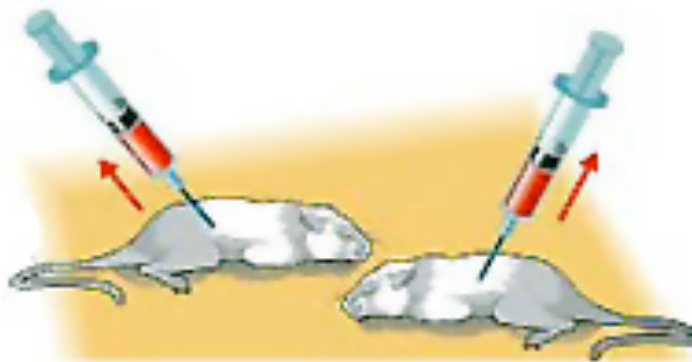


Baktériumok tenyésztése

Kanizsai Szilvia

Koch posztulátumok

A betegből a kórokozó
izolálása



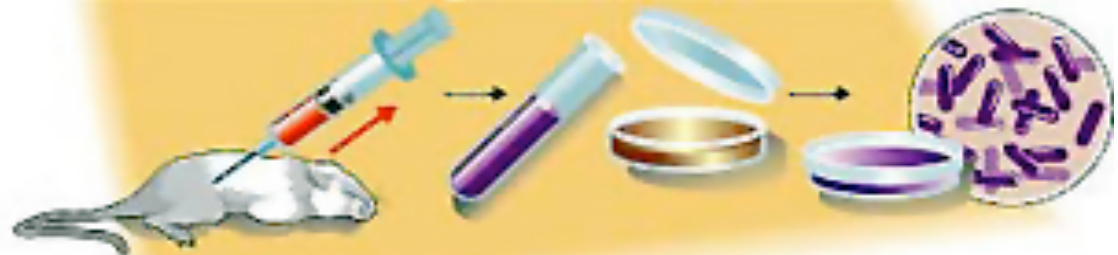
Izolálás, tenyésztés,
tápközegben fenntartás

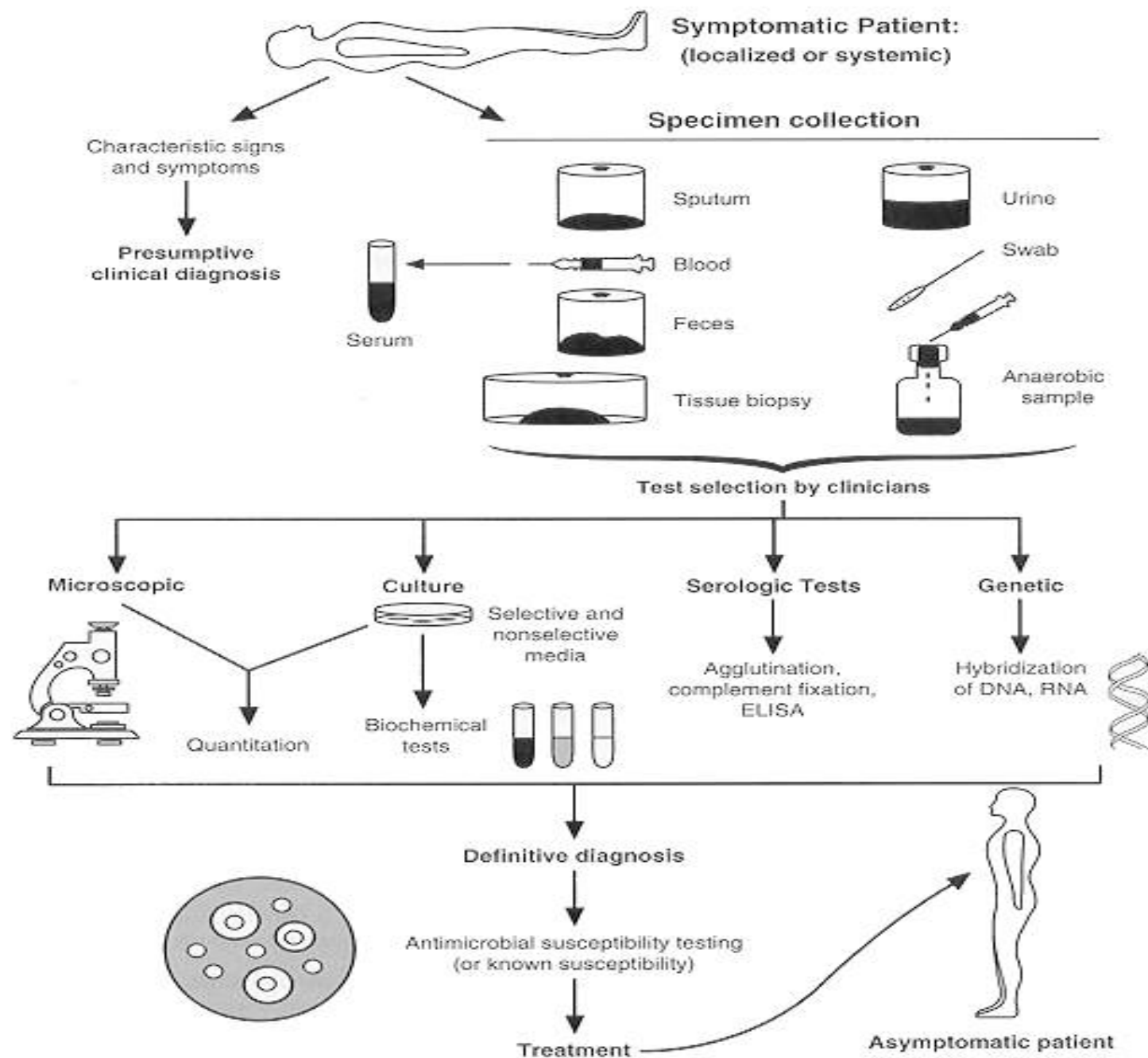


Kísérleti állatba oltva
a betegségre
jellemző tünetek kialakulása

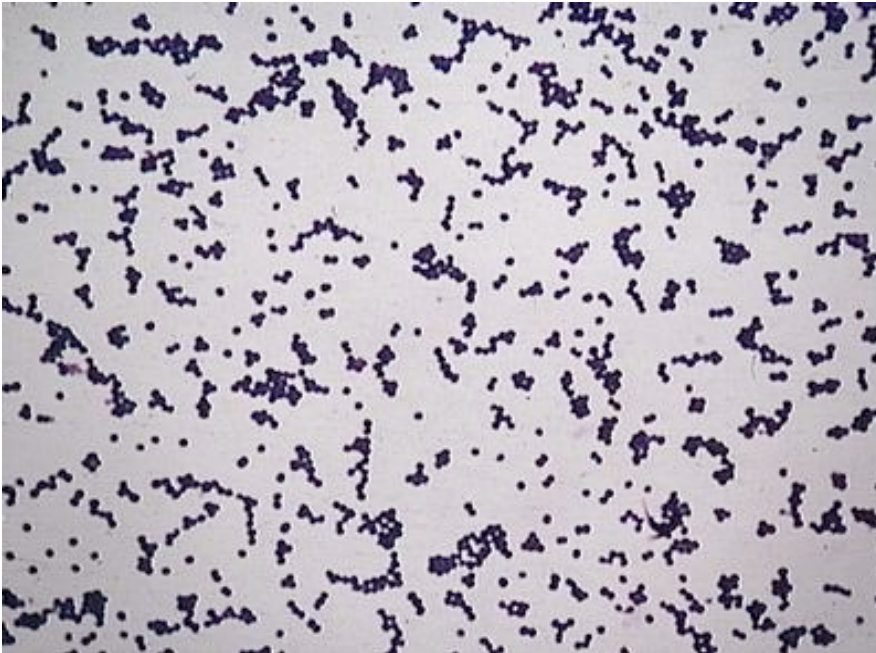


Ezen állatokból a kórokozó
ismételt izolálása





Morfológia



Mikroszkópos morfológia



Makroszkópos morfológia

Baktériumok makroszkópos jellemzése

- (Telep: genetikailag homogén populáció)
- Méret: kb. hány mm.
- Alak: tűszúrásnyi, kerek, szabálytalan
- Kiemelkedés: lapos, kiemelkedik, köldökszerű behúzódás
- Felszín: nyákos, csillogó, matt, durva
- Szag: Pl.: hársfa illat: *Pseudomonas aeruginosa*
 - fokhagyma szag: *Corynebacterium diphtheriae*
 - beszáradt takony szag: *Haemophilus influenzae*

Alak



kereszt



ovális



szabálytalan

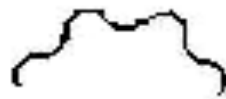


gyökerez

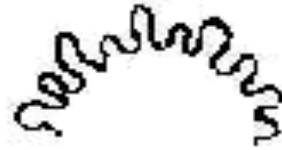
Körvonal



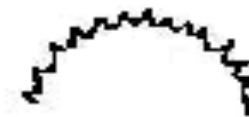
ép



hullámos



lebenyes



erodált

Keresztmetszet

lapos vagy
szétterülő

platószerű

enyhén
domború

köldökös

sáncolt
felszínű

szemölcsös

Telepmorfológia

Baktériumok anyagcseréje

Energia nyelés szempontjából:

Fototrófok – energia a fény hasznosítással

Kemotrófok – kémiai anyagok közötti redox reakciókat használják ATP termelésre

H⁺/e⁻ felvevők: (régebben H⁺ felvevőkről beszéltek csak, de találtak vas ion felvevőket is)

Organotrófok – szerves anyagokat használnak fel

Litotrófok – ásványi anyagokat használnak e⁻ és p⁺ szerzése céljából

C-forrás alapján:

Heterotrófok – szerves **Paratrófok** (pl.: ic.)

Autotrófok – szervetlen

Baktériumok tenyésztése

Tenyésztést követően lehet makroszkóposan vizsgálni.

Orvosi mikrobiológiai szempontból:

Heterotrófok: energia nyérése szerves anyagok lebontása révén (kemoorganotróf heterotrófok)

Táptalajon tenyésztjük. (steril)

(VBNC - viable but not culturable)

(Egér talpában, vagy armadillóban – *Mycobacterium leprae*)

Baktériumok tenyésztése

<u>Hőmérséklet:</u>	mezofil	30 - 37 °C	!!!
	termofil	> 50 °C	
	pszikrofil	< 20 °C	

Listeria monocytogenes 4 °C – hűtő

Termus aquaticus baktérium: akár 100 °C →
PCR felhasználás enzimét, (Taq polymeráz)

Baktériumok tenyésztése

Táptalaj összetétel: H₂O, C, N, ionok, nyomelemek (Se, Cu, Zn, Mn), fehérje, vitaminok (folsav)

a) **pH:** optimális 7,2- 7,4

Kivétel: *Vibrio cholerae* pH: 8-9

Lactobacillus pH: 5,4 - 6,6

b) **ionkoncentráció.:** mikróbák toleránsak

halofil: *Staphylococcus aureus* 7% NaCl

Vibrio cholerae

Táptalaj készítés

Készítéshez: pepton: aminosav, polipeptid forrás

húskivonat: N, növekedési faktor, szénhidrát

agar-agar: tengeri moszat kivonat

szilárdításhoz kell **1,5- 2%**-ban, 0,7% félfolyékony

nem tápanyagforrás

súlyának 100x-t vízmegkötés

95 °C-on olvad

45°C-on dermed

(szilárdító anyag lehet még: zselatin, burgonya, gelrite - nincs benne galaktóz ill. szerves anyag, szilikagél – vízüveg+kénsav elegye)

pH beállítása,

Steril

Táptalajok

I. Természetes: tej, burgonya stb.

II. Mesterséges: pontos kémiai összetétel meghatározható.

Összetétel alapján:

1) Egyszerű:

a, Folyékony - húsleves, bouillon

b, Szilárd - magas agar

ferde agar

agar lemez

véres agar: agar lemez + 5% vér

csokoládé agar: véres agar felhevítve

c, Félfolyékony

Táptalajok

2) Összetett: a) szelektív

szelekciós előny biztosítása a normál flórával szemben
pl.: Vancomycines csokoládé agar – *H. influenzae*

b) szelektív – differenciáló

Eozin-metilénkék táptalaj:

szelektív – csak a Gram-negatív baktériumokat engedi kinőni

differenciáló – laktóz bontás alapján

Laktóz pozitív: sötét eozinos telepek

Laktóz negatív: világos rózsaszín telepek

c) **dúsító táptalajok** – általában folyékony táptalajok

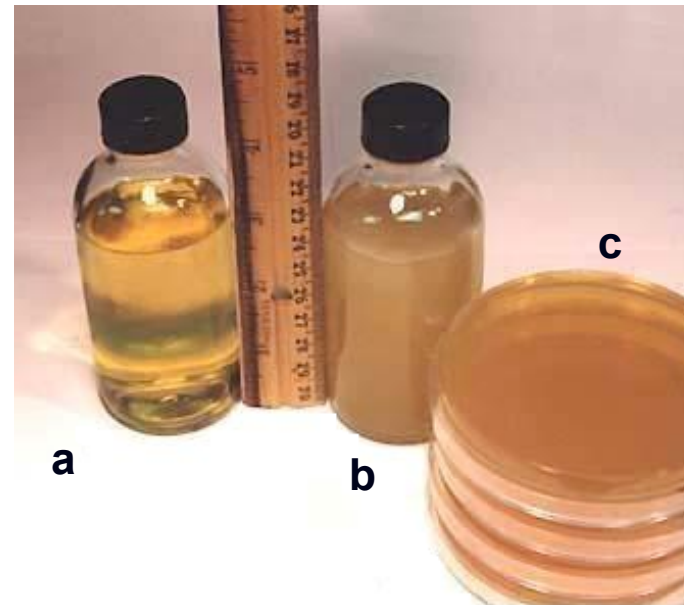
Folyékony táptalaj (bouillon)



Szálás (a) és porított (b) agar-agar

Agar-agar táptalajok

- a. folyékony (98°C)**
- b. dermedt (40-42°C)**
- c. agar lemez**
- d. ferde agar**
- e. magas agar**

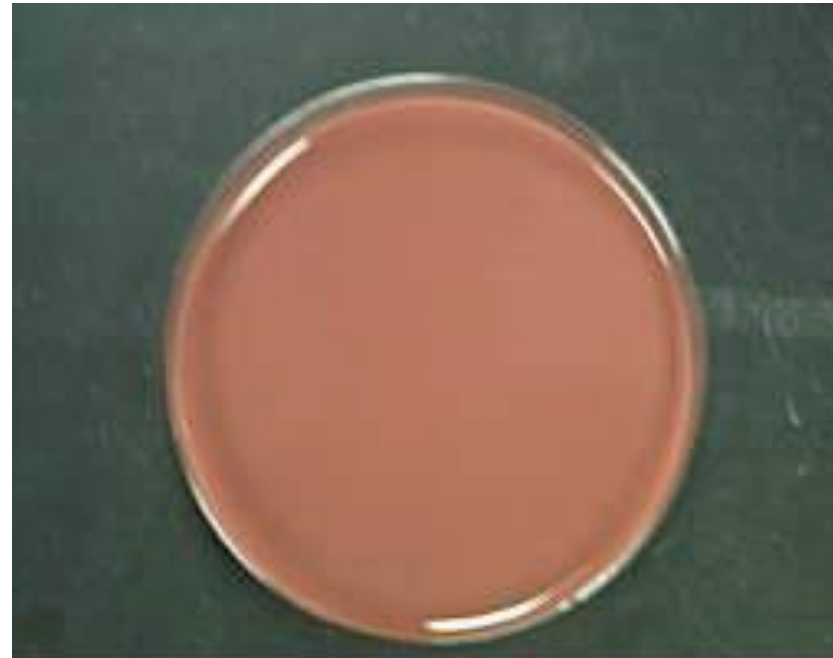


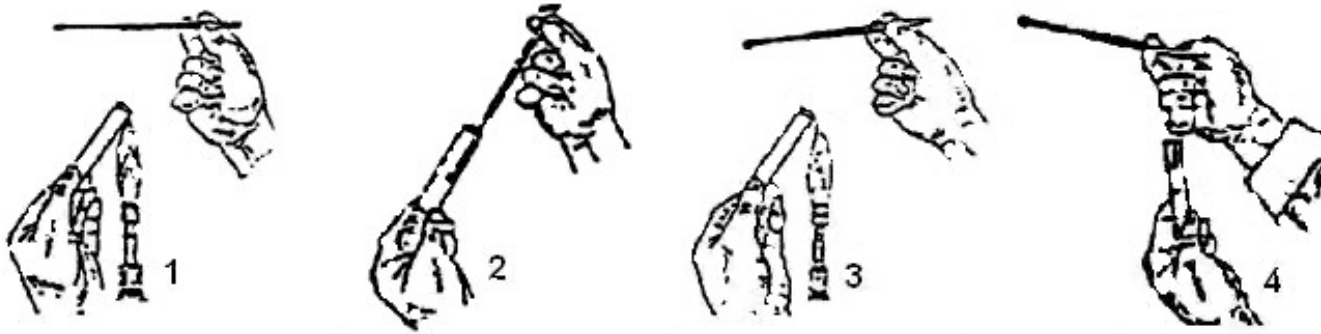
Baktériumok tenyésztése,
telepmorfológia



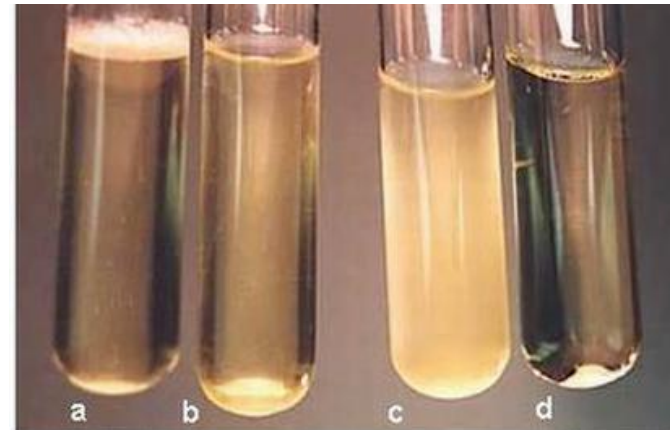
Véres agar (5% defibrinált vért tartalmaz)

Csokoládé agar (hővel kezelt véres agar) táptalaj

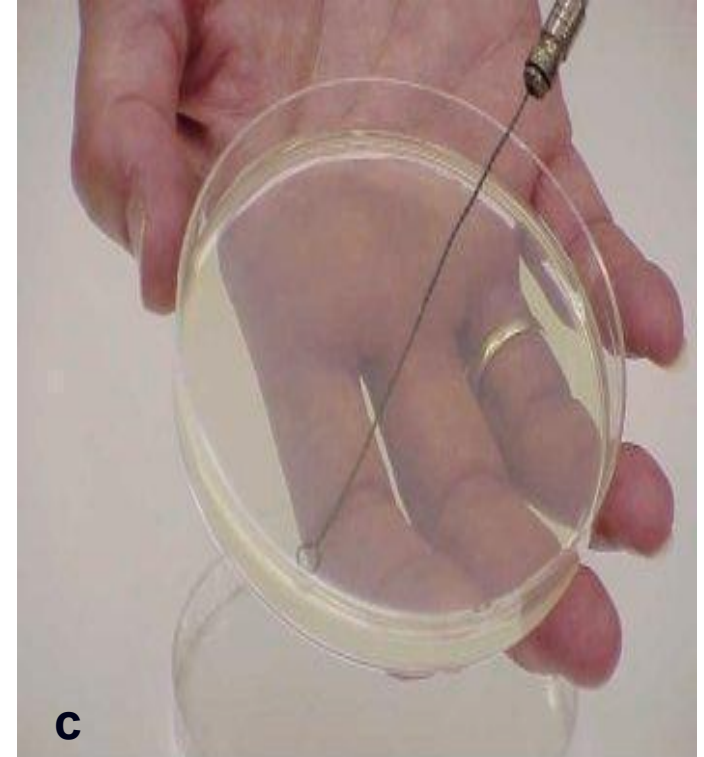




Mintavétel lépései folyékony táptalajból 1. A kémcső nyitása és leégetése, 2. Mintavétel kaccsal, 3. A kémcső szájának leégetése és 4. lezárás



**a: lepedék, b: üledék,
c: zavarosodás, d: steril táptalaj**

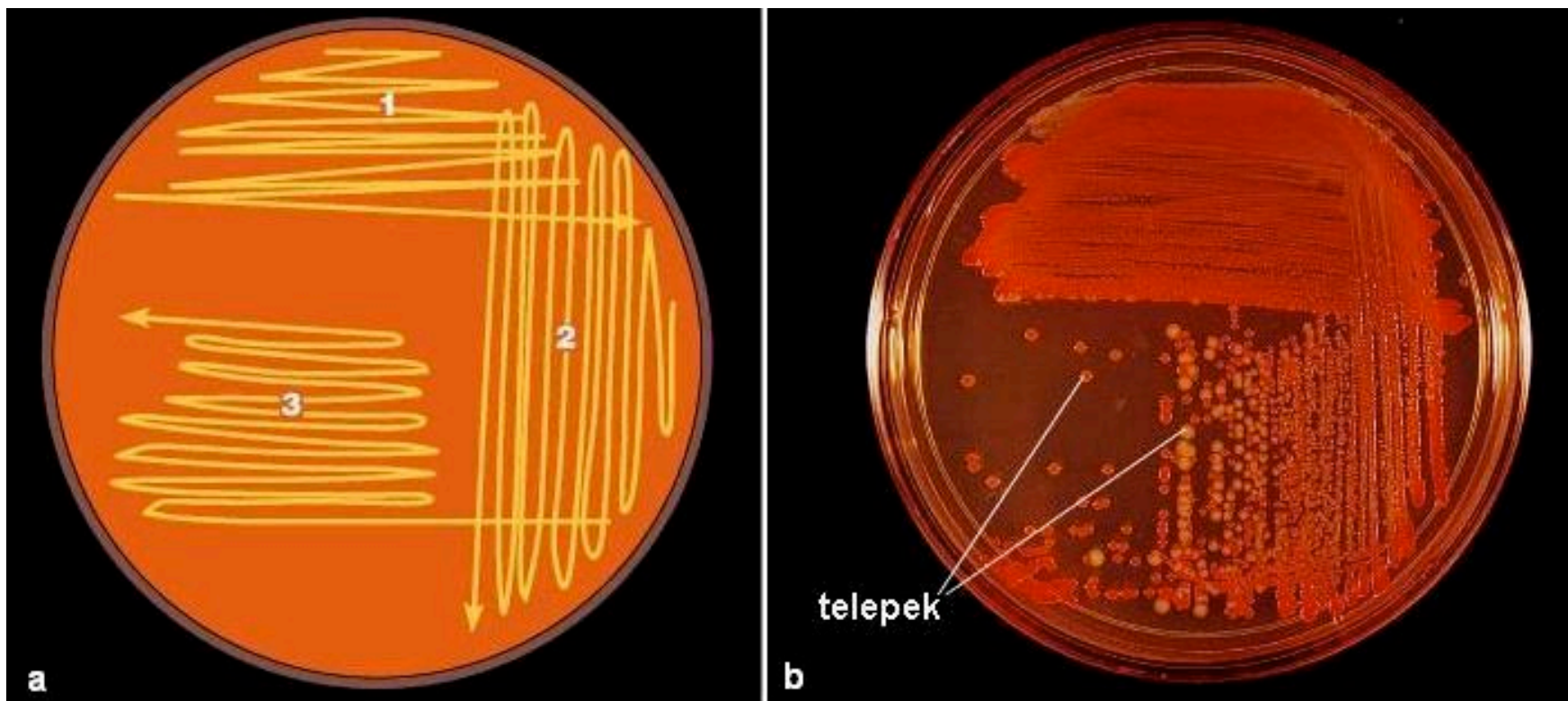


Leoltás

(a) Ferde agar

(b) Magas agar

(b) táptalajba - agarlemezre



A leoltás lépései szilárd táptalajra (agarlemez Petri csészében)

a: a leoltás irányát nyíl jelzi. 1. leoltás az eredeti baktériumtenyészetből. A további lépések között a kacsot leégetjük. 2. és 3. a kacs egyre kevesebb baktériumot vesz fel a szélesztésből.

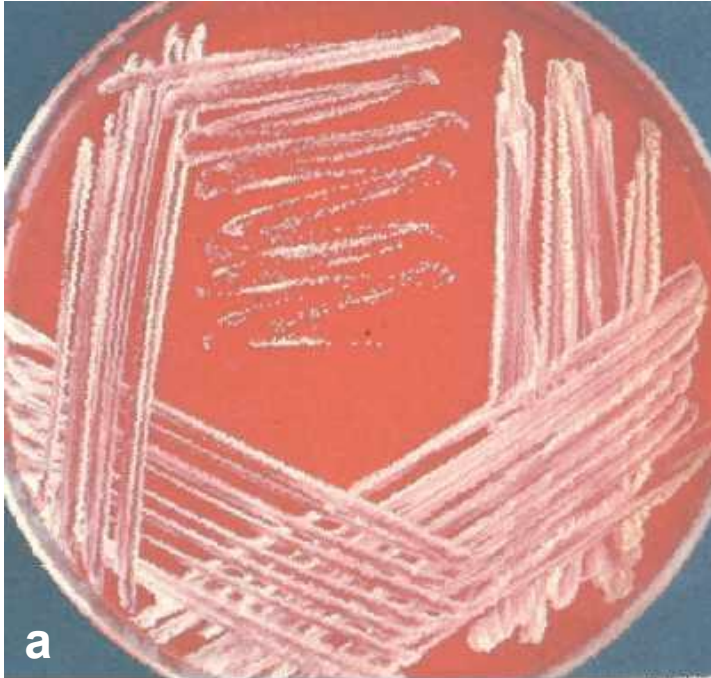
b: a leoltás megfelelően izolált telepeket eredményez



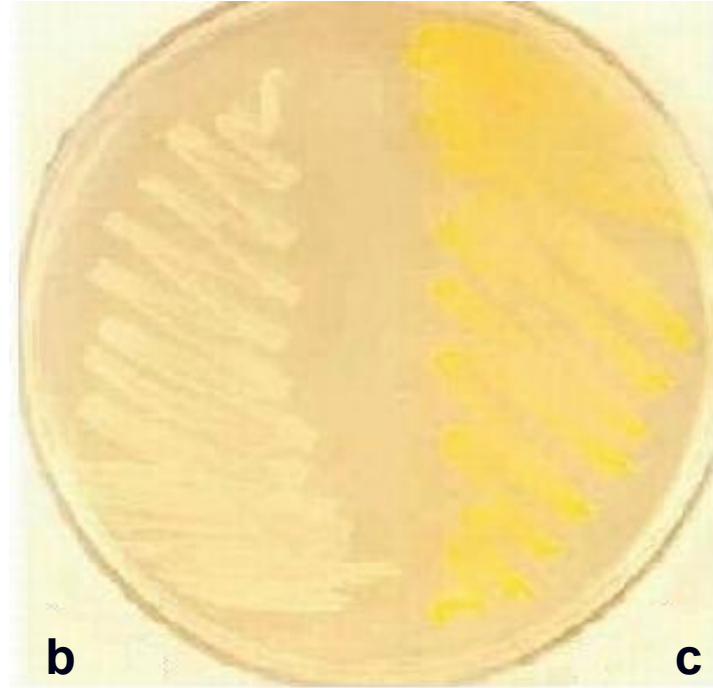
A táptalaj helytelen leoltásakor az izolált telepek hiánya miatt a telepmorfológiai jellemzők nem figyelhetők meg



A túl sokáig nyitva hagyott táptalajra a levegőből gomba spórák eshetnek, ami gomba telepek kialakulásához vezet



a



b

c



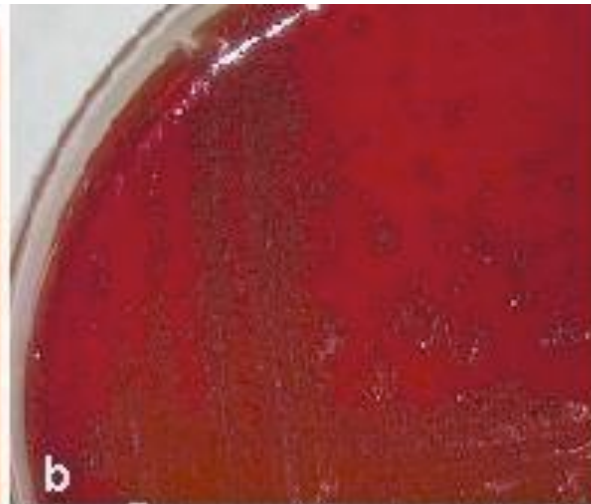
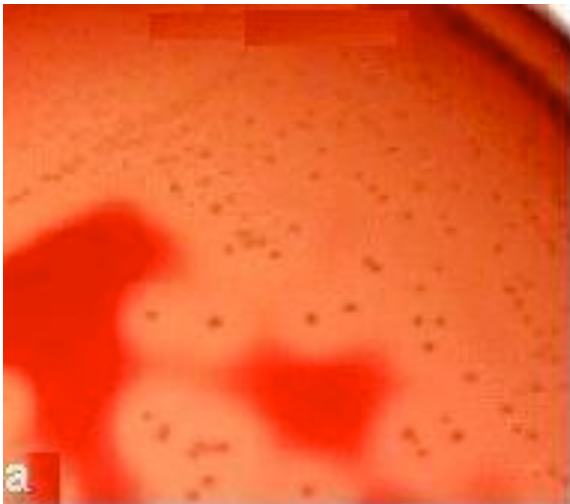
d

Zsírdékony pigmentet termelő baktériumok (a telepek színesek)

- a. *Staphylococcus epidermidis*
- b. *Staphylococcus epidermidis*
- c. *Staphylococcus aureus*
- d. *Serratia marcescens*

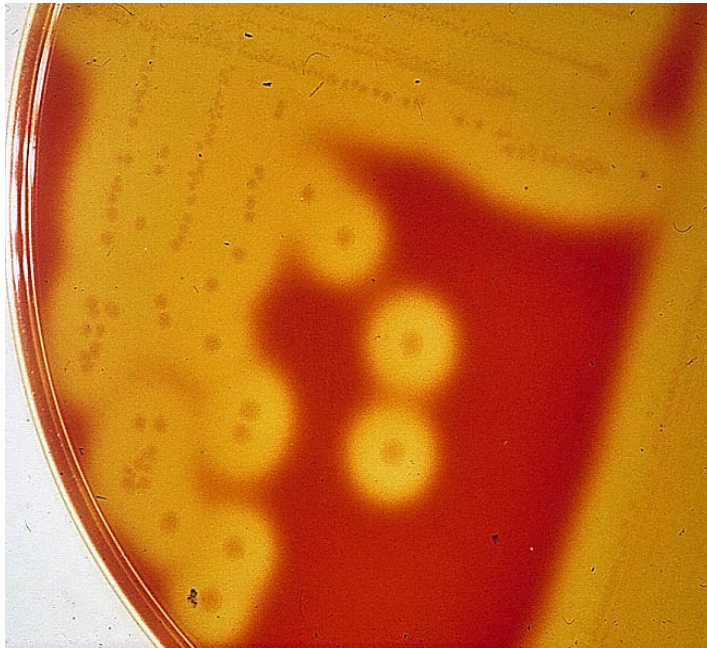


**Vízoldékony pigmentet termelő
baktérium tenyésztete
(*Pseudomonas aeruginosa*)**



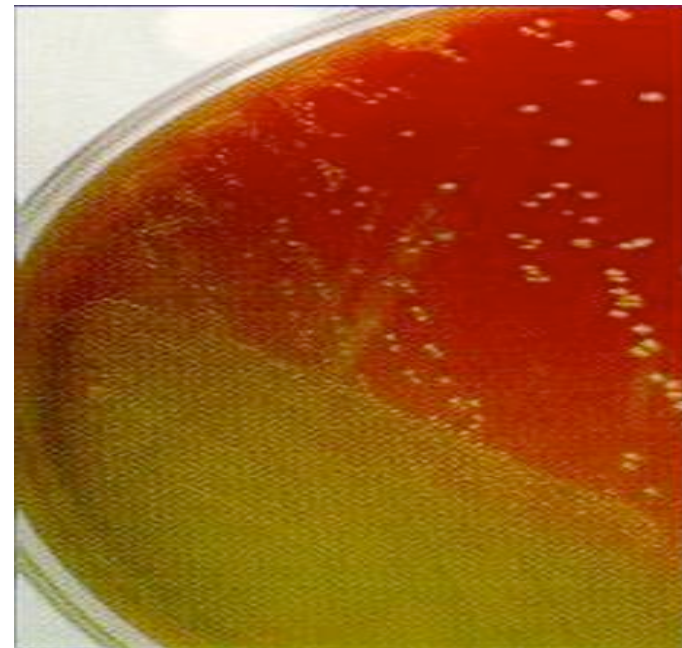
Hemolízis véres agar táptalajon (a: beta-hemolízis, b: alfa-hemolízis, c: gamma-hemolízis)

Baktériumok makroszkópos jellemzése: véres agaron



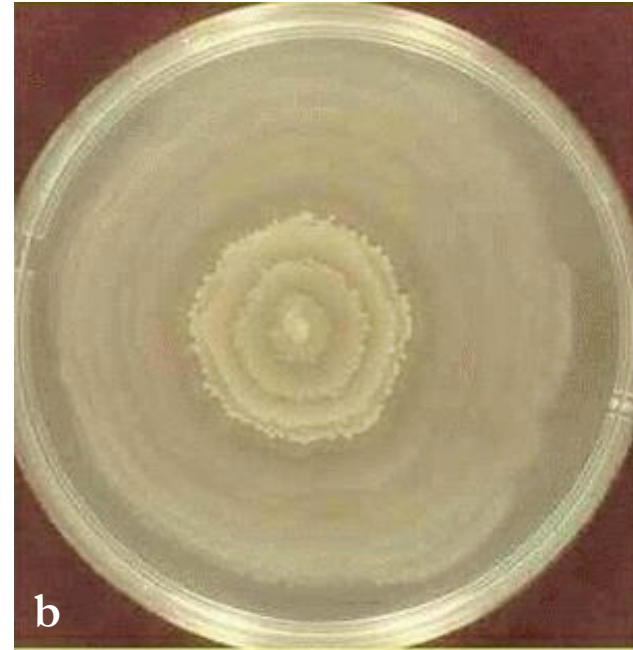
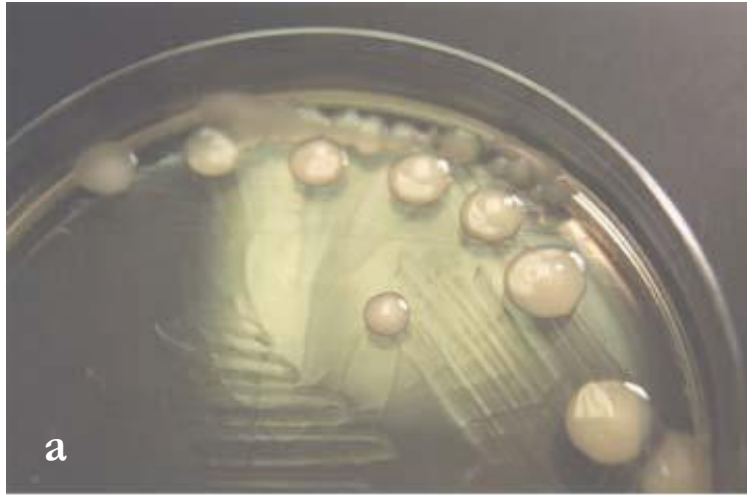
Beta-hemolízis

- Teljes hemolízis
- Baktérium hemolizinje a hgb teljesen elbontja. Agar színe tűnik elő

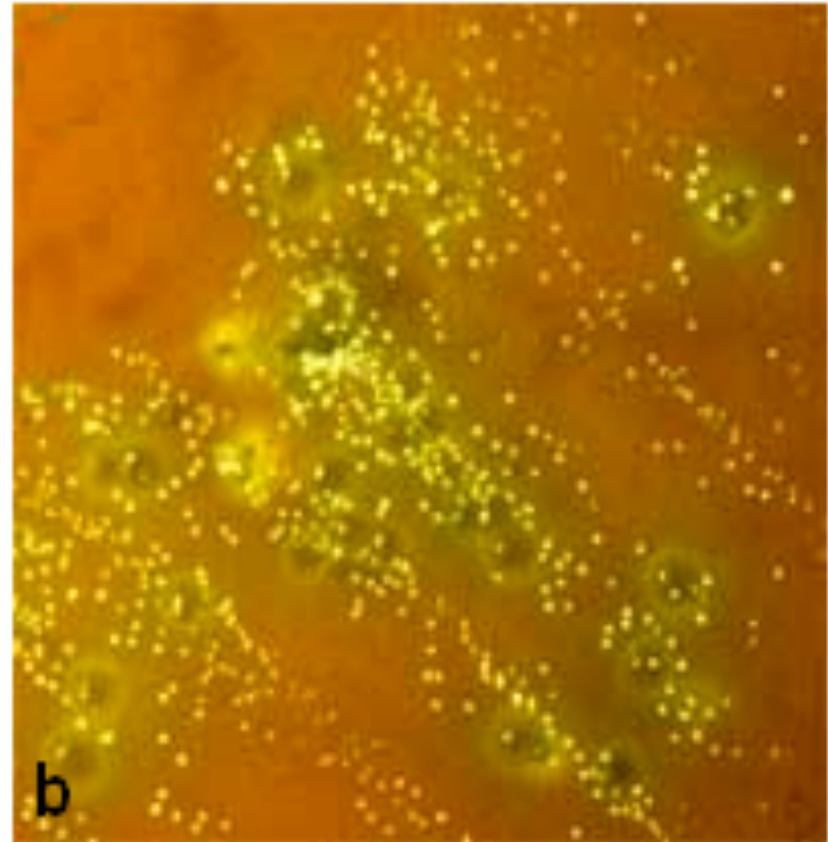
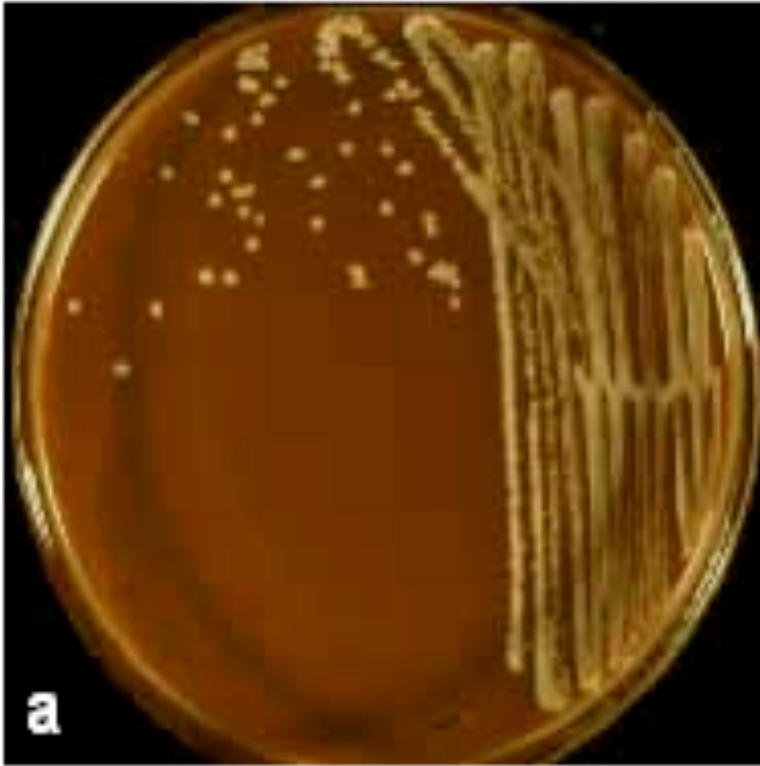


Alfa-hemolízis

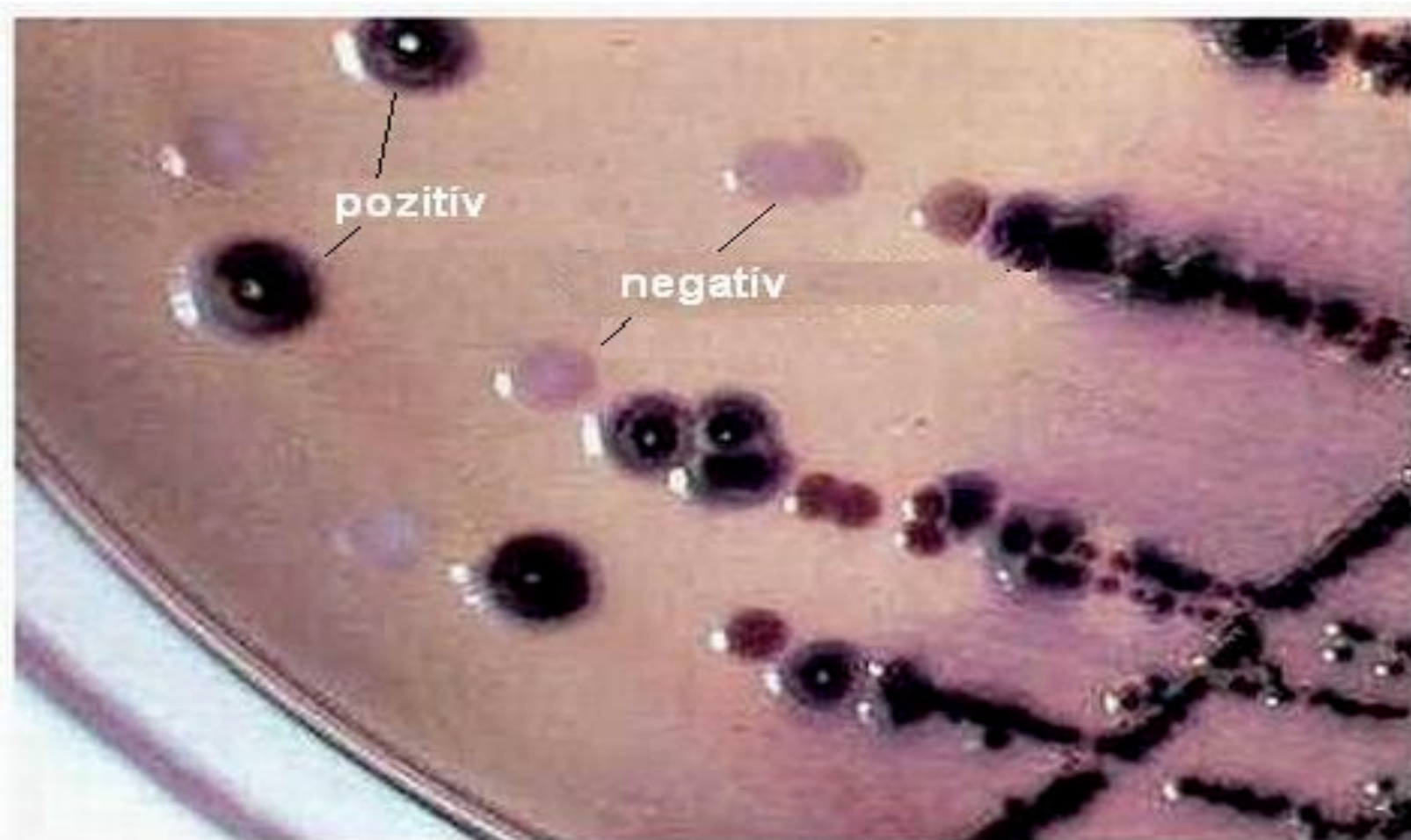
- inkomplett hemolízis
- Baktérium hemolizinje nem bont teljesen.
(verdoglobin: zöldnek látjuk)



- a. tokos baktérium tenyésztete
(*Klebsiella pneumoniae*)**
**b: csillós baktérium tenyésztete
(*Proteus vulgaris*)**
**c: “meduzafő” alakú telepek
(*Bacillus cereus*)**

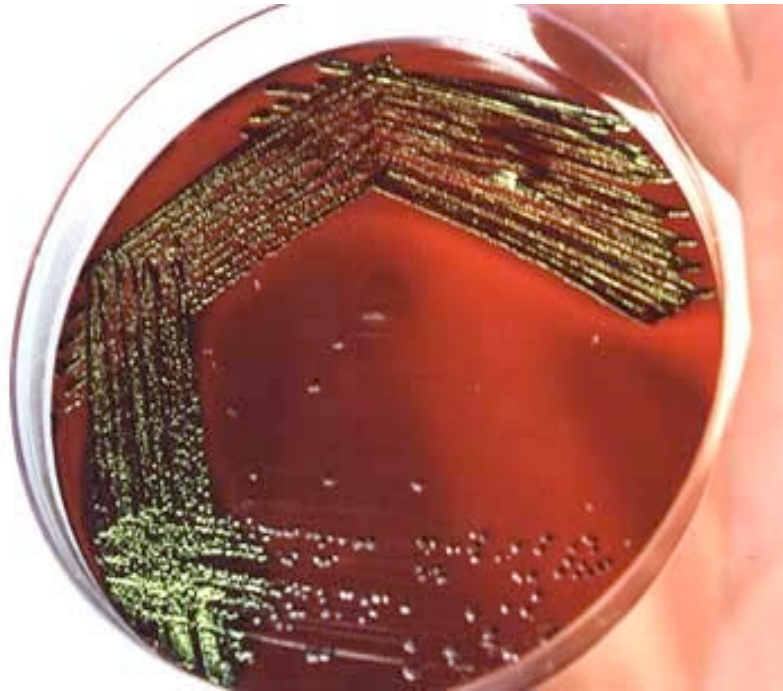


Haemophilus influenzae
csokoládé agaron (a), irizáló telepek (b)



Differenciáló táptalaj (EMB táptalaj: eozint, metilénkéket és laktózt tartalmaz. A laktózbontó baktériumok telepei kékeslilák, a laktózt nem bontó baktériumok telepei színtelenek)

Baktériumok makroszkópos jellemzése: eozin-metilin kék táptalajon



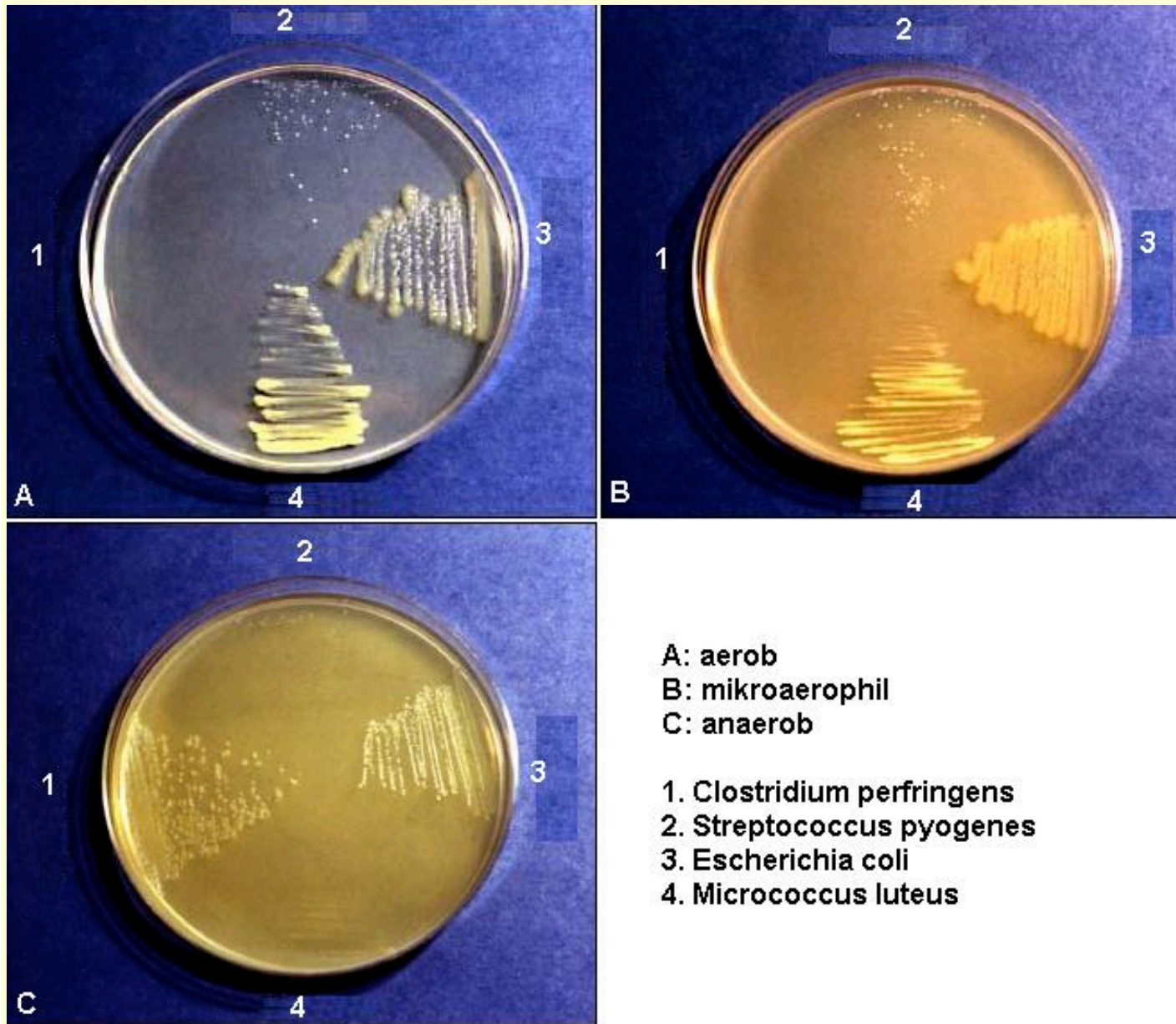
Laktóz pozitív: lila, sötét

Laktóz negatív: áttetsző,
világos

Baktériumok tenyésztése

O₂ jelenléte vagy hiánya:

- 1) **obligát aerob:** *Pseudomonas aeruginosa* (respiráció)
- 2) **obligát anaerob:** Clostridiumok (fermentáció)
- 3) **fakultatív anaerob:** *E. Coli* (mindkét lehetőség, humán pathogének) !!!
- 4) **microaerophil:** *Campylobacter* (alacsonyabb oxigén tenzió)
- 5) **capnophil:** *Haemophilus influenzae* (CO₂↑)



Légzési enzimek

Csoport	Szuperoxid-dizmutáz	Kataláz	Peroxidáz
Obligát aerob és a legtöbb fakultatív anaerob	+	+	-
Legtöbb aerotoleráns anaerob	+	-	+
Obligát anaerob	-	-	-

Tenyésztési feltételek

I. Aerob baktériumok: **O₂ jelenléte (respiráció)**

37 °C termosztátban

70-80% -os páratartalom

1 atmoszféra nyomáson

24 órán át

Tenyésztési feltételek

II. Anaerob baktériumok: O_2 hiány – fermentáció

Kémiai módszer

- **Holman – húsdarabka**
- redox potenciál csökkentése,
- **Légmentesen zárni parafinnal**

- **Tioglikolát tart. bouillon**
- redox potenciál csökkentése
- (Brewer táptalaj másnéven)

Tenyésztési feltételek

II. Anaerob baktériumok: O₂ hiány – **fermentáció**

Kémiai módszer

GasPack

CO₂, H₂ fejlesztése, O₂ elnyelése

Fizikai módszer

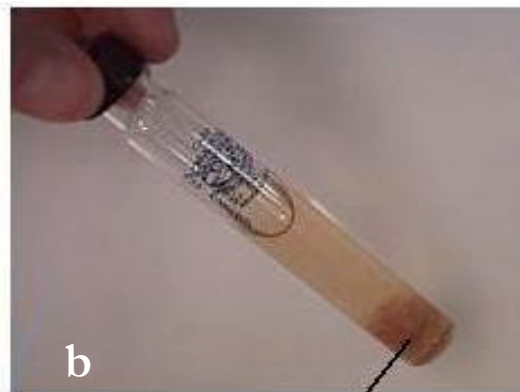
Anaerosztát

Biológiai módszer

Fortner technika: aerob és anaerob baktériumokat egyszerre tenyésztene: elhasználja az O₂-t



a
Rezazurint és
dextrózt tartalmazó
táptalaj



b
Főtt húst tartalmazó (Holmann)
táptalaj

Anaerob tenyésztésre szolgáló
táptalajok



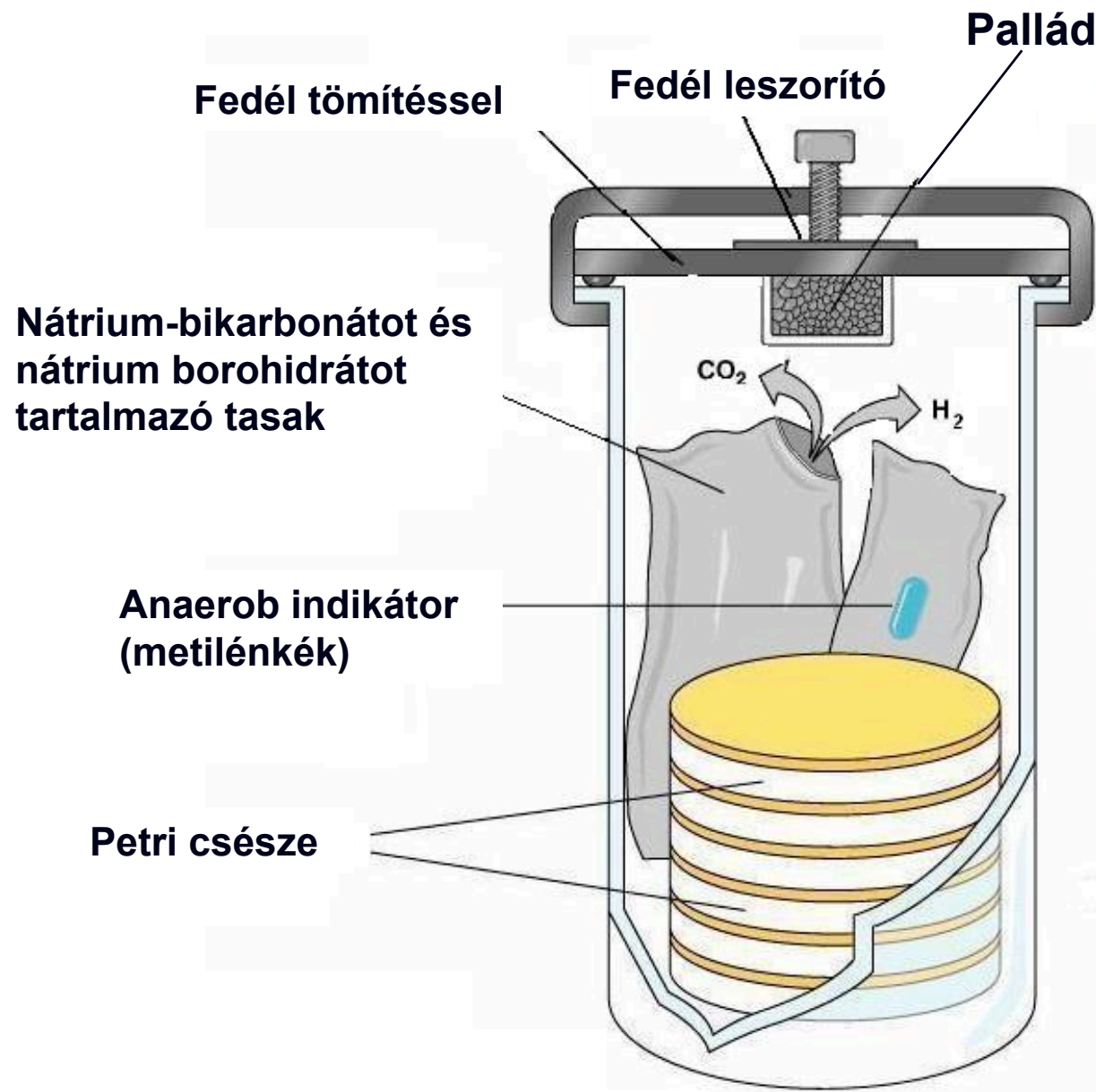
c
Az anaerosztátból a levegőt
eltávolítjuk (kiszívjuk), szükség
esetén inert gázzal (nitrogén)
feltölthetjük. A vizsgálandó anaerob
baktériumokat táptalajra oltva a
készülékbe helyezzük és
inkubáljuk.

Anaerob tenyésztés táptalajai és módszere

a. rezazurint és dextrózt tartalmazó táptalaj

b: főtt húst tartalmazó (Holmann) táptalaj

c: anaerosztát



Anaerob tenyésztés (GasPack)

Baktériumok tenyésztése,
telepmorfológia



Hemokultúra palackok

Baktériumok tenyésztése,
telepmorfológia

Tenyésztési feltételek

III. Microaerophil baktériumok:

tenyésztés csökkentett O₂, emelt CO₂ tartalmú
atmoszférába

pl.: *Campylobacter jejuni*, *Helicobacter pylori*

IV. Capnophil baktériumok: tenyésztés növelt CO₂ tartalmú atmoszférába

pl.: *Neisseria*, *Haemophilus*

Transzport táptalaj



Akkor használjuk amikor a betegből vett mintát nem tudják azonnal diagnosztikus laborba szállítani. Ebben a közegben a kórokozók túlélnek.

Pl. **Uricult-Plus** (CLED – minden kinő)

(MacConkey – G⁻)

(Na-azidos – Enterococcus)



Tanszport közeg

NEM táptalaj

A vizsgálati anyagban a baktériumok

- eredeti állapotában
- eredeti csíraszám-beli arányokkal

Pl.: Stuart, Amies transzport közeg

A vizsgálati anyag leoltása szilárd táptalajra

Szélesztés

Vegyes tenyészet: ha kettő vagy annál több különböző küllemű telepet látunk

Szintenyészet: csak egy féle baktériumot tenyésztünk

Izolált telep: szélesztés után kapjuk

Egy telep: azonos genetikai tartalommal rendelkező baktériumok

Baktérium pázsit: baktérium minél vastagabb egyenletes rétegben növekedjék a táptalajon

Baktériumok növekedési görbéje

Lag fázis: (adaptációs fázis): baktérium sejt növekszik, környezetében lévő szubsztrátokat felhasználja, felkészül osztódásra, enzimeket termel

Log fázis: (exponenciális fázis) idő – sejtszám logaritmusá között lineáris összefüggés, sejt szám növekedés, → hasadás
(primer metabolitok) – (kemosztát: limitáló tápanyagkomponens)

generációs idő: két osztódás között eltelt idő

E. coli 20 perc, *Mycobacterium tuberculosis*: 20 óra

Stacioner fázis: tápanyag felhasználásával toxikus anyagok halmozódnak fel: baktérium sejtszám növekedés- elhalálozás egyensúlyban van, spóra képzés itt indul be

Sejtek többsége: endogén metabolizmust folytat. Nem osztódik, de enzimeket / toxinokat termel (szekunder metabolitok: vitaminok, alkaloidok, antibiotikumok)

Deklinációs fázis: elhalnak sejtek, osztódás minimális, elhalálozás jellemző, autolízis (baktériumok önbontása)

Baktériumok növekedési görbéje

