

Úvod do identifikace bakterií Základní biochemické testy

Protokol by měl mít následující strukturu: stručně teorie (Úvod), Pomůcky včetně svého kmene, Použité testy – každý zvlášť s vlastním hodnocením, Vyhodnocení případné nefermentující kultury pouze úkol 1 až 3, Vyhodnocení fermentující kultury úkol 1-3 a dále v obou případech Enterotest, oxidázový a ONPG test (fermentující kmen společný od úlohy 4), Závěr – které reakce byly sporné, co jste měli za druh, identifikační skóre, zmínka o programu TNW...

Identifikace neznámých vzorků bakterií spočívá krok za krokem v hodnocení:

- jejich **morfologie (buněk a kolonií)**
(morfologie buněk – buňky a tím i jejich tvar zviditelníme barvením diagnostickým či negativním obarvením pozadí buněk; morfologie kolonií – jejich okraje, barva, profil..)
- **Gramovo barvení** – morfologie buňky + charakter shluků buněk
- **KOH test** – k rychlému odlišení G+ a G- bakterií, neboť G- bakterie tvoří viskózní suspenzi
- **fyziologických a biochemických vlastností (kultivační testy)**
skupina **biochemických testů** v podobě zkumavkových i v podobě standardizovaných komerčních identifikačních systémů, schopnost růstu při různých teplotách – větš. 22, 25, 30, 37, 44 °C; vztah ke kyslíku, tolerance k NaCl, citlivost na ATB, využívání zdrojů uhlíku, redukce nitrátů, tvorba indolu, charakter a schopnost aerobního, anaerobně respiračního a fermentativního růstu na urč. mediích včetně selektivních př:
OF test (oxidace-fermentace) – odečet po 24 h, 48 a 72 h
TSI test
ENTEROTEST u enterobakterií
- Na základě výsledků těchto testů dále navrhujeme doplňující testy metod molekulární biologie jako např. PCR reakce, sekvenace 16S rRNA, ribotypizace, hybridizace, dále imunochemické reakce, důkaz produkce toxinu, fagotypizace...

Jedna z cílových skupin našeho cvičení:

Enterobacteriaceae je klinicky nejdůležitější početná čeleď – cca 65 druhů - **gramnegativních** tyčinek důležitá i pro ne-klinická odvětví mikrobiologie. Zahrnuje **fakultativně anaerobní druhy**, z nichž většina žije v trávicím traktu obratlovců – součást **mikroflory**. Většina je nepatogenních; některé druhy jsou však závažnými původci onemocnění. Mezi nejzávažnější patogeny způsobující celkové infekce patří *Yersinia pestis* a tzv. antropopatogenní serovary salmonel (serovary Typhi, Paratyphi A, Paratyphi B a Paratyphi C) a některé kmeny *E. coli*. Závažné jsou ale i obligátní patogeny působící zpravidla „jen“ střevní infekce. I u nich je však riziko sepse, hlavně u oslabených osob. Protože enterobakterie žijící ve střevě se výkaly dostávají do vnějšího prostředí, jejich přítomnost (například ve vodě) ukazuje na **fekální znečištění**. Nejdůležitější rody čeledi se rozlišují podle kvasné zkoušky, redukce nitrátů, tvorby sulfanu, hydrolýzy močoviny, KCN-testu, glycerolového testu, tvorby indolu, ztekucování želatiny, testu na pohyblivost. Diagnostické půdy speciálně pro enterobakterie zahrnují například **Endův a MacKonkey agar**, **Desoxycholát-citrátový agar**, **Salmonella-Shigella agar** nebo **agar s briliantovou zelení**, **Simmons-citrát agar**.



Pokud již víme, že pracujeme s G- buňkou (KOH test, Gram), v rámci této velké skupiny bakterií můžeme dělit dále bakterie na fermentující (fakultativně anaerobní metabolismus, např. enterobakterie) a bakterie s výhodnějším respiračním metabolismem (př. aerobní vibria, aeromonády). Takové testy pro vzájemné odlišení enterobakterií od Vibrií, aeromonád spočívají v jednoduchých reakcích: test oxidázový, katalázový, fermentační...

Enterobakterie jsou gramnegativní tyčinky, 1-6 μm dlouhé a 0,3-1 μm široké, tvoří spory; pohyblivé druhy mají peritrichální bičíky

- Enterobakterie jsou nenáročné chemoautotrofní bakterie, mezofilní – rostou v rozmezí 18 - 40°C, optimum je 37°C
- Po provedení oxidázového testu jsou enterobakterie oxidáza negativní (s výjimkou rodu Plesiomonas, který k nim byl nedávno přiřazen), tvoří katalázu (kataláza pozitivní) a vždy štěpí glukózu za tvorby plynu, dále redukuje nitráty (při fakultativní anaerobióze jsou totiž nitráty akceptorem elektronů)
- V rutinní identifikaci: ENTEROtest 16 – destičky s jamkami biochemických testů, do kterých se očkuje 0,1 ml husté bakteriální suspenze a po kultivaci se metabolity stanovují pomocí indikátorů. Obsahuje testy na využití cukrů, cukerných alkoholů, aminokyselin; dále na produkci některých látek (sulfan, indol), testy na aktivitu enzymů: ureáza, lipáza, ONPG – betagalaktosidáza (štěpící laktózu), Voges-Proskauer test...
- *Vibria* a aeromonády také štěpí glukózu, ale jsou vždy oxidáza pozitivní – glukózu tedy nefermentují, jsou nefermentující
- Další skupiny gramnegativních nefermentujících bakterií (mohou to být tyčinky, ale i kokotýčinky či koky) nikdy neštěpí glukózu. Oxidázu mohou mít pozitivní i negativní

Kromě klasických zkumavkových testů (jeden test = jedna zkumavka) se používají **destičkové mikrotesty**, které šetří materiál, energii a čas. Jsou jednoduché; v jedné soupravě je 10-20 testů. K hodnocení se používají diagnostické tabulky. Testy mají dostatečně dlouhou skladovací dobu. Nejrozšířenější jsou soupravy pro identifikaci gramnegativních fermentujících tyček - zástupců čeledi *Enterobacteriaceae* - ENTEROtest a ENTERO Rapid, další dodávané soupravy jsou: ANAEROtest pro identifikaci anaerobů, STAPHYtest pro stafylokoky a mikrokoky, STREPTOtest pro rozlišení streptokoků a enterokoků, NEFERMtest pro identifikaci gramnegativních nefermentujících tyček.

Příklad identifikace neznámého vzorku:

- 1) KOH test – zjistíme G+ a G-
- 2) Kultivace 24h na MPA a krevním agaru, 24h, vzhled kolonií příp. různé teploty kultivace
- 3) Gramovo barvení, mikroskopie
- 4) U G+ buněk – hodnotíme v preparátu
tyčky – po barvení spor – sporulující (dle vzhledu určíme rod *Bacillus*), nesporulující (*Lactobacillus*)
koky – dle morfologie shluků, hrozníčků (*Staphylococcus*) dvojic, čtveřic (*Micrococcus*), balíčků = sarcin (*Sporosarcina*), řetízků – streptokoky. Dále katalázový test – kápnutí peroxidu na agar – bublinky u kataláza pozitivních (*Staphylococcus*)
- 5) U G- buněk hodnotíme rovněž tyčky a koky (G- koky méně časté, větš. patogeny)
OF test viz níže úkol 3.

Ve cvičení tedy budeme sledovat růst vzorků v těchto kombinacích testů, některé budou pouze demonstrační, budeme z nich odečítat pouze výsledky:

- KOH test – určíme G- a G+ bakterie
- Provedeme test na katalázu
- U **gramnegativních** (po KOH testu) dále budeme dělit pomocí testů na **fermentující a nefermentující glukózu** (OF test a TSI test)
- Fermentující kmeny naočkujeme na ENTEROtest
- Provedeme papírkový oxidázový test a u nefermentujících orientačně zařadíme
- Provedeme papírkový ONPG test

Pomůcky:

- Sterilní destilovaná voda
- Fyziologický roztok
- Očkovací kličky
- Podložní sklička
- Automatické pipety a špičky
- Mikrotest – ENTEROtest – na enterobakterie
- Oxidázové a ONPG papírky
- Peroxid vodíku 3%
- KOH 3%
- Bakteriální kmen číslo: (ne)fermentující kultura - dopsat

Hodnocení:

Získané údaje jsou zpracovávány podle klíčů a tabulek, často za pomoci počítače. Protože identifikace je značně náročná, podaří se jen málo typických vzorků zařadit až do druhu přímo v provozních laboratořích. Protože se vyskytují mutanty a jejich procento stoupá v souvislosti se vzrůstajícím znečištěním životního prostředí, přechází se od identifikačních klíčů, které uváděly pouze pozitivní či negativní reakce, k tabulkám, v nichž je uvedeno procento kmenů daného druhu, u nichž je test pozitivní, eventuelně zda výsledek kolísá i u buněk určitého kmene.

1. KOH test

Postup a hodnocení:

- kapka 3% KOH na skličku slouží po rozmíchání kličkou s kulturou buněk k odlišení G+ a G- bakterií, neboť G- bakterie tvoří (po poškození stěny a vylití obsahu buňky) viskózní suspenzi táhnoucí se za kličkou. Nelze použít u bakterií tvořících sliz.

2. Katalázový test

Některé bakterie jsou schopny redukovat kyslík na peroxid vodíku. Ten je pro buňky toxický. Obranný mechanismus snižující toto poškození spočívá v rozkladu peroxidu vodíku na vodu a kyslík je katalyzován enzymem **katalázou**. Přítomnost katalasy je možné testovat jednoduchým **katalázovým testem**.

Postup a hodnocení:

- spočívá v přidání peroxidu vodíku k bakteriální kultuře přímo na mediu nebo na skličku, na kterém je rozetřená kultura. Pozitivní test se projeví uvolňováním bublinek kyslíku.

3. OF test: test na oxidaci (aerobní metabol.)/fermentaci (anaerobní met.)

= detekce respiračních enzymů, přítomnosti oxidázy

- používá se medium s glukózou a acidobazickým indikátorem bromthioloovou modří, která je následně ve vzniklém kyselém prostředí **žlutá**, v zásaditém **modrá** alkalizací a při neutrální reakci **zelená**

Postup:

- k OF testu se využijí dvě zkumavky s vysokou vrstvou polotuhého media
- Inokulum čisté kultury se očkuje vpichem
- první se kultivuje aerobně bez parafínu (oxidace), druhá anaerobně s parafínem (fermentace)
- odečet po 24h
- **Pozitivní reakce: žlutá**
- Možno odečíst i pohyb buněk – pohyblivé druhy tvoří „oblak“ kolem vpichu
- Následné určení fermentujících bakterií!! – po KOH testu již víme, že pracujeme s G-buňkami, po OF testu vidíme, že **GLUKÓZU FERMENTUJÍCÍ DRUHY** mají **v obou zkumavkách pozitivní výsledek (žluté zbarvení je tedy i ve zkumavce s parafínem = anaerobní utilizace = fermentace glukózy) = enterobakterie**
- **GLUKÓZU NEFERMENTUJÍCÍ** – ve zkumavce s parafínem **negativní výsledek (zelené, modré)**

Hodnocení:

OF test – **pozitivní oxidace i fermentace** (obě zkumavky žluté) = fakultativní anaerob, bude tedy zřejmě fermentující a součást střevní mikroflory, vzorek podrobíme ENTEROtestu

- **pozitivní pouze oxidace, fermentace negativní** (modrá) – jedná se o aerobní druh, nefermentující, tedy zřejmě *Aeromonas*, *Vibrio*, *Pseudomonas* – hodnotíme i pohyb, nepohyblivý *Acinetobacter*
- **oxidace i fermentace negativní**, oba testy negativní = nefermentující aerobní; pokud je zároveň oxidáza pozitivní, jedná se zřejmě o *Alcaligenes faecalis*, který štěpí močovinu. Oxidáza negativní je např. *Agrobacterium tumefaciens* – pohyblivé ureáza negativní buňky

Glukosa vstupuje do buňky a je dále katabolizována. Některé mikroorganismy katabolizují glukosu **oxidativně** za tvorby oxidu uhličitého a vody. Většina však katabolizuje glukosu **fermentativně** (zkvašováním) bez použití kyslíku (a to i v přítomnosti kyslíku). Mikroorganismy jsou schopny kromě glukosy fermentovat další monosacharidy (fruktosu), disacharidy (např. sacharosu, laktosu, maltosu) či polysacharidy (celulosu). Koncovými produkty fermentace jsou malé organické molekuly, obvykle organické kyseliny (např. kyselina mléčná). Některé mikroorganismy vytvářejí při fermentaci **plyny (vodík, oxid uhličitý)**. Tvorba kyseliny a plynu se testuje pomocí **fermentační zkumavky**.

Pro zkvašování cukrů platí následující pravidla: pokud kultura nekvasí glukosu, nekvasí ani jiný cukr. Kultura fermentující glukosu fermentuje i fruktosu a manosu. Fermentuje-li laktosu, nefermentuje maltosu a naopak.

Během metabolických procesů v buňce jsou uvolňovány elektrony, které jsou přijímány dalšími sloučeninami – **akceptory elektronů**. Přijetím elektronu jsou sloučeniny redukovány. Při fermentativním metabolismu působí jako akceptory elektronů organické sloučeniny, při oxidativním metabolismu (respiraci) jsou to anorganické sloučeniny. Při **aerobní respiraci** je koncovým akceptorem elektronů kyslík. Při **anaerobní respiraci** slouží jako akceptory elektronů anorganické sloučeniny. Během anaerobní respirace některé bakterie redukují dusičnany na dusitany, některé dále redukují dusitany na oxid dusný a dusík.

4. TSI test (triple-sugar iron): test na utilizaci laktózy, glukózy, sacharózy, produkci H₂S pomocí indikátoru železa podle Hajny

- acidobazický indikátor je bromkrezolová červeň
- indikátor produkce H₂S je železo

Postup:

- medium ve zkumavce je očkováno vpichem a vzápětí hádkem po šikmém agaru v jediné zkumavce
- sledujeme zabarvení po kultivaci 24-48h/37°C

Hodnocení:

Sledujeme štěpení glukózy nebo laktózy

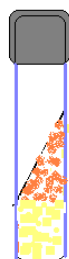
- **pozitivní** **utilizace cukrů: žlutá barva a to: GLUKÓZA sledována dole ve sloupci LAKTÓZA v šikmé horní části agaru**

Fermentace laktózy i sacharózy – celé medium žluté (*E. coli!*)

- sledujeme i produkci sirovodíku – reaguje s železem a medium **při pozitivní reakci zčerná**
Některé bakterie uvolňují **sirovodík** z aminokyselin obsahujících síru (cystin, cystein, methionin). Některé enterobakterie tvoří sirovodík redukcí kyslíkatých siřných sloučenin (např. thiosíranu). Produkce sirovodíku je detekována pomocí síranu železnatého (vytváří se černý, nerozpustný sulfid železnatý).
- při produkci plynu kvašením dole ve zkumavce **vznikají bubliny**



V celé části agaru sledujeme fermentaci laktózy, nebo sacharózy nebo obou = celé medium žluté



V této části agaru sledujeme fermentaci glukózy, ne sacharózy a laktózy

5. Enterotest 16 - pro další identifikaci fermentujících (s pozitivním testem fermentace a tedy negativním oxidázovým testem) z čeledi *Enterobacteriaceae* izolovaných např. na Endově agaru

- jedná se o komerční systém jamkových testů
- 16 testů ve 2 řádcích
- 17tý test zkumavkový na beta-galaktosidázu (odštěpí se paranitrofenol, zežloutnutí)
- potvrzení čeledi se provádí testem na fermentaci glukózy, pro odlišení od čeledi *Vibrionaceae* se provádí oxidázový test (vibria či aeromonády jej mají pozitivní)
- testy v jamkách: (popis některých viz. Další biochemické testy níže): produkce sirovodíku (H₂S), dekarboxylace lysinu (LYS), produkce indolu (IND), dekarboxylace ornithinu (ORN), rozklad močoviny (URE), deaminace fenylalaninu (PHE), hydrolýza eskulinu (ESC), utilizace citrátu (SCI), utilizace malonátu (MAL), produkce kyseliny z inositolu (INO), adonitu (ADO), celobiózy (CEL), sacharózy (SUC), sorbitolu (SOR), trehalózy (TRE), mannitolu (MAN)
- Na jedné destičce je možno zpracovávat 6 kmenů.

Postup:

- Z 24hodinové kultury se odpíchnutím z nárustu připraví suspenze buněk ve fyziologickém roztoku – 3 ml, se zákalem o hodnotě 1 podle stupnice MacFarlanda

- Destičku orientujeme na výšku a odřízneme krycí folii, sejmeme ji a označíme destičku čísly kmenů
- Pipetujeme 100 µl důkladně protřepané suspenze do každé jamky
- Některé testy probíhají v anaerobních podmínkách – příslušné jamky se tedy zakápnou (prvních 5) dvěma kapkami sterilního parafinového oleje (testy pro sirovodík (H), lysin (G), indol (F), ornitin (E), ureáza (D))
- Testy se při kultivaci uloží do sáčku aby nevysychaly
- Kultivace při 37°C/18-24h spolu se zkumavkou s beta-galaktózidázovým testem ONPG

Hodnocení:

- Zakapeme jamky: F (činidlo pro indol), a 12 (činidlo pro fenylalanin).
 - Odečteme všechny reakce ENTEROtestu, fenylalanin do 3 minut, protože po této době pozitivní reakce mizí. Orientujeme se podle interpretační tabulky přiložené k soupravě (eventuelně podle Barevné srovnávací stupnice).
- (Jako kontrola kvality použitých chemikálií a kontrola interpretace barevných reakcí se používají tzv.kontrolní kmeny bakterií, které dávají standardní výsledky. Tyto kontrolní kmeny dodává CCM v lyofilizovaném stavu nebo na želatinových discích.

Nejčastější příčiny neúspěšné identifikace:

- kontaminace
- jiná hustota nebo objem suspenze
- kápnutí inokula do sousední řady nebo činidla do jiného sloupce
- jedná se o druh nebo atypický kmen, jehož údaje nejsou uvedeny v tabulce.

6. papírkový ONPG test

Důkaz produkce β -galaktózidázy – štěpí laktózu

K provedení testu je používán bezbarvý o-nitrofenyl- β -D-galaktopyranozid, který je v pozitivním případě (kmen má enzymy schopné štěpit laktózu) hydrolyzován na žlutý ortho-nitrofenol.

Postup a hodnocení:

Do fyziologického roztoku s bakteriální kulturou sterilně vložíme testovací proužek na ONPG test a po 24h kultivaci při 37°C vyhodnotíme případné zežloutnutí

7. papírkový oxidázový test – u všech nefermentujících

Identifikuje organismy, které vytvářejí enzym cytochrom *c* oxidasu (poslední enzym dýchacího řetězce) účastníci se přenosu elektronů v elektronovém transportním řetězci aerobních bakterií na kyslík (oxidace cytochromu *c* kyslíkem, kyslík je redukován). Oxidasové činidlo obsahuje chromogenní oxidačně-redukční činidlo, které oxidací mění barvu (tmavě červenofialové).

Test se používá k diferenciaci druhů rodu *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*.

+ : *Pseudomonas aeruginosa*, *Ps. putida*, *Ps. Fluorescens* atd.

- : *E.coli*, *Agrobacterium* spp. atd.

Postup:

- Na papírky kličkou nanášíme 24 hodinovou kulturu nebo je zatlačíme do kultury nebo je ponoříme do (po ENTEROtestu) zbylého fyziologického roztoku s kulturou
- Médium, z něhož kulturu odebíráme, nesmí obsahovat glukózu nebo nitráty.

Hodnocení:

Reakce **pozitivní:** do 30s intenzivně modrá

opožděně pozitivní: do 2 min intenzivně modrá
negativní beze změny nebo reakce po 2 min

Závěr:

Výsledky zapište do protokolu.

V protokolu budou uvedeny výsledky identifikace a její zhodnocení (kmen typický - netypický - které reakce, výborně odlišen - neodlišen...) programem TNW – T-index a % identifikace..

Další biochemické testy nebo princip testů z ENTEROTESTU 16:

8. Důkaz zkvašování zdroje uhlíku

Při utilizaci sacharidů vznikají kyseliny, CO₂ a vodík

Postup:

- Do peptonové vody s indikátorem (bromthymolová modř) se přidá 1% zdroj uhlíku
- Medium se rozplní do zkumavek s plynovkami
- Po sterilizaci a vychlazení se očkují bakterie
- Kultivace při 37°C a výsledek se hodnotí po 5-7 dnech

Hodnocení:

Pozitivní reakce: žlutá a tvorba plynu

Negativní reakce: beze změny

9. Proteolytická aktivita – ztekucování (hydrolýza želatiny)

Po vpichu do masopeptonové želatiny se sleduje produkce proteáz a peptidáz zkapalněním substrátu.

Postup:

- Bakterii naočkujeme svislým vpichem do želatinového media (vpich končíme 0,5 mm od dna zkumavky)
- Inkubujeme 3-5 dnů při 20°C
- Před odečtem vkládáme zkumavky asi na 30min do lednice

Hodnocení:

Pozitivní reakce: želatina je zkapalněna – uvedeme tvar zkapalnění (miskovité, vakovité, vodorovné, úplné)

10. Tvorba indolu

Indol vzniká při metabolické činnosti některých bakterií dekarboxylací peptidů. K jeho detekci se používá p-dimethylaminobenzaldehyd, s nímž dává indol červené zbarvení.

Postup:

- do media s tryptofanem se naočkuje mikroorganismus
- kultivuje se 24h/37°C
- po kultivaci se přidá 0,1ml reagens, opatrně promíchá a po 10ti minutách se odečítá reakce

pozitivní reakce: zčervenání reagens ve vrstvě nad mediem

negativní reakce: nenastane barevná reakce

11. Důkaz produkce ureázy

Ureáza je enzym rozkládající močovinu za vzniku amoniaku a CO₂. Reakce je detekována změnou barvy indikátoru. Reakci je možno provádět jako mikrotest bez sterilizace média.

Médium: Fosfátový ústoj (0,1mol/l, pH=6,0).....100ml

Močovina.....2,0g

Fenolová červen (0,2% vodný roztok).....2,0ml

Postup:

- Médium pipetujeme po 0,3 ml do zkumavek
- očkujeme jej masivně kličkou 18-24 hodin staré kultury.
- Inkubujeme 2 hodiny při 37°C.

Hodnocení:

Hodnocení se provádí po 1, 2 a 6ti hodinách kultivace; maximálně však po 24h

Hodnotíme změnu barvy média:

Pozitivní reakce: červenofialová

negativní beze změny (žlutá až oranžová)

+ : *Proteus vulgaris*, *Morganella morganii*, *Agrobacterium* spp.

- : *E.coli*, *Alcaligenes faecalis*

12. Voges-Proskauerův test (produkce acetoinu) a MR test

VP test: Některé bakterie tvoří při odbourávání glukózy z pyruvátu acetoin.

V alkalickém aerobním prostředí se acetoin oxiduje na diacetylmetylkarbinol vstupující do reakce se složkami peptonu a vzniká červenohnědé zbarvení média s fluorescencí.

MR test: v glukózovém mediu vytváří *E. coli* kyseliny, které lze prokázat v testu s methylenovou červení. Slouží pro průkaz kys. octové a jantarové.

Postup:

- zkumavky s pepton-glukózovým médiem se naočkují testovanou kulturou a inkubují se 48-72h při 37°C.
- poté se provede test na acetoin: k 5 ml narostlé kultury se přidá 5 ml 10% KOH a pozoruje se zbarvení média
- Tvorba kyselin: k narostlé kultuře se přidá 5 kapek roztoku methylčerveně

Hodnocení:

VP test – pozitivní reakce je po pěti minutách po přidání reagens červenohnědá

MRtest – pozitivní reakce je červené zbarvení média

13. Hydrolýza eskulinu

Test sleduje štěpení eskulinu na eskuletin a glukózu. Hydrolýza se projeví hnědým až černým zbarvením média v důsledku reakce eskuletinu s ionty železa.

14. Důkaz využívání citrátů - Simmons citrátový test

Sledujeme využívání citrátu jako jediného zdroje uhlíku. Pozitivní reakce se projeví změnou zeleného zbarvení na modré (indikátor bromtymolová modř).

15. Vznik kyseliny z manitolu, adonitu, celobiózy, rhamnózy, sacharózy, sorbitolu, trehalózy, dulcitolu

Sledujeme rozklad cukrů za tvorby kyselin, pozitivní reakce se projeví žlutým zbarvením acidobazického indikátoru (bromtymolová modř).

Výsledky identifikace některých rodů										
	Glu	Lac	H ₂ S	indol	želatina	Ure	MR	VP	mnt	O/F
<i>E. coli</i>	+	+	-	+	-	-	+	-	+	
<i>Proteus vulgaris</i>	d	-	d	d	d	d	+	d	-	
<i>Salmonella typhimurium</i>	+	d	+	-	d	-	+	-	+	

Zdroje:

195.113.158.234/forum/data/materialy/