

**Katedra zeleninárstva, Fakulta záhradníctva a krajinného inžinierstva,
Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre**



Pestovanie húb 2

Ing. Marcel Golian, PhD.



Základné laboratórne techniky

Ing. Marcel Golian, PhD.



Drobné laboratórne vybavenie

- mikrobiologické skúmavky – vatové (bakteriologické) zátky
- Petriho misky (90 mm) – izolácia/kultivácia kultúr na stužených pôdach
- Erlenmayerové banky – kultivácia na tekutých živných pôdach
- autoklávovateľné fľaše
- odmerné sklo



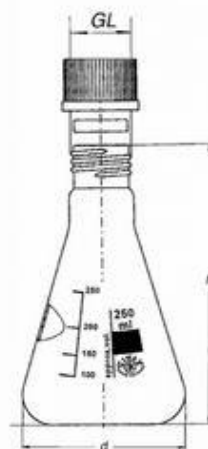
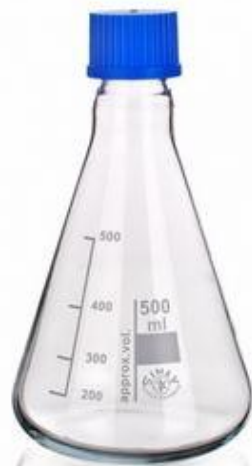
Mikrobiologická skúmavka



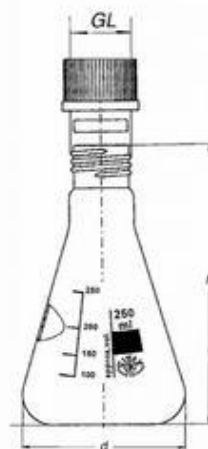
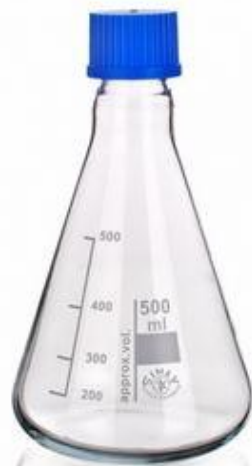
Petriho misky



Petriho misky



Erlenmayerové banky



Erlenmayerové banky



Autoklávovateľné fľaše



Odmerné nádoby

Očkovanie

- prenesenie časti mikróbnej populácie žiadaného druhu (čistej kultúry) z prostredia v ktorom sa udržiavala do sterilnej živnej pôdy

Nástroje na očkovanie

- mikrobiologické očká
(rukoväť + chrómniklový drôtik)
- očkovacie ihly
- očkovacie hokejky
- skalpel
- stojan na mikrobiologické očká
- sterilizátor (plynový, IR, lieh..)



Mikrobiologické očka



Chrómniklový drôtik (odporový drôt)



Skalpel



Sterilizátor náradia – liehový hakan



Sterilizátor náradia - plynový



Stojan na mikrobiologické očká - sterilizátor



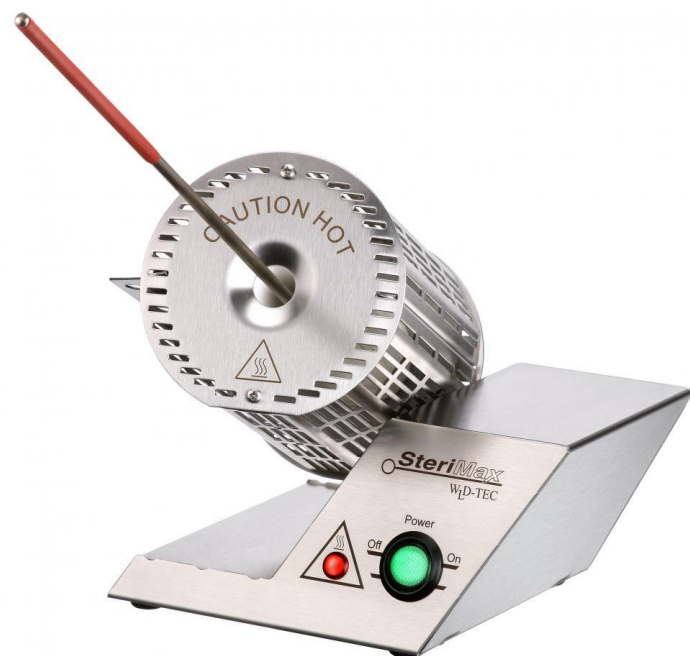
Sterilizátor náradia - plynový



Sterilizátor náradaia - plynový



Sterilizátor náradia - plynový



Sterilizátor náradia - infra



Sterilizátor náradia - infra

Očkovacie priestory

- materiál - kov v kombinácii so sklom
- prívod elektriny a plynu
- plnenie, nalievanie živých pôd
- očkovanie, izolovanie čistých kultúr
- malý uzavretý priestor – kedysi
- dnes - Očkovací/laminárny box



Laminárny box



Laminární box



Laminárny box



Laminárny box



Laminární box

Technika očkovania 1/2

- skúmavka (v ľavej ruke) so žiaducou kultúrou je pri plameni
- do pravej ruky zoberieme očkovacie očko
- pomocou dlane a malíčka otvoríme skúmavku
- pomalým pohybom opálime hrdlá skúmaviek a zátku (aj vatovú)
- vypálime očkovacie očko

Technika očkovania 2/2

- ochladíme o okraj steny sterilnej skúmavky alebo sterilnú vodu
- odoberieme čistú kultúru
- zatvoríme opálenou zátkou
- pootvoríme pod 45° uhlom sterilnú pôdu
- kultúru na očku prenesieme na sterilnú pôdu
- zatvoríme zaočkovanú sterilnú pôdu
- očko tiahneme priamo do ohňa
- opálené očko odložíme do stojana

Spôsoby očkovania

- očkovanie vpichom
- očkovanie rozterom
- zalievaním
- nakvapkaním atď.



Proces očkovania

Sterilizácia očka

- pred a po použití vypaľujeme
- držíme ho takmer zvisle v nesvietivom plameni
- kovovú časť opaľujeme do rozžeravenia
- následne ochladíme

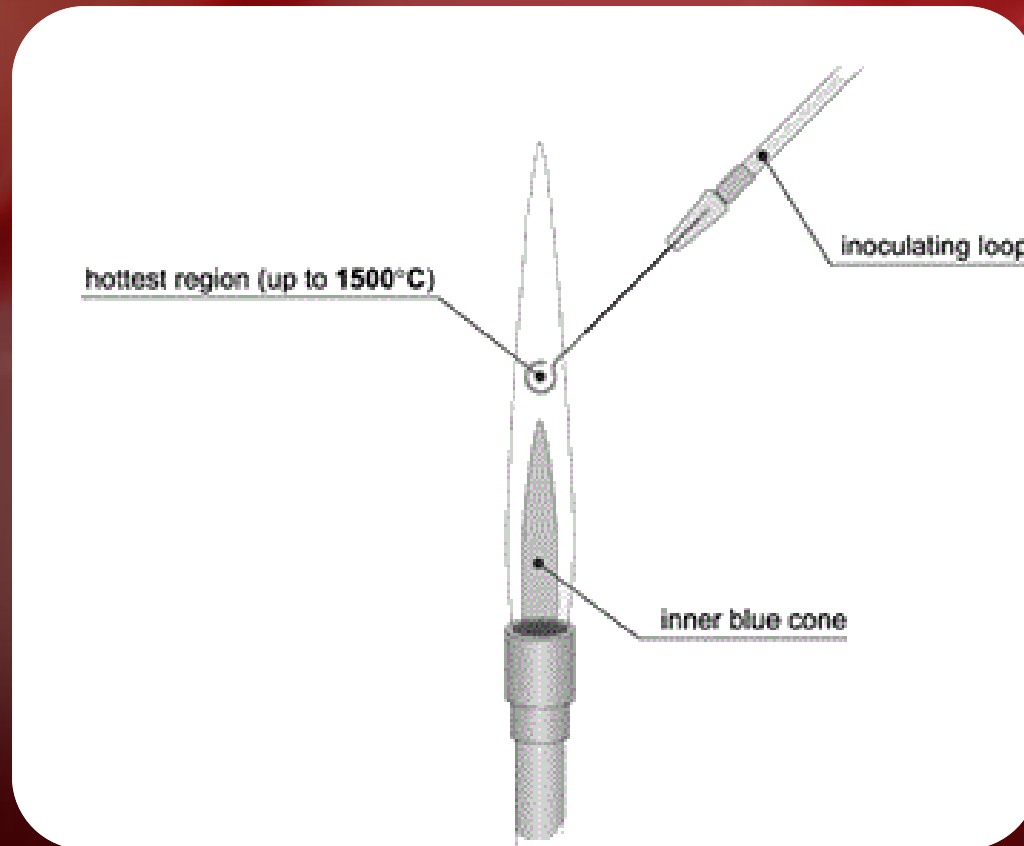
Video 2

Sterilizácia

- kvantitatívne zničenie všetkých foriem života
- ničí vegetatívne aj generatívne formy
- fyzikálne – plameň, suché teplo, vlhké teplo, žiarenie, filtrácia, ultrazvuk..
- chemické – spôsobujú koaguláciu a denaturáciu bielkovín (formaldehyd, lieh)

Sterilizácia plameňom

kovové nástroje (očka, ihly, skalpel..), zátky, hrdlá..



Sterilizácia horúcim vzduchom

- sklenené nádoby (misky, skúmavky), kov
- v sušiarňach s uzavretým obehom vzduchu
- automatická regulácia teploty
- všetko balíme do alobalu
- 190°C po dobu 6 hodín



Teplovzdušný sterilizátor



Teplovzdušný sterilizátor

Sterilizácia v autokláve

- vákuový parný sterilizátor
- sterilizácia je kratšia a účinnejšia
- hrubostenné vákuové nádoby s vyvíjačom pary
- 15-20 min pri teplote 121° C



Autokláv – parný strilizátor



Autokláv – parný strilizátor



Autokláv – parný strilizátor



Autokláv – parný strilizátor

Sterilizácia žiarením

- miestnosti
- UV – UF – má baktericídny a fungicídny účinok
- gama žiarenie, röntgenové žiarenie, infračervené..

Dezinfekcia

- zneškodnenie choroboplodých zárodkov
- na predmetoch alebo povrchu tela

Pasterizácia

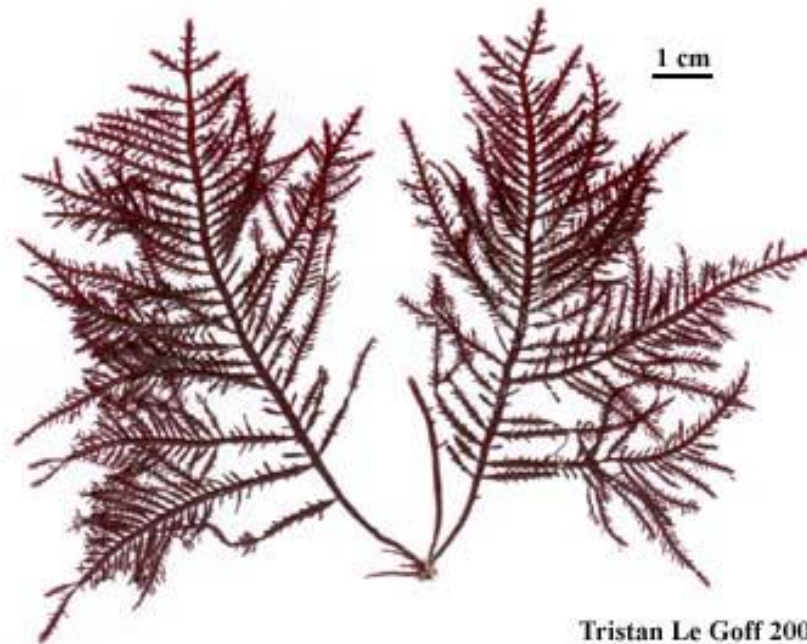
- keď nie je možné použiť sterilizáciu kvôli denaturácii bielkovín
- čiastočná sterilizácia pri nižších teplotách
- teplota 60-80°C po dobu max 30 minút
- usmrcujú sa len vegetatívne formy mikroorganizmov
- pivo, mlieko, nápoje

Pravidlá aseptickéj práce

- pracujeme v očkovačom boxe
- ruky pred prácou vydezinfikujeme
- pri práci nehovoríme a chránime sa
- pracovnú plochu vždy vydezinfikujeme, môžeme aj opáliť
- pracujeme rýchlo a opatrne
- hrdla a zátky pri práci opaľujeme
- očkovačie nástroje odkladáme z ruky až po opálení

Agar

- polysacharid z červených morských rias *Gelidium* sp.
- získava sa zložitým čistením
- bod topenia je cca 96° C a tuhnutia cca 40° C
- mletý alebo vlákna



Tristan Le Goff 2004

Riasa *Gelidum* sp. – zdroj agaru



Agar – púder / mletý / prach



Agar – kapsule

Rozlievanie sterilných stužených médií 1/2

- nikdy nevyrábame do zásoby (znižuje sa pH a stužujúca schopnosť)
- hrúbka agarovej platne má byť cca 3-4 mm
- rozlievame vždy v sterilnom prostredí v blízkosti boxu
- nad kahanom otvoríme nádobu s horúcim agarom

Rozlievanie sterilných stužených médií 2/2

- malíčkom a dlaňou vyberieme zátku
- opálime hrdlo
- podvihneme krycie sklíčko Petriho misky
- nalejeme potrebné množstvo agaru
- misku uzavrieme a jemným krúživým pohybom pokrútime

Šikmé agary

- skúmavky naplníme do $\frac{1}{4}$ objemu
- zazátkujeme, opätovne sterilizujeme
- necháme stuhnúť v šikmej polohe (agar do $\frac{2}{3}$)

Potato dextroze agar (PDA)

- zemiakovo glukózový agar
- 200 g zemiakov očistíme, nakrájame
- varíme v 1000 ml vody 60 minút
- scedíme, prefiltrujeme
- pridáme 20 g agaru a 20 g dextrózy
- doplníme na 1000 ml
- autoklávujeme



Potato dextroze agar (PDA)

Sladinkový agar

- sladina o pH 6,5 1000ml
- agar 20 g
- sterilizujeme

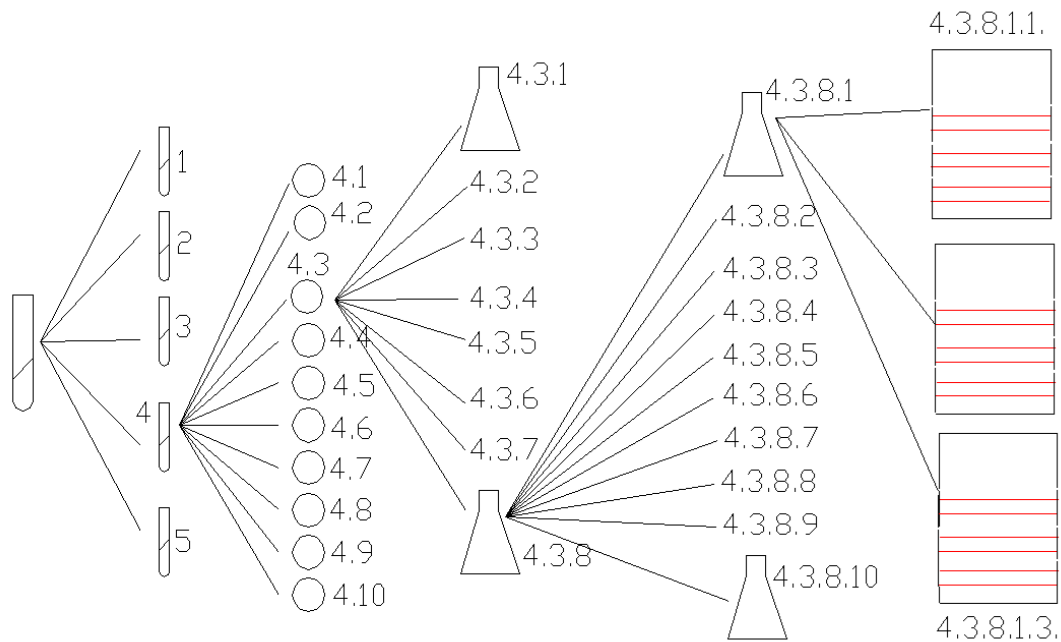


Laboratórne váhy

Video 3

Sadba/inokulum

- obyčajne obilný nosič (pšenica, proso, jačmeň..)
- prímes sadry – vyrovnanie pH a jednotnosti zrn
- menej piliny alebo drevené kolíky



Sadba/inokulum

Výroba sadby

- zmáčanie – nasýtenie vodou
- prímes sadry
- sterilizácia
- schladnutie
- očkovanie čistou kultúrou



Výroba sadby



Výroba sadby

Výroba sadby

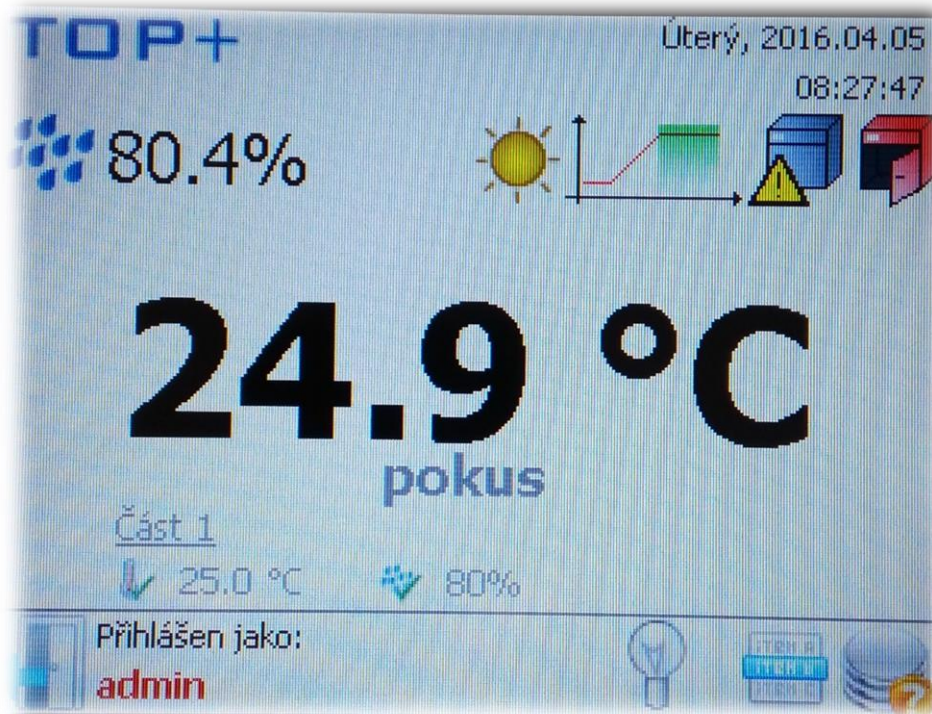
- zmáčanie – nasýtenie vodou
- prímes sadry
- sterilizácia
- schladnutie
- očkovanie čistou kultúrou
- inkubovanie



Biologický inkubátor/termostat - fytotrón



Biologický inkubátor/termostat - fytotrón



Biologický inkubátor/termostat - fytotrón



Biologický inkubátor/termostat - fytotrón



Biologický inkubátor/termostat - fytotrón



Biologický inkubátor/termostat - fytotrón



Biologický inkubátor/termostat - fytotrón

Úschova médií a sadby

- v suchom chladnom mieste
- 4°- 10° C v chladničke

Dekontaminácia

- použité nádoby (Petriho misky, skúmavky...)
- sterilizácia v autokláve
- následne vyliatie tekutého média do odpadu
- následne umývanie saponátmi
- sušenie
- sterilizácia pred opätovným použitím

Ďakujem za pozornosť