběhu cvičení, umyjte a vydesinfikujte si ruce před opuštěním laboratoře.
21. Práce v mikrobiologické laboratoři je zakázána těhotným ženám a matkám do konce 9. měsíce po porodu. Posluchačka je povinna vedoucímu cvičení oznámit graviditu.
22. Připojování přístrojů do elektrické sítě je nutno provádět pod dohledem asistenta. Provádění jakýchkoliv změn na elektrickém zařízení není dovoleno. Opravovat elektrické instalace smějí jen osoby tím zvláště pověřené, s příslušnou kvalifikací. Závady v instalaci (voda, plyn, elektřina) ihned hlase.

## **Protokol:**

Cíl práce

Teorie

Pomůcky + kmeny MO (*jméno kurzívou* a CCM číslo)

Postup

Závěr a diskuze

**Docházka** – 1 povolená absence s omluvenkou  
(vypracovat protokol – jen teorii)

**Zápočet** – docházka, protokoly, 2 testy (75% správných odpovědí)  
zápočtový preparát

**Sebou vždy PLÁŠŤ, PŘEZŮVKY, FIX NA SKLO!!!**

# Půdy pro růst mikroorganismů (MO)

Info a přehled:

[http://sharka-ali.blog.cz/0803/mikrobiologie-  
prehled-kultivacnich-pud](http://sharka-ali.blog.cz/0803/mikrobiologie-prehled-kultivacnich-pud)

<http://www.agrola.cz/zivne-pudy.html>



## Živná média – ke kultivaci, přímému průkazu a izolaci MO

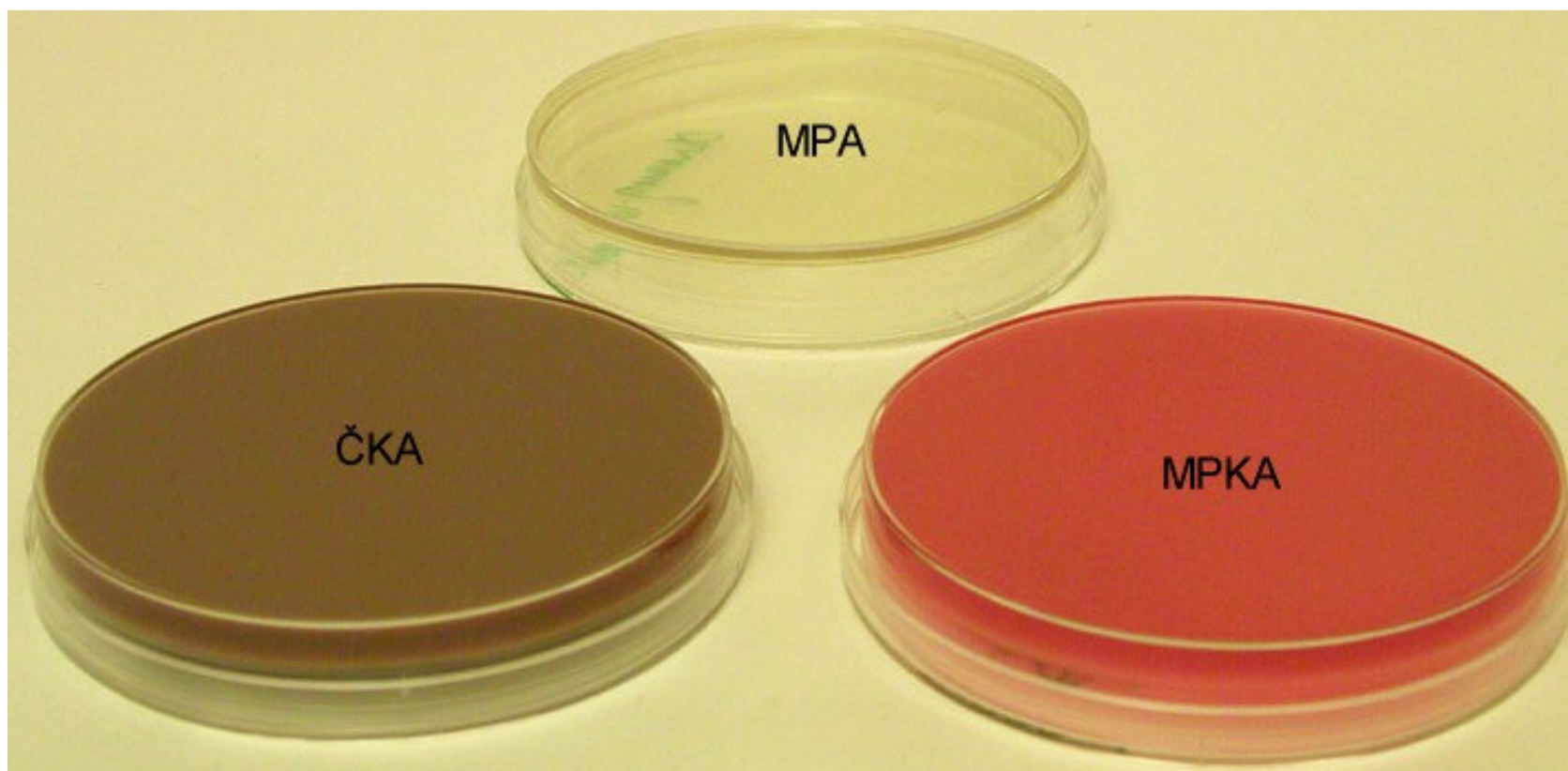
- Sledování fyziologických vlastností (vztah k O<sub>2</sub>, rychlost růstu,...)
- Složení odpovídá požadavkům MO (pH, zdroj C, N..)
- Příprava – aseptická práce se sterilním nádobím
  
- Syntetická x přirozená                      základní x obohacená
- Univerzální x selektivní x selektivně diagnostické
- Tekuté x polotekuté x tuhé x ztužené
- transportní
  
- Způsoby sterilizace chemická x fyzikální (suché a vlhké teplo, filtry, frakcionizovaná sterilizace, záření...) – délka závisí na použitém objemu, pozor na citlivá média (např. s cukry)
- **Dezinfekce** = zničení vegetativních forem MO
- **Sterilizace** = zničení všech forem MO

- Agar – izolace jednotlivých kolonií, přímý průkaz MO, pozorování makroskopických znaků
- Bujon – pomnožení, nerozeznáme směs MO
  
- Mikroorganismy – kultivovatelné asi 1,5 – 5%
- Půdy si připravíme dle cílového MO → směs z prostředí, sbírková kultura (katalog), klinika,...
  
- Viry – kultivace na nárůstu bakterií → fágy
  - Na tkáňových kulturách → živočišné viry
  - Podobné je to u intracelulárních parazitů

- Cílená izolace ze vzorku směsné kultury
- Selektivní podmínky
- Zisk uhlíku (heterotrofie, autotrofie)
- Zisk energie (chemoorganotrofie, chemolitotrofie, fotolitotrofie)



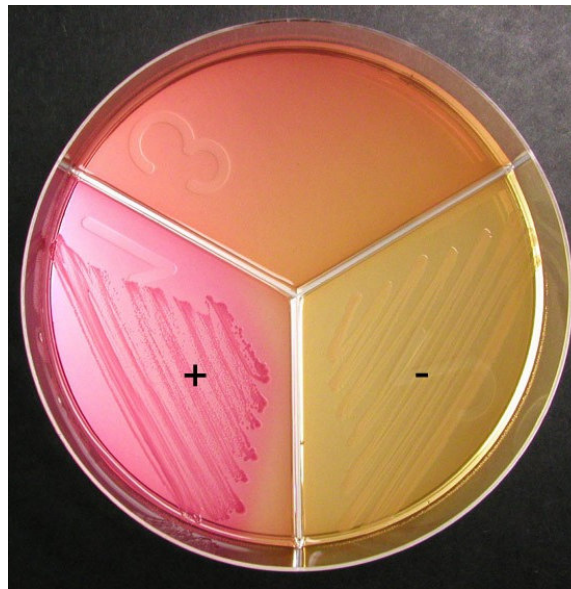
- čokoládový agar
- masopeptonový
- masopeptonový-krevní agar



- **Endův agar** - selektivní složkou a zároveň indikátorem štěpení laktózy je v této půdě Schifovo reagens (vyvážená směs bazického fuchsinu s kyselým siřičitanem sodným), které reaguje s aldehydy

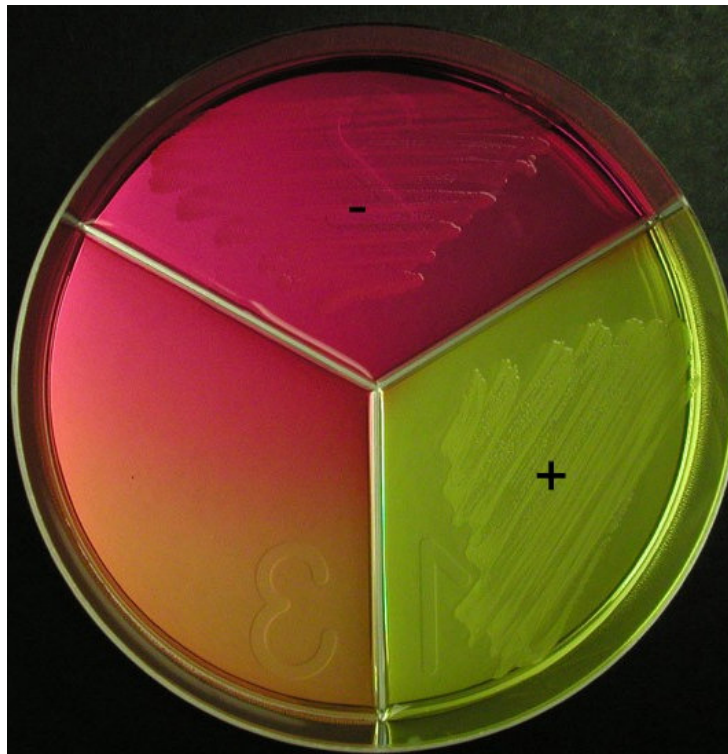


- **MacConkeyův agar** - inhibiční složkou v médiu je speciální směs žlučových solí. Okyselení, které vzniká rozkladem laktózy, indikuje neutrální červeň. Inhibiční rozsah má téměř shodný s Endovým agarem. Obě média umožňují růst gramnegativním nenáročným bakteriím z čeledi *Enterobacteriaceae*, *Vibrionaceae*, *Aeromonadaceae* a některým dalším rodům (*Pseudomonas*, *Alcaligenes*).



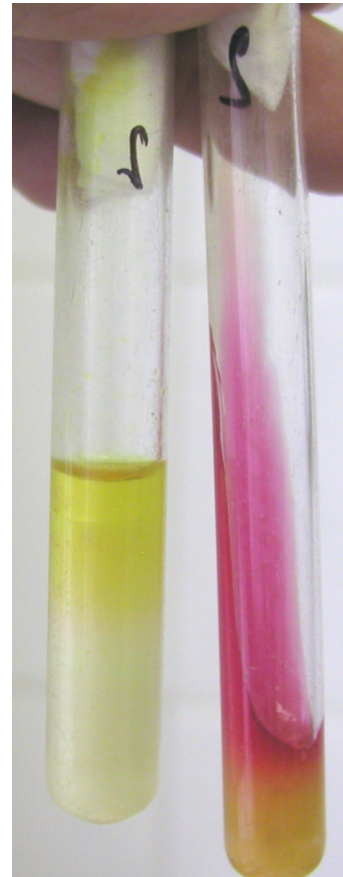
- **Desoxycholát-citrátový agar (DC agar)** - inhibiční složkou jsou v médiu tvoří žlučové soli, avšak ve vyšší koncentraci než v MCA. Navíc obsahuje citronan železitý, který indikuje tvorbu sirovodíku. Indikátorem okyselení je opět neutrální červeň. DCA je zvláště vhodný pro izolaci salmonel a yersinií. Podobné složení má i Salmonella-Shigella agar (SS agar).

- **Agar s brilantovou zelení** - inhibiční složkou je brilantová zeleň, indikátorem pH fenolová červeň. Používá se hlavně pro selektivní izolaci salmonel. Přidá-li se do půdy jako diagnostická přísada vedle laktózy ještě sacharóza, zvýší se její diferenciací hodnota. Dnes je průmyslově vyráběna řada tzv. chromogenních půd na kterých lze rozlišit podle typického zbarvení kolonií vybrané rody z čeledi *Enterobacteriaceae*. Jako příklad lze uvést Rambachův agar, který je určený pro izolaci salmonel.





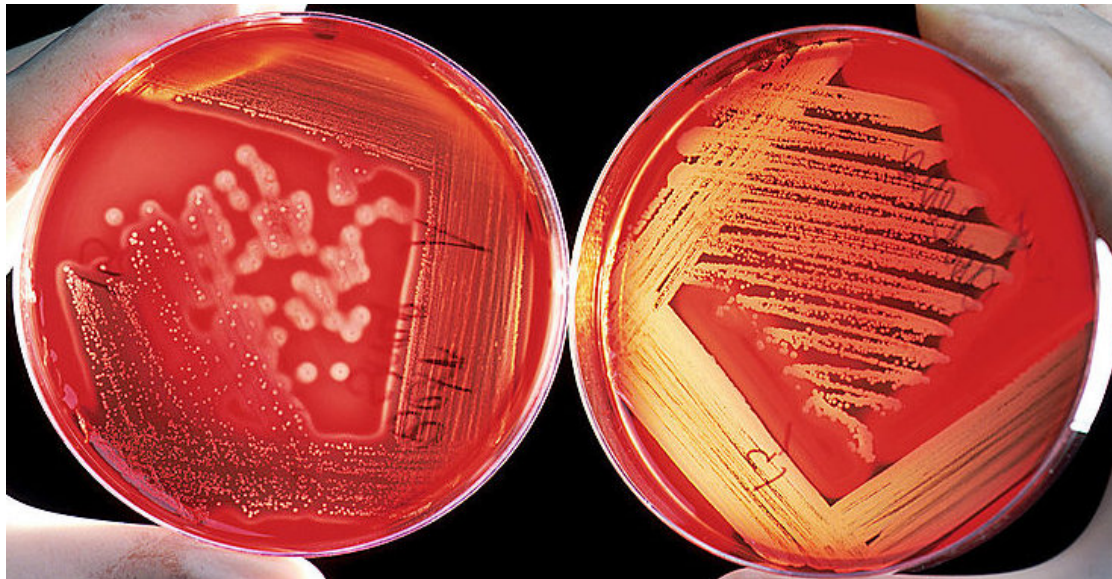
- zkvašování cukrů a produkce  $\text{CO}_2$  v **kombinované půdě podle Hajny**. Substrátem pro tvorbu  $\text{H}_2\text{S}$  je thiosulfát sodný a indikátorem citrát železitoamonný. Sirovodík vytvořený redukcí thiosulfátu reaguje s ionty železa za vzniku sulfidu železitého. Produkce  $\text{H}_2\text{S}$  se projeví zčernáním spodní části půdy. *S. Typhi* dělá jen užoučký černý proužek na rozhraní šikmé části a plného sloupce.



- **Mueller Hinton agar** je kultivační půda, která se používá pro test citlivosti na antibiotika a sulfoamidy (disková, difúzní Kirby-Bauer metoda) a pro primární izolaci neisserií.



- **krevní agar** (vlevo stafylokoky, vpravo streptokoky)

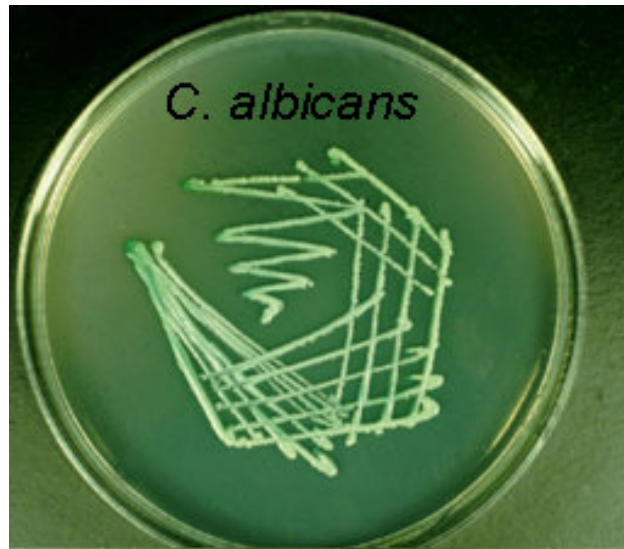


- **Polotuhé médium, *Proteus mirabilis***
- plazivý růst = Raussův fenomén = fenomén příbojové vlny





- Chromogenní půda



## Postup

### !POPSAT SVÉ ZKUMAVKY A MISKY ZESPODU!

- Navážit 2,6 g masopeptonového bujonu = MPB
  - Doplnit do 200 ml destilovanou vodou, změřit pH (případně upravit)
  - Pipetovat po 5 ml do zkumavek
  - Přidat 3,6 g agaru, po zahřátí pipetovat do zkumavek po 5 ml
  - Sterilizace v autoklávu (poté již aseptická práce!!!!)
  - Rozlití MPA (masopepton.agar) do Petriho misek, ožihávat hrdlo!
  - Zkumavky s MPA našikmit
- Výsledek: 3 misky MPA, 2 šikmé agary MPA, 1 tekutý bujon MPB