

## Všeobecná mikrobiológia

### Praktické cvičenie 7 : KULTIVÁCIA BAKTÉRIÍ

#### **Kultivácia**

Väčšina baktérií (aj huby, prípadne aj niektoré prvoky) je schopných rozmnožovať sa aj mimo živých orgánov na umelých médiách, čo sa využíva pri ich kultivácii v laboratórnych podmienkach. Túto vlastnosť nemajú vírusy, ktoré sú obligátnymi intracelulárnymi parazitmi a niektoré intracelulárne baktérie napr. chlamýdie (vzhľadom na neexistenciu nástrojov energetického metabolizmu).

#### **Statická kultivácia**

Najčastejšie používaná kultivácia v mikrobiologickej diagnostickej praxi je statická kultivácia. Pri tejto kultivácii sa baktérie rozmnožujú v určitom ohraničenom objeme kultivačnej pôdy s presne definovaným zložením. Faktory obmedzujúce rast sú vyčerpanie živín a nahromadenie produktov metabolizmu. Rastová krivka baktérií je obrazom siedmich rastových fáz.

##### 1/ Pokojová – lag fáza

– inokulum je prenesené do nového prostredia. Baktérie sa prispôsobujú, adaptujú novým podmienkam – fáza prispôsobenia alebo adaptácie. V tejto fáze je možný pokles množstva žijúcich baktérií.

##### 2/ Fáza zrýchleného rastu

– prežívajúce a prispôsobené baktérie sa začínajú deliť a intenzita metabolizmu je vysoká.

##### 3/ Exponenciálna fáza – log fáza

– delenie bakteriálnych buniek je intenzívne a ich počet narastá geometrickým radom. – rýchlosť delenia buniek sa spomaľuje, narastá počet odumierajúcich buniek. V prostredí nastáva postupné vyčerpanie živín a hromadenie metabolitov látkovej výmeny. Produkty látkovej výmeny sú často toxické povahy. U niektorých baktérií sa na konci tejto fázy začína sporulácia.

##### 5/ Stacionárna fáza

– prostredie sa stáva nevhodným pre delenie buniek, vyrovnáva sa počet odumierajúcich a vznikajúcich buniek. Rýchlosť delenia je nulová a celkový počet buniek dosahuje maximum.

##### 6/ Fáza poklesu – fáza exponenciálneho úbytku

– bunky maximálnou rýchlosťou odumierajú. Počet mŕtvych buniek je v prevahe nad živými.

##### 7/ Konečná stacionárna fáza – autosterilizácia

– nevznikajú nové generácie buniek a existujúce bunky sa začínajú rozpúšťať vlastnými autolytickými enzýmami.

## Kultivačné pôdy

Základné pôdy: KA, Muller Hinton,

Diagnostické : Endova, DC, Hajn, manit slaný, ČA

Selktívne: Sabouraud, Campylobakterova, Gardnerella,

### *Výber vhodnej kultivačnej pôdy*

Univerzálna pôda na izoláciu a kultiváciu všetkých známych baktérií neexistuje. Kultivačné pôdy napodobňujú prirodzené prostredie baktérií, z ktorého boli izolované. Pôda musí vyhovovať nutričným požiadavkám baktérií (obohacujeme ju o potrebné živiny, rastové faktory, vitamíny, atď.). Pre medicínsky významné baktérie je potrebné vytvoriť prostredie podobné prostrediu vo vnútri organizmu (prítomnosť erytrocytov, zdroj uhlíka, fyziologickú teplotu). Najbežnejšou pôdou, ktorá vyhovuje väčšine baktérií vyvolávajúcich ochorenie človeka, je krvný agar.

### Kultivačné pôdy **podľa pôvodu**

- o Prirodzené – obsahujú zložky rastlinného a živočíšneho pôvodu (krv, mlieko, vajcia, zemiaky).
- o Syntetické – obsahujú chemicky definované zlúčeniny.
- o Polosyntetické – obsahujú chemicky definované zlúčeniny, ku ktorým sa pridávajú prírodné zložky.

### Kultivačné pôdy **podľa konzistencie:**

#### **- Tekuté pôdy:**

slúžia ako pôdy rozmnožovacie. Baktérie v živnom bujone vyrastajú vo forme blanky na povrchu pôdy (sporujúce baktérie, *Pseudomonas sp.*) – aerofilné baktérie. Formou difúzneho zákalu (enterobaktérie) - hydrofilné baktérie a formou sedimentu (streptokoky) – hydrofóbne baktérie. Povrchová blana môže byť pevná alebo drobivá, sediment vločkovitý

#### **- Polotuhé (polotekuté):**

používajú sa na dôkaz niektorých vlastností, napr. kultivačný dôkaz pohyblivosti metódou podľa Hajna, v ktorej sa baktérie môžu pohybovať a rásť na väčšej ploche alebo u pôdy Gardovej na uvoľnenie niektorých antigénov pred aglutináciou (kolónie na tejto riedkej pôde rastú na väčšej ploche, čím sa baktérie v kolónii usporiadajú v tenšej vrstve, a tak antigény nie sú prekryté telom iných baktérií).

#### **- Tuhé pôdy:**

umožňujú rast baktérií v izolovaných kolóniách. Ich základ tvorí agar – morská riasa, ktorá sa povarením rozpúšťa a pri ochladení pod 42o C tuhne. Používa sa na prípravu tuhých pôd v 2-5 % koncentrácii. Nie je zdrojom živín pre baktérie. Ako zdroj živín sa pridávajú rôzne látky, najčastejšie barania krv (krvný agar).

### Kultivačné pôdy **podľa použitia:**

#### **- Základné (univerzálne )**

Na týchto pôdach vyrastá väčšina medicínsky významných baktérií (mäso-peptónový bujón, krvný agar) a používajú sa na zachytenie väčšiny medicínsky významných baktérií z biologického materiálu.

### -Diagnostické

Obsahujú indikátor, ktorý identifikuje charakteristické metabolické alebo fyziologické vlastnosti vyšetrovaného mikroorganizmu (skvasovanie cukrov, produkcia hemolyzínov). Indikátorom je obvykle chemická látka, ktoré mení farbu pri zmene pH (podobne ako lakmus, alebo fenolftaleín). Pri metabolizme cukrov je konečným štádiom alebo medziproduktom kyseliny, ktorá zmení pH pôdy, a preto aj pH. To znamená, že ak baktéria metabolizuje substrát (sacharid) prítomný v pôde, prejaví sa to zmenou farby pôdy.

### -Selektívne

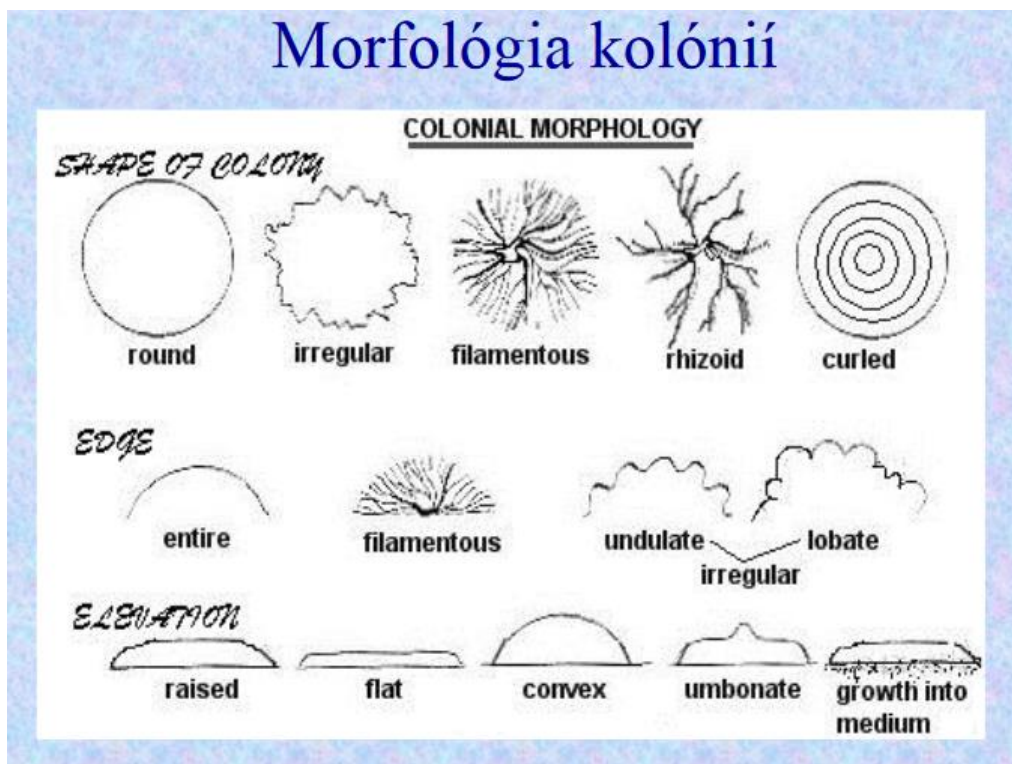
Obsahujú látky, ktoré cielene potláčajú rast určitých baktérií alebo celých skupín baktérií a hľadané diagnostikované baktérie sú rastovo zvýhodnené. Ako inhibičné faktory sa používajú napr. soli ťažkých kovov, antibiotiká, farbivá, atď.).

Medzi kultivačnými pôdami nejstávajú ostré hranice. Niektoré pôdy môžu súčasne slúžiť ako základné a pre určité mikroorganizmy sú aj pôdami diagnostickými (streptokoky a krvný agar), iné spájajú selektivitu s diagnostickými vlastnosťami (Escherichia coli a Endova pôda).

### Hodnotenie rastu baktérií na kultivačných médiách

Na vhodných tuhých kultivačných médiách baktérie rastú vo forme kolónií. Kolónia je nahromadenie baktérií jedného typu, ktoré vznikli binárnym delením každej z baktérií v tzv. kolóniu tvoriacej jednotke (CFU – colony forming unite). CFU je obvykle mikroskopický kúsok tkaniva, hlienu, biologického materiálu, ktorý sa oddelili pri rozočkovaní z biologickej vzorky prenesenej na tuhú kultivačnú pôdu.

Vyrastené kolónie môžeme posudzovať zrakom, môžeme použiť lupu, pre ich často

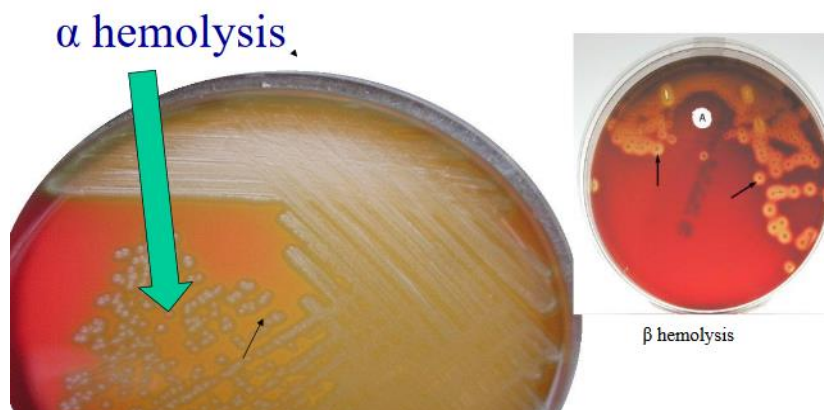


charakteristický zápach (vôňu) použijeme čuch, bakteriologickou kľučkou môžeme posúdiť ich konzistenciu. Pri ich identifikácii si musíme všímať aj nasledovné charakteristické prejavy rastu: veľkosť kolónií, tvar kolónií, okraje kolónií, povrch kolónií, farbu kolónií, vzťah vyrastených kolónií k erytrocytom v krvnom agare:

**beta hemolýzu** – úplná hemolýza, prejaví sa prejasnením krvného agaru v okolí bakteriálnej kolónie (*Streptococcus pyogenes*)

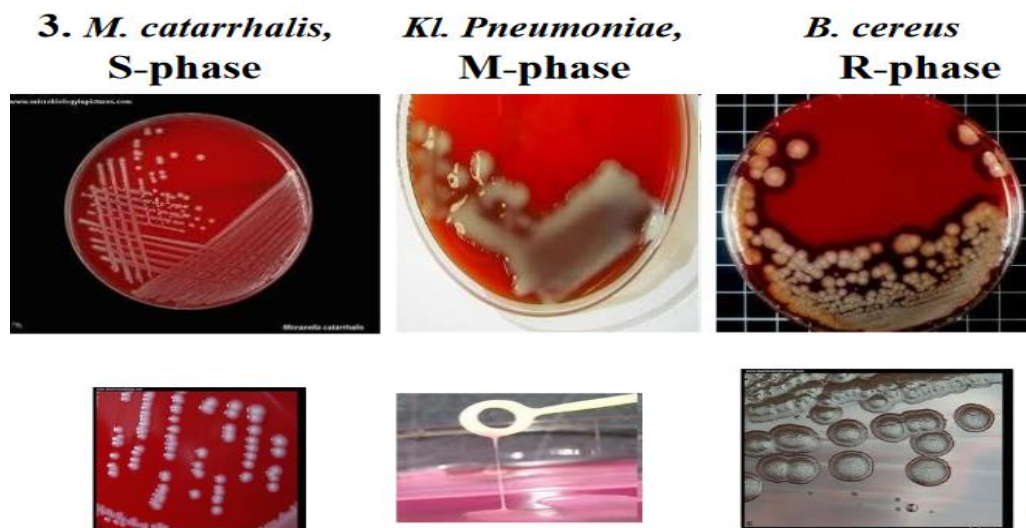
**alfa hemolýzu** – neúplná hemolýza, prejaví sa zelenkastým zafarbením krvného agaru v okolí bakteriálnej kolónie. Označuje sa aj ako viridácia ( z gr. viridis = zelený) – *Streptococcus viridans*, *Streptococcus pneumoniae*

**gama hemolýzu** – nedochádza k žiadnej zmene krvného agaru v okolí bakteriálnej kolónie – *Staphylococcus epidermidis*



Pri kultivácii rovnakého druhu baktérií môžeme posudzovať rôzne tvary kolónií – disociačné fázy.

Rozoznávame tri základné disociačné fázy:



**M fáza (mukózna – mucous):** Kolónie sú mukózne, hlienovité, pripomínajú kvapku oleja, Takto rastú opúzdrené virulentné baktérie.

**S – fáza ( hladká - smooth):** Kolónie sú hladké, ostro ohraničené od okolia. Takto rastú baktérie, ktoré nemajú púzdro a majú zachovanú virulenciu.

**R- fáza ( drsná – rough )** : Kolónie majú povrch drsný, nepravidelné okraje

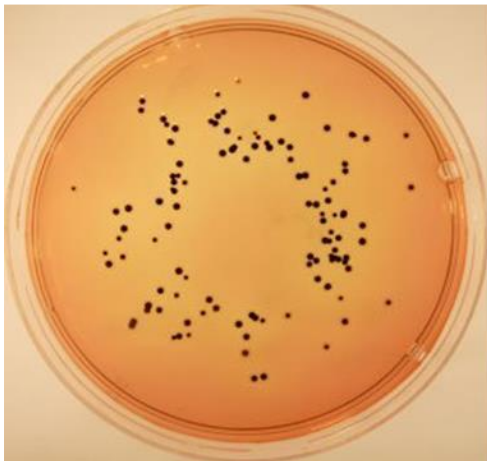
### Endova pôda

**Endova pôda** je selektívna pôda pre enterobaktérie. Selektivita agaru je vytvorená kombináciou siričitanu a bázického fuchsínu, ktoré potláčajú rast grampozitívnych mikroorganizmov.



Koliformné baktérie skvasujúce laktózu tvoria na Endovej pôde ružovo-červené až silno červené vypuklé kolónie, v niektorých prípadoch s kovovým leskom (*E. coli*). Rovnako sa sfarbuje médium okolo kolónií. Mikroorganizmy, ktoré laktózu nefermentujú sú bezfarebné, dobre pozorovateľné oproti ružovému pozadiu pôdy.

### Dezoxycholát-citrátový agar (DCA)



**Dezoxycholát-citrátový agar (DCA)** slúži na izoláciu patogénnych črevných enterobaktérií a vzájomné rozlišovanie salmonel a šigel. Selektivita je dosiahnutá pridaním dezoxycholanu sodného a citronanov, ktoré inhibujú rast grampozitívnych baktérií. Enterobaktérie sú diferencované na základe skvasovania laktózy v pôde. Tvorba kyseliny je indikovaná neutrálnou červeňou a vznikom červeno sfarbených kolónií. Niektoré kmene salmonel a proteusov (H<sub>2</sub>S pozitívne) tvoria na tejto pôde šedé až čierne stredy – pozitívna tvorba sírovodíka. Rast *E. coli* je

na tejto pôde čiastočne potlačený, ale niektoré vitálnejšie kmene môžu rásť ako sýtoružové až červené kolónie.

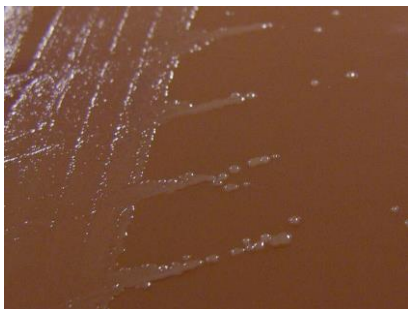
### Raussov fenomén

Pohyblivosť *P. mirabilis* je možné identifikovať aj na základe Raussovho fenoménu. Vyšetrovaný kmeň sa naočkuje do stredu platne s kultivačnou pôdou (krvný agar). Počas kultivácie dochádza k postupnému plazivému narastaniu bakteriovej populácie od stredu k okrajom petriho misky vo forme typických koncentrických kruhov. Tento jav sa označuje ako Raussov fenomén.



### Čokoládový agar

Čokoládový agar (CHOC) je kultivačné médium, ktoré sa vyrába zmiešaním horúceho (80°C) agaru s krvou. Pri tepelnej lýze sa z erytrocytov uvoľňuje množstvo rastových faktorov (NAD, hemín). CHOC sa používa najmä na kultiváciu patogénnych neissérií a hemofilov. Hemoglobín obsiahnutý v pôde je dôležitý pre rast uvedených baktérií (termostabilný faktor X). Používa sa na kultiváciu neissérií a hemofilov.



*N. gonorrhoeae* na čokoládovom agare. Drobné kolónie, pripomínajúce tvarom kvapky rosy.

## Sabouraudov agar



***Candida albicans* – kolónie na Sabouraudovom agare.**

Sabouraudov dextrózový agar je pôda na kultiváciu húb. Nízka hodnota pH (približne 5,6) vytvára priaznivé podmienky na rast húb, najmä dermatofytov a inhibuje rast kontaminujúcich baktérií v klinických vzorkách. Pridaním antimikrobiálnych látok sa zlepšuje množenie patogénnych húb zo vzoriek so silnou kontamináciou baktériami a saprofytickými hubami.