

## Kultivace bakterií na pevných půdách

Prezentace pro obor:  
Všeobecná sestra  
Jan Smíšek © ÚLM 3. LF UK 2008

1

## 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

2

## Základy kultivace

- Na tekutých půdách
  - Jedná se o jednoduchém i složitější roztoky živin a růstových faktorů
  - Používají se zejména k pomoci bakterií pro účely další diagnostiky
  - Patří mezi ně bujón (masový vývar), masoseptonová 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

4

## Kolonie

- Ukázka kolonií
  - *Micrococcus luteus*



5

## Morfologie kolonií

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

6

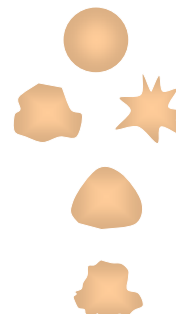
## Hodnocení morfologie kolonií

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

7

## Hodnocení morfologie kolonií

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



8

## Hodnocení morfologie kolonií

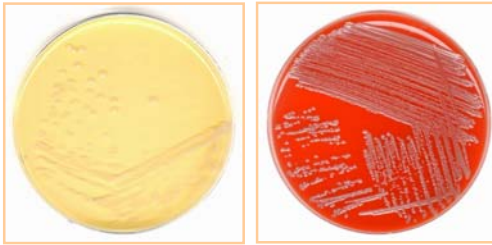
- Povrch
  - Hladký
  - Lesklý
  - Matný
  - Drsný
  - Vrstevnatý
  - Zrnitý



9

## Hodnocení morfologie kolonií

- Barva kolonie
  - Šedobílá – většina bakterií



10

## 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

13

## Hodnocení morfologie kolonií

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

14

## Hodnocení morfologie kolonií

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

15

## Souhrn morfologie kolonií

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

16

## 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...

17

## Rozdělení pūd dle účelu

- Pūd univerzální neboli základní
  - Slouží pouze k pomnožení mikrobů
- Pūd 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

18

## Rozdělení půd dle účelu

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

19

## 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.

20

## 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

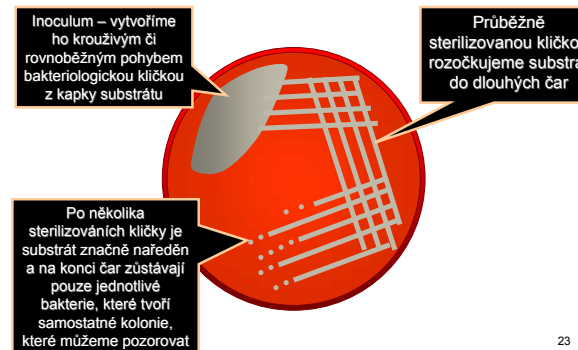
21

## 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)

22

## Očkování na pevné půdy



23

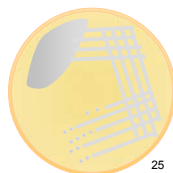
## Očkování na pevné půdy



24

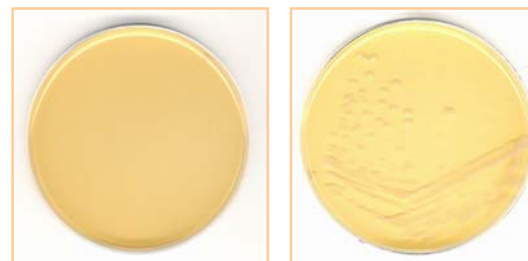
## Živný agar

- 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



25

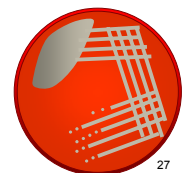
## Živný agar



26

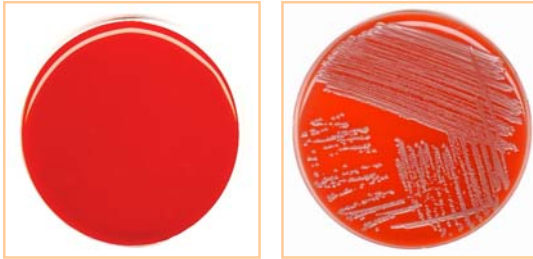
## Krevní agar

- 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



27

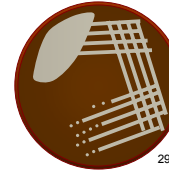
## Krevní agar



28

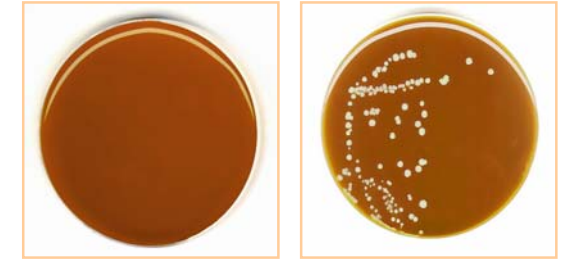
## Čokoládový agar

- 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*



29

## Čokoládový agar



30

## 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



31

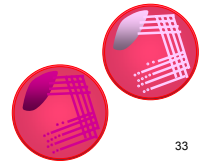
## Lewinthalův agar



32

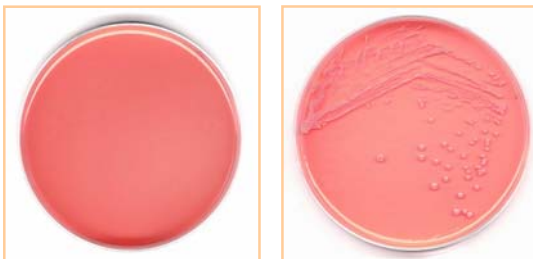
## McConkyho agar

- McConkyho půda/agar (MCA)
  - Diagnostická půda pro enterobakterie
  - Složení: ŽA + laktóza +  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  + indikátor
  - Můžeme na ní rozdělit enterobakterie (*Salmonely, Shigely*) podle toho zda zkvašují laktózu → změna pH → změna barvy kolonie z růžové na červenou



33

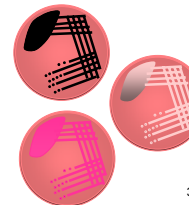
## McConkyho agar



34

## DC Agar

- Desoxycholátová půda/agar (DC)
  - Selektivně diagnostická půda, určená pro enterobakterie. Gram + bakterie zde nerostou.
  - Složení: ŽA + citrátový roztok + desoxycholát sodný + laktóza + neutrální červeně
  - Bakterie zkvašující laktózu vyrostou na DC agaru v jasně červených koloniích
  - Bakterie produkující  $\text{H}_2\text{S}$  vyrostou v černých koloniích



35

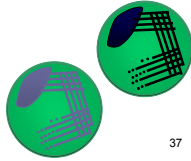
## DC Agar



36

## 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



37

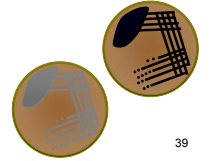
## WB Agar



38

## Claubergova půda

- Claubergova půda/agar (CA)
  - Selektivně diagnostická půda
  - Složení: ŽA + glycerinovaná krev + cystein + vodní modř + metachromová žluť + teluricitan draselný (KTe<sub>4</sub>)
  - Slouží k záchytu *Corynebacterium diphtheriae*
  - Ta při růstu vyredukuje Te z KTe<sub>4</sub> – jasně černé zbarvení kolonií.
  - Na podobném principu funguje Tinsdalův agar



39

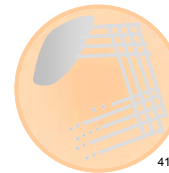
## Claubergova půda



40

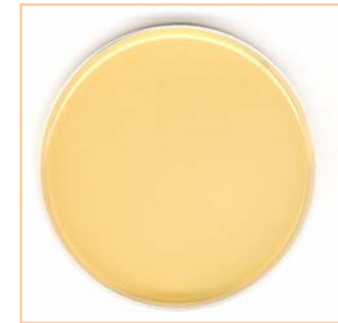
## Sabouraudův agar

- 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



41

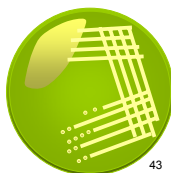
## Sabouraudův agar



42

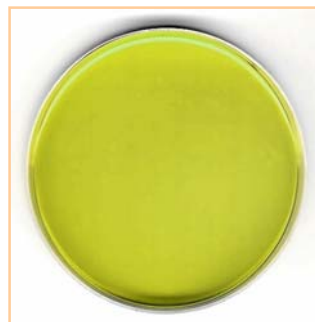
## Löwenstein-Jensen-Holmova půda

- 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



43

## Löwenstein-Jensen-Holmova půda



44