

Pátráme po mikrobech
Díl III.

Kultivace bakterií a kvasinek

Ondřej Zahradníček

K praktickému cvičení pro VLLM0421c

Kontakty na mne:

777 031 969

zahradnicek@fnusa.cz

ICQ 242-234-100

Co už víme

- Mikroby mají různou **velikost**. Kvasinky jsou větší než bakterie, ty zase než viry
- Bakterie mají různý **tvar** (koky, kokobacily, tyčinky, spirochety) a uspořádání
- Bakterie mají různý **typ buněčné stěny**, a podle toho je rozdělujeme na Gram +, Gram – a Gram 0 (Gramem se nebarvící).
- Můžeme také sledovat bakteriální **pouzdra** a bakteriální **spory**.

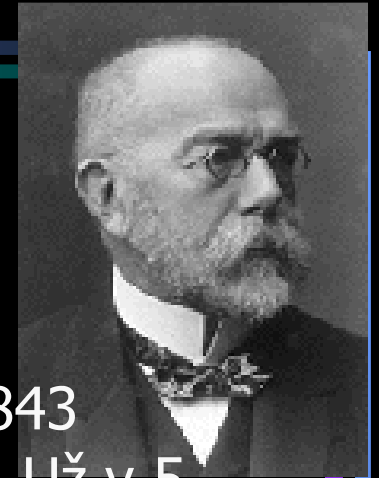
Pohádka

- 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

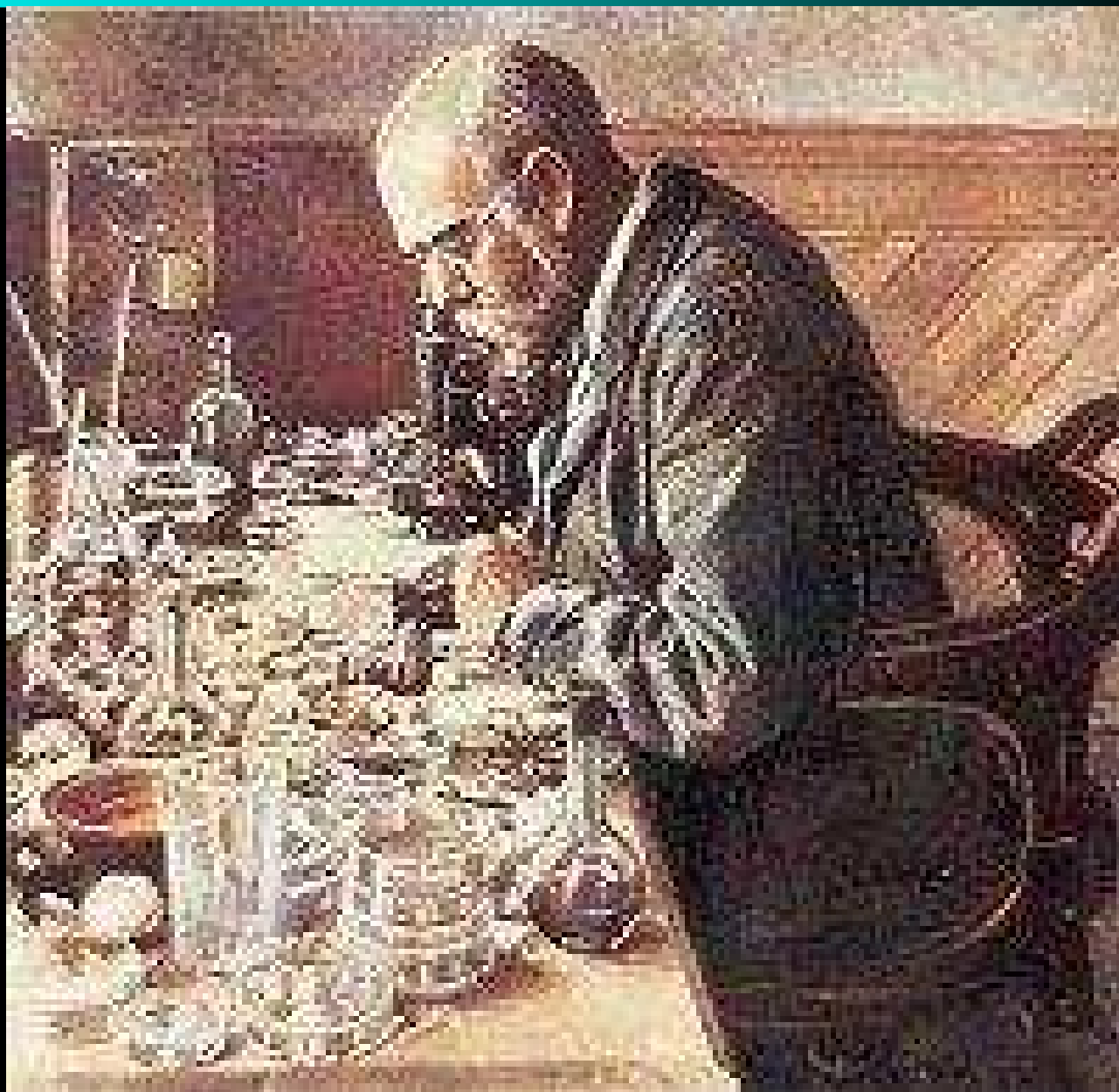


Německý mikrobiolog Robert Koch se narodil 11. prosince 1843 v Clausthal-Zellerfeldu jako jedno z 13 dětí důlního technika. Už v 5 letech ohromil rodiče, když jim oznámil, že se podle novin naučil číst. V roce 1862 odešel Koch na univerzitu do Göttingenu studovat medicínu. Po obdržení doktorátu v roce 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 vyznamenán 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



<http://www.educationforum.co.uk/kochlesson.htm>

Robert Koch při expedici do Egypta při cholerové epidemii



www.amuseum.de/rkoch.htm

Množení bakterií

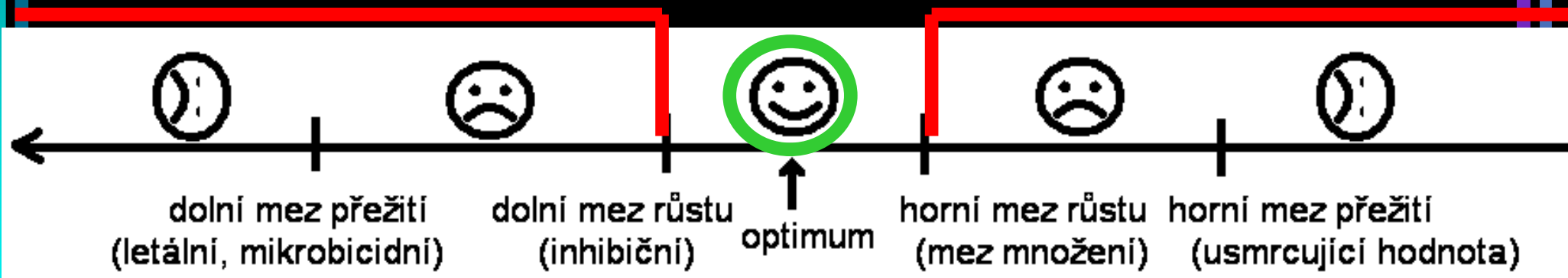
- Každá bakterie má svou **generační dobu**
- Za jednu generační dobu jsou **z jedné dvě**, za desetinásobek je z jedné 1024 bakterií (teoreticky) a podobně
- Ideální množení by existovalo pouze kdybychom neustále přidávali živiny a popř. kyslík a odebírali odpadní produkty

Reálná růstová křivka

- **Fáze latence** – 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“

Je jedno, za jakých podmínek bakterie pěstujeme?

Samozřejmě, že není! Pro většinu bakterií musíme teplotu, vlhkost, koncentrace solí a řadu dalších vlastností vtěsnat do poměrně úzkého rozmezí.



Pro pěstování nestačí hodnoty, za kterých mikroby přežívají. Musí být schopny se množit.

Požadavky různých mikrobů se vzájemně liší!

Klinicky významné bakterie

- **Teplotu** zpravidla vyžadují kolem 37 °C
 - ale ptačí patogeny více (42 °C), mikroby pocházející zvenčí méně (30 °C)
- **Hodnotu pH** vyžadují kolem pH 7
 - ale žaludeční helikobakter mnohem méně
- **Koncentraci NaCl** vyžadují kolem 0,9 % (fyziologický roztok)
 - ale stafylokoky, které musí být schopny množit se i na zpocené kůži, se množí i při 10 % soli!

V praxi je část parametrů (např. teplota) dána nastavením termostatu, a zbytek (např. koncentrace NaCl) složením kultivačního média.

Kultivační termostat

Kromě skříňových termostatů, jako je tento, máme na ústavu i jeden termostat komorový, tedy celou místnostku o 37 °C.

Většina bakterií se kultivuje v termostatu přes noc, tedy cca 24 h.



Vztah bakterií ke kyslíku

- **Aerobní a fakultativně anaerobní (případně 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)

Něco málo o bakteriálním katabolismu

- Katabolismus může být trojí:
 - **Fermentace** – štěpení bez potřeby kyslíku. Málo energeticky výhodný, ale nepotřebuje kyslík. Produktem např. kyselina mléčná, etanol apod.
 - **Aerobní respirace** – z mála živin se získá hodně energie, je ale nutný kyslík. Produktem CO_2 a H_2O
 - **Anaerobní respirace** – jiný akceptor elektronů
- Typ katabolismu je **úzce spjat se vztahem ke kyslíku**. Fermentující bakterie jsou zpravidla fakultativně nebo **striktně anaerobní**. Naopak **aerobně respirující bakterie bývají striktně aerobní**.

Pěstování anaerobních bakterií



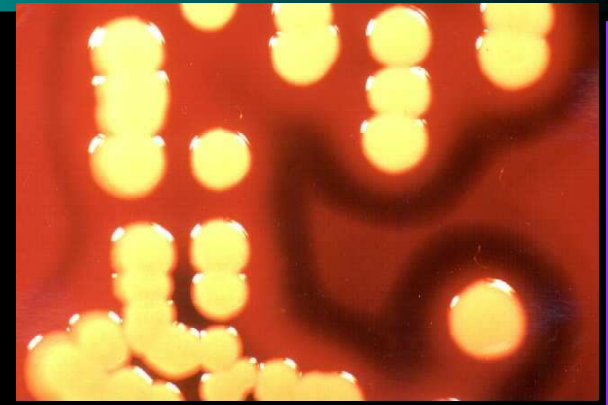
Smysl kultivace bakterií

- 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** – pouze pevné půdy
 - Abychom je vzájemně **odlišili a oddělili** – používají se diagnostické a selektivní půdy, sloužící k identifikaci

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**

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 bakteriální diagnostice

Takhle vypadají pevné půdy



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

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 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. Příklad: výtěr ze spojivkového vaku
 - Vzorky, kde může být hodně i málo mikrobů a i málo mikrobů je významných očkujeme na pevné i tekuté půdy. 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

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 pudy

Pevné (agarové) půdy

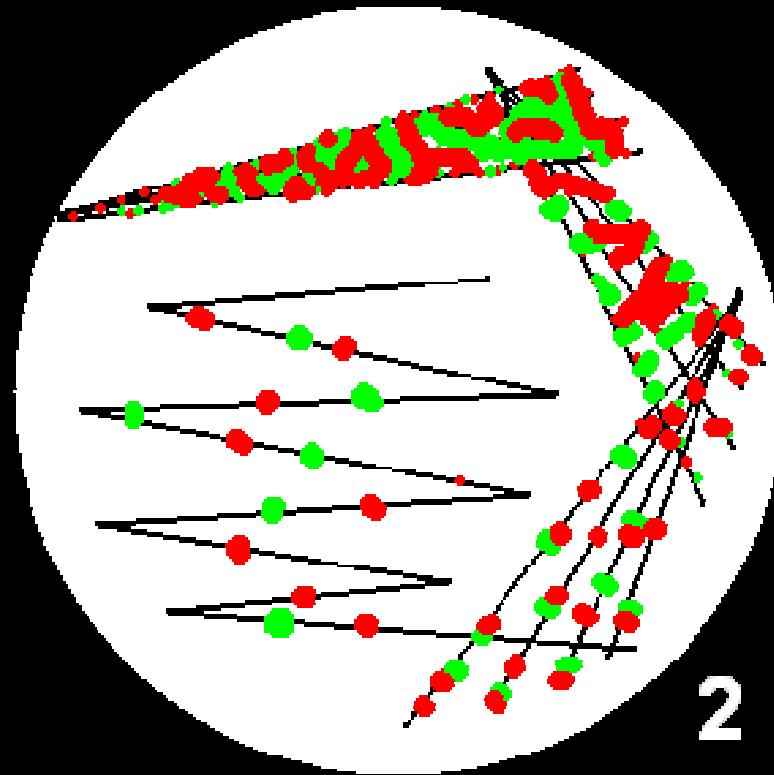
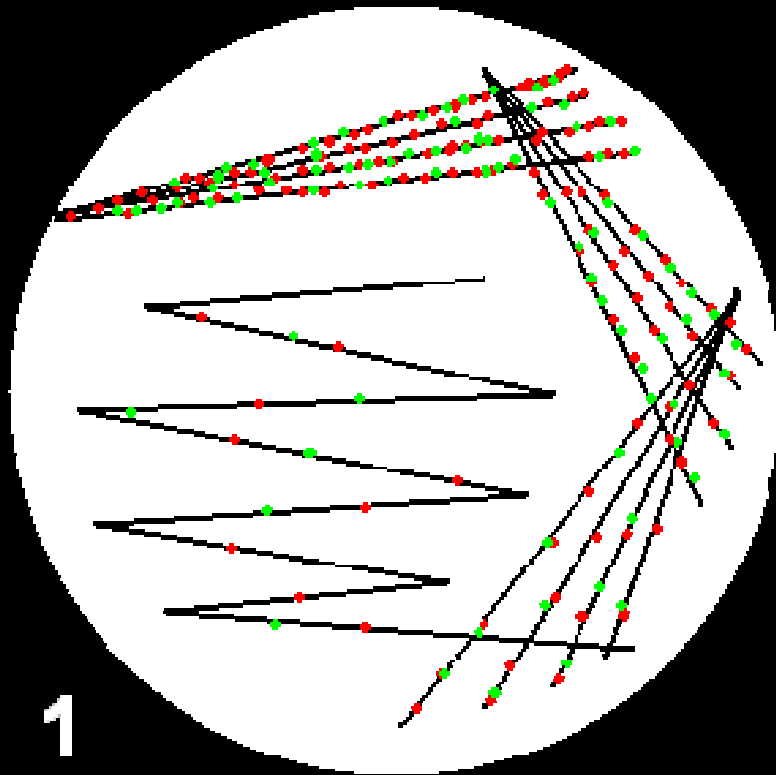
- Abychom využili všech výhod, které pevné půdy nabízejí, musíme vzorek (kultivace vzorek → kmen), ale i kmen (kultivace kmen → kmen) dobře rozočkovat. Klasickým způsobem rozočkování je tzv. **křížový roztěr**. V praxi se zpravidla natře např. na polovinu misky tamponem a pak se rozočkovává kličkou.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

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



Ilustrační foto: krystalky NaCl

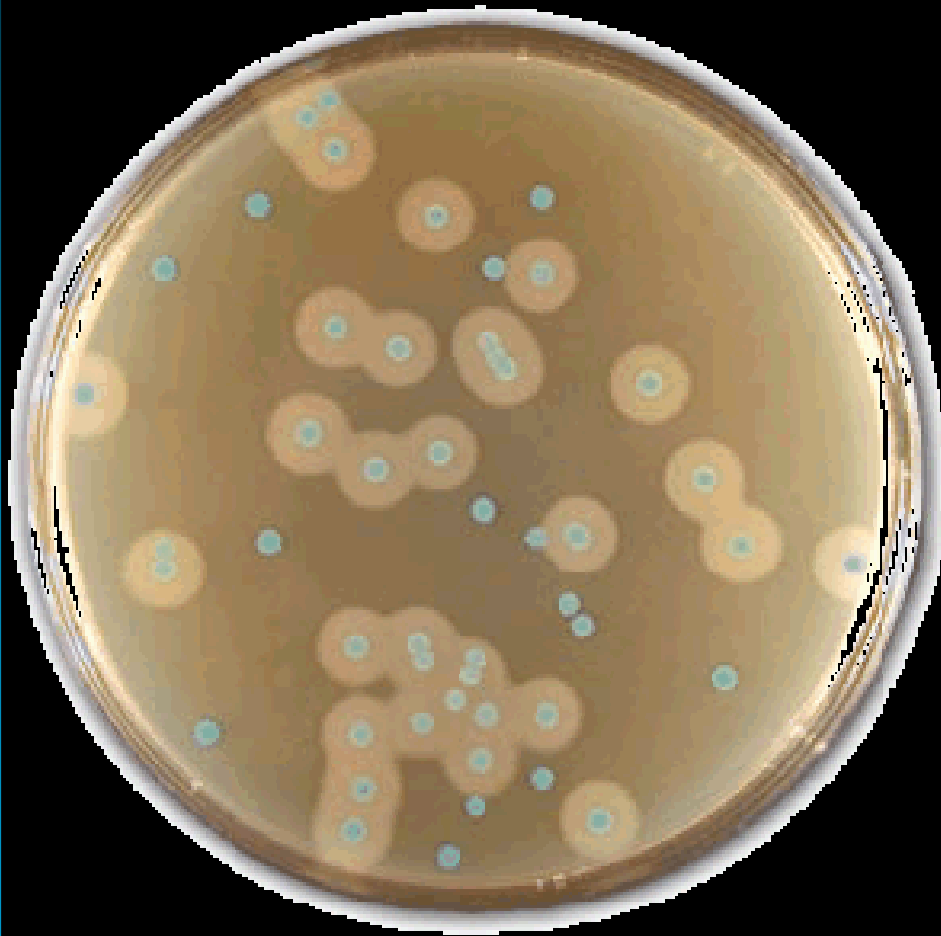
- Účelem je **selektovat (vydělit) ze směsi bakterií** pouze určitou skupinu nebo skupiny
- Příkladem je **agar pro stafylokoky s 10 % NaCl**
- Někdy je selektivnosti dosaženo přidáním antibiotika. **Krevní agar s amikacinem** je selektivní pro streptokoky a enterokoky

Půdy diagnostické

- 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

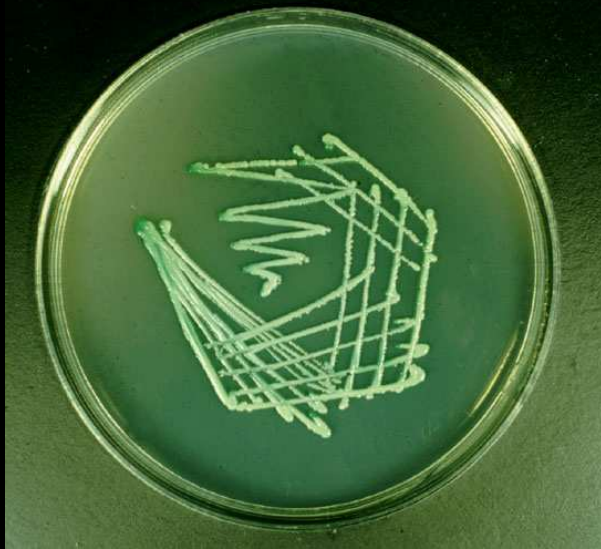


Půdy chromogenní a fluorogenní



- **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 více druhů)
- **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.



Princip chromogenní půdy

...substrát je o



Chromofor

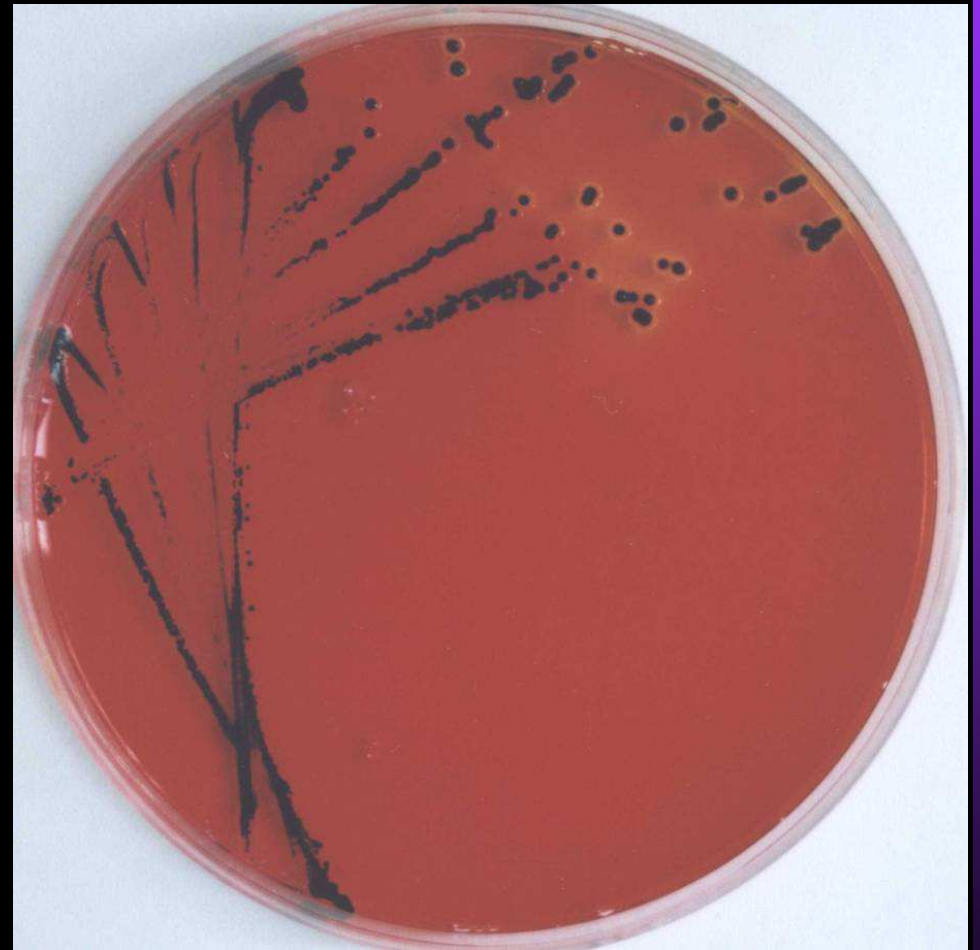
The diagram shows a stylized blue outline of a fish's head on a yellow background. A small circle representing an eye is located in the upper right. A rectangular box labeled 'Chromofor' is positioned in the middle of the head, with lines extending from its corners towards the snout area.

Půdy selektivně diagnostické

- 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



Zátiší z naší
komorové
lednice



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
- **Obohacenou půdou je i krevní agar**, který jsme ale uvedli mezi půdami diagnostickými (svými vlastnostmi patří do obou kategorií)
- Příkladem „čistých obohacených půd“ jsou **čokoládové a Levinthalovy agary pro patogenní neisserie** a hemofily (které ani na krevním agaru nerostou)
- Půdy též mohou být **selektivně obohacené** (např. **GC agar**, což je čokoládový agar s antibiotiky pro kultivaci *Neisseria gonorrhoeae*)

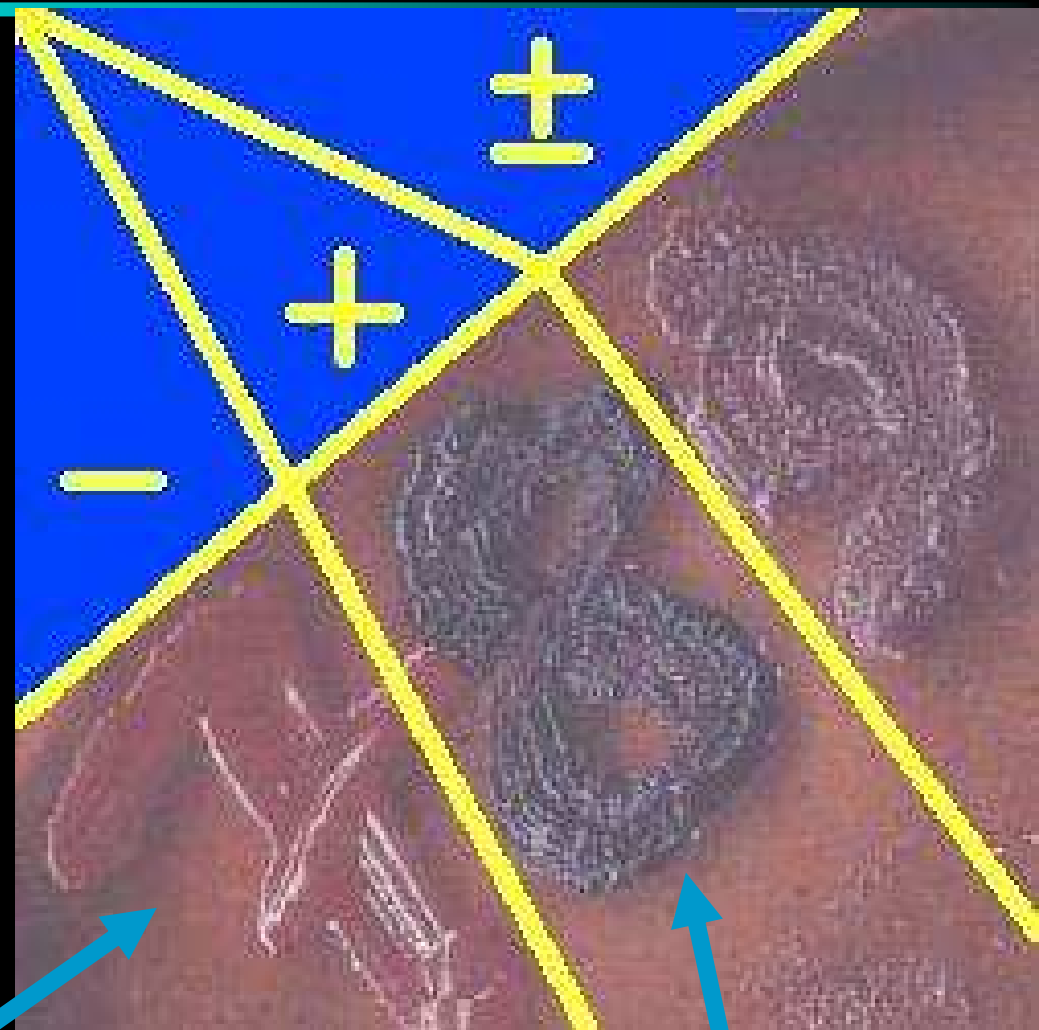
Čokoládový agar



Půdy ke speciálním účelům – 1

Sledování faktorů virulence:

- na obrázku půda s kongočervení pro stafylokokový sliz (biofilm)
- dále např. žlutkový agar pro histotoxická klostridia

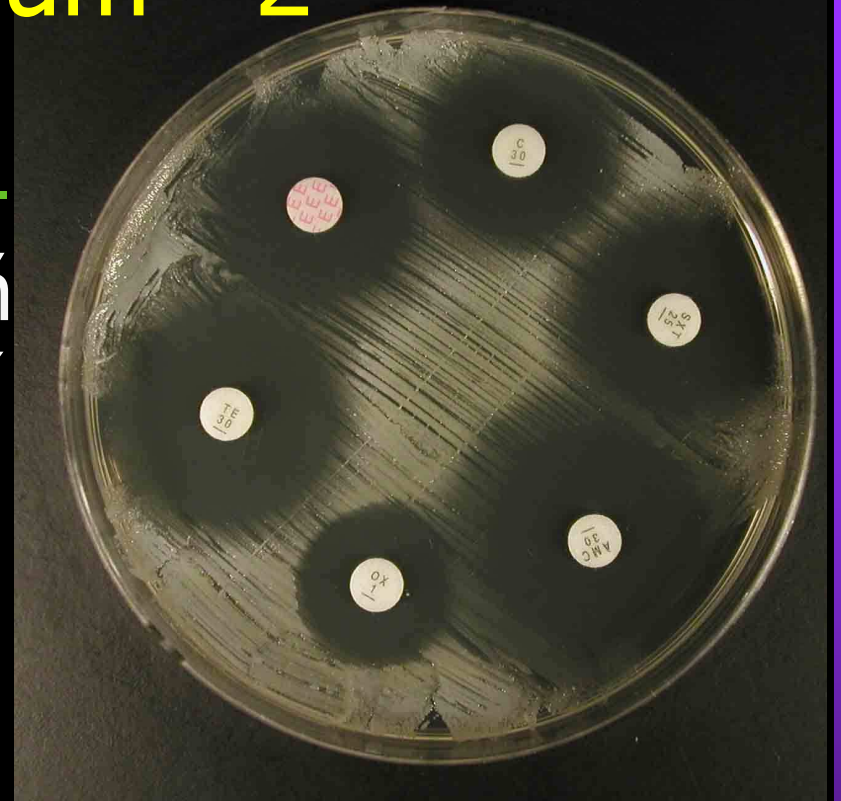


Červené, vlhké kolonie znamenají negativní výsledek

Suché, černé kolonie svědčí o produkci slizu daným kmenem

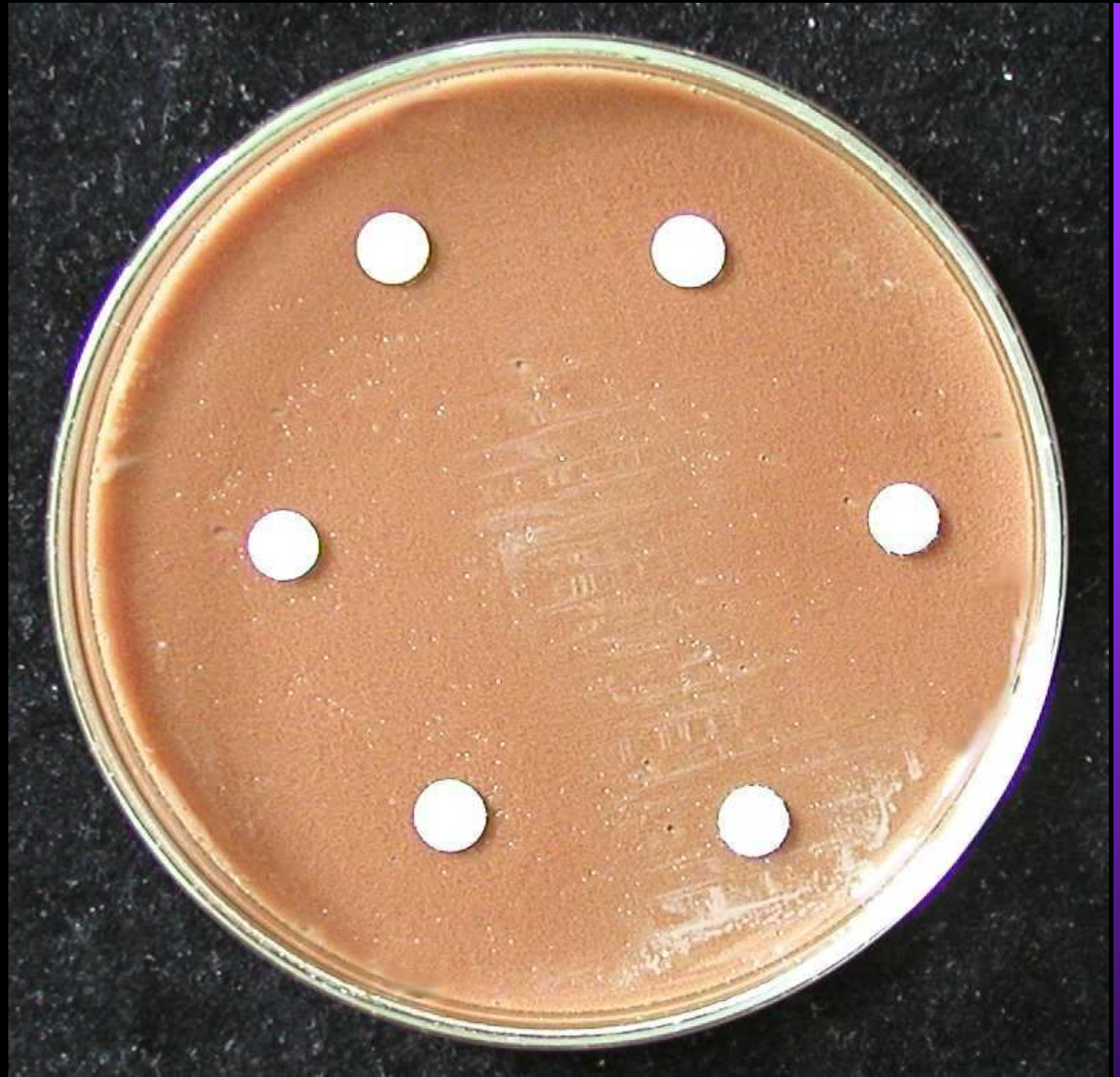
Půdy ke speciálním účelům - 2

In vitro testování citlivosti na antimikrobiální látky: Müllerův-Hintonové agar; slouží zároveň ke sledování pigmentů bakterií



*Vpravo nahoře
nepigmentovaný
stafylokok, vlevo dole
zeleně pigmentovaná
Pseudomonáda*

Poznámka



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

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

Úkol 1a – Prohlédněte si půdy

1. bujon
2. VL-bujon
3. selenitový bujon
4. Sabouraud
5. Löwenstein-Jenssen
6. KA
7. Endo
8. MH
9. NaCl
10. VLA
11. XLD
12. ČA
13. Levinthal
14. Slanetz-Bartley

Přehled půd – první část

*pouze jsou-li
přidána antibiotika

Název	Druh	Barva	Typ	Pro
bujon	tekuté půdy	nažloutlá	pomno- žovací	aeroby
VL-bujon		tmavší		anaeroby
selenitový bujon		narůžovělá	selektivně pomnož.	salmonely
Sabourau- dův agar	pevné půdy ve zkumavce	bílá	selektivní*	houby
Löwentein- Jensen		zelená	obohacená	TBC
krevní agar	pevné půdy v misce	červená	obohacená diagnostická	většinu bakterií
Endova půda		růžová	selektivně diagnostická	především enterobakterie

Přehled půd – druhá část

Název	Druh	Barva	Typ	Pro
MH	pevné půdy na Petriho miskách	skoro bílá	speciální	atb citlivost
NaCl		hnědá	selektivní	stafylokoky
VL-agar		červená	jako KA	anaeroby
XLD		oranžová	selektivně diagnostická	salmonely
čokoládový agar		hnědá	obohacená	hemofily, neisserie
Levinthalův agar		nažloutlá	obohacená	hemofily
Slanetz- Bartley		růžová	selektivně diagnostická	enterokoky

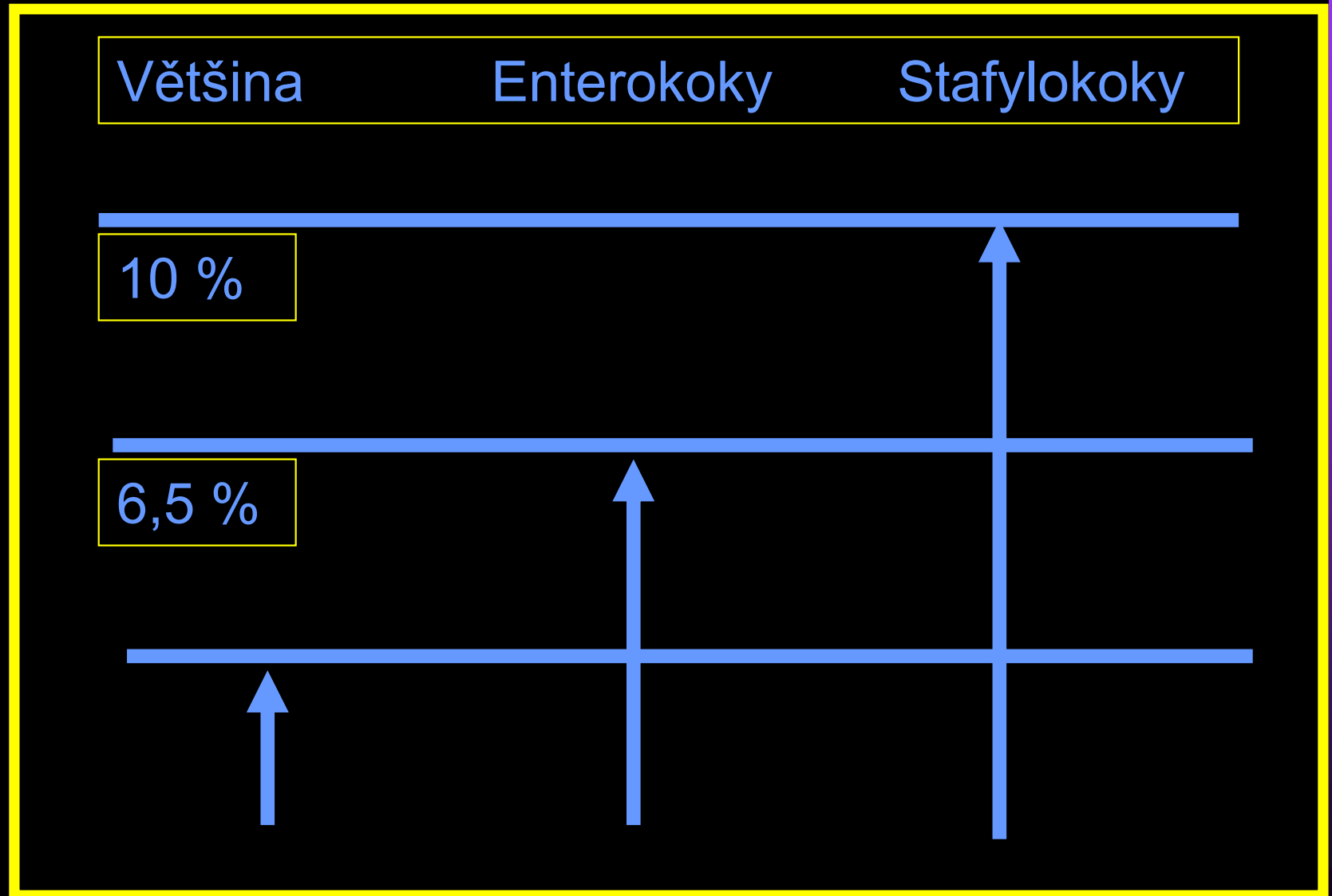
Úkol 1 b – video „Příprava krevního agaru“

- Prohlédněte si **video**
- Všimněte si, že je naprosto nezbytné postupovat **tak, aby vyrobená půda byla sterilní** a nebyla kontaminována bakteriemi v prostředí
- **Ovčí krev** nelze přidávat, dokud je půda ještě příliš horká

Úkol 2a – závislost na kyslíku

- **Striktní aeroby** rostou jen v přítomnosti kyslíku
- **Striktní anaeroby** rostou jen tam, kde kyslík není
- **Fakultativní anaeroby** a od nich nerozeznatelné aerotolerantní bakterie rostou za všech podmínek
- **Mikroaerofilní bakterie** rostou jen tam, kde jsou stopy kyslíku
- **Kapnofilní bakterie** vyžadují více CO₂

Úkol 2b – různé koncentrace NaCl

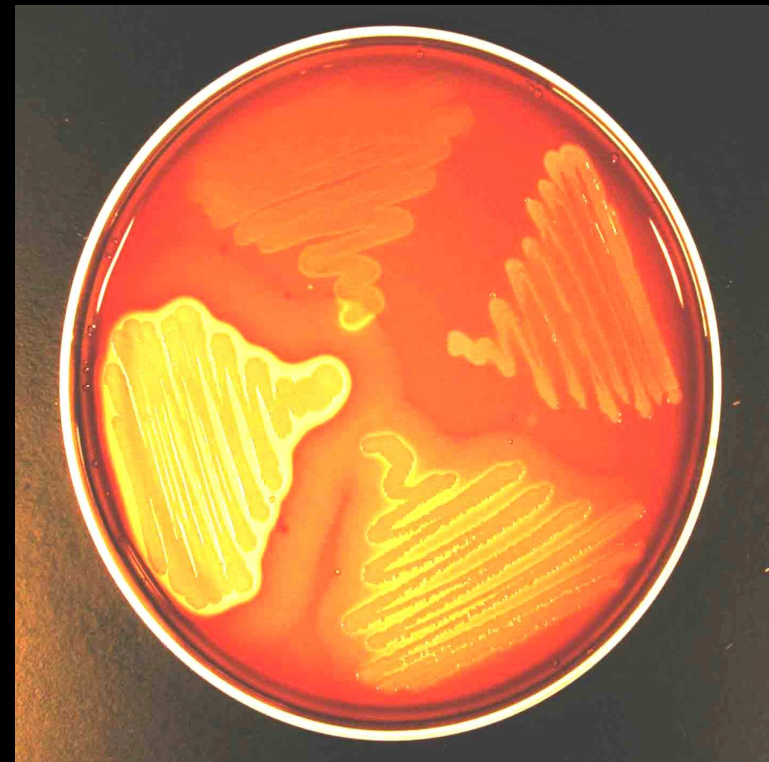


Úkol 2c – závislost na teplotě

- *Escherichia coli* stejně jako *Pseudomonas aeruginosa* rostou při teplotách 37 °C a 42 °C.
- Naopak *Pseudomonas fluorescens* roste při 4 °C a 37 °C.
- **Závěr:** Metodu lze použít k rozlišení pseudomonád. Musíme ovšem vědět, že kmen je pseudomonáda.

Úkol 3a: Změny na krevním agaru

- 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)



Úkol 3b: Vlastnosti Endovy půdy

- Zopakujme si z úvodu:
- Na Endově půdě rostou **pouze G- bakterie**, a to ještě jenom některé (selektivita)
- Ty, co rostou, lze rozlišit na **laktóza pozitivní** (červené) a **negativní** (bledé).



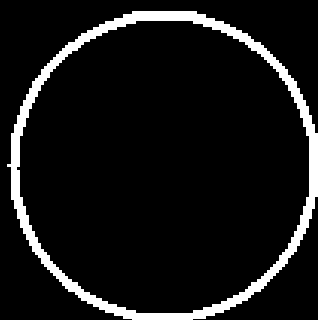
Z hlediska klinické mikrobiologie to má význam: laktóza pozitivní bakterie jsou zpravidla mírnějšími patogeny než bakterie laktóza negativní

Úkol 4: Popis morfologických vlastností kolonií

- I když **v praxi většinou nepopisujeme všech deset vlastností**, které máte uvedeny v protokolu, z cvičných důvodů se o to nyní pokuste.
- Tam, kde to nejde, **napište, proč to nejde**. Nezapomeňte na okolí kolonie, tj. hemolýzu na krevním agaru či štěpení laktózy na Endově půdě

Rozdíl mezi tvarem a profilem

Tvar



okrouhlý



nepravidelný

Profil



konvexní



plochý



miskovitý

Úkol 5a: Naočkování vzorku na agarovou půdu

Naneste tamponem vzorek na část misky (asi tak do jedné třetiny průměru misky)

Vyžíhejte kličku

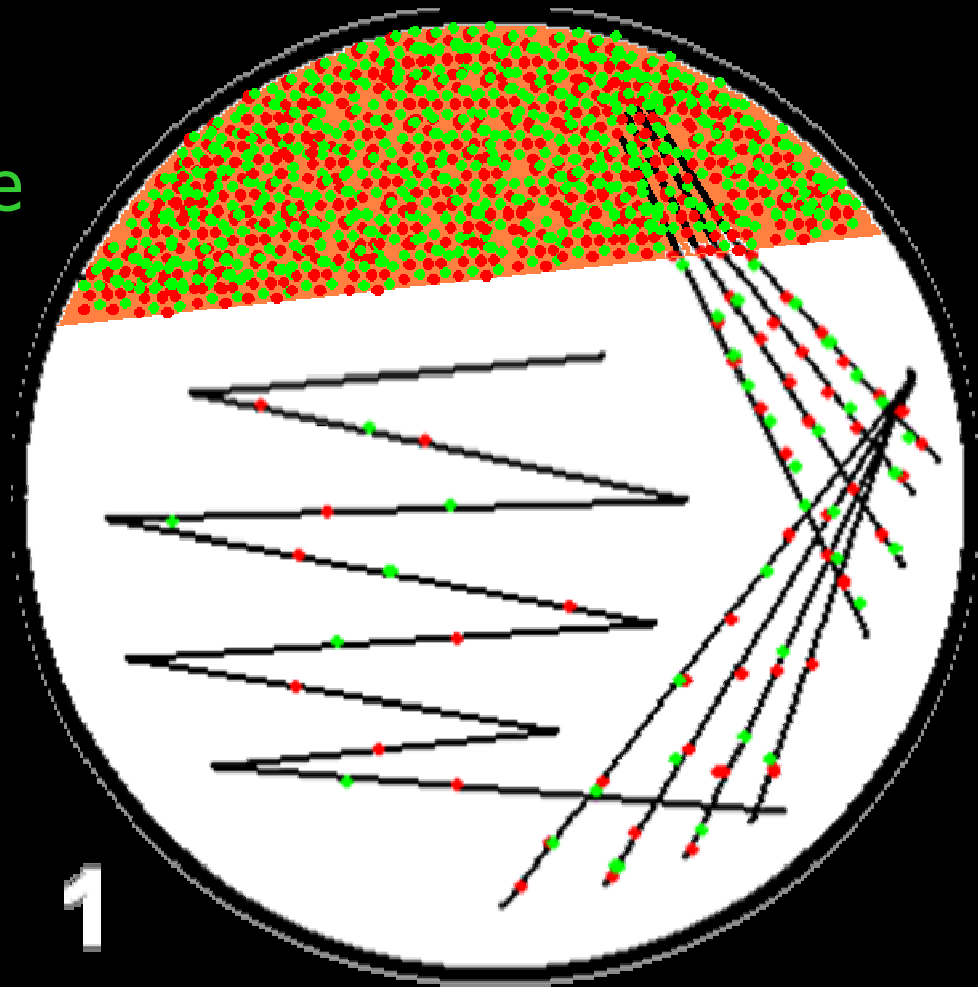
Rozočkujte z plochy, kam jste nanесли vzorek, do další části

Vyžíhejte kličku

Rozočkujte z čar, kde jste rozočkovali minule (už se nedotýkejte plochy, kam jste očkovali tamponem)

Vyžíhejte kličku

Naočkujte „hádka“



Úkol 5b: Přeočkování agarové kultury

Vyžíhejte kličku

Naberte kmen

Naočkujte první úsek

Vyžíhejte kličku

Už znovu nenabírejte kmen

Naočkujte druhý úsek

Vyžíhejte kličku

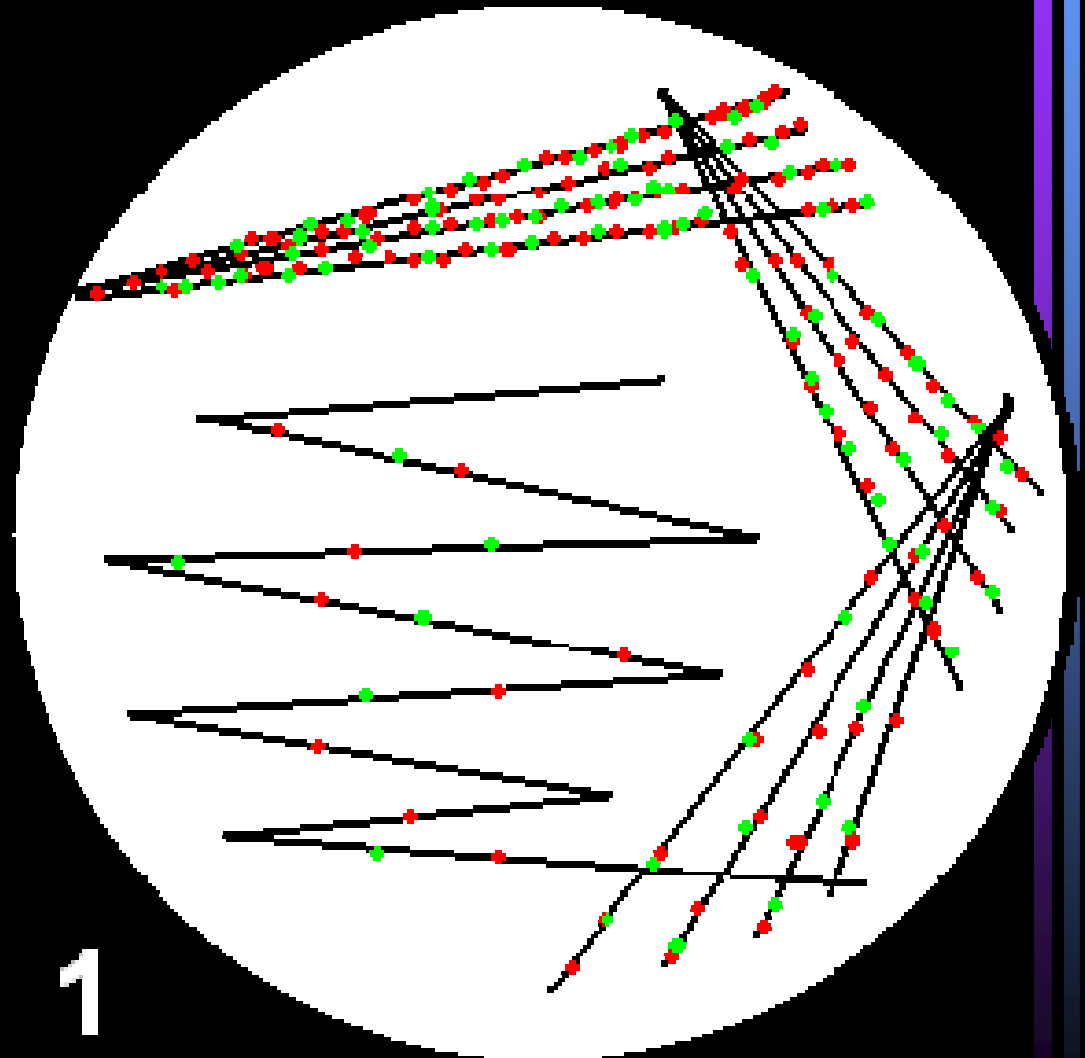
Už znovu nenabírejte kmen

Naočkujte třetí úsek

Vyžíhejte kličku

Už znovu nenabírejte kmen

Naočkujte „hádka“



Přeji Vám
hezký
zbytek
dne...

