



KULTIVACE

Lékařská mikrobiologie – cvičení, jarní semestr 2016
Mikrobiologický ústav LF MU

Osnova

- ▶ Opakování pojmů
- ▶ Růst mikroorganismů – růstová křivka, výživa, podmínky růstu
- ▶ Kultivace
- ▶ Tekuté půdy
- ▶ Pevné půdy



Opakování

- ▶ **Bakterie, kvasinky:** nemožno vidět pouhým okem, nutno použít mikroskop.
- ▶ **Vzorek:** „to, co jsme odebrali pacientovi“.
- ▶ **Kmen:** nárůst bakteriálních/kvasinkových buněk vzniknuvších z jedné jediné buňky = populace jedné buňky. **Čistá kultura.**
- ▶ **Kolonie:** podoba, v níž sledujeme nárůst kmenů na pevné půdě.

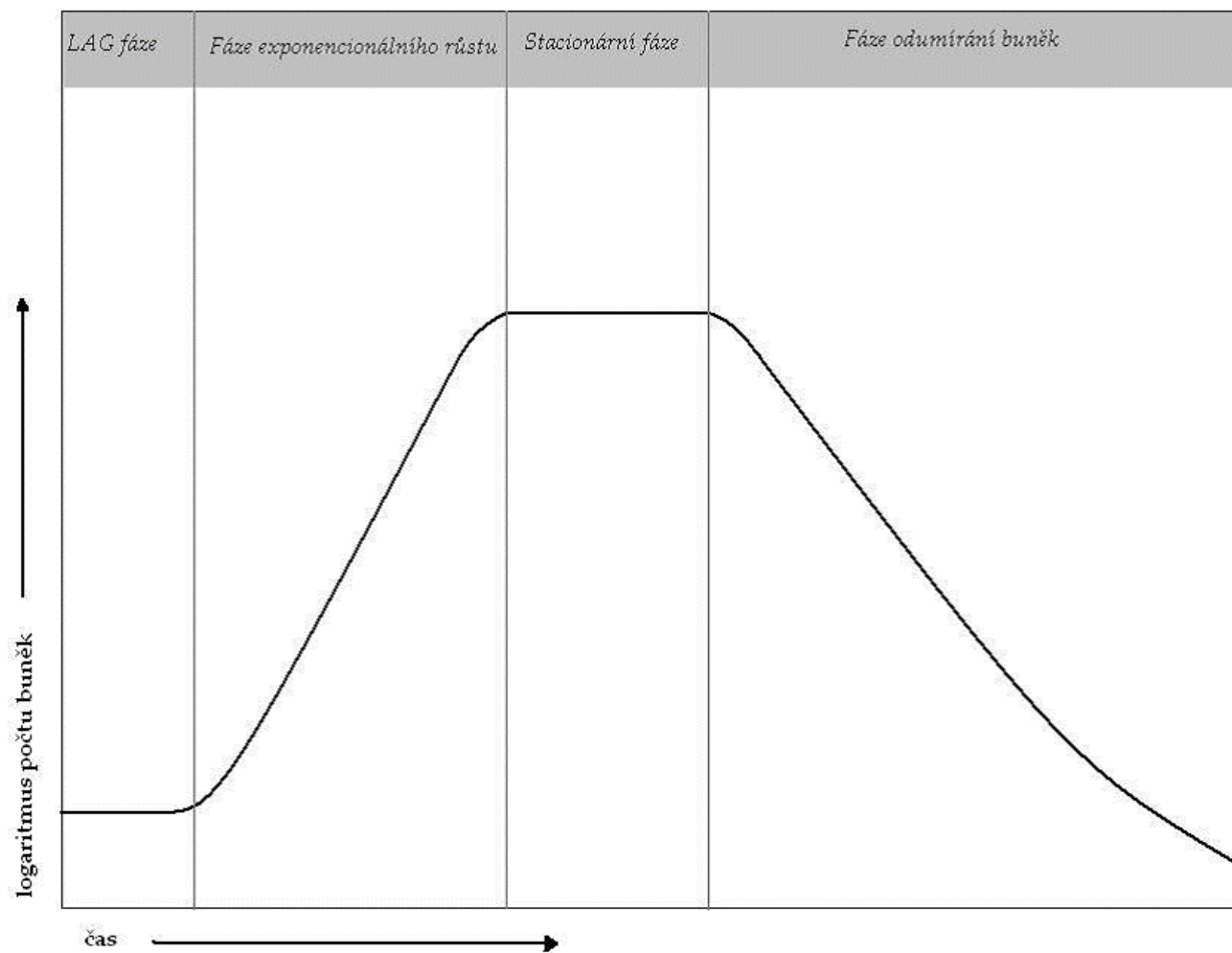


Růst mikroorganismů

- ▶ **Generační doba:** doba nezbytná pro zmnožení bakterie – vznik dvou dceřinných buněk z jedné mateřské.
- ▶ ***Escherichia coli*** – generační doba 20-70 minut, zmnožení DNA trvá kratší dobu (cca 40 minut).
- ▶ **Dělení bakterií:** binární (eukaryota – mitóza, výrazně složitější proces).
- ▶ **Množení kvasinek:** nepohlavní (pučení), pohlavní (konjugace, tvorba spor).



Růstová křivka



Růstová křivka

- ▶ **Lag fáze** – fáze adaptace, buňky nepřibývají, „aktivuje se“ metabolismus.
- ▶ **Log fáze** – fáze neintenzivnějšího růstu a množení (buňky se množí geometrickou řadou s kvocientem 2).
- ▶ **Stacionární fáze** – buňky stejně rychle přibývají jako odumírají. Vyčerpávají se živiny a hromadí zplodiny metabolismu.
- ▶ **Fáze odumírání** – příliš vysoká koncentrace zplodin, buňky hynou.



Výživa mikroorganismů

- ▶ **Zdroj energie, uhlíku, elektronů a dalších biogenních a růstových prvků**
- ▶ **pH**
- ▶ **Voda**
- ▶ **Teplota**
- ▶ **Osmotický tlak**

- ▶ Rozdílné růstové optimum a rozdílné meze přežití pro různé mikroorganismy → **diagnostika!**



Výživa mikroorganismů – klinicky významné druhy (1)

- ▶ **Zdroj uhlíku a energie** – organická látka = chemoheterotrofie.
- ▶ **Bakteriální katabolismus** (akceptory elektronů):
 - **Fermentace** – bez přístupu kyslíku, málo energeticky výhodný, akceptor elektronů nemusí být přítomen v prostředí (např. mléčné kvašení, etanolové kvašení atd.)
 - **Aerobní respirace** – konečným akceptorem elektronů je kyslík
 - **Anaerobní respirace** – konečným akceptorem elektronů je kyslíkatá sloučenina, ale ne přímo kyslík (např. denitrifikace – NO_3^- , $\text{NO}_2^- \rightarrow \text{N}_2\text{O} + \text{N}_2$)



Výživa mikroorganismů – klinicky významné druhy (2)

- ▶ **Kyslík:**
- ▶ **Aerobní** – růst za přítomnosti kyslíku
- ▶ **Fakultativně anaerobní** – preferují růst bez přístupu kyslíku, ale mohou růst i za přítomnosti kyslíku
- ▶ **Striktně anaerobní** – vyžadují atmosféru bez kyslíku
- ▶ **Mikroaerofilní** – vyžadují sníženou tenzi O_2
- ▶ **Kapnofilní** – vyžadují zvýšenou tenzi CO_2



Vytvoření anaerobních podmínek

► Anaerobní box, anaerostat



Výživa mikroorganismů – klinicky významné druhy (3)

► pH:

- Většina vyžaduje pH neutrální = 7
- Acidofilní druhy – $\text{pH} < 7$ (např. helikobaktery v žaludku $\text{pH} < 3$)
- Alkalofilní druhy – $\text{pH} > 7$ (některé enterokoky až $\text{pH} > 11$)

► Teplota:

- Růst zpravidla při 37 °C, některé druhy (ptačí patogeny) při 42 °C.
- Některé druhy (*Listeria monocytogenes*, plísně) roste i při chladničkových teplotách – 4 °C.



Výživa mikroorganismů – klinicky významné druhy (4)

► **Osmotický tlak – koncentrace NaCl:**

- Běžně mikroorganismy tolerují prostředí podobné fyziologickému roztoku, tedy 0,9 %.
- Halofilní druhy – některá vibria vyžadují k růstu alespoň 1 % NaCl.
- Halotolerantní druhy – stafyloky tolerují až 10 % NaCl, enterokoky 6,5 % NaCl.



Kultivace mikroorganismů

► Proč?

- Získání čisté kultury – kmene
- Udržení mikroorganismů při životě – přeočkování na novou půdu
- Odlišení jednotlivých mikrobů na základě diagnostických a selektivně diagnostických půd



Půdy tekuté a pevné

► Tekuté půdy

- Základem je masopeptonový bujon (hovězí vývar + bílkovinný hydrolyzát).
- Používají se především k pomnožení.
- **Vyhodnocení výsledku:** čirý bujon = neroste; zakalený bujon nebo přítomný sediment = roste.
- Použití hlavně tam, kde se nepředpokládá velká variabilita druhů (např. výtěr ze spojivkového vaku).

► Pevné půdy

- Bujon zpevněný agarem (agarová řasa) – pomalejší, ale rozmanitější růst.
- Tam, kde se předpokládá velká variabilita druhů (např. stěr z rány, výtěr z krku).



Tekuté půdy

► **Pomnožovací:**

- nejběžnější a univerzální; bujón pro aerobní kultivaci a VL-bujón pro anaerobní kultivaci (VL = viande-levure, obsahuje masokvasničný extrakt)

► **Selektivně pomnožovací:**

- pomnožení určité bakterie a potlačení množení jiných (selenitový bujón pro salmonely)

► **Obohacené pomnožovací:**

- z kvalitnějších extraktů (např. BHI = mozkosrdcová infuze), hydrolyzátů (kasein), vitamínů (kvasničný hydrolyzát) atd. Vhodné pro náročnější bakterie (streptokoky, hemofily, patogenní neisserie)



Pevné půdy

▶ **Základní:**

- základ je masopeptonový bujon, NaCl a 1,5 % agaru – pro nenáročné bakterie.

▶ **Obohacené:**

- základní s přidavkem dalších složek (např. růstové faktory, krev, cukry...)

▶ **Diagnostické:**

- přidané složky, které reagují charakteristicky s metabolismem mikroorganismu (krevní agar, chromogenní a florogenní půdy...)



Pevné půdy

► **Selektivní:**

- Přidány látky podporující růst některých mikroorganismů a potlačují růst jiných (krevní agar s 10 % NaCl pro růst stafylokoků, krevní agar s azidem sodným pro enterokoky – stafylokoky ani streptokoky na něm nerostou, ...)

► **Selektivně diagnostické:**

- Kombinace diagnostických a selektivních – ENDO (selektivní složka je fuchsin, diagnostická složka fuchsin odbarvený siřičitanem a laktóza), XLD, MAL (k detekci salmonel).



Pevné půdy pro speciální účely

► **MH agar (Müllerův-Hintonové agar):**

- in vitro testování citlivosti na antimikrobiální látky
- používá se také k testování pigmentů bakterií
- V MH agaru je namísto peptonu (v masopeptonovém agaru) použit kaseinový lyzát. Pepton brání difúzi antimikrobiálních látek.

► **Půdy pro sledování virulence:**

- žloutková půda pro histotoxická klostridia
- půda s kongočervení pro detekci stafylokokového biofilmu



Úkol 1a: Půdy v klinické mikrobiologii (1)

Název	Druh	Barva	Typ	Bakterie
bujon	tekuté půdy	nažloutlá	pomno- žovací	aeroby
VL-bujon				anaeroby
selenitový bujon			selektivně pomnož.	salmonely
Sabourau- dův agar	pevné půdy ve zkumavce	skoro bezbarvá	selektivní*	houby
Löwentein- Jensen		bílá až velmi světle zelená	obohacená	mykobakteria (pův. TBC)
krevní agar	pevné půdy v misce	červená	obohacená diagnostická	většinu bakterií
Endova půda		růžová	selektivně diagnostická	především enterobakterie



Úkol 1a: Půdy v klinické mikrobiologii (2)

Název	Druh	Barva	Typ	Bakterie
MH	pevné půdy na Petriho miskách	skoro bezbarvá	speciální	atb citlivost
NaCl		červená -hnědá	selektivní	stafylokoky
WCHA/VL-agar		červená	jako KA	anaeroby
XLD (a blízký MAL)		oranžová	selektivně diagnostická	salmonely
čokoládový agar		hnědá	obohacená	hemofily, neisserie
Hemofilový/ Levinthalův agar		nažloutlá	obohacená	hemofily
Slanetz-Bartley		světlounce růžová	selektivně diagnostická	enterokoky



Úkol 1b: video – příprava krevního agaru

- ▶ Prohlédněte si video, které se připravují půdy.
- ▶ Všímejte si kroků, které zaručují sterilní postup.



Úkol 2a: závislost růstu na kyslíku

- ▶ Zaznamenejte do tabulky, kde bakterie rostou a kde nikoliv a na základě znalostí o závislosti růstu na kyslíku rozhodněte, do které patří skupiny.
- ▶ **striktní aeroby** – růst v přítomnosti kyslíku
- ▶ **striktní anaeroby** – růst v prostředí bez kyslíku
- ▶ **fakultativní anaeroby a aerotolerantní** – rostou i za přítomnosti kyslíku, i bez
- ▶ **mikroaerofilní** – rostou pouze za stopového množství kyslíku
- ▶ **kapnofilní** – vyžadují větší tenzi CO_2

Úkol 2b: závislost růstu na ATB a solích

- ▶ Zaznamenejte do tabulky, kde bakterie rostou a kde nikoliv a na základě znalostí o závislosti růstu na přítomnosti ATB a koncentraci solí rozhodněte, do které patří skupiny.
- ▶ KA s 10 % NaCl jen pro stafylokoky
- ▶ KA s 6,5 % NaCl pro stafylokoky a enterokoky
- ▶ KA s amikacinem pro streptokoky a enterokoky
- ▶ KA s azidem sodným pro enterokoky



Úkol 2c: závislost růstu na teplotě

- ▶ Zaznamenejte do tabulky, kde bakterie rostou a kde nikoliv a na základě znalostí o závislosti růstu na teplotě rozhodněte, o jaký se jedná druh.
- ▶ *Pseudomonas aeruginosa* roste při 37 °C a 42 °C
- ▶ *Pseudomonas fluorescens* roste při 4 °C a 37 °C

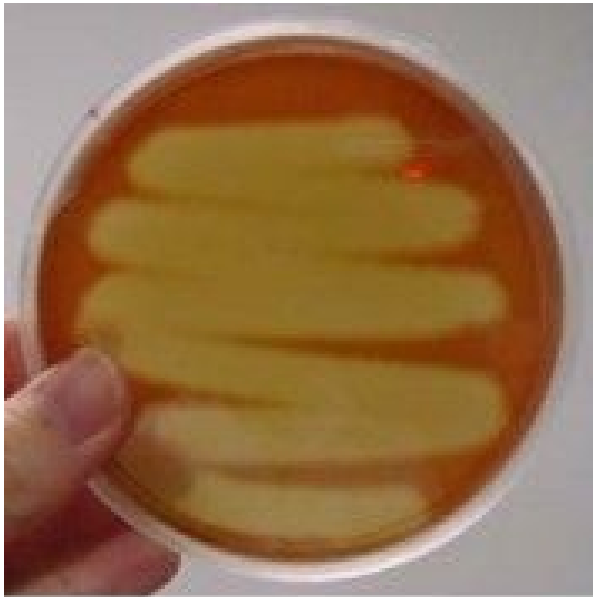


Úkol 3a: krevní agar – viridace a hemolýza

- ▶ 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** (β -hemolýza) a **částečnou hemolýzu** (β -hemolýza) – *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*
- ▶ **nepřítomnost hemolýzy** (γ -hemolýza)
- ▶ **viridaci** – půda „zezelená“ (α -hemolýza) – *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus mutans*



Úkol 3a: krevní agar – viridace a hemolýza



Beta Hemolysis



Alpha Hemolysis



Gamma Hemolysis



Úkol 3b: Endova půda

- ▶ na Endově půdě rostou pouze G- bakterie (čeledi *Enterobacteriaceae*, *Vibrionaceae*, GNFB)
- ▶ Endova půda obsahuje jako substrát laktózu. Dále obsahuje basický fuchsin zodpovědný za selektivitu půdy. Fuchsin společně s Na_2CO_3 slouží jako indikátor (= Schiffovo činidlo). Bakterie využívající laktózu tvoří laktaldehyd → tmavočervená barva kolonií.
- ▶ **laktóza pozitivní** (červené, včetně okolí, jinak může jít pouze o pigment!) a **negativní** (bledé)



Úkol 4: Popis vlastností kolonií

- ▶ Pokuste se popsat 10 základních vlastností kolonií.
- ▶ Všímejte si rozdílů mezi jednotlivými koloniemi.

ZNAKY POPISOVANÉ NA BAKTERIÁLNÍ KOLONII	
Velikost	hodnotí se jen u dobře izolovaných kolonií, uvádí se v mm
Tvar	kolonie pravidelná kulatá, oválná, nepravidelně laločnatá, plazící se
Profil	kolonie plochá, vypouklá, miskovitá, s vystupujícím středem, s navalitymi okraji apod.
Okraje	rovné, nebo vláknité, s výběžky, lalůčky atd.
Povrch	hladký, lesklý (S-fáze), matný, drsný (R-fáze), krabatý
Transparence	kolonie průhledná, průsvitná, neprůsvitná
Barva	kolonie bezbarvá, nebo pigmentovaná: naředlá, bělavá, žlutá, s černým středem apod.
Změny v okolí	dvorec zbarvení, hemolýzy, precipitátu
Konzistence	kolonie mazlavá, drobivá, hlenovitá, vrůstá do agarů apod.
Zápach	po jasmínu, spermatu, žluklém másle, ovocný, nakyslý atd.

Úkol 5a: Očkování stěru/výtěru na pevnou půdu

- ▶ **naneste tamponem** vzorek na část misky (asi tak do jedné třetiny průměru misky)
- ▶ **vyžíhejte** kličku
- ▶ **rozočkujte z plochy**, kam jste nanесли vzorek, do další části
- ▶ **vyžíhejte** kličku
- ▶ **rozočkujte z čar**, kde jste rozočkovali minule (už se nedotýkejte plochy, kam jste očkovali tamponem)
- ▶ **vyžíhejte** kličku
- ▶ **rozočkujte „hádka“**



Úkol 5b: Přeočkování agarové kultury

- ▶ **vyžíhejte kličku**
- ▶ **naberte kmen** (pouze teď, nikdy znovu v dalších krocích!)
- ▶ **naočkujte první úsek**
- ▶ **vyžíhejte kličku**
- ▶ **rozočkujte druhý úsek**
- ▶ **vyžíhejte kličku**
- ▶ **rozočkujte třetí úsek**
- ▶ **vyžíhejte kličku**
- ▶ **rozočkujte „hádka“**



Po skončení práce

- ▶ Uklid'te misky a zkumavky do beden, stojanů
- ▶ Proved'te dezinfekci stolů
- ▶ Proved'te dezinfekci a umytí rukou
- ▶ Pokud chcete misky z úkolu 5b nechat vykultivovat, označte je čitelně jménem či pro vás jasným symbolem a dnešním datem a ponechte je na stolech.

Po tomto cvičení byste měli umět

- ▶ Vysvětlit růstovou křivku a popsat množení mikrobů.
- ▶ Umět vyjmenovat základní nároky mikroorganismů na růst a množení.
- ▶ Znat základní typy tekutých a pevných půd včetně způsobu použití.
- ▶ Očkovat na pevné půdy.

