

IZOLÁCIA BAKTÉRIÍ



Selektívne agary, očkovanie, izolácia čistých kultúr

Izolácia baktérií

- prirodzené prostredie – MO v spoločenstvách (biocenózach-bakteriocenózach)
- izolácia = oddelenie mikroorganizmu od ostatných druhov v biocenóze (zo zmiešanej kultúry)
- cieľ izolácie – získavanie čistej kultúry s rovnakým genetickým kódom
- techniky – závislosť od charakteru substrátu a počtu MO v substráte
- čistá kultúra = potomstvo s rovnakými gen. vlastnosťami (z jednej bunky)
- nahromad'ovacia kultúra → namnoženie pred izoláciou (ak sa v substráte nachádza v nízkom počte)

Izolácia baktérií

- izolácia skupín MO na báze rozdielnych parametrov, napr.:
 - nutričných požiadaviek
 - pH (acidofilné, neutrofilné, alkalofilné MO)
 - nárokov na kultiváciu (teplota, čas, vzťah ku kyslíku)

Teplota – príklad - Enterobaktérie (35 ± 2 °C)

- Klostrídiá (30 °C)

Čas – príklad - Enterobaktérie (24 h.)

- Enterokoky (24-48 h.)

- Laktobacily (48-72 h.)

Vzťah ku kyslíku (obligátne aeróby, fakultatívne aeróby, mikroaerofily, fakultatívne anaeróby a obligátne anaeróby)

Izolácia baktérií

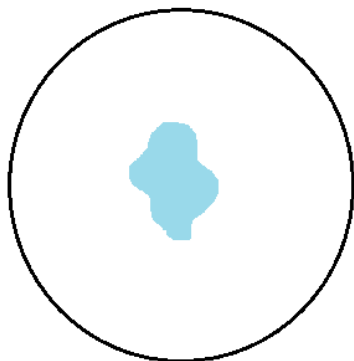
- reakcie na pridanie špecifických látok (napr. žľčové kyseliny pre Enterobaktérie)
- » prvotné roztriedenie -» čistenie preočkovaním – výber vhodných kolónií na preočkovanie podľa morfológických a kultivačných znakov
- jednoduchá izolácia – kultivácia na selektívnych živných pôdach –väčšinou sa kultivuje požadovaných typ MO,
- Izolácia z neselektívnych živných pôd – podmienkou je vyselektovať čistú kultúru a opakované prečisťovanie kultúry
- uchovávanie: šikmý agar v skúmavkách

Metódy izolácie

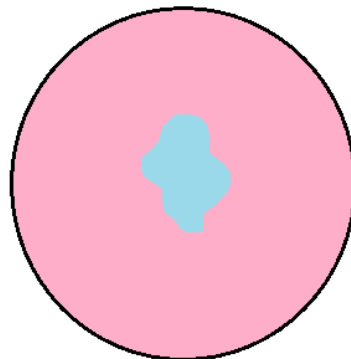
- MAKROSKOPICKY (farba, rast, tvar kolónie, vôňa a pod)
- MIKROSKOPICKY (tvar buniek, usporiadanie buniek a pod.)
- izolácia nalievaním platní
- iz. rozterom na povrchu platne
- iz. čiarkovaním
- iz. rozmiešaním do vysokej vrstvy agaru

Izolácia zalievaním bakt. suspenzie

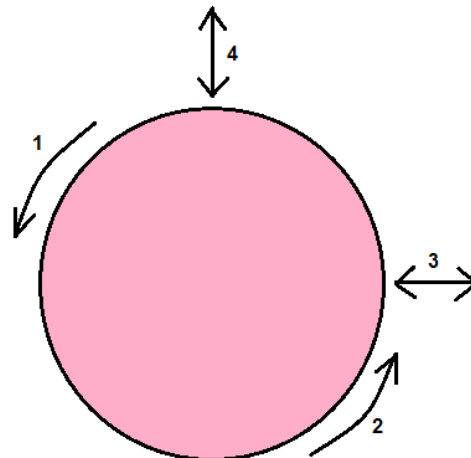
1. Do sterilnej petriho misky pridáme 1 ml bakteriálnej suspenzie o známom riedení
2. Bakteriálnu suspenziu prekryjeme dostatočne ochladeným agarom (20 – 30 ml agaru) podľa požadovaného typu mikroorganizmu
3. Petriho misku opatrne premiešavame vo všetkých smeroch, aby sa bakteriálna suspenzia rovnomerne rozmiestnila v celom objeme agaru



1 ml bakt. suspenzie



pridáme 20 - 30 ml agaru

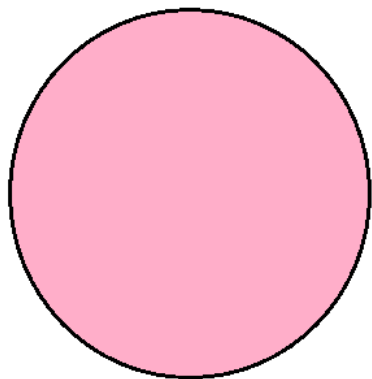


premiešavame

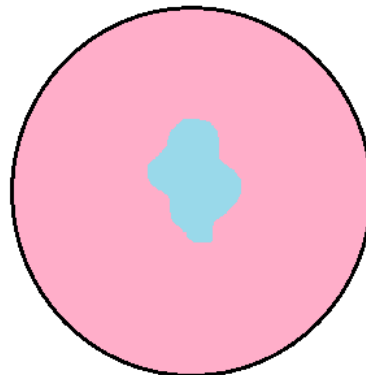


Izolácia rozterom na povrch platne

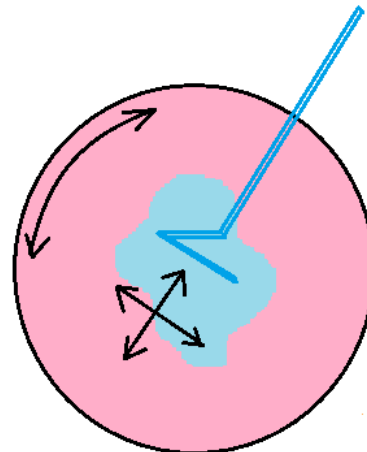
1. Do sterilnej petriho misky pridáme 20-30 ml agaru a necháme stuhnúť pri izbovej teplote, pozn.: pri naliatí horúceho agaru sa pary skondenzujú na kryte misky, ktoré môžu spôsobiť zmiešanie čistenej kultúry pri kultivácii
2. Na povrch stuhnutého agaru pridáme od 100µl do 1 ml bakt. Suspenzie
3. Pomocou L-tyčinky rozotrieme bakt. suspenziu všetkými smermy aby sa bakt. suspenzia rovnomerne rozmiestnila po celom povrchu agaru



pridáme 20 - 30 ml agaru



1 ml bakt. suspenzie



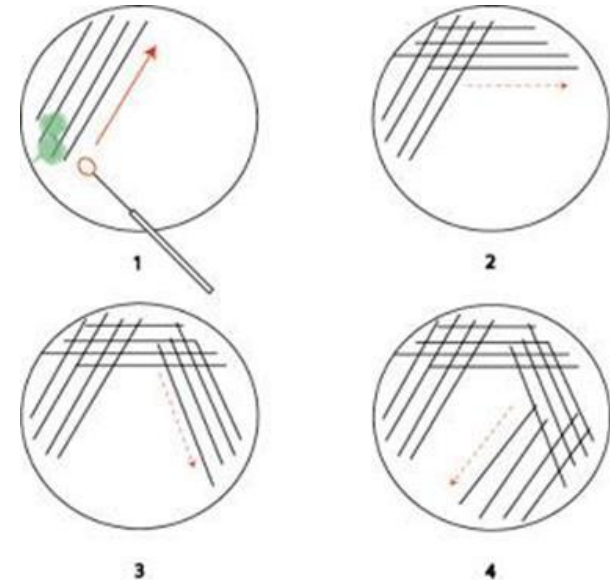
smery rozotieranie



Izolácia čiarkovacou metódou

1. Na povrch agaru do jedného body misky nanesieme bakteriálnu kultúru, očko opálime a bakteriálnu kultúru rozťahujeme v 3-4 čiarach
2. Z opačnou stranou očka vyťahujeme čiary z konca predošlých čiar
3. Proces 2 zopakujeme
4. Proces 3 zopakujeme a urobíme poslednú vlnovitú čiaru

Pozn.: čiarkujeme vždy z konca predošlých čiar, očko musí byť vysterilizované plameňom po prvom kroku, čiarkujeme jemne aby nedošlo k pretrhnutiu agaru

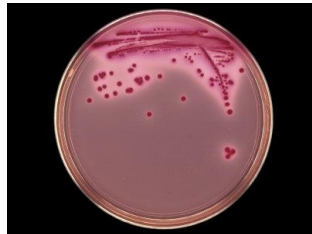
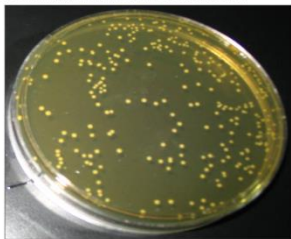


Živné média

Izolácia na selektívnej ž. p.:

- Ashbyho agar – nitrogénne baktérie
- Waxmanov agar – aktinomycéty
- Endov agar, MacConkey agar – koliformné baktérie
- Kopřivníkov šampiónový agar – myxobaktérie
- MRS agar – rod *Lactobacillus* sp.
- Slanetz-Bartley agar – rod *Enterococcus* sp.

Figure 4.1: Colony appearance of lactic acid bacteria in MRS agar for product II.



Očkovanie - spôsoby

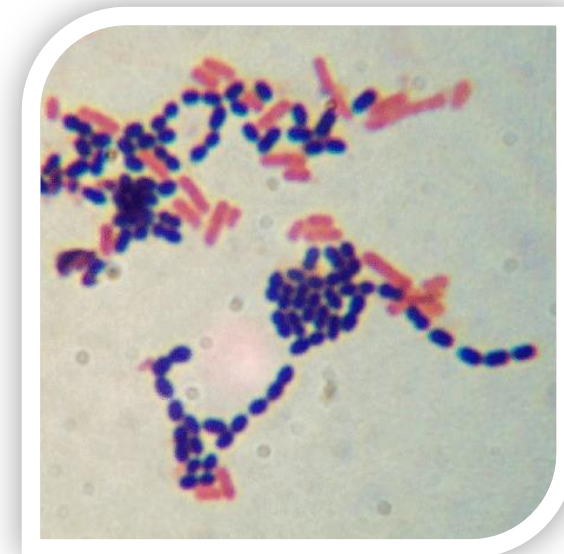
- pipetou (presný objem) zaliatím (vmiešaním)
rotačné r. L-tyčkou - povrch

- preparačnou ihlou vpichom
- bakteriologickým očkom povrchovo
 - jednoduché r.
 - lúčovité r.
 - r. krížom
 - r. rotačne

Praktické cvičenie

1. Farbenie bunkovej steny podľa Gramma + mikroskopické pozorovanie

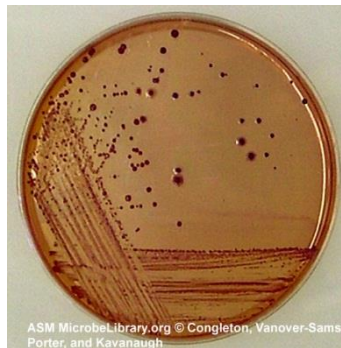
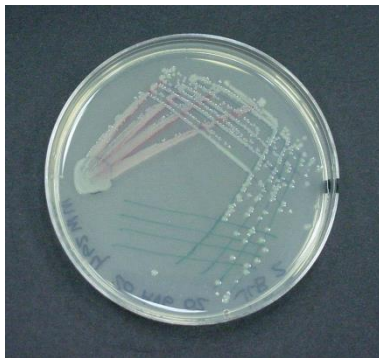
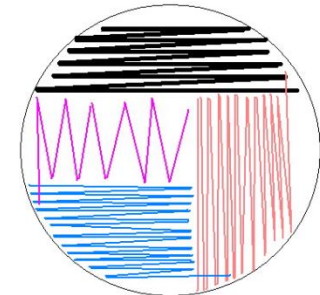
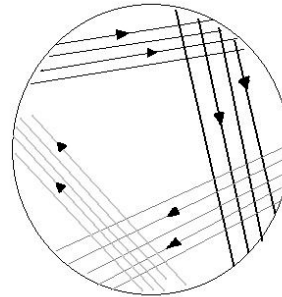
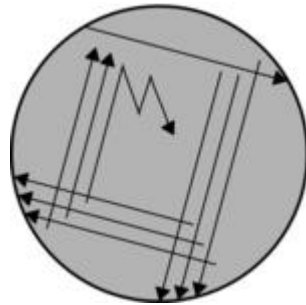
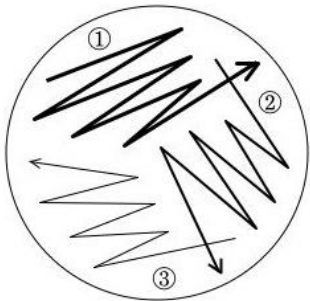
- Na podložné sklíčko kvapneme malú kvapku vody (priemer 3mm)
- Sterilným bakteriologickým očkom prenesieme do kvapky bakteriálnu kultúru
- Vytvoríme náter (napr. pomocou druhého podložného sklíčka)
- Necháme uschnúť
- Fixovanie plameňom (2-5 sekúnd, neupiecať!)
- Preparát prevrstvíť na 60 sekúnd roztokom kryštálovej violeti
- Farbivo sa opatrne zmyje stričkou
- Preparát sa preleje asi na 20 sekúnd Lugolovým roztokom
- Opatrne zmyjeme stričkou rovnakým smerom
- Preparát sa odfarbuje etanolom alebo acetónom – kým vidíte zmývať farbu
- Opäť zmyjeme stričkou rovnakým smerom
- Preparát prelejeme na 3 sekundy zriedeným karbolfuchsinom
- Farbivo opláchneme stričkou
- Preparát prikryjeme krycím sklíčkom
- Prebytočnú tekutinu osušíme medzi filtračnými papiermi
- Pozorujeme pod mikroskopom homogénnou imerziou



Praktické cvičenie

2. Čistenie bakteriálnej kultúry - čiarkovaním

- Pomocou bakteriologického očka nabrať bakteriálnu kultúru
- Použiť jednu z nasledujúcich metód čiarkovania
- Dôležité: po nanosení bakt. kultúry očko opáliť, až potom čiarkovať



Praktické cvičenie

3. Čistenie bakteriálnej kultúry - rozterom

- Pomocou bakteriologického očka nabrať bakteriálnu kultúru
- Preniesť ju do skúmavky z fyziologickým roztokom alebo vodou
- Obsah skúmavky rozmiešať vortexom na homogénnu suspenziu
- Pri vysokom zákale riediť na 0,1 – 0,2 McF°
- Zo skúmavky odpipetovať 1 ml bakteriálnej suspenzie a preniesť na povrch agaru
- Pomocou L – tyčinky rovnomerne rozotrieť suspenziu po celom povrchu
- Povrch agaru musí byť dostatočne suchý (v prípade nutnosti dosušiť v sušičke pri 60°C)
- Nechať kultivovať pri odporúčanej teplote v termostate

