



Kultivace bakterií na pevných půdách



Prezentace pro obor:

Všeobecná sestra

Jan Smíšek © ÚLM 3. LF UK 2008

Základy kultivace



- Bakterie v mikrobiologii kultivujeme (pěstujeme) na tekutých a pevných živných půdách
 - Tekuté půdy se skládají ze směsi živin rozpuštěných ve vodě
 - Pevné půdy se skládají ze směsi živin obohacujících agarový gel

Základy kultivace



- Na tekutých půdách
 - Jedná se o jednoduchém i složitější roztoky živin a růstových faktorů
 - Používají se zejména k pomožení bakterií pro účely další diagnostiky
 - Patří mezi ně bujón (masový vývar), masopeptonová voda (pepton je směs natrávených AMK) a další...



Základy kultivace



- Na pevných půdách
 - Nejčastěji uchovávaných v Petriho miskách tvoří bakterie nakupení biomasy tzv. kolonie
 - Kolonie je pomnožená skupina bakterií pocházející často z jedné bakterie nebo pevného seskupení několika bakterií (CFU colony formy unit)
 - Taková skupina bakterií je nejen jednoho druhu, ale má i společné vlastnosti a tvoří reprezentativní vzorek populace mikroba
 - Tato čistá kultura je nezbytná pro další vyšetřování konkrétních vlastností izolovaného mikroba

Kolonie

- Ukázka kolonií
– *Micrococcus luteus*



Morfologie kolonií



- Kolonie na agaru mají často poměrně typickou morfologii v závislosti
 - na svém druhovém původu
 - složení půdy
 - a okolnostech kultivace

Hodnocení morfologie kolonií

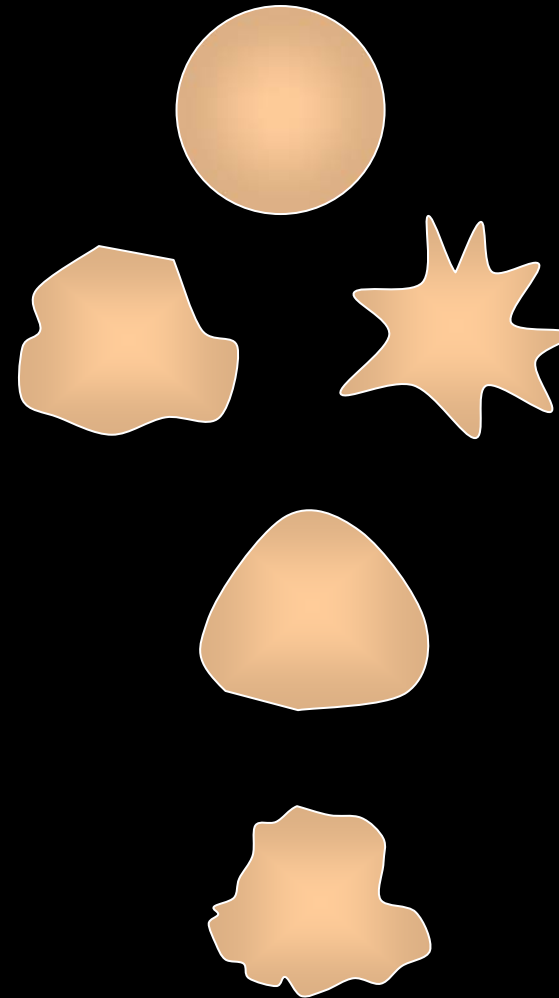


- Velikost kolonií
 - Drobné méně než 1mm
 - Malé 1mm
 - Střední 2-3 mm
 - Velké 5mm a více

Hodnocení morfologie kolonií



- Tvar kolonií
 - Okrouhlý
 - Laločnatý
 - Obláčkovitý
- Okraje kolonie
 - Rovné
 - Vroubkované
 - Vykousané

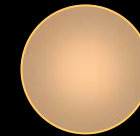


Hodnocení morfologie kolonií



- Povrch

–Hladký



–Lesklý



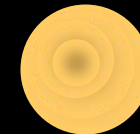
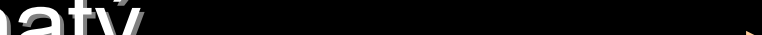
–Matný



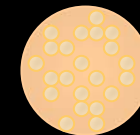
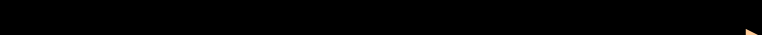
–Drsný



–Vrstevnatý



–Zrnitý



Hodnocení morfologie kolonií



- Barva kolonie
 - Šedobílá – většina bakterií



Hodnocení morfologie kolonií



- Barva kolonie

- Závisí na kultivační půdě – diagnostické půdy obsahují indikátor, který difunduje do bakterií a v závislosti na jejich pH mění svou barvu



Hodnocení morfologie kolonií



- Barva kolonie
 - Závisí na pigmentech, které některé bakterie produkují



Hodnocení morfologie kolonií



- Konzistence kolonie
 - Mazlavá – hlenovitá
 - Odpovídá tzv. M růstové fázi spojené s tvorbou pouzdra
 - Drsná (suchá)
 - Odpovídá R růstové fázi
 - Hladká
 - Odpovídá S růstové fázi (běžný růst)
 - Kolonie je vrostlá do agaru
 - Odpovídá D růstové fázi

Hodnocení morfologie kolonií



- Zápach kolonie
 - Příjemná vůně (*Pseudomonas*)
 - Fekální zápach
 - Amoniakový zápach
 - Plísňový zápach
 - Kyselý zápach
 - Indiferentní – bez vůně a zápachu...

Hodnocení morfologie kolonií



- Okolí kolonie
 - Obvykle beze změny
 - Někdy změna barvy
 - Hlavně u **diagnostických pŕd**
 - změna pH => změna barvy
 - **Krevní agar – Rozklad hemoglobinu**
 - Alfa hemolýza – viridace - tvoří se meziprodukty
 - » Zelenohnědé zbarvení
 - Beta hemolýza – úplný rozklad – projasnění pŕdy
 - Gama hemolýza – hemoglobin beze změny
 - Hemolýza patří mezi významné diagnostické znaky

Souhrn morfologie kolonií



- Morfologie kolonií je geneticky determinována
- Variace morfortypu však závisí na vnějších podmínkách, mezi něž patří zejména
 - Obsah živin v půdě
 - A hustota půdy (agaru)
- Bakterie žijící ve společenství (kolonii) jsou více rezistentní proti vnějším nepříznivým podmínkám

Podmínky kultivace



- Dostatek živin (zdroj N, C)
- Vlhkost (pro příjem živin)
- Ideální teplota pro většinu 37°C
 - může se pohybovat od velmi nízkých až po značně vysoké
- Optimální pH
 - běžné pH 7-7.2
 - (ale u laktobacilů 3 a např. u cholery 8)
- Optimální atmosféra
 - vzhledem ke vztahu ke kyslíku – aerobní, anaerobní, striktně či fakultativně...

Rozdělení půd dle účelu



- Půdy univerzální neboli základní
 - Slouží pouze k pomnožení mikrobů
- Půdy diagnostické
 - Obsahují indikátory, které obvykle mění barvu v závislosti na změně podmínek okolí (nejčastěji pH) v důsledku pochodů vyvolaných mikroby
 - Podle odlišných vlastností poté můžeme odlišovat jednotlivé mikroby

Rozdělení půd dle účelu



- Půdy selektivní
 - Potlačují růst nežádoucích mikrobů
- Půdy selektivně diagnostické
 - Sdružují v sobě vlastnosti obou předchozích skupin
- Půdy speciální
 - Slouží pro kultivaci jediného konkrétního druhu mikroba

Rozdělení půd dle složení



- **Definované syntetické půdy**
 - Přesné chemické složení jednotlivých půd
 - V budoucnu zřejmě převládnou – snaha o standardizaci kultivačních postupů – dodávají se v prášku od výrobců
- **Nedefinované polosyntetické půdy**
 - Vznikají přidáním daného množství materiálu přírodního původu – plné krve, krvinek, sérových bílkovin atd.

Agar



- Je základní nosnou strukturou většiny pevných půd)
- Skládá se ze dvou složek
 - Agarózy a Agaropektinu
- Vyrábí se z řasy Agar-Agar
 - Chaluha, která roste v Pacifiku

Agar



- Příprava:
 - Namočení, uvaření a úprava pH
 - přidávají se jednotlivé složky živné půdy
 - Ještě horká tekutá směs se nalévá na Petriho misky kde chladnutím tuhne
 - Po vychladnutí se na něj může očkovat mikrobiální preparát
 - (V současné době se už tímto způsobem agar nepřipravuje, je součástí směsi konkrétní půdy → tato směs se pouze rozvaří a vylévá na Petriho misky)

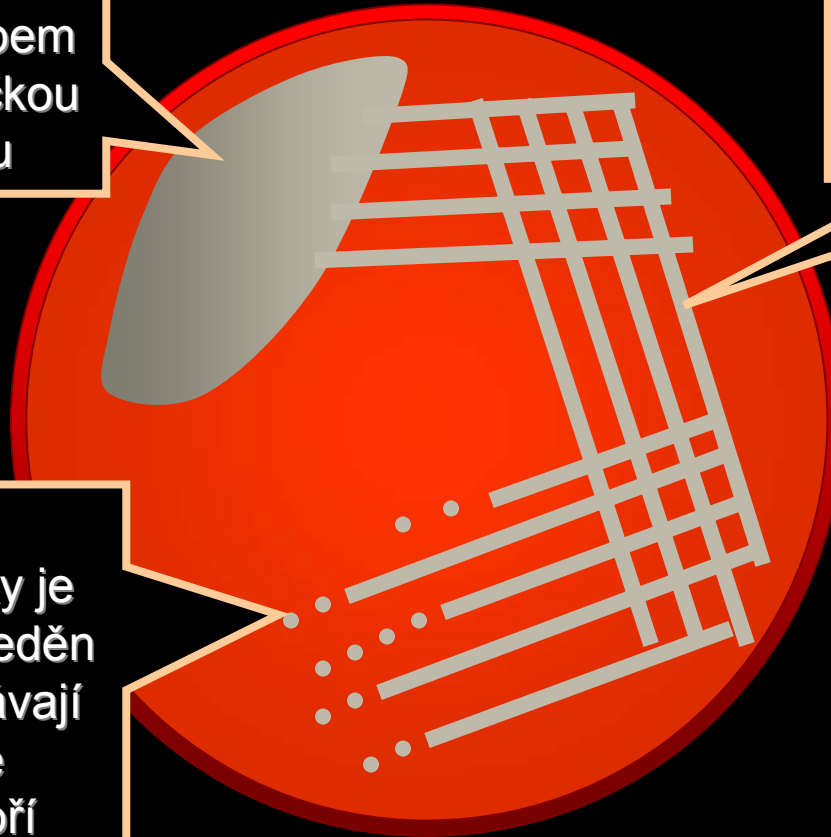
Očkování na pevné půdy



Inoculum – vytvoříme ho krouživým či rovnoběžným pohybem bakteriologickou kličkou z kapky substrátu

Průběžně sterilizovanou kličkou rozočkujeme substrát do dlouhých čar

Po několika sterilizováních kličky je substrát značně naředěn a na konci čar zůstávají pouze jednotlivé bakterie, které tvoří samostatné kolonie, které můžeme pozorovat



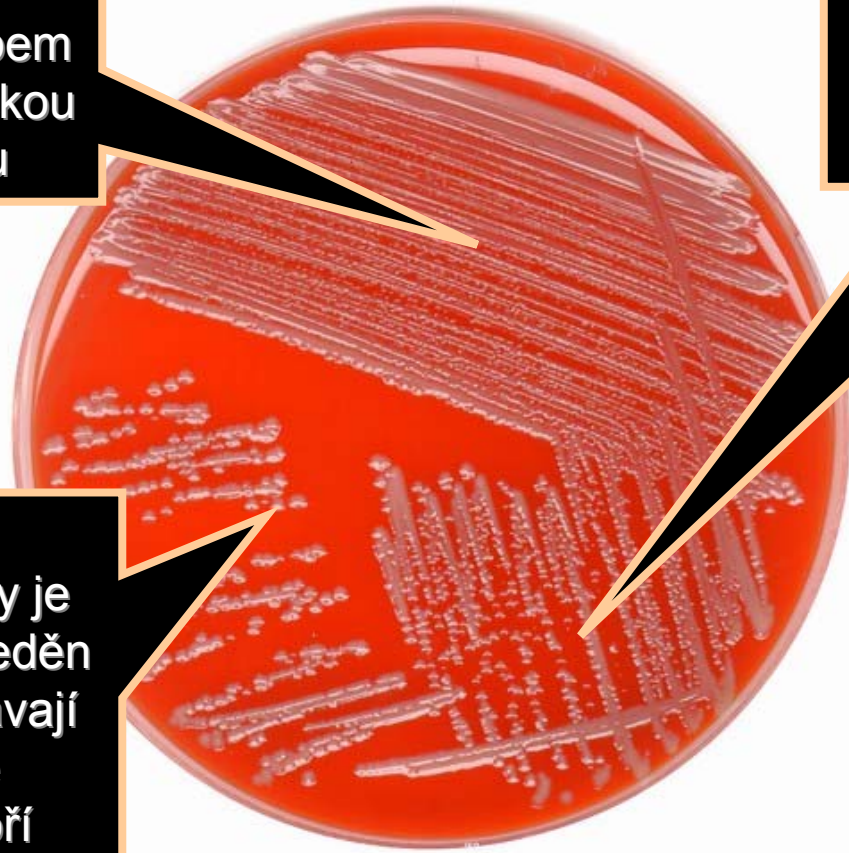
Očkování na pevné půdy



Inoculum – vytvoříme ho krouživým či rovnoběžným pohybem bakteriologickou kličkou z kapky substrátu

Průběžně sterilizovanou kličkou rozočkujeme substrát do dlouhých čar

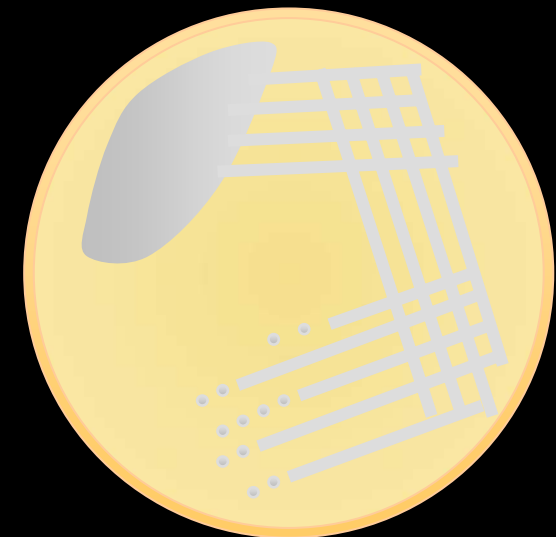
Po několika sterilizováních kličky je substrát značně naředěn a na konci čar zůstávají pouze jednotlivé bakterie, které tvoří samostatné kolonie, které můžeme pozorovat



Živný agar



- Živný (masopeptonový) agar (ŽA, MPA)
 - Základní směs – agar obohacený bujónem
 - Pěstují se na něm nenáročné bakterie
 - Obvykle se používá spíše jako základ pro přípravu složitějších půd



Živný agar



Krevní agar



- Krevní agar (KA)
 - Je nejpoužívanějším pevnou půdou
 - Vyrábí se přidáním beraních krvinek k chladnoucím agaru (56°C)
 - Slouží pro zachycení Gram + bakterií
 - Je částečně diagnostickou půdou – mohou se na něm projevit hemolytické bakterie



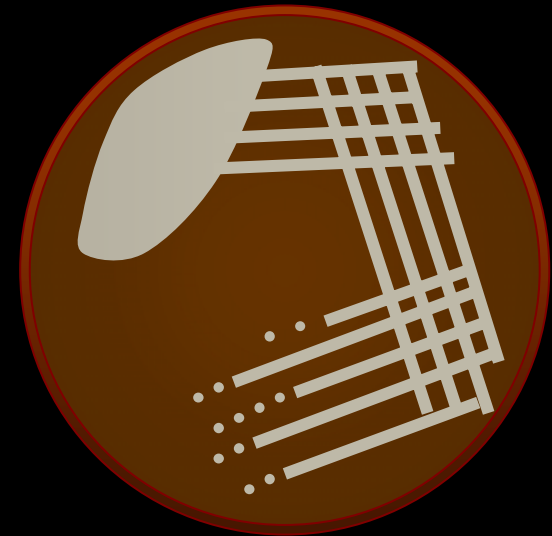
Krevní agar



Čokoládový agar



- Čokoládový agar (ČA)
 - Vyrábí se podobně jako KA přidáním beraních krvinek k agaru (ten má však vyšší teplotu 80°C) – a tak dojde k hemolýze
 - Ta způsobí čokoládové zbarvení
 - Používá se pro pěstování náročnějších bakterií
 - *Neisseria* a *Haemophilus*



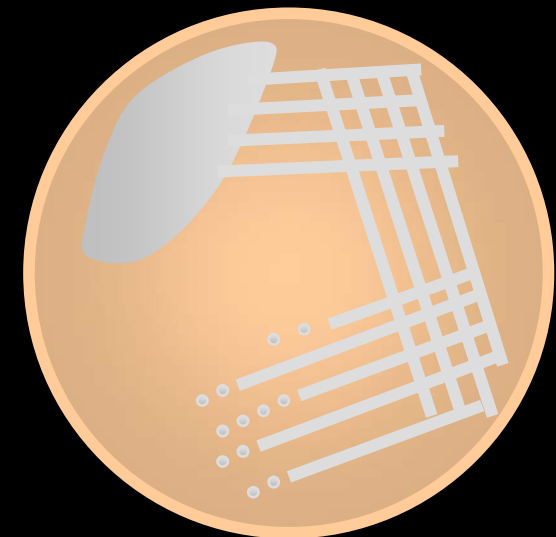
Čokoládový agar



Lewinthalův agar



- Lewinthalův agar (LA)
 - Připravuje se stejně jako ČA, ale před nalitím na Petriho misku se přefiltruje přes jemný filtr, který zachytí cytoplazmatické membrány zhemolyzovaných krvinek
 - Tím se pro bakterie přístup k živinám usnadní, což způsobí lepší růst
 - LA patří mezi nejvýživnější půdy – obsahuje NAD a hemin je vhodný pro záchyt Haemophilů



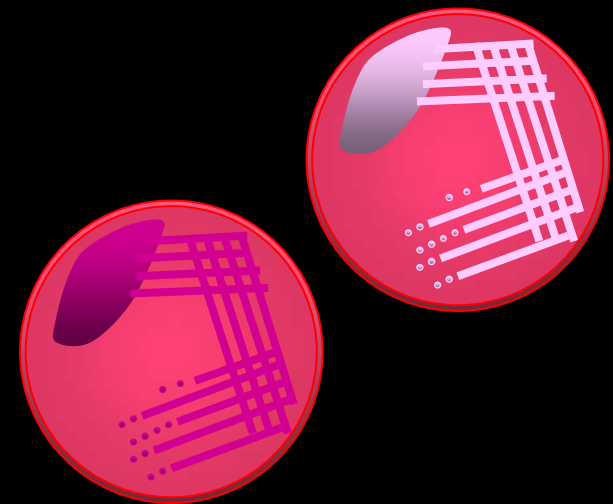
Lewinthalův agar



McConkyho agar



- McConkyho půda/agar (MCA)
 - Diagnostická půda pro enterobakterie
 - Složení: ŽA + laktóza + Na_2SO_3 + indikátor
 - Můžeme na ní rozdělit enterobakterie (*Salmonely*, *Shigely*) podle toho zda zkvašují laktózu → změna pH → změna barvy kolonie z růžové na červenou



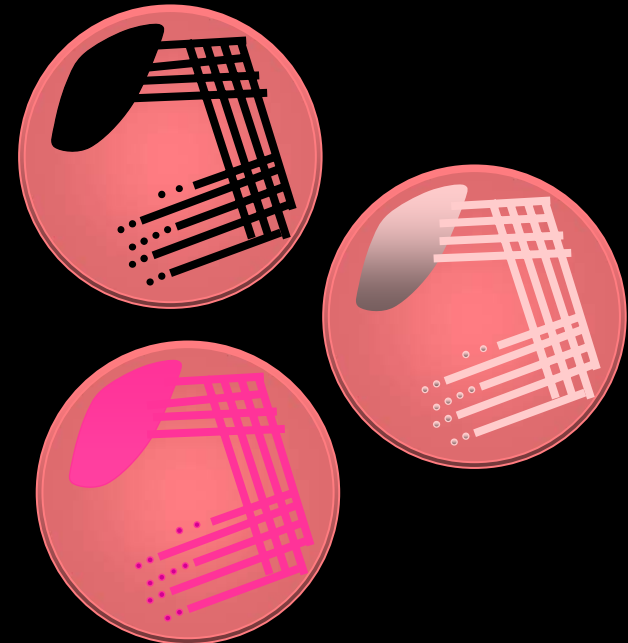
McConkyho agar



DC Agar



- Desoxycholátová půda/agar (DC)
 - Selektivně diagnostická půda, určená pro enterobakterie. Gram + bakterie zde nerostou.
 - Složení: ŽA + citrátový roztok + desoxycholát sodný + laktóza + neutrální červeň
 - Bakterie zkvašující laktózu vyrostou na DC agaru v jasně červených koloniích
 - Bakterie produkující H₂S vyrostou v černých koloniích



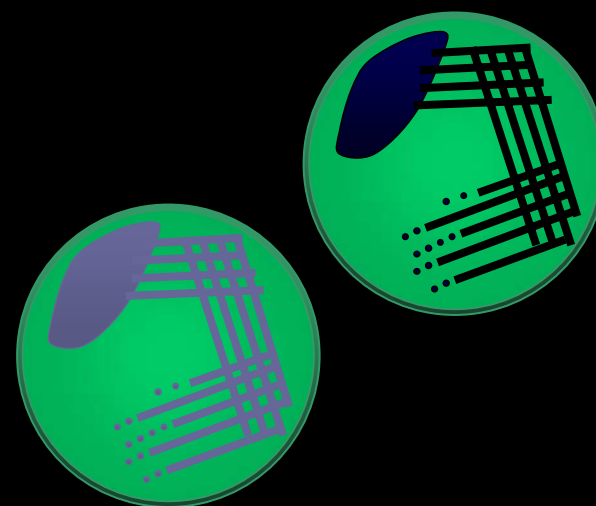
DC Agar



WB Agar



- Wilson-Blairova půda/agar (WB)
 - Selektivně diagnostická půda na které nerostou Gram + bakterie
 - Složení: ŽA + Bismut-sulfidový roztok + brilantová zeleň
 - Salmonely na této půdě vysráží Bi a rostou v černých koloniích
 - Ostatní enterobakterie vyrostou v šedomodrých koloniích
 - Gram + bakterie na této půdě nevyrostou



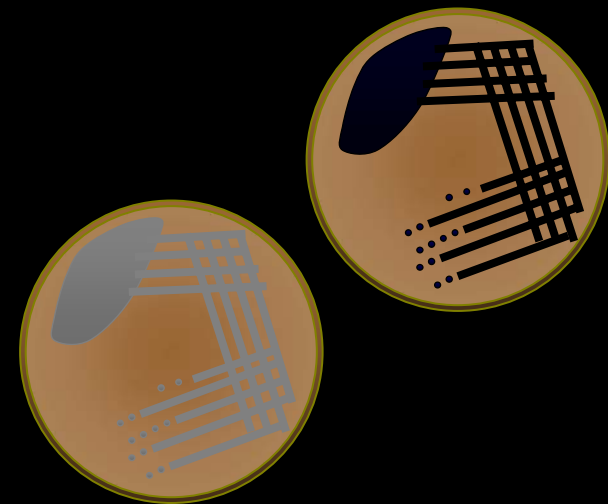
WB Agar



Claubergova půda



- Claubergova půda/agar (CA)
 - Selektivně diagnostická půda
 - Složení: ŽA + glycerinovaná krev + cystein + vodní modř + metachromová žluť + teluričitan draselný (KTe_4)
 - Slouží k záchytu *Corynebacterium diphtheriae*
Ta při růstu vyredukuje Te z KTe_4 – jasně černé zbarvení kolonií.
 - Na podobném principu funguje Tinsdalův agar



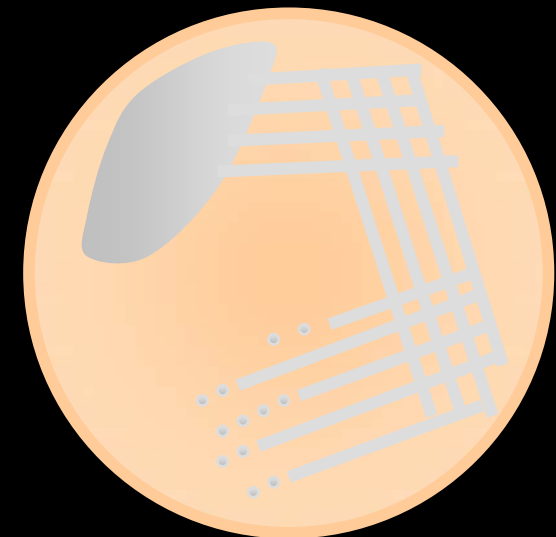
Claubergova půda



Sabouraudův agar



- Sabouraudův agar (SA)
 - Speciální půda používající se pro kvasinkové mikroorganismy.
 - Složení: ŽA + maltóza (nebo dextróza) + pepton (AMK výtažek)
 - Pěstujeme na ní Kandidy
 - Smetanově bílé kolonie
 - Jsou cítit po droždí



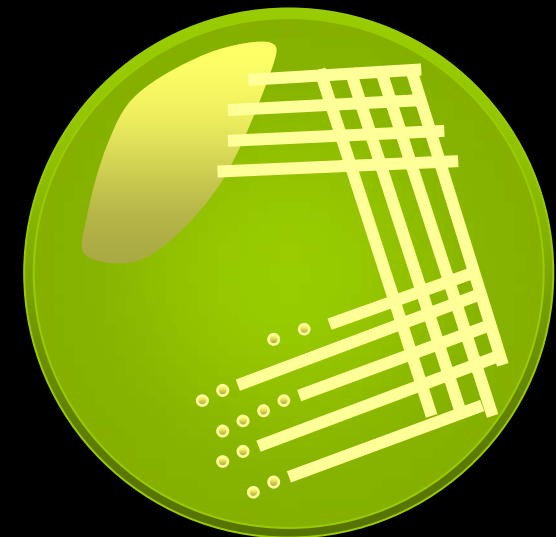
Sabouraudův agar



LJHA



- Löwenstein-Jensen-Holmova půda (LJHA)
 - Speciální půda pro pěstování Mykobakterií
 - Složení: ŽA + asparagin + glycerin + škrob + čerstvé vejce + malachitová zeleň
 - Na rozdíl od jiných půd se nalévá většinou do zkumavek, kde se nechává šikmo ztuhnout
 - *Mycobacterium tuberculosis* na této půdě roste v žlutavých koloniích



LJHA

