

Obsah:

2 očkovací kličky	testovací antibiotické proužky 2x6 ks s různými látkami
1 Drigalského klička	2x 125 ml živného agaru
4 kapátka	5 ml roztoku methylenové modři
20 jednorázových dvoudílných Petriho misek	20 ks filtračního papíru
50 podložních sklíček	

Práce s bakteriemi a jejich kultivace jsou v moderní výuce biologie nepostradatelné. „Cvičení z bakteriologie“ od společnosti Schlüter má za úkol vám tuto výuku co nejvíce usnadnit.

U žáků i dospělých se často setkáváme s určitým „strachem z bakterií“, který vede k tomu, že se této skupině organismů „klidíme z cesty“. Nehledě na to, že to v každodenním životě není ani možné, ani rozumné, je třeba si rovněž uvědomit, že jen relativně málo druhů bakterií je vysloveně původcem nemocí – jejich kultivace ve škole je pak tak jako tak zakázána. Přesto vám radíme, abyste při zkoumání a kultivaci nepatogenních organismů dodržovali bezpečnostní opatření. Manipulace s bakteriemi by měla zásadně probíhat při dodržení bezpečnostních opatření – to je úkol pro pedagogické pracovníky. Všechny pracovní metody v rámci tohoto cvičení z bakteriologie byly vyvinuty v souladu s bezpečnostními hledisky.

Dodržujte prosím následující pokyny: Při práci s bakteriemi je zakázáno jíst, pít a kouřit.

Bakteriální kultury nesmí zůstat stát otevřené (např. víčko Petriho misek je třeba upevnit lepicí páskou ke dnu) a je zakázáno se jich dotýkat prsty. Laboratorní přístroje, které přišly do kontaktu s bakteriemi, je nutné sterilizovat. Často stačí pouhé opálení nebo vyžihání (např. očkovací kličky před každým použitím a po něm). Bakterie pocházející od lidí (např. zubní plak, kožní bakterie) jsou samozřejmě pro mikroskopická pozorování vhodné a vedou k zajímavým poznatkům. **Neměly by se však kultivovat pro účely vyučování.**

Pracovní plochy znečištěné bakteriemi je třeba otřít dezinfekčními prostředky nebo lihem. Použité bakteriální kultury se musí pečlivě zlikvidovat. K tomu se velmi dobře hodí jednorázové pomůcky. Dříve než např. vyhodíte kultury v Petriho miskách, smíchejte je s několika mililitry dezinfekčního prostředku (např. 5% roztok formalínu nebo běžně dostupné dezinfekční prostředky) a vložte je dobře uzavíratelného plastového sáčku. Pokud jste kultury pěstovali ve skleněných pomůckách (např. reagenčních zkumavkách), které je třeba umýt, musíte i v tomto případě přidat dezinfekční prostředek; ten by měl působit po dobu několika hodin (nejlépe přes noc).

Pokud máte k dispozici laboratorní autokláv, dají se bakteriální kultury samozřejmě spolehlivě zničit i v něm. Kultury v plastových Petriho miskách se rovněž dají spálit, pokud k tomu máte možnost.

Obstarání bakteriologického materiálu ke zkoumání

Bakteriologický materiál ke zkoumání snadno najdete v přírodě nebo si ho můžete snadno vypěstovat. Zde uvádíme několik příkladů:

Kyselé mléko vznikne bez dalšího přičiněním z nepasterizovaného mléka tím, že ho jednoduše necháme stát. Zejména v teplém prostředí se bakterie mléčného kvašení, které jsou v mléce obsaženy, množí velmi rychle. Rozkládají mléčný cukr na kyselinu mléčnou, která způsobuje srážení mléčkového proteinu.

Kyselé mléko (sražené mléko) obsahuje *Streptococcus lactis*, bakterii, která se vyskytuje samostatně, ve dvojicích, nebo také v krátkých řetězcích složených ze 3 až 4 buněk. Kromě toho se v něm nachází ještě *Lactobacillus lactis*, relativně velká tyčinkovitá bakterie.

Jogurt obsahuje *Streptococcus thermophilus* (koky) a *Lactobacillus bulgaricus* (tyčinky).

Kefír vzniká činností různých bakterií mléčného kvašení, např. *Streptococcus lactis*, *Streptococcus cremoris* (vytváří dlouhé řetězce) a *Lactobacillus caucasicus* (tyčinkovité bakterie). Dále se v kefiru nachází *Bacillus caucasi* – šroubovitá tyčinkovitá bakterie – a také různé laktózové kvasinky.

Všechny tyto mléčné produkty se velmi dobře hodí pro přípravu roztěrů pro mikroskopické pozorování. Roztěry by měly být co nejtenčí. Je výhodné, pokud preparát obsahuje jen malé množství mlékových proteinů. Toho dosáhnete tím, že budete pozorovat syrovátkovou kapalinu, která se hromadí v prohlubních.

Kořenové hlízkové luštěnin (motýlokvěté rostliny) obsahují hlízkové bakterie (*Rhizobium leguminosarum*), které jsou velmi důležité pro fixaci dusíku. Pro pozorování musíte kořenovou hlízkou rozřezat. Nožem poté seškrabte z řezné plochy trochu hmoty a zhotovte z ní roztěr.

Zalijete-li seno vodou a tento nálev necháte po několik dnů v klidu stát, vytvoří se na vodní hladině „křís“, který je z velké části tvořen sennými bacily (*Bacillus subtilis*). *Bacillus subtilis* je možné ještě více zkoncentrovat, a to převařením senného nálevu. Zničí se tím velký počet cizích zárodků, zatímco spory bacilu senného ohřev přežijí.

Dostupné jsou vždy bakterie zubního plaku. Zde můžete narazit na tokové druhy bakterií jako např. *Leptotrichum dentium*, tyčinkovitou bakterii o délce až 25 µm. Kromě toho se zde nachází různé koky, spirochety a vibriony. Nehledě na to, že většině bakterií zubního plaku se na běžném živném agaru nedaří, měli byste se kultivace těchto bakterií vzdát také z bezpečnostních důvodů.

Příprava destiček se živným agarem

Pro většinu bakteriologických experimentů je zapotřebí sterilní živný agar, který pokryje dno Petriho misky. Tato sada pomůcek obsahuje jednorázové sterilní Petriho misky a také sterilní živný agar.

Pro zkapalnění živné půdy zahřejte obsah lahvičky v lázni s vařící vodou. Nejlépe se k tomu hodí kádinka naplněná vodou, do které lahvičku s živným agarem postavíte. Přitom dbejte na to, že průměr kádinky by neměl být příliš velký, aby se lahvička nemohla převrhnout. Dále by voda měla sahat maximálně do 2/3 lahvičky, aby se do ní nemohla dostat vařící voda. Před zahříváním povolte uzávěr lahvičky o cca ¼ otáčky (ale uzávěr neodstraňujte). Tlusté sklo lahvičky by při prudké změně teploty mohlo prasknout. Doporučujeme proto, abyste lahvičky s živným agarem postavili do studené vody a teprve poté zahřívali. Jakmile je celý obsah lahvičky tekutý, můžete jej začít kapat na destičky.

Mezitím si podél hrany stolu rozestavte 8 až 10 Petriho misek. Dávejte prosím pozor, aby Petriho misky byly sterilní a bylo je tak možné bez dalších opatření okamžitě použít. Destičky se nesmí zbytečně otevírat a už vůbec se nesmíte jejich vnitřní strany dotýkat prsty.

Nyní lahvičku s živným agarem uchopte do silné utěrky, uzávěr zcela odšroubujte a otvor kvůli bezpečnosti opalte krátce nad plamenem plynového nebo lihového hořáku. Poté lehce nadzvedněte víčko Petriho misky na jedné straně a ze zásobní nádoby nalijte tolik živného agaru, aby bylo dno misky pokryto do výšky cca 3 mm. Po ztuhnutí agaru destičky otočte a nechejte je ležet na víčku.

Víčko misky se zpravidla pokryje kondenzovanou vodou. To může experimenty narušovat, pokud kondenzát odkapává na živnou půdu. Proto byste měli destičku použít teprve tehdy, až se voda odpaří (např. ji nechejte ležet přes noc). Zkondenzovanou vodou ale můžete z víčka destičky také krátce před použitím setřít. Tvorbě

kondenzátu se dát také zabránit tím, že se zkapalněná živná půda před nalitím ochladí na cca 60 °C („mírně teplá“).

Ted' máme sterilní živné půdy, které se hodí pro celou řadu pokusů.

Zde uvádíme několik příkladů:

Prokázání vzduchem přenášených bakterií

Pro „zachycení“ vzduchem přenášených bakterií jednoduše otevřete Petriho misky a živný roztok nechejte po dobu 10 až 20 minut volně exponovat. Poté opět nasadte víčko a nechejte destičku po několik dnů stát při pokojové teplotě na místě chráněném před světlem. Na povrchu živné půdy pak budete moci rozeznat větší či menší počet v tu dobu skutečně nápadně zbarvených kolonií bakterií, které se budou výrazně odlišovat od případných přítomných plísní. Jedna kolonie vzniká zpravidla z jedné jediné bakterie (tzv. spory). Tento pokus se dá snadno různě modifikovat: destičky necháte exponovat na různých místech (např. pokoj, školní dvůr, rušná ulice, les atd.). Počet kolonií pak dokládá zatížení vzduchu bakteriemi.

Můžete také stejným způsobem exponovat několik destiček, inkubaci však nechat probíhat při různých teplotách. Zřejmě budou nejen různé potíže s množením, ale také rozdíly, které souvisí s různými požadavky bakterií na teplotu.

Pomocí očkovací kličky se dají vzorky bakterií snadno odebrat a zhotovit z nich roztěry. Můžete připravit rovněž monokultury.

Zkoumání vzorků vody

Zde máte dvě možnosti:

1. Jednu kapku ze vzorku vody naneste na povrch agarů a pomocí Drigalského kličky ji rovnoměrně rozetřete. Abyste kličkou nezanesli do vzorku žádné další bakterie, musíte ji před použitím opálit.
2. Do prázdné Petriho misky nakapejte pipetou 1 mililitr zkoumané vody a přilijte k ní vlažný tekutý živný agar. Opatrnými, krouživými pohyby obsah misky rovnoměrně rozdělte.

V obou případech se inkubace provádí při pokojové teplotě a kontrola proběhne po 24 nebo 48 hodinách. Obzvláště výrazně se kolonie, které jsou v některých případech skutečně malé, vyjmají na tmavém podkladu. Z „počtu kolonií“ se dají vyvodit závěry o kvalitě vody.

Příprava monokultur

Monokultura obsahuje bakterie stejného druhu.

Většinou z jednoho zárodku vznikne kolonie bakterií jednotného vzhledu, jak ji najdeme např. na „vzdušné destičce“, a v souladu s tím se po naočkování na čerstvém živném agaru vyvine monokultura.

Někdy se však může stát, že se kolonie, která z makroskopického hlediska vypadá jednotně, skládá ze dvou druhů bakterií. Kvůli jistotě je třeba jednocení buněk bakterií provést i u jednotně vypadajících kolonií. Rozdělení musí proběhnout tím spíš, pokud se mají z heterogenního materiálu (např. ze senného nálevu) vypěstovat jednotlivé bakteriální kmeny.

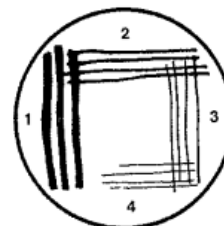
Jednoduchou metodou, jak směsi bakterií rozdělit, je zředěný roztěr:

Očkovací kličkou naberte malé množství bakteriálního materiálu a rozetřete ho v úzké vlnovce na destičku s živným agarem. Čím delší vlnovka je, tím více jednotlivých bakterií nakonec bude. Kolonie, které se z nich vyvinou, je možné dále kultivovat samostatně jako monokulturu.



Očkovací klíčka

Dobrych výsledků můžete dosáhnout i s rozetěrem podle následujícího vzoru:

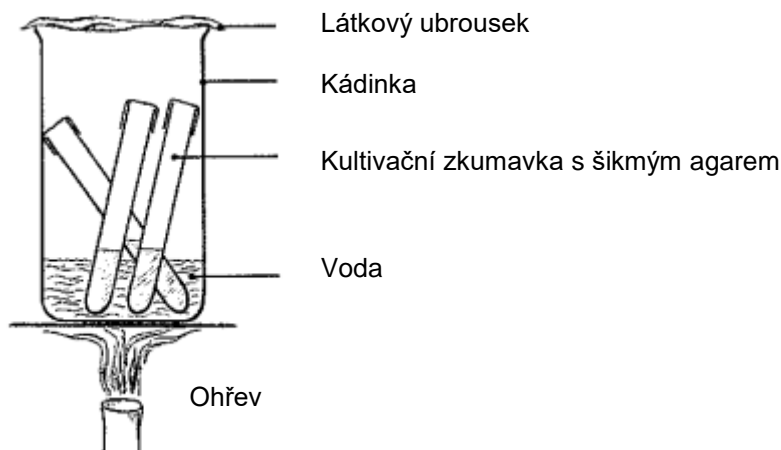


1-4: pořadí, ve kterém jsou čáry vedeny

Pro delší uchování a pro kultury nenáročné na místo se obzvláště hodí kultivační zkumavky s šikmým agarem. Jedná se o reagenční zkumavky s čepičkovým nebo vatovým uzávěrem, které se plní živným agarem zhruba do jedné čtvrtiny. Je však vyžadována nová sterilizace živné půdy – buď v parním hrnci, nebo tlakovém hrnci (autokláv).

Parní hrnec: Velkou kádinku (1 litr, vysoká) naplňte asi 3-5 cm vody, vložte zkumavku s agarem a vodu přiveďte k varu. Pro dosažení vysokého nasycení parou přikryjte kádinku látkovým ubrouskem. Vodní lázeň nechte vařit po dobu asi 20 minut.

Tento postup následujícího dne ještě dvakrát zopakujte. Na závěr nechte agar v šikmé poloze ztuhnout a poté vlnovkově naočkujte bakterie.



Při vyhodnocení pokusů byste si měli uvědomit, že samotná čistá pramenitá voda obsahuje na rozdíl od dekontaminované vody vždy určitý počet takzvaných „vodních zárodků“. Nízký počet bakterií by tedy mohl v závislosti na podmínkách představovat jakýsi důkaz kvality.

Test na antibiotika

Očkovací klíčkou přeneste na povrch živné půdy bakteriální vzorek. Jako testovací bakterie se hodí např. bacil senný (*Bacillus subtilis*). Poté Drigalského klíčkou rozetřete bakterie rovnoměrně po celé živné půdě („vytvořte plát“). Nyní položte jeden nebo více testovacích proužků s různými látkami doprostřed živné půdy. Už příštího dne uvidíte kolem těchto proužků zóny bez bakterií. Velikost inhibiční zóny udává účinnost antibiotika, resp. citlivost testovaného zárodku. Jednotlivé výsledky se liší podle druhu použité testované bakterie.

Testovací antibiotické proužky: Používají se v humánní a veterinární medicíně pro posouzení účinnosti antibiotik na určité původce nemocí. Na jednotlivých proužcích jsou nanášena různá antibiotika. Množství použitých antibiotik se však liší. Odpovídají hladině v krvi a tkáni in vivo dosažitelné při běžné léčbě.

Životnost: Při uchovávání v suchu a chladu (lednice) zůstává plná účinnost zachována po dobu 4 týdnů. Poté sice účinnost postupně klesá, **použití ve školní výuce je však možné ještě po několik dalších měsíců.**

Upozornění: Protože při tomto pokusu může dojít k obohacení rezistentních kmenů, je nutné při odstraňování destičky postupovat opatrně (k dezinfekci přidejte formalinový roztok)!

Při vyučování je mimořádný zájem i o testování baktericidní účinnosti jiných látek. Za tím účelem napustte malé kousky filtračního papíru (označené) různými dezinfekčními prostředky nebo solemi těžkých kovů (např. soli mědi nebo rtuti). Tyto kousky papírů, vlhké nebo suché, položte na kulturu a výsledky zaznamenejte do protokolu.

Bakterie na kůži, efekt mytí

Destičku s živnou půdou rozdělte na dvě poloviny (vyznačte čáru na dně misky). Na jedné polovině otiskněte neumytý palec. Pak si ruku důkladně umyjte mýdlem, opláchněte ji pod tekoucí vodou a stejný palec, ještě vlhký (neosušený!), otiskněte na druhou polovinu živné půdy. Bakterie se vyvíjí už při pokojové teplotě, rychleji při 30 °C.

Po několika málo dnech získáte překvapující výsledek: V podstatě se dá předpokládat, že se více bakterií vyvine pod otiskem nemytého palce než toho umytého. Opak je ale pravdou.

Vysvětlení: Mýdlo čistí až „do hloubky pórů“ a vymývá bakterie z papilárních linií. Pokud nyní umytou kůži osušíte, ulpí bakterie na ručníku (problém společných ručníků!).

Metoda otisku prstu se hodí také pro orientační prokázání výskytu bakterií na povrchu různých předmětů. Zajímavé jsou například pokusy s ručníky, bankovkami, mincemi, dveřními klikami atd.

Upozornění: Z bezpečnostních důvodů by se bakterie z lidské kůže neměly dále kultivovat. **Kultury po použití spolehlivě zničte.**

Účinek ultrafialového záření. UV záření dokáže bakterie usmrtit. Proto se používá také ke sterilizaci. Jako zdroj záření pro jednoduché experimenty slouží laboratorní UV lampa, případně UV ozařovací přístroj.

Provedení: Na povrch živné půdy naneste vrstvu bakteriálního vzorku (použijte Drigalského kličku). Bakterie by měly pocházet z kultury staré teprve cca 1-2 dny. I kultury bakterií tvořících spory, např. *Bacillus subtilis*, se v této době ještě nachází ve vegetativní fázi citlivé na UV světlo.

Otevřenou Petriho misku přikryjte kolečkem z lepenky, do kterého jste vyřízli okýnko (např. ve tvaru kříže). Takto zakrytou kulturu vystavte po dobu asi 20 minut záření, poté ji uzavřete víčkem a nechejte 1 až 2 dny inkubovat (při pokojové teplotě).

Pro kontrolu prostupnosti UV světla sklem zakryjte okýnko v šabloně skleněnou destičkou (podložním sklíčkem).

Výsledek: Bakterie netvořící spory stejně jako bakterie tvořící spory ve vegetativním stavu relativně rychle umírají. („Okýnko“ v lepenkovém kolečku). Protože se pod skleněným krytem vyvíjí nenarušený bakteriální porost, můžeme vyvodit, že sklo absorbuje UV světlo.

Zkopírování distribučního vzorku kolonií na jiné živné půdy

Uvědomte si prosím, že používané Petriho misky mají průměr minimálně 80 mm.

Pomocí replikačního razítka (obj. č. 355.400) se bakteriální kultury se svými distribučními vzory přenesou na jiné živné půdy (duplikují).

Tímto způsobem můžete provádět různé testy se stejnými, avšak duplikovanými bakteriálními kmeny. Například tak, že na kmeny necháte působit různé účinné látky nebo změníte pH hodnotu živné půdy. Při použití živného agarů, kterému chybí jednotlivé aminokyseliny, dochází ke změně rychlosti růstu, mohou se objevit zmutované bakterie atd.

Použití: Pro duplikaci destičky s kolonií přichyťte na razítko pomocí přídržného kroužku sterilní ubrousek. Razítko a přídržný kroužek nejprve sterilizujte ethanolem, stejně jako pinzetu, kterou ubrousky opatrně vyjmete z hliníkové fólie a měkkou stranou je položíte na replikační blok. Přídržným kroužkem připevněte ubrousek na blok. Poté destičku s kolonií zlehka přitlačte horní stranou napjatý transferový ubrousek. Tento postup zopakujte s další Petriho miskou, ve které se nachází vhodná živná půda. Získáte tak obtisk (replikát) původního uspořádání kolonie na nové destičce.

Zhotovení preparátů s roztěry

Podmínkou pro to, aby se preparáty dobře podařily, je, že použijete podložní sklíčka zbavená veškerého tuku. Pro odmaštění je otřete např. benzínem nebo alkoholem. Úplně také stačí pouhé omytí vodou, ke které přidáte malé množství mycího prostředku. Podložní sklíčko postavte svisle a nechejte ho okapat a uschnout na vzduchu – neotírejte ho do sucha! Vytvoří se vrstva mycího prostředku, která usnadní roztěr.

Nyní postupujte následovně:

Na podložní sklíčko naneste malou kapku vody.

Očkovací kličkou naneste do kapky vody bakterie.

Nanesené bakterie rozetřete pomocí očkovací kličky, tu držte horizontálně.

Roztěry položte vodorovně a nechejte uschnout na vzduchu.

Fixace:

Podložní sklíčko s roztěrem obráceným směrem dolů protáhněte třikrát, vždy po dobu asi jedné sekundy, nečadivým plamenem (např. úsporným plamenem Bunsenova kahanu, plamenem lihového hořáku atd.). Bakterie se tím usmrtí, a navíc ulpí na podložním sklíčku.

Barvení:

Roztěr položte horizontálně na savou podložku (filtrační papír, novinový papír atd.) a nakapejte roztok barviva.

Při použití **roztoku methylenové modři** nechejte barvu působit po dobu asi 5 minut. Poté ji omyjte vodou z vodovodu. Obarvený roztěr nakonec nechejte uschnout na vzduchu. Zbytky mycího prostředku můžete také odsát opatrným (!) přiložením filtračního papíru. Neotírejte!

Nyní je preparát připraven k mikroskopickému pozorování. Je zbytečné ho přikrývat krycím sklíčkem. Pokud budete preparát skladovat na místě chráněném před světlem, bude jeho životnost několik roků.

Trvalý preparát:

Na dobře vysušený roztěr nakapejte několik kapek uzavíracího média a přikryjte krycím sklíčkem – hotovo.