

Baktériumok biokémiai vizsgálata

Kanizsai Szilvia

Baktériumok jellemzése



Mikroszkópos morfológia



Makroszkópos morfológia



Biokémia

Biokémiai vizsgálatok

Biokémiai identifikálás => baktérium fajra jellemző
enzimek kimutatása
(bizonyos enzim megléte vagy hiánya)

Módszer => a baktériumot szubsztrát tartalmú
táptalajba oltjuk, enzim aktivitást indikátorral
mutatjuk ki

Feltétel => izolált telep

Biokémiai vizsgálatok

Szénhidrát anyagcsere

- OF-táptalaj
- **Oxidatív / fermentatív glükózbontás**
csöves szilárd táptalaj, eredeti szín zöld
(1% glükóz + pepton + indikátor (brómtimolkék))
- **fermentáció:** alul sárga (*Clostridium tetani*) **anaerob**
- **oxidáció:** felül sárga (*Pseudomonas aeruginosa*) **aerob**
- **oxidáció + fermentáció:** egész cső sárga (*E.coli*)
fakultatív anaerob

Biokémiai vizsgálatok

Russel táptalaj:

cukorbontás + gázképzés detektálása

(laktóz + dextróz + szacharóz + Andrade-indikátor)

brillant cukor: laktóz + dextróz + szacharóz

- 1) **laktóz +** : egész táptalaj piros
- 2) **laktóz -** : piros szín a táptalaj alján
- 3) **gázképzés:** táptalaj feltöredezik

Biokémiai vizsgálatok

Módosított Russel vagy TSI (Triple Sugar Iron) táptalaj

cukorbontás + gázképzés + H₂S termelés egyszerre
(laktóz, szacharóz, dextróz + ferrifoszfát)

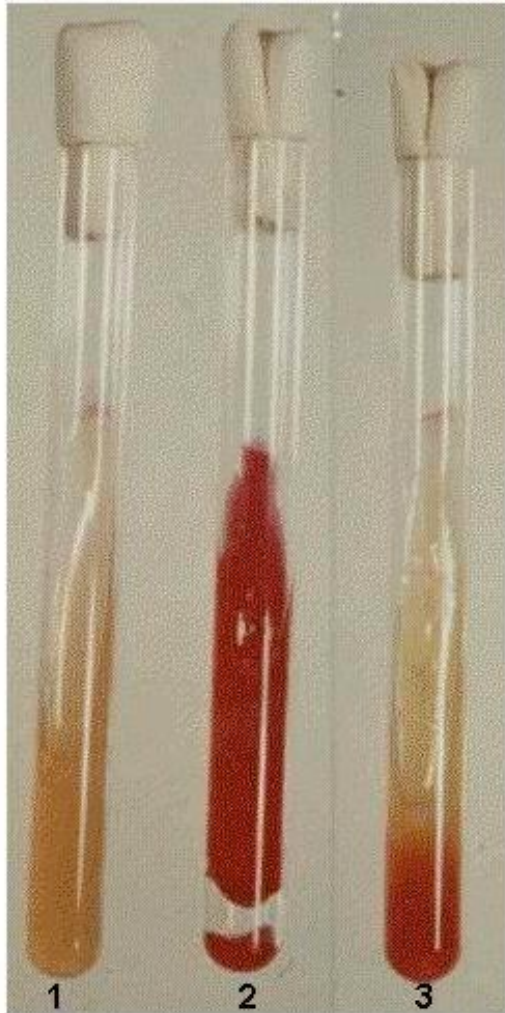
H₂S termelés: feketedés ⇒ vas-szulfid

a két táptalaj indikátorában különbözik

Russel: Andrade-indikátor ⇒ **piros** (cukorbontás)

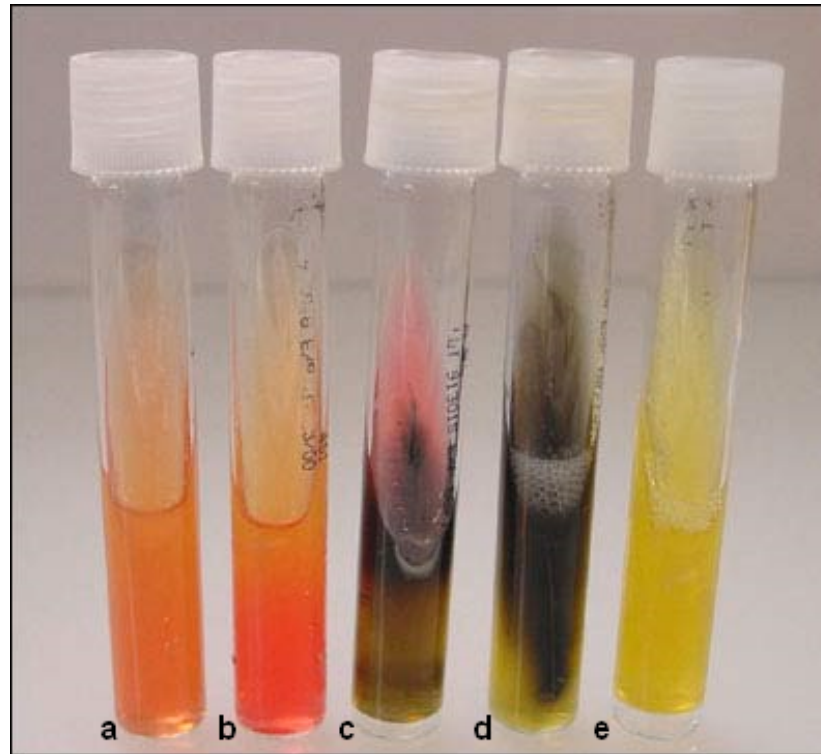
TSI: fenolvörös indikátor ⇒ **sárga** (cukorbontás) (kisebb csövek)

gázképzés: táptalaj feltöredezik



Magas-ferde agar cukorbontás és gázképzés kimutatására (brilliantcukor:laktóz-dextróz-saccharóz + Andrade indikátor)

1. steril
2. laktóz-gáz: pozitív (*E. coli*)
3. dextróz: pozitív, gáz: negatív (*Shigella*)



TSI táptalaj

TSI táptalaj

a: steril

b: min. változás/lúgos/-/-

c: lúgos/savas/-/+

d: savas/savas+/+/+

e: savas/savas+/-

(ferde szín/magas szín/gáztermelés/kénhidrogén termelés)

Bélbaktériumok elkülönítésére szolgáló biokémiai reakciók

Biokémiai vizsgálatok

Eozin-metilénkék táptalaj:

szelektív-differenciáló táptalaj

Szelektív : Gram-negatív nő csak rajta

Differenciál : laktóz pozitív: laktóz bontás



pH csökken



eozin kicsapódik a telepekre



metilén-kék megfesti a telepeket

L+ telep: sötét eozinos

laktóz negatív telep: színtelen

Biokémiai vizsgálatok

ONPG – próba (Orto-nitro-phenil- β -galaktozidáz)

β -galaktozidáz aktivitás vizsgálata

laktóz \Rightarrow glükóz + galaktóz (in vivo baktériumban)

- orto-nitrofenil- β -galaktopiranozid peptonvízben
- nincs indikátor adagolva

A szintelen orto-nitrofenil- β -galaktopiranozid elbontásakor **sárga** színű orto-nitrofenol szabadul fel

Laktóz pozitív: van permeáz, β -galaktozidáz

Laktóz negatív: nincs permeáz, β -galaktozidáz

“lassú laktóz fermentálók”: csak β -galaktozidáz

Biokémiai vizsgálatok

Citokróm-oxidáz rendszer vizsgálata

Oxidáz-reakció:

módszer: 1) tárgylemezre szűrőpapír

2) 2 csepp reagens (parafenilén-diamin származék)

3) egy másik tárgylemez sarkával minta vétel a
tenyészetből

4) összekeverni

parafenilén-diamin + oxidáz enzim \Rightarrow oxidáció \Rightarrow **lila** színváltozás

oxidáz + : sötét lila szín (*P. aeruginosa*, *Neisseria*)

oxidáz - : nincs színváltozás

Biokémiai vizsgálatok

Nitrogén (aminosav) metabolizmus:

ureáz enzim vizsgálata: urea (karbamid) bontás

urea \Rightarrow ammónia + CO₂

Christensen táptalaj:

szilárd táptalaj, csőben

ureum + dextróz + fenolvörös indikátor

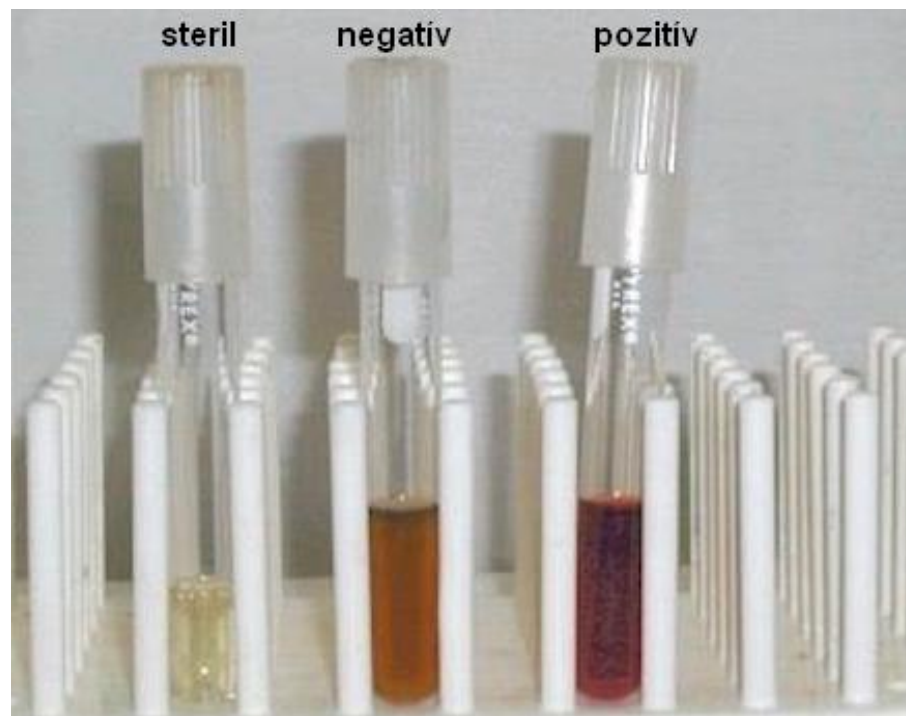
ureáz pozitív: püspöklila (lúgos pH) /*Proteus, Klebsiella*/

ureáz negatív: sárga (savas pH) *E. coli*



Ureáz enzim termelés kimutatása:
 Christensen táptalaj (dextrózt, ureumot és fenilvörös indikátort tartalmaz). Pozitív esetben a táptalaj pH-ja lúgosra változik (a szín püspöklilára változik)

1. pozitív (*Proteus*)
2. steril
3. negatív (*E. coli*)



Voges-Proskauer reakció
 (dextróz tartalmú peptonvizben acetil-metilkarbinol termelődik, ami KOH, alfa-naftol és oxigén hatására vörös elszíneződést ad)

Pozitív: *E. coli*
 Negatív: *K. pneumoniae*

Bélbaktériumok elkülönítésére szolgáló biokémiai reakciók

Biokémiai vizsgálatok

Indol termelés: triptofán metabolizmusából keletkezik

Kémcsőben baktérium tenyészet

Kovács reagens hozzáadása, összerázás

A reagens **piros** komplexet képez az indollal

E. coli indol pozitív

Klebsiella pneumoniae indol negatív



Indoltermelés kimutatása:

a peptonvízes baktériumtenyészetet amilalkoholban oldott sósavas paradimetil-amino-benzaldehiddel összerázva pozitív esetben az amilalkoholos fázis élénk vörös színű lesz

1. kontroll
2. negatív (*Klebsiella*)
3. pozitív (*E. coli*)



Kénhidrogén termelés kimutatása:

a magas agarba kevert ólomacetáttól a kéndioxid termelés hatására fekete színű bizmutszulfid képződik (a táptalaj feketére színeződik)
pozitív: *Proteus*

balra: negatív (steril)
jobbra: pozitív

Bélbaktériumok elkülönítésére szolgáló biokémiai reakciók

Biokémiai vizsgálatok

H₂S termelés:

- kén-tartalmú aminosavak metabolizmusa
 - indikátor: ólom, vas, bizmut
 - **fekete** elszíneződés utal a nehézfém-szulfid kialakulására
 - **Ólom-acetátos szűrőpapír bouillonban**
 - **Magas agar** (S-tartalmú aminosavak, ólom-acetát)
 - **Bizmut-szulfitos táptalaj**
 - Salmonellák szelektív-differenciáló táptalaja
 - **brillantzöld**: szelektivitásért felelős, csak Salmonella nő ki rajta
 - Salmonella **H₂S**-t tud termelni
- bizmut-szulfid + H₂S ⇒ bizmut-szulfid (fekete telepek)
- **Módosított Russel vagy TSI (Triple Sugar Iron) táptalaj**

Biokémiai vizsgálatok

Lipid metabolizmus

lecitináz aktivitás demonstrálása tojás tartalmú táptalajon

lecitináz: lecitin \Rightarrow **diglicerid** + foszforilkolin



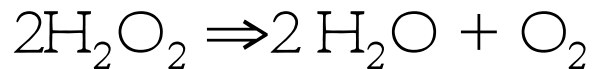
opaleszkáló rész a telepek körül

(*Bacillus cereus*)

Biokémiai vizsgálatok

Pathogenitási és taxonómiai tulajdonságok

Kataláz reakció:

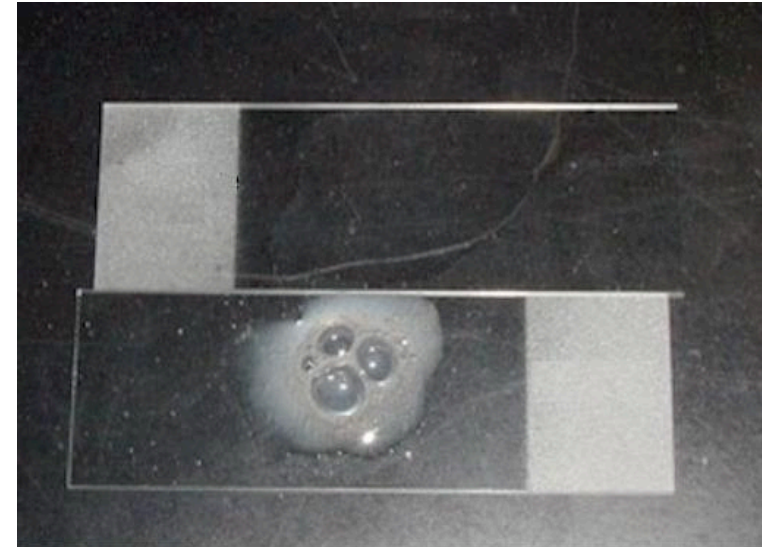


módszer: 1) tárgylemezre H_2O_2 -t cseppentünk

2) minta a tenyészetből, összekeverés

Kataláz pozitív : buborék (*Staphylococcus* genus)

Kataláz negatív : nincs buborék (*Streptococcus* genus)



Kataláz enzim termelésének kimutatása

negatív: *Streptococcus*

pozitív: *Staphylococcus* (a baktérium élénk pezsgés közben elbontja a hidrogén-peroxidot)

Biokémiai vizsgálatok

Koaguláz reakció:

csöves módszer (exokoaguláz): plazma bealvad vagy nem

clumping-teszt (endokoaguláz): tárgylemezen elvégezve

latex agglutináció:

- 1) fekete kartonra cseppentünk a reagensből
- 2) mintát veszünk a tenyészetből és összekeverjük
- 3) fiziológiás sóoldat negatív kontrollnak
pozitív: agglutináció

Biokémiai vizsgálatok

Haemolyzin termelés:

α - haemolízis: nem teljes haemoglobin lebomlás
(verdoglobin)

β - haemolízis: teljes haemolízis és haemoglobin lebontás
(γ - haemolízis: nincs haemolízis)

CAMP-teszt:

Christie, Atkins, Munch-Petersen nevek rövidítéséből

Streptococcus agalactiae felerősíti a *S. aureus* β -haemolitikus zónáját. (lepkeszárnyyszerű)

Biokémiai vizsgálatok

CAMP-próba (Christine, Atkins, Much-Petersen)

Streptococcus agalactiae és *Staphylococcus aureus* szélesztése véres agarra. A *S. agalactiae* egy erős diffúzibilis anyagot képez, amely teljessé teszi a *Staphylococcus* sphingomyelinázának kitett vörösvérsejtek haemolízisét.



Biokémiai vizsgálatok

DNáz termelés

DNS tartalmú táptalajban vizsgáljuk

DNáz elhasítja a DNS-t a táptalajban \Rightarrow **sósav** hatására nem tud denaturálódni

Ha a baktérium nem termel DNáz-t \Rightarrow **sósav** hatására denaturálódik a DNS

DNáz pozitív: nincs denaturációs sáv (*S. aureus*)

DNáz negatív: van denaturációs sáv (*S. epidermidis*)



DNáz enzim kimutatása

Biokémiai vizsgálatok

Automatizált mikromódszerek: API (Automated Profile Identification)

mikropléteken is elvégezhető a biokémiai reakciók

detektálás után számítógép segítségével azonosítás egyszerre több vizsgálat végezhető, gyorsabb

