

Izolace čisté kultury mikroorganismů/bakterií křížovým roztěrem

Cíl, teorie:

- a) seznámit se s postupem křížového roztěru a izolací čisté kultury v mikrobiologii

Izolace čisté kultury mikroorganismů je důležitá pro další mikrobiologickou práci. Izolace čisté kultury bakterií je historicky spojena se jménem významného německého mikrobiologa, zakladatele bakteriologie Roberta Kocha (1843-1910). Izolace čisté kultury křížovým roztěrem je jednou z nejběžnějších mikrobiologických izolačních technik. Postup je takový, že postupným vyředováním vzorku, pomocí roztěru bakteriologickou kličkou po agarové půdě. Po několika opakovaných roztěrech (viz obr. 1) dostaneme po vyředění jednotlivé bakteriální kolonie, které rostou z jedné bakteriální buňky. V laboratorním cvičení se seznámíme s izolací bakterií na agarové plotně křížovým roztěrem, budeme přitom postupovat podle instrukcí vedoucího laboratorního cvičení.



Obr. 1: Agarová plotna s křížovým roztěrem a ředěním – ukázka kolonií, jeden z možných postupů při provádění roztěru. [Vymětalová]

Materiál, laboratorní sklo a plast, použité chemikálie, přístroje:

Petriho misky s připravenými agarovými půdami, kultura bakterií *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis* apod., jednorázové plastové sterilní bakteriologické kličky, lihový kahan, popisovač, laminární box, kádinky, inkubátor, nádoba na odpad

Vlastní pracovní postup

- a) Naučíme se postup, jakým budeme provádět roztěr u bakteriálních kultur. Případně si můžeme fixem rozdělit Petriho misku s agarem pro jednotlivé zóny, ve kterých budeme provádět ředění.

- b) V laminárním boxu si připravíme nalité Petriho misky s agarovou půdou, kultury bakterií, se kterými budeme pracovat, kahan, kádinku, bakteriologické kličky.
- c) Na bakteriologickou kličku nabereme kulturu bakterií z pevného agaru.
- d) Pomalu a podle instrukcí vedoucího praktika nadzvedneme v laminárním boxu víčko Petriho misky. Víčko nepokládáme, ale snažíme se držet v jedné ruce, v druhé ruce držíme sterilní bakteriologickou kličku a provádíme roztěr po povrchu agaru. Pozor kličku nezapichujeme do agaru, jen bakteriální kulturu roztíráme po povrchu!!! Provedeme nejméně 3 vodorovné tahy vedle sebe. Pootočíme misku a přes původní čáry uděláme další 3 vodorovné tahy, můžeme opakovat nebo také finálně opakujeme ještě jednou jen s jedním tahem, např. ve formě hádku.
- e) Nakonec provedeme několik tahů na finální vyředění.
- f) Petriho misku uzavřeme.
- g) Petriho misku popíšeme datumem a použitou bakteriální kulturou a uložíme do inkubátoru.
- h) Inkubaci provádíme při teplotě podle optima pro růst zvolené bakteriální kultury (30°-37°C pro mezofilní bakterie).

Získané výsledky a vyhodnocení

Do protokolu popíšeme, jaké množství Petriho misek, s jakými bakteriálními kulturami jsme připravili. Popíšeme, při jaké teplotě, po jakou dobu 24 h, 48 h, 72 h kultivujeme. Vyhodnotíme úspěšnost naší práce, tj. jestli se nám po vyředění, podařilo získat jednotlivé bakteriální kolonie.

Diskuse a závěr

Zjistíme, jak proběhla izolace čisté kultury u dalších dvojic ve skupině, provedeme diskusi.