

Lékařská mikrobiologie pro ZDRL

Týden 3: Fyziologie bakterií,
kultivační půdy

Ondřej Zahradníček
zahradnicek@fnusa.cz

Nejprve opakování z minula

Morfologie bakterií (složení, tvary, uspořádání, sporulace)	Fyziologie bakterií (množení, metabolismus, využívání substrátů)
Barvení (= pozorování mikroba jako morfologické jednotky)	Kultivace (= pozorování růstových, tedy fyziologických vlastností mikroba)

Množení bakterií (u bakterií je synonymem i slovo „růst“)

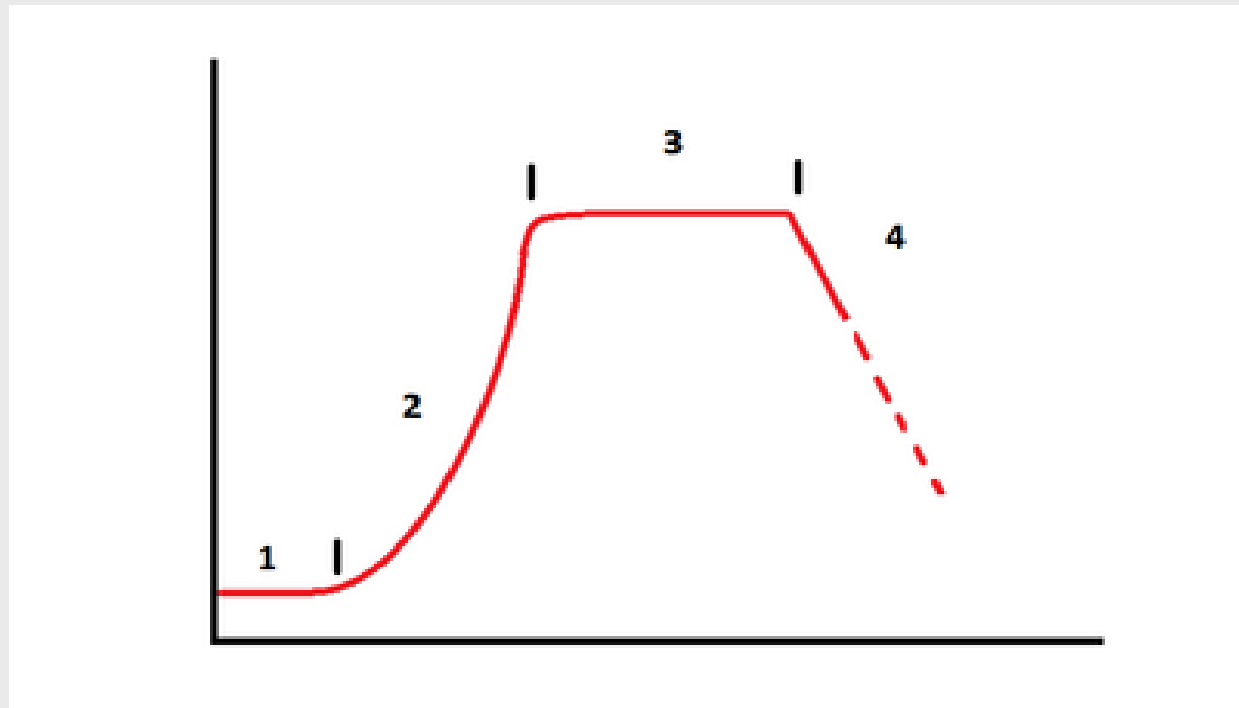
- Množení bakterií je základním projevem jejich životaschopnosti
- Každá bakterie má svou generační dobu (zpravidla hodiny, u některých dny)
- Za jednu generační dobu jsou z jedné dvě, za desetinásobek je z jedné 1024 bakterií (teoreticky) a podobně
- Ideální množení by existovalo pouze kdybychom neustále přidávali živiny a popř. kyslík a odebírali odpadní produkty



Reálná růstová křivka

- **Fáze lagu** – bakterie jsme nechali kultivovat, ale ještě jich nepřibývá
- **Fáze exponenciální** – růst se zrychluje
- **Fáze stacionární** – rostou pořád stejně rychle
- **Zpomalení a zastavení růstu** – došly živiny, je příliš mnoho odpadů, nebo bakterie samy regulují svůj počet pomocí „quorum sensingu“

Růstová křivka bakterií v uzavřeném systému



- 1 Lag fáze
- 2 logaritmická (exponenciální) fáze
- 3 stacionární fáze
- 4 fáze odumírání

Fyziologie bakterií

- Tak jako každý organismus, i bakterie mají svůj **katabolismus a anabolismus**
- Katabolismus může být trojí:
 - **Fermentace** – štěpení bez potřeby kyslíku. Málo energeticky výhodný, ale nepotřebuje kyslík
 - **Aerobní respirace** – z mála živin se získá hodně energie, je ale nutný kyslík
 - **Anaerobní respirace** – není nutný kyslík, ale je nutný jiný akceptor elektronů (například síra); málo významné u klinicky významných bakterií

Vztah bakterií ke kyslíku

- **Aerobní a fakultativně anaerobní (případně také aerotolerantní) bakterie** můžeme pěstovat za normální atmosféry
- **Striktně anaerobní bakterie** vyžadují atmosféru bez kyslíku
- **Bakterie se speciálními nároky na kyslík** vyžadují speciální atmosféru (mikroaerofilní a kapnofilní bakterie)

Jak spolu souvisí katabolismus a vztah ke kyslíku?

Typ katabolismu je **úzce spjat se vztahem ke kyslíku.**

- **Fermentující** bakterie jsou zpravidla **fakultativně** či **striktně anaerobní.**

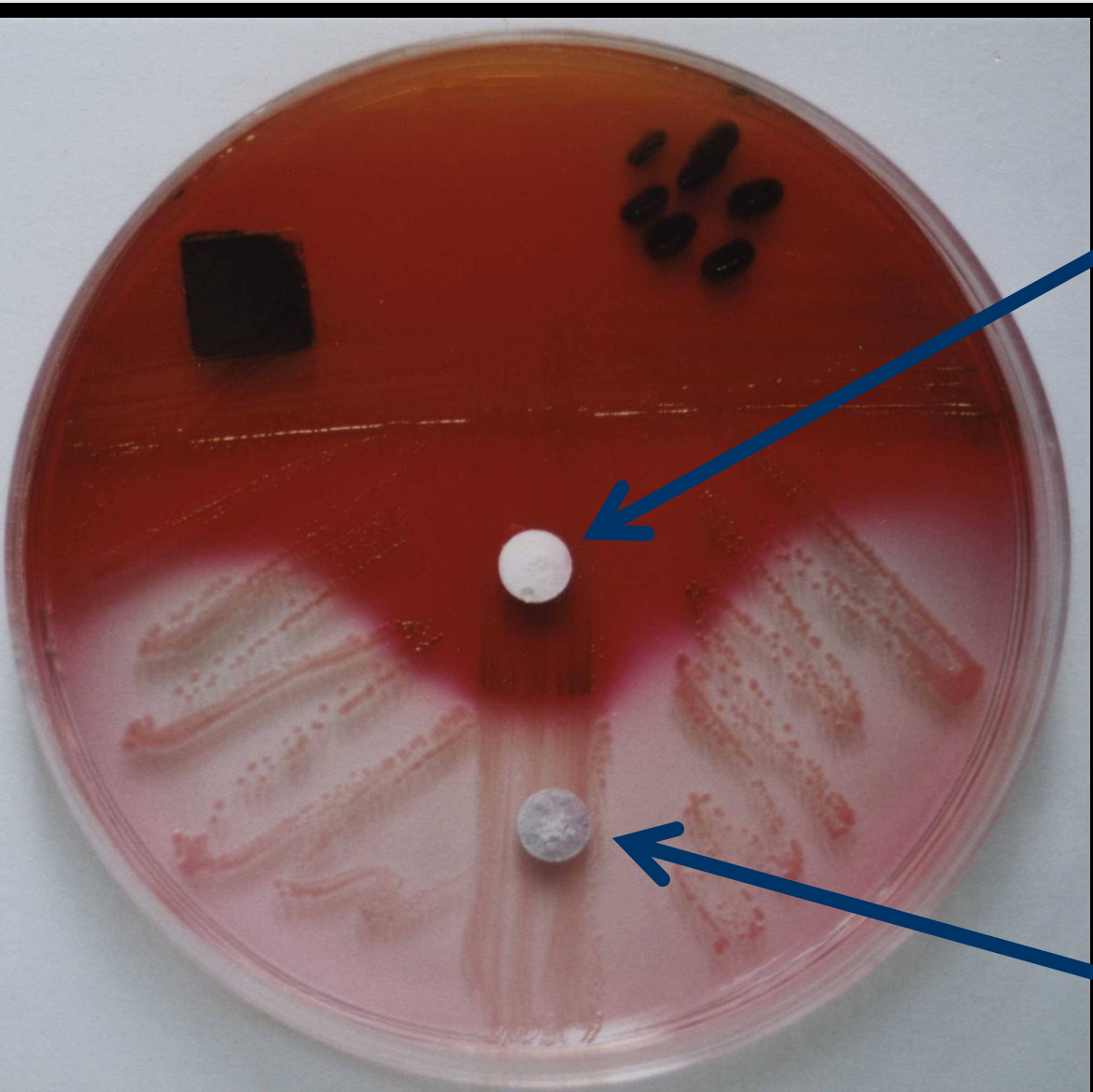
(Pravé fakultativně anaerobní bakterie umějí „přepínat“ fermentaci na aerobní respiraci; ty, které to neumějí, pouze fermentují a přesto kyslík snášejí, se správně nazývají aerotolerantní. V praxi se často obě skupiny nerozlišují.)

- Naopak **aerobně** respirující bakterie bývají **striktně aerobní.**
- Existují ovšem i **výjimky**

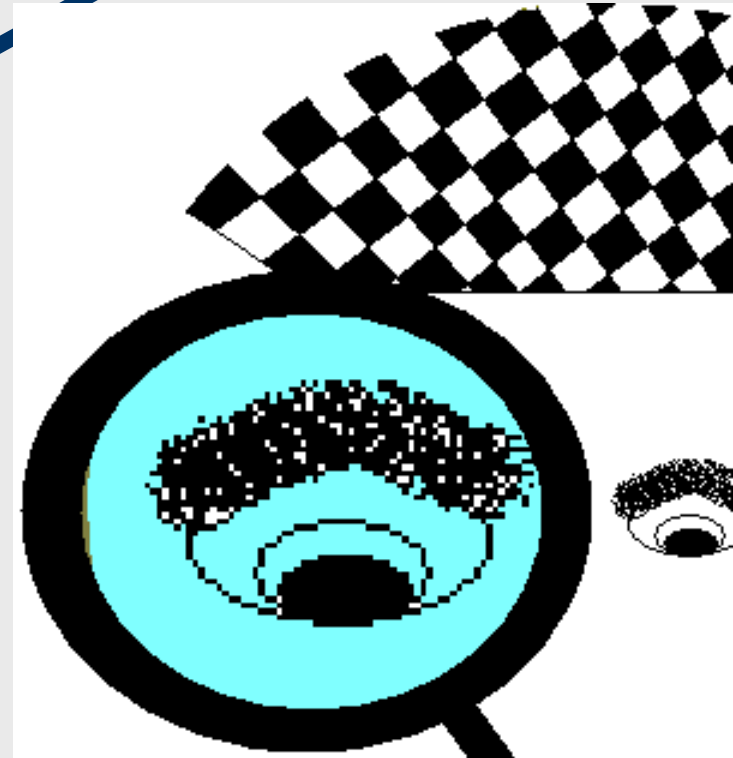
Substráty

- Fermentovat i respiračně odbourávat lze **různé substráty**. Substrátem může být polysacharid, monosacharid, aminokyselina, lipid apod.
- Pro různé bakterie existují **typické substráty**, které umějí buďto fermentovat nebo respiračně odbourávat. To se **využívá v diagnostice**.
- Typické substráty zpravidla souvisejí s **adaptací mikrobů** na určité prostředí nebo s tím, jaké produkty či třeba jaké pH bakterie potřebují ke svému životu.

Co chutná... třeba takové salmonelce

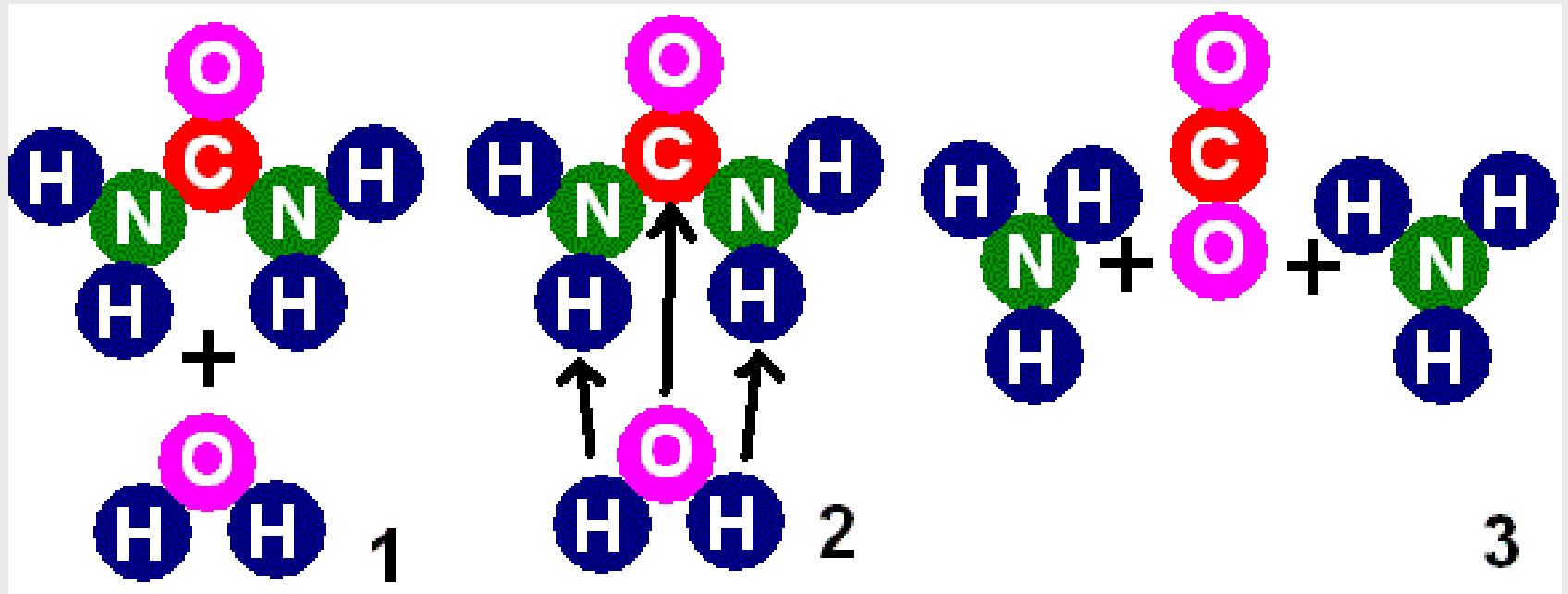


Manit? Mňam!



Sacharóza? Fuj!

Příklad – ureázová aktivita helikobaktektera



Urea (močovina) se v žaludku vyskytuje, a její štěpení helikobakterům umožňuje zvýšit ve svém těsném okolí pH a vzdorovat tak žaludeční kyselině

Mikrobiologické metody – rozdělení (opakování)

- Metody **přímého průkazu**
 - Přímý průkaz ve vzorku (pracujeme s celým vzorkem, například sputem, mozkomíšním mokem, močí apod.)
 - Identifikace kmene (pracujeme s jedním kmenem, který byl ze vzorku izolován)
- Metody **nepřímého průkazu** – spočívají v průkazu protilátek proti mikrobovi

Postavení kultivace v systému metod

- Přímé metody (mikrob – část – produkt):
 - Mikroskopie – průkaz ve vzorku i identifikace
 - **Kultivace – průkaz ve vzorku i identifikace**
 - Biochemická identifikace – jen identifikace!
 - Průkaz antigenu – průkaz ve vzorku i id.
 - Průkaz nukleové kyseliny – zpravidla jen průkaz ve vzorku
 - Pokus na zvířeti – zpravidla průkaz ve vzorku
- Nepřímé metody (protilátky)

Vzorek a kmen (opakování)

- **Vzorek** je to, co se odebírá pacientovi. Vzorek obsahuje buňky makroorganismu, různý počet druhů mikrobů (nula až třeba dvacet) a další příměsi
- **Kmen – izolát** – je populace jedné bakterie, izolovaná ze vzorku na pevné půdě
- Abychom získali kmen, **musíme bakterii pěstovat na pevné půdě a dobře rozočkovat**

Smysl kultivace bakterií

- Proč vlastně v laboratoři bakterie pěstujeme?
 - Abychom je **udrželi při životě a pomnožili**. K tomu slouží kultivace na **tekutých půdách** i na „**pevných**“ **půdách** (to jsou půdy, které netečou, jejich základem je většinou agarová řasa)
 - Abychom získali **kmen** – můžeme použít **pouze pevné půdy**
 - Abychom je vzájemně **odlišili a oddělili** – používají se diagnostické a selektivní půdy, sloužící k identifikaci

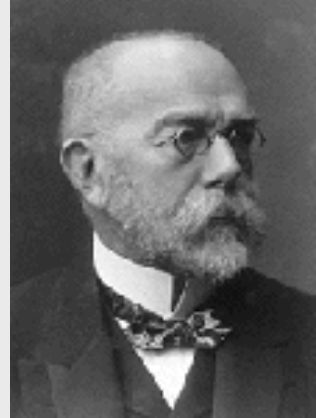
Pohádka

- Byla jednou jedna **bakterie, a ta byla maličká**, takže ji bez mikroskopu nikdo neviděl, a v mikroskopu bylo sotva vidět, jaký má tvar. Byla z toho velice nešťastná, protože si velice zakládala na tom, jak je zvláštní a zajímavá.
- Až jednou přišel **pan Koch**. Ten bakterii posadil **na pevnou půdu** a schoval přes noc **do termostatu**. Bakterie zajásala a začala se vesele množit...

A druhý den

- Pan Koch přišel, odevřel termostat, vyndal Petriho misku s půdou, a co neviděl: jeho milá, maličká bakterie, najednou **byla viditelná pouhým okem!** Ne ovšem jako jedna bakterie, ale jako celý **kmen** úplně stejných buněk, který z této jedné bakterie vzešel, v podobě kopečku – **kolonie**
- Bakterie byla celá šťastná, a předváděla se panu Kochovi v celé své kráse. **Předvedla mu tvary, profily i povrch své kolonie,** pigmenty a spoustu dalších věcí.

Robert Koch



Německý mikrobiolog Robert Koch se narodil 11. prosince 1843 v Clausthal-Zellerfeldu jako jedno z 13 dětí důlního technika. Už v pěti letech ohromil rodiče, když jim oznámil, že se podle novin naučil číst. V roce 1862 odešel Koch na univerzitu do Göttingenu studovat medicínu. Po obdržení doktorátu v roce 1866 odešel na šestiměsíční studium chemie do Berlína. Po období všeobecné praxe se jako dobrovolník přihlásil do služby v ve francouzsko-pruské válce v roce 1870 a od roku 1872 do 1880 ve wollsteinském okresu. Zde uskutečnil své epochální výzkumy, které ho vynesly do čela vědeckých pracovníků. Zabýval se zejména bacilem antraxu, tuberkulózními bacily a choleroým vibriem. Koch byl během života vyznamenám mnoha medailemi a odměněn mnoha cenami, získal také několik čestných doktorátů a stal se čestným občanem několika měst. V roce 1905 obdržel Nobelovu cenu za fyziologii a medicínu.

Robert Koch zemřel 27. května 1910 v Baden-Badenu

<http://www.quido.cz/osobnosti/koch.htm>

Ještě jednou Robert Koch



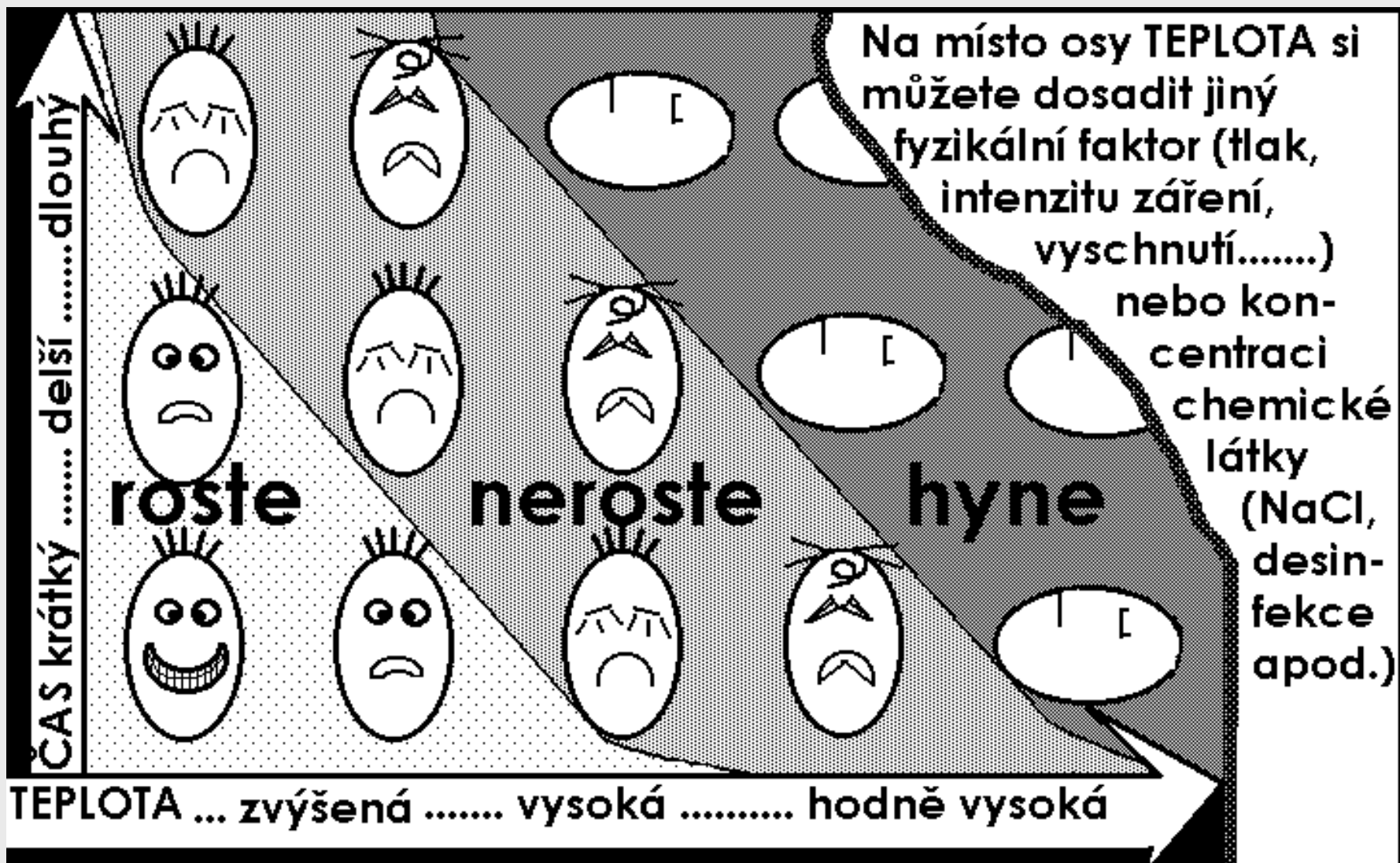
Robert Koch při expedici do Egypta při cholerové epidemii



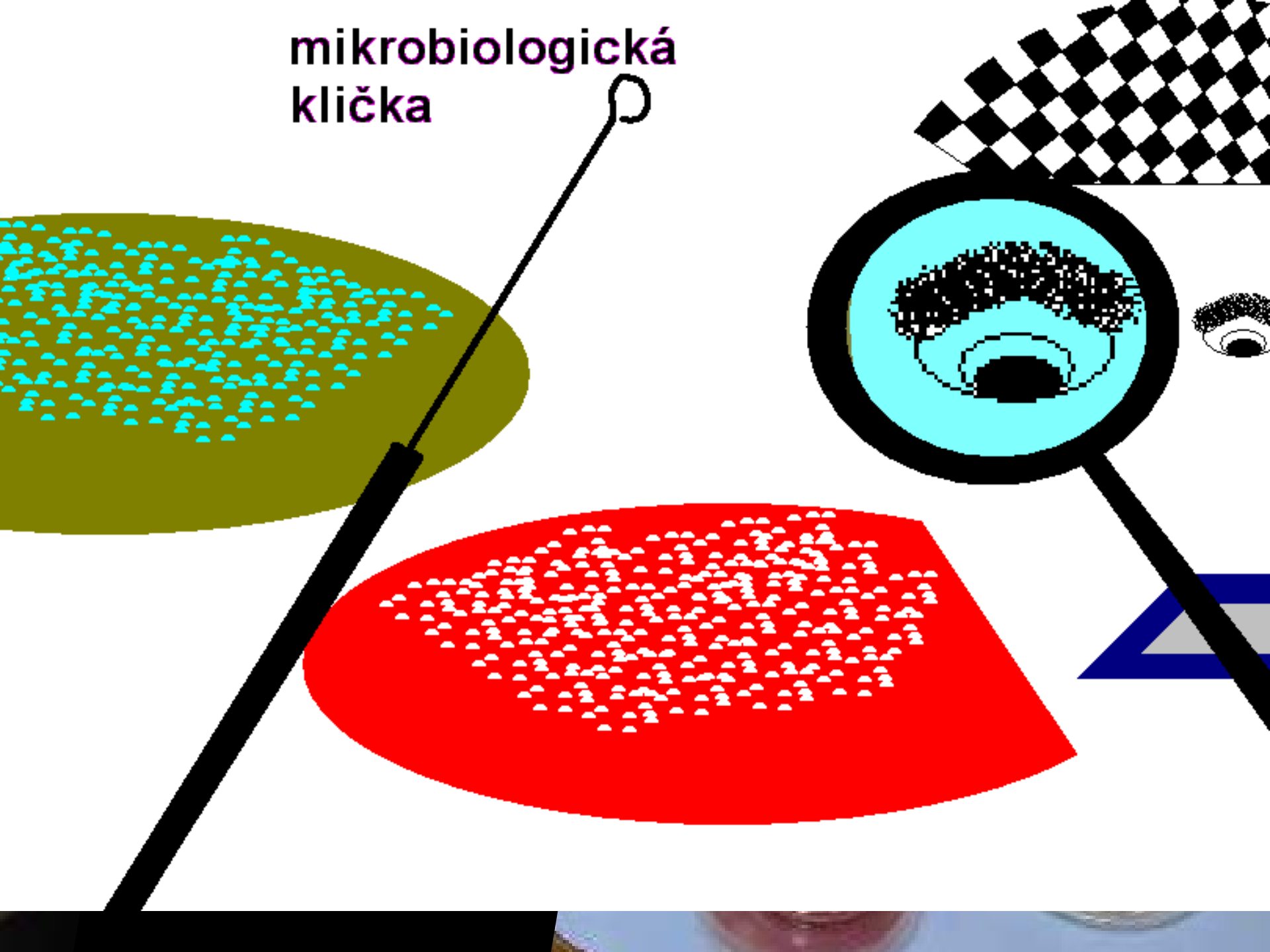
Podmínky pěstování (kultivace) bakterií

- Pro kultivaci (pěstování) bakterií jsou nutné určité **podmínky**, bez kterých není pěstování možné
- Nestačí přitom takové, aby bakterie přežívala. Musí být i schopna se **množit**
- **Podmínky kultivace**: voda, živiny, zdroj energie, teplota, atmosféra, pH, osmotický tlak - koncentrace solí, redox potenciál, růstové faktory, případně minerální látky
 - Nepůsobí přitom jednotlivě, kombinují se
 - Některé podmínky lze zajistit nastavením inkubátoru neboli termostatu (teplota, CO₂), jiné složením půdy

Když se mění určité faktory



mikrobiologická
klička



Kultivace bakterií obecně

- Bakteriím musíme připravit přijatelné vnější podmínky
- **Aerobní a fakultativně anaerobní** bakterie můžeme pěstovat za normální atmosféry
- **Striktně anaerobní bakterie** vyžadují atmosféru bez kyslíku – *Clostridium difficile*
- Bakterie se **speciálními nároky na kyslík** vyžadují **zvláštní zacházení**
 - mikroaerofilní **snížený podíl kyslíku** ↓ 20 % - kamylobakter
 - kapnofilní **zvýšený podíl CO₂** asi 10 % - neisseria
- Používáme různá kultivační média, sloužící k určitým účelům

Kultivace bakterií obecně

- Většinou vyžadují **teplotu kolem 37 °C**, ovšem při různě širokém rozmezí.
 - Ale bakterie původem z vnějšího prostředí preferují nižší teploty, ptačí patogeny naopak vyšší (ptáci mají vyšší teplotu těla)

Většinou vyžadují **pH kolem sedmi** (6 - 8)

Alkalofilní - *Vibrio cholerae* (7,4 - 9,6)

Acidofilní - kvasinky, plísně, laktobacily (5 - 6)

Kultivace bakterií obecně

- Osmotický tlak – běžné kultivační půdy 0,5 % NaCl
- Vyšší obsah solí - halofily
 - halotolerantní - nevyžadují – enterokoky; stafylokoky - jsou zvyklé žít na zpcené kůži
 - obligátní halofily - nerostou za běžné koncentrace - *Vibrio parahaemolyticus* (1 % NaCl)

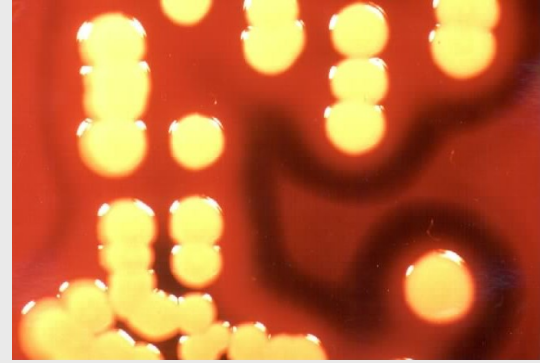
Pěstování anaerobních bakterií

www.medmicro.info



www.medmicro.info





Pojem kolonie

- Kolonie je **útvár na povrchu pevné půdy**. Pochází z jedné buňky nebo malé skupinky buněk (dvojice, řetízku, shluku)
- V některých případech můžeme z počtu kolonií **odhadnout počet mikrobů** ve vzorku – nebo přesněji počet „kolonií tvořících jednotek“ (CFU)
- Popis kolonií má významné místo v diagnostice
- Kolonie je vždy tvořena jedním kmenem. Pojmy „kolonie“ a „kmen“ ale nejsou synonyma, kmen nemusí mít tvar kolonie.

Kultivační doba

- Kultivační doba je časový úsek nezbytný k tomu, aby z jedné nebo několika bakterií vyrostla **viditelná kolonie**
- Kultivační doba je **závislá na generační době**, samozřejmě je ale daleko delší (pro vznik viditelné kolonie nestačí, když se z jedné bakterie stanou dvě, ba ani čtyři nebo osm, nezbytné jsou miliardy bakterií)

Praktická kultivace

www.medmicro.info



Význam kultivace
v tekutých půdách

Typy tekutých půd

Význam kultivace
na pevných půdách

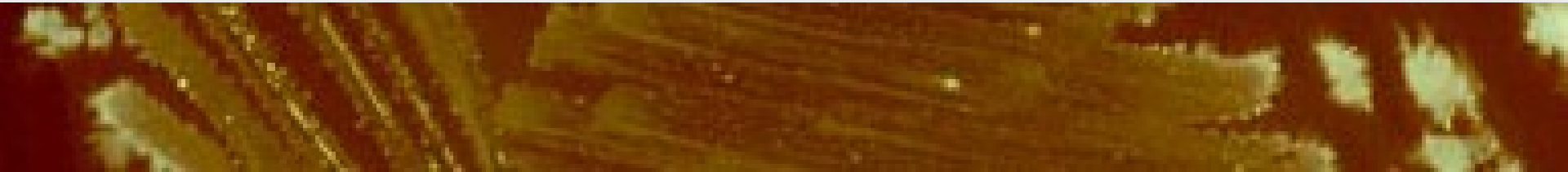
Typy pevných půd

Kultivační podmínky – opakování

- Pro kultivaci bakterií jsou nutné určité **podmínky**
- Nestačí takové, aby bakterie **přežívala**.
Musí být i schopna se **množit**
- Podmínky musí být splněny, co se týče **teploty, pH, koncentrace solí** a mnoha dalších věcí. Některé jsou dány nastavením termostatu, jiné složením kultivační půdy.
- Nepůsobí přitom jednotlivě, **kombinují se**

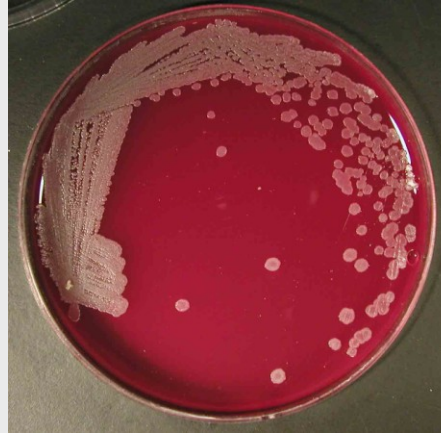
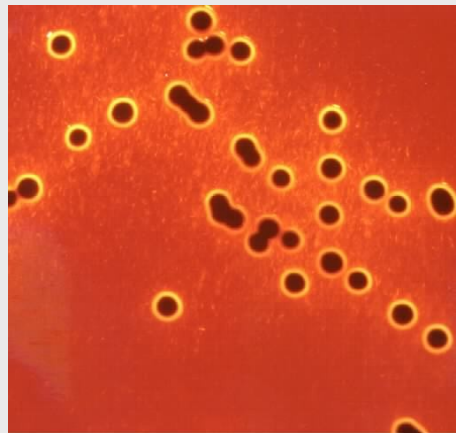
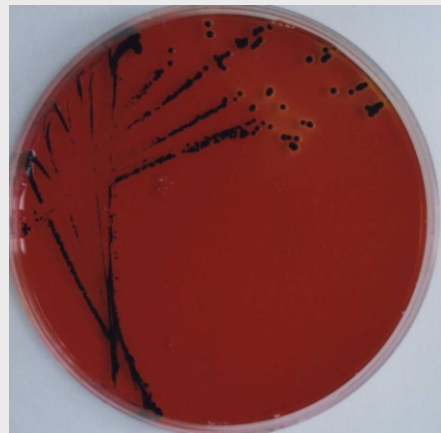
Je to dobře, nebo špatně, že různé bakterie jsou různě náročné?

- **Je to špatně**, protože se špatně definují podmínky, které by vyhověli většině (neřkuli všem) klinicky významným bakteriím
- **Je to dobře**, protože díky tomu můžeme i kultivaci využít v diagnostice (např. schopnost růst na půdě s 10 % NaCl dobře odliší stafylokoky od jiných bakterií, které na ní nerostou)



Půdy obecně versus půdy v klinické mikrobiologii

- **V průmyslové mikrobiologii** či v některých jiných aplikacích se zpravidla používají chemicky přesně definované půdy. Víme, kolik je v nich čeho, a můžeme taky sledovat, kolik čeho přibylo nebo ubylo.
- **V klinické mikrobiologii** nepotřebujeme vědět přesné složení. Často i složky půd jsou chemicky nedefinované (krvinky, extrakt z kvasnic).



Tekuté půdy a pevné půdy

- Základem **tekutých půd** je masopeptonový bujon (hovězí vývar + bílkovinný hydrolyzát). Používají se především k pomnožení. Výsledek se špatně hodnotí: v podstatě jen čirý bujon / zakalený bujon (roste /neroste)
- Základem většiny **pevných půd** je tentýž bujon, ale doplněný výtažkem z agarové řasy. Bakterie na pevných půdách rostou pomaleji, ale zato velmi rozmanitě, a lze je rozočkovat.



Různé vzorky – různá kultivace

Jak ovlivňuje typ vzorku typ kultivace?

Vzorky, kde **je obvykle málo mikrobů** se dávají jen do tekutých půd, kde se mikroby rychle pomnoží. Teprve pak se (v případě zákalu = positivity) mikroby vyočkují (subkultivují) na pevnou půdu.

Příklad: výtěr ze spojivkového vaku

Vzorky, kde **může být hodně i málo mikrobů a i případné malé množství mikrobů je významné**, očkujeme na pevné i tekuté půdy. Pokud na pevné půdě nic vidět není, ale tekutá půda je zakalená, provádí se subkultivace (subkultura) z tekuté půdy na pevnou. **Příklad: stěry z ran**

Vzorky, kde **je většinou hodně mikrobů, popř. i fyziologická běžná flóra** se očkují pouze na pevné půdy. **Příklad: výtěry z krku**

Krevní agar
je půda,
která
obsahuje
ovčí červené
krvinky





A petri dish containing a pink agar medium. A streaked bacterial culture is visible, showing a dense, mucous, and stringy growth pattern characteristic of Klebsiella pneumoniae. The growth is concentrated in the upper right quadrant of the dish, with some smaller colonies or streaks in the lower right. The agar is a deep pink color, and the bacterial growth is a darker, more opaque pink.

Bakterie
Klebsiella pneumoniae
na Endově agaru

Tatáž
bakterie na
krevním
agaru



Použitá půda versus vlastnosti bakterií

Různé vlastnosti, např. barvu, ovlivňují substráty přítomné v půdě, proto na různých půdách mohou mít bakterie různou barvu.

Pochopitelně také například hemolýzu můžeme studovat pouze na půdách, které obsahují krvinky

Pro připomenutí:

Pojmy vzorek a kmen

- **Vzorek** je to, co se odebírá pacientovi. Vzorek obsahuje buňky makroorganismu, různý počet druhů mikrobů (nula až třeba dvacet) a další příměsi
- **Kmen – izolát** – je populace jedné bakterie, izolovaná ze vzorku na pevné půdě
- Abychom získali kmen, musíme bakterii pěstovat na **pevné půdě** a dobře rozočkovat

Nejdříve si ale probereme půdy tekuté, i když jimi kmen nezískáme...

Tekuté půdy



Rozdělení tekutých půd

- Tekuté půdy mnoho kategorií nemají. Vlastně jen dvě:
- **Půdy pomnožovací** jsou nejběžnější a univerzální. Příkladem je **bujón** pro aerobní kultivaci a **VL-bujón** pro anaerobní kultivaci (VL = viande-levure, z francouzštiny – obsahuje masokvasničný extrakt)
- **Půdy selektivně pomnožovací** mají za úkol pomnožit určitou bakterii a potlačit množení jiných. Příkladem je **selenitový bujón** pro salmonely

Pevné půdy

www.medmicro.info



Pevné (agarové) půdy

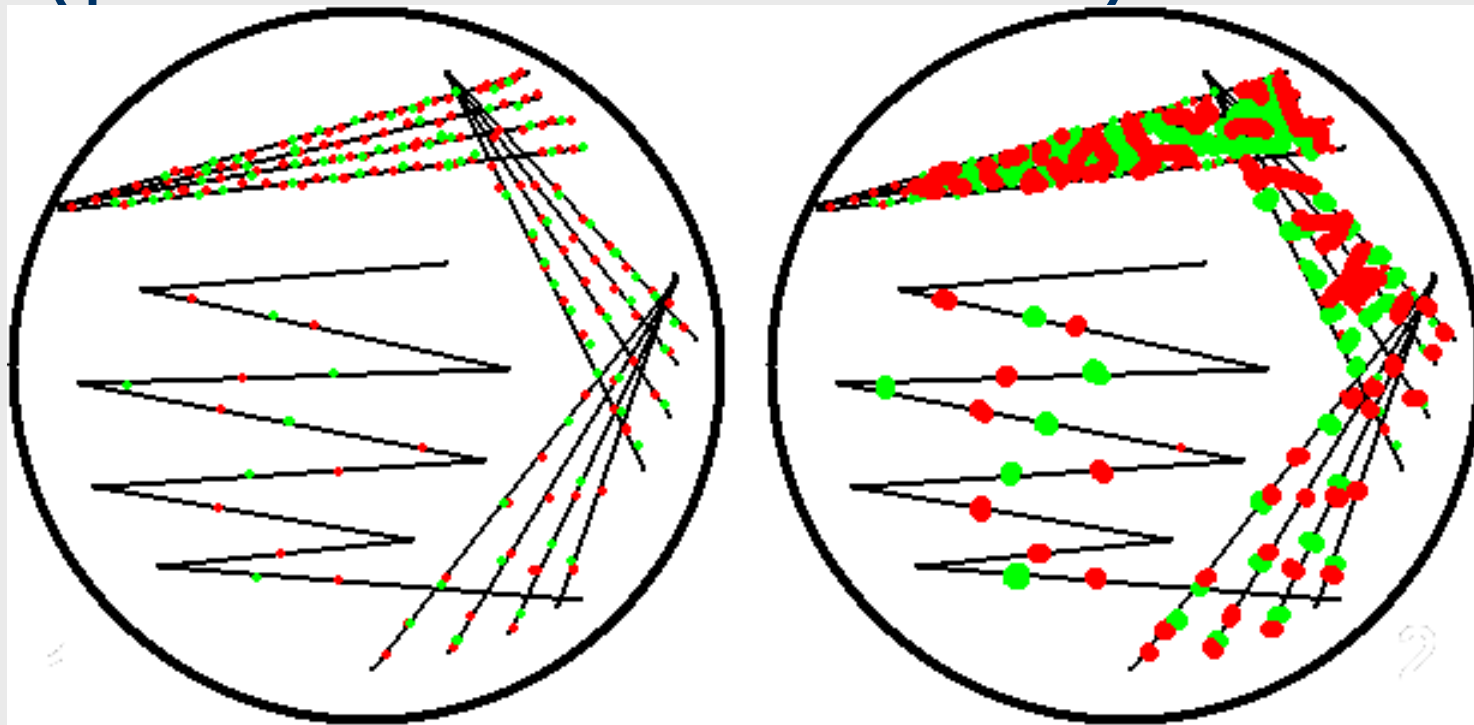
- Abychom využili všech výhod, které pevné půdy nabízejí, musíme vzorek (kultivace vzorek → kmen), ale i kmen (kultivace kmen → kmen) dobře rozočkovat. Klasickým způsobem rozočkování je tzv. **křížový roztěr**. V praxi se zpravidla natře např. na polovinu misky tamponem a pak se rozočkovává kličkou. Někdy se ještě doplňují různé čáry a disky – o nich jindy.

Proč je potřeba mít izolované kolonie

- Protože jen v tom případě **lze identifikovat větší počet patogenů**, které jsou ve směsi
- Ale také proto, že **pouze jednotlivé kolonie umožňují pozorovat typické vlastnosti** kolonie.

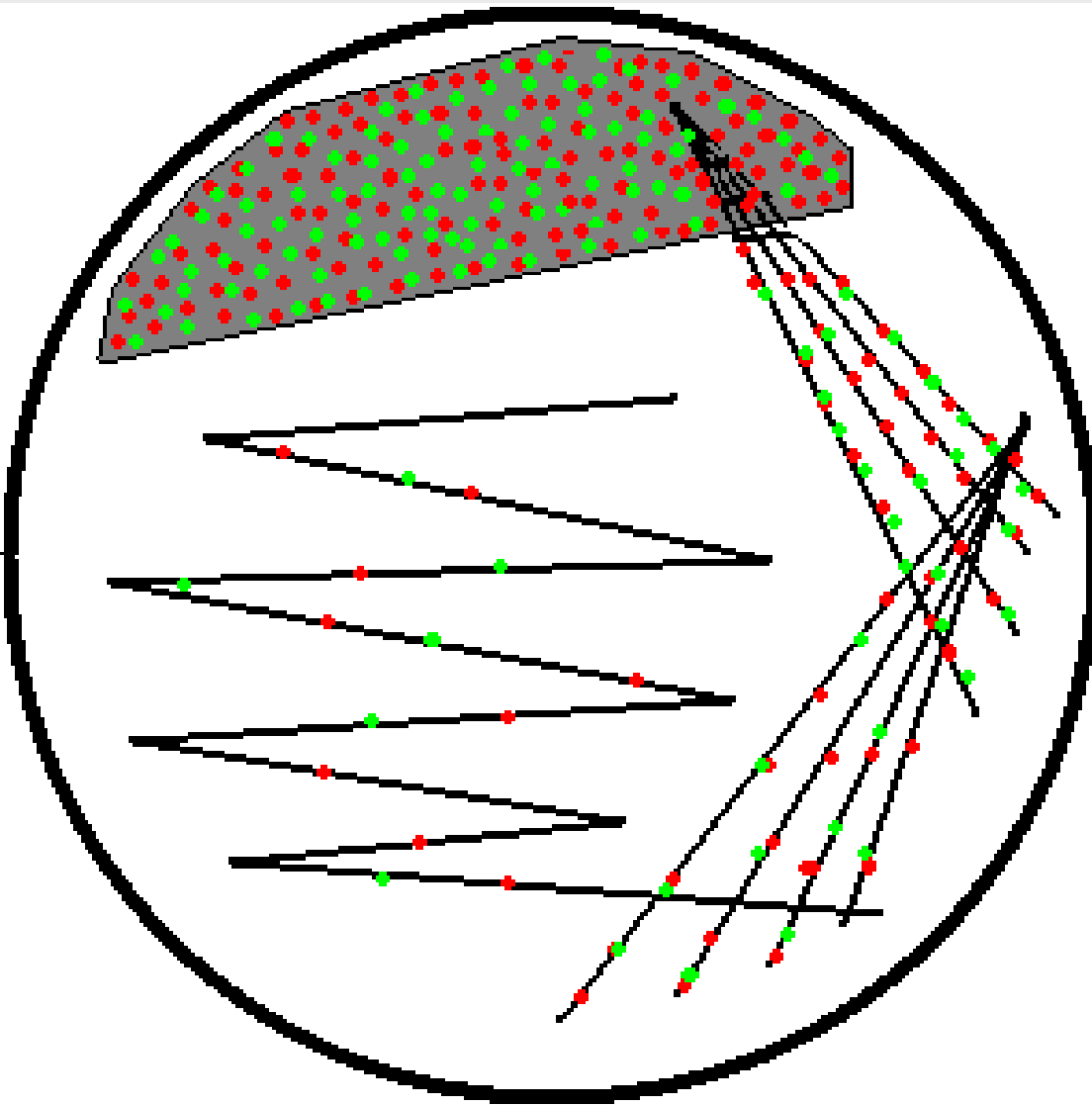
Sebelepší klaun vám nepředvede nic ze svého umění, držíte-li ho v kamrlíku nahečmaného na spoustu dalších klaunů.

V případě směsi vytvoří každá bakterie svoje kolonie (při dobrém rozočkování)



1 – očkování směsi bakterií (naznačeny tečkami), 2 – výsledek kultivace: v prvních úsecích směs, až na konci izolované kolonie

Postup očkování vzorku



Vzorek se nanese na menší či větší plochu, a pak se rozočkovává jako při přeočkování kmene

Výtěr z krku – reálný výsledek



Co lze popisovat u kolonií

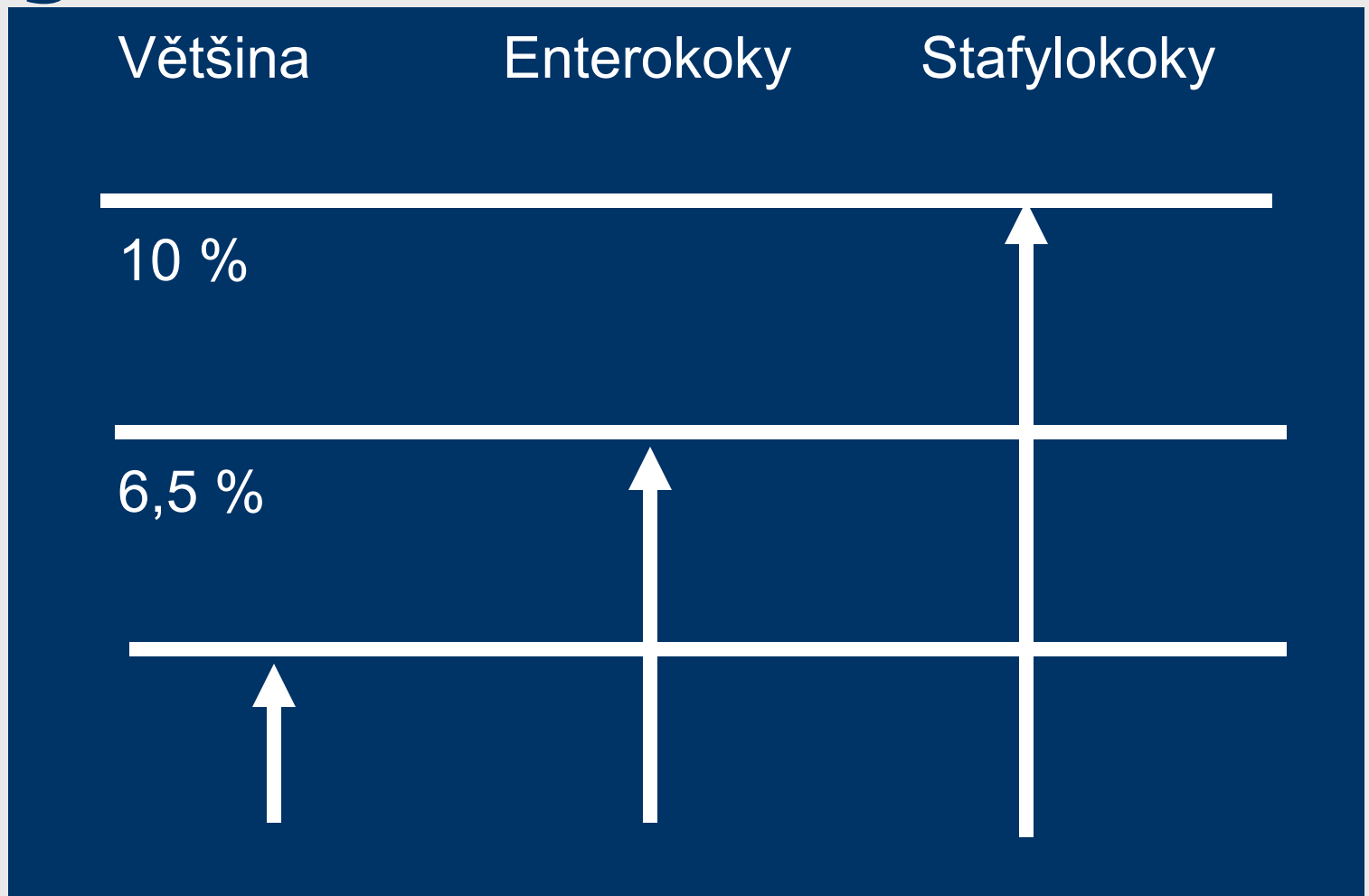
- Velikost
- Barva
- Tvar (okrouhlý...)
- Profil (vypouklý...)
- Okraje (výběžky..)
- Povrch (hladký, drsný)
- Konzistence (suchá...)
- Průhlednost
- Vůně/zápach
- Okolí kolonie*

*Přesný význam tohoto pojmu záleží na druhu půdy. Například u půd s krvinkami se hodnotí narušení krvinek v okolí kolonie

Pevné selektivní půdy

- Účelem je selektovat (vydělit) ze směsi **baktérií** pouze určitou skupinu nebo skupiny
- Příkladem je **agar pro stafylokoky s 10 % NaCl**
- Někdy je selektivnosti dosaženo přidáním antibiotika.
 - **Krevní agar s amikacinem** je selektivní pro streptokoky a enterokoky.
 - Půdy pro **kultivaci kvasinek** zpravidla obsahují **kombinaci antibiotik** (abychom potlačili bakterie, kvasinkám antibiotika nevadí, takže rostou)

Selektivita hypersolného agaru



Půdy diagnostické

www.medmicro.info

- Nepotlačují růst žádného mikroba
- Zato díky svému složení rozlišují mikroby podle určité vlastnosti
- Příkladem je **krevní agar** ke sledování hemolytických vlastností a **VL krevní agar** (podobný, ale na anaeroby)
- Zvláštním případem půdy chromogenní a fluorogenní



www.medmicro.info

Půdy s krví – základ klinické mikrobiologie

- Všechny půdy s krvinkami (krevní agar, VL krevní agar, agar s pranými erytrocyty apod. – *netýká se ale krevního agaru s 10 % NaCl, kde jsou krvinky lyzovány*) jsou schopny rozlišit:

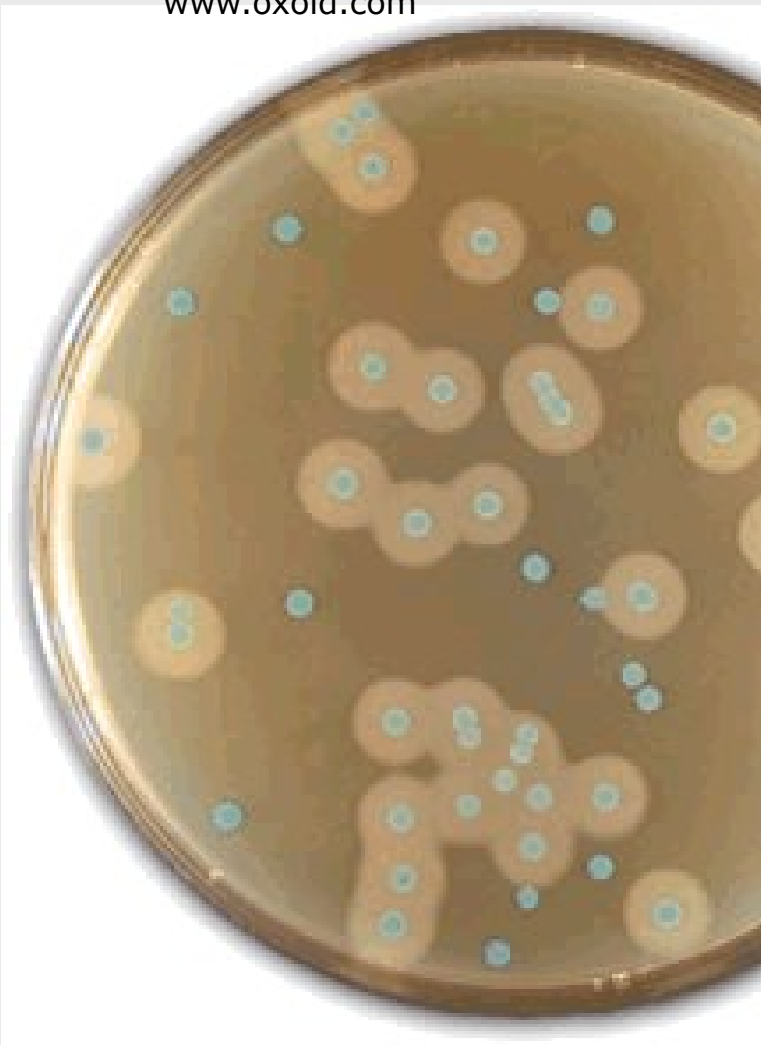
Úplnou hemolýzu
Částečnou hemolýzu
Nepřítomnost hemolýzy
Viridaci (zezelenání)

www.medmicro.info



Půdy chromogenní a fluorogenní

www.oxid.com



- **Chromogenní** půdy obsahují barvivo, na které je navázaný specifický substrát → barevnost se ztrácí, není to už barvivo, ale **chromogen**
- Bakterie schopná štěpit specifický substrát **změní chromogen zpět na původní barvivo**
- **Půda může obsahovat i více chromogenů (pro současné určení více druhů bakterií)**
- **Fluorogenní** půdy podobné, s **fluorescenčním** barvivem

Ukázka chromogenní půdy na kvasinky



Čtyři různé kvasinky rostou v typických koloniích – jedna v zelených, jedna v modrých, jedna v suchých růžových a jedna v hladkých růžových. Ostatní druhy kvasinek jsou na této půdě bílé.



Půdy selektivně diagnostické

www.medmicro.info

- **Kombinují v sobě selektivní a diagnostické vlastnosti**
- Příkladem **půda Endova**:
 - Rostou pouze některé G-bakterie (selektivita)
 - Ty, co rostou, lze rozlišit na laktóza pozitivní (červené) a negativní (bledé)



Podobná je **půda McConkeyho**, ve světě běžnější
Selektivně diagnostické jsou i půdy **XLD**, **CIN** aj.

Půdy XLD a MAL na salmonely





www.medmicro.info

XLD

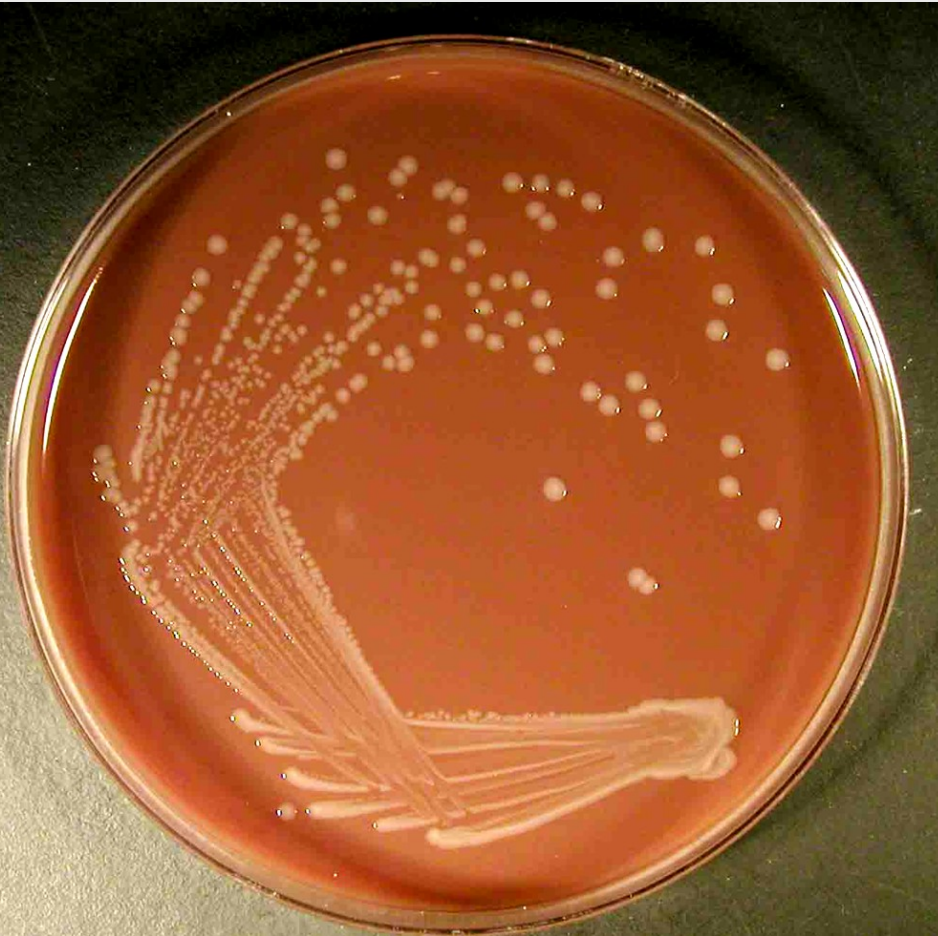
MAL

Půdy selektivní, diagnostické a selektivně diagnostické – shrnutí

Půda selektivní	Kmen A neroste	Kmen B roste	
Půda diagnostická	Kmen C roste, má kolonie makové	Kmen D roste, má kolonie takové	
Půda selektivně diagnostická	Kmen E neroste	Kmen F roste, má kolonie makové	Kmen G roste, má kolonie takové

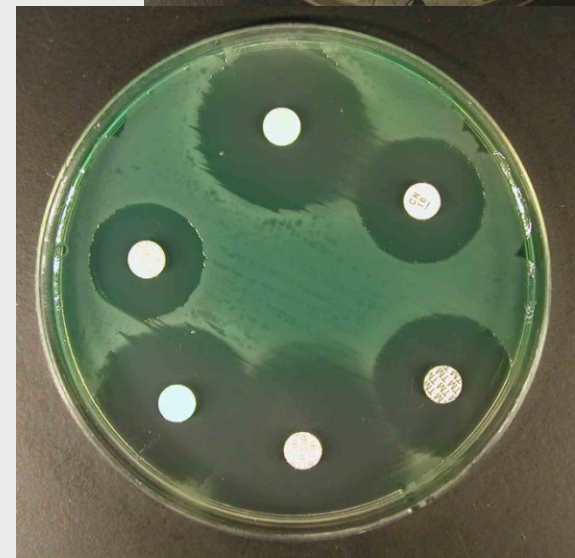
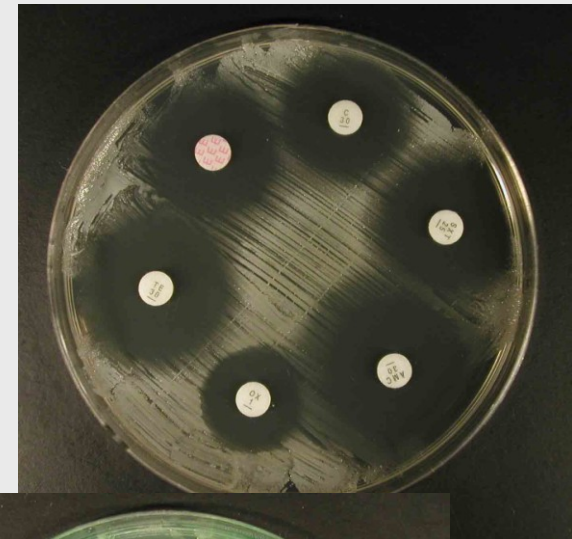
Půdy obohacené a selektivně obohacené

- Jsou určeny pro náročné mikroby
- Obsahují různé nutriční faktory
- Příkladem je **čokoládový agar** pro neisserie a hemofily a **Levinthalův agar** pro hemofily
- Mohou být **selektivně obohacené** (GC agar), tedy kombinace selektivity a obohacení



Půdy ke speciálním účelům

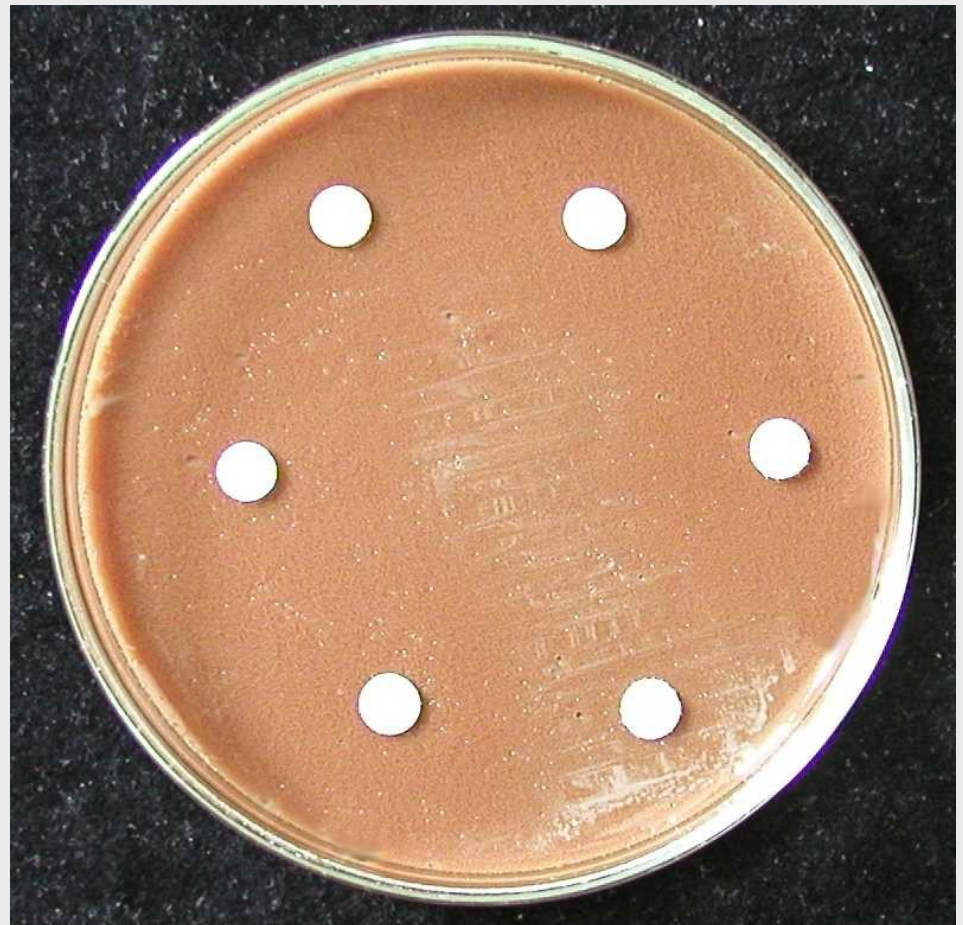
- Sledování faktorů virulence (**žloutkový agar** pro histotoxická klostridia, půda s kongočervení pro stafylokokový sliz)
- In vitro testování citlivosti na antimikrobiální látky: **Müllerův-Hintonové agar**; slouží zároveň ke sledování pigmentů bakterií



Poznámka

V případě kultivačně náročných bakterií se i testování citlivosti provádí na obohacených půdách.

www.medmicro.info



Současné trendy v kultivaci

- Navzdory rozvoji genetických metod si **kultivace zachovává svou klíčovou úlohu** při diagnostice zejména bakterií
- Standardizace nutí přecházet **od půd vyráběných „na koleně“ k půdám komerčně vyráběným**
- **Chromogenní a fluorogenní půdy** se i přes vyšší cenu zvolna prosazují

Pěstování anaerobních bakterií



Nashledanou

Příště budeme pokračovat povídáním o biochemické identifikaci bakterií

