

Laboratoř oboru – Mikrobiologie

Identifikace neznámé bakterie

- a) Mikroskopické zhodnocení morfologie a produkce spor
- b) Stanovení velikosti
- c) Barvení podle Grama
- d) Testy na katalasu a oxidasu
- e) Identifikace pomocí testovacích souprav – demonstrace

1. Základní postupy

1.1 Studium morfologie mikroorganismů

Morfologie mikroorganismů je nauka o velikosti a tvaru mikroorganismů. Morfologické údaje poskytují cenné informace při kontrole užitečných mikroorganismů používaných v mlékárenském a tukařském průmyslu (čisté mlékařské kultury bakterií, kvasinek a plísní). Dále jsou základem při identifikaci neznámých mikroorganismů užitečných i nežádoucích.

1.1.1 Studium velikosti mikroorganismů

Mikroorganismy jsou vesměs pouhým okem neviditelné, jejich velikost se stanovuje po zvětšení mikroskopem. Velikost se obvykle udává dvěma rozměry – délkou a šířkou – a vyjadřuje se v μm (např. $6 \times 2 \mu\text{m}$).

1.1.1.1 Příprava preparátů pro stanovení velikosti mikroorganismů

Bakterie

Pro mikroskopické pozorování bakterií se připravují vitální preparáty a fixované preparáty barvené methylenovou modří. Oba typy se pozorují imerzním objektivem

Vyžíhaným platinovým drátkem se přenese do kapky vody nebo fyziologického roztoku vyšetřovaná suspenze nebo přímo kolonie mikroorganismů a rozetře se rovnoměrně v tenké vrstvě na povrch podložního sklíčka. Získaný nátěr se opatrně vysuší vysoko nad plamenem, závěrem se 2 – 3x protáhne plamenem. Fixovaný preparát se pak barví buď bazickými (methylenová modř, malachitová zeleň, krystalová violet[®]) nebo kyselými (kyselý fuchsin, eosin, erytrosin) barvivými. Doba působení barviva je 2 – 3 min. Poté se vodou spláchne přebytečné barvivo a preparát šetrně osuší.

U bakterií se mění velikost fixací i barvením, proto se snažíme proměřovat vitální preparáty. Vždy je nutné uvést způsob přípravy i barvení proměřovaného preparátu.

Vitální preparát bakterií se připraví přenesením kapky tekutiny na podložní sklíčko a překryje se krycím sklíčkem. Pro zvýraznění je možno přidat kapku methylenové modří. Preparáty se pozorují imerzním objektivem s použitím kapky oleje na krycí sklíčko.

Kvasinky

Pro měření velikosti kvasinek se připravuje preparát stejně jako pro bakterie, nativní preparát nebo fixovaný preparát barvený methylenovou modří.

Nativní preparát kvasinek se připraví aseptickým přenesením kapky tekuté kultury kvasinek (příp. se zhotoví suspenze z části kolonie vyrostlé na pevné půdě v kapce destilované sterilní vody) pomocí vyžíhané a ochlazené očkovací jehly na ožehnuté podložní skličko. Po rozetření se kapka přikryje čistým krycím skličkem tak, aby v preparátu nebyly vzduchové bubliny. Přebytečná kapalina se odsaje filtračním papírem. Kvasinky se nejdříve pozorují při celkovém zvětšení 400 – 600 x a sleduje se tvar buněk a způsob vegetativního rozmnožování.

Plísně

Při charakterizaci plísní je třeba provádět měření jednotlivých orgánů. Nejčastěji se používá preparátů laktofenolových. Laktofenol zabraňuje svraštní a bobtnání buněk. Laktofenol je možno přibarvit anilinovou nebo methylenovou modří. Vodné preparáty se užívají jen pro krátké pozorování (několik min).

Penicilia jsou velmi těžko smáčitelná, takže je velmi obtížné připravit preparát bez vzduchových bublin. Je tedy vhodné připravit preparát do ethanolu, který se postupně nahrazuje vodou nebo laktofenolem (postupně se přidává laktofenol a směs se odsává filtračním papírem).

Do dostatečně velké kapky laktofenolu nebo vody na podložním skličku se přenesou vyžíhanou preparační jehlou část mycelia s rozmnožovacími orgány. Po přiklopení krycího skla bez přitisknutí se odsaje přebytečná kapalina ze stran filtračním papírem. Preparát se pozoruje suchým objektivem při menším zvětšení mikroskopu.

1.1.1.2 Zjišťování tvorby spor u bakterií

Bakteriální spory se velmi těžko barví. Z používaných způsobů barvení spor je nejběžnější:

Negativní barvení spor

Teplem fixovaný preparát se barví (15 – 20 s) krystalovou violetí (viz roztoky na Gramovo barvení), opláchnou vodou, osuší a mikroskopuje (při celkovém zvětšení 1000 x). Zbarveny jsou pouze vegetativní buňky, spory jsou bezbarvé.

Barvení spor dle Wirtze-Conklina

Připravený teplem fixovaný preparát se převrství vodným roztokem malachitové zeleně (5 % hm.) a nechá se působit 2 min. Preparát se pak opatrně zahřívá (1 - 2 min) až do výstupu par (barvivo se nesmí vařit), barvivo se slije a postup se opakuje 3krát. Preparát se opláchnou vodou a dobarví (doba působení 1-2 min) zředěným karbolfuchsinem (viz roztoky pro Gramovo barvení). Preparát se opláchnou vodou a mikroskopujeme v olejové imerzi při celkovém zvětšení 1000 x.

Vegetativní buňky jsou obarveny růžově a spory zeleně (viz Obr. 1). Výhodou této metody je, že jí lze užít i k barvení preparátů barvených už podle Grama.

Obr. 1 Spory *Bacillus* spp. - barveno dle Wirtze-Conklina.

1.1.1.2.1 Stanovení srovnávacího koeficientu

K měření mikroorganismu se používá okulárový mikrometr.

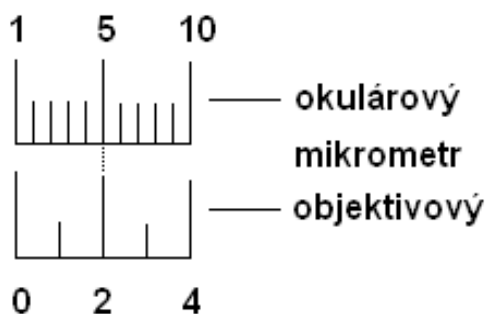
K určení velikosti mikrobů je třeba znát srovnávací koeficient. Ten se stanovuje pomocí objektivového mikrometru. Objektivový mikrometr je podložní sklíčko s úsečkou dlouhou 1 mm rozdělenou na 100 dílků (1 díl objektivového mikrometru = 10 μm). Tento mikrometr se pozoruje pomocí okulárového mikrometru, který je také opatřen úsečkou (1 mm, rozdělen na 10 dílků). Zjišťuje se, kolik dílků objektivového mikrometru se přesně kryje s jedním nebo více dílky okulárového mikrometru.

Např. (viz Obr. 2):

2 dílky objektivového mikrometru = 5 dílků okulárového mikrometru,

20 μm = 5 dílků okulárového mikrometru,

4 μm = 1 dílek okulárového mikrometru = srovnávací koeficient.



Obr. 2 Stanovení velikosti dílků okulárového mikrometru.

Při vlastním měření mikroorganismů se pozoruje místo objektivového mikrometru preparát přes okulárové měřítko a počet dílků odpovídající rozměru mikroorganismu se násobí srovnávacím koeficientem (ve výše uvedeném případě se násobí 4). Měří se délka i šířka mikroorganismu.

Pozor! Nalezený srovnávací koeficient platí pouze při použití stejného objektivového koeficientu, okuláru a délky tubusu. Pro jiné příslušenství je třeba stanovit nový srovnávací koeficient.

Při měření velikosti je vždy třeba měřit větší počet jedinců a z naměřených hodnot vypočítat jejich průměr, jelikož velikost mikrobiálních buněk u téhož druhu závisí na fyziologickém stavu buněk.

1.1.2 Zařazení bakterií podle Grama

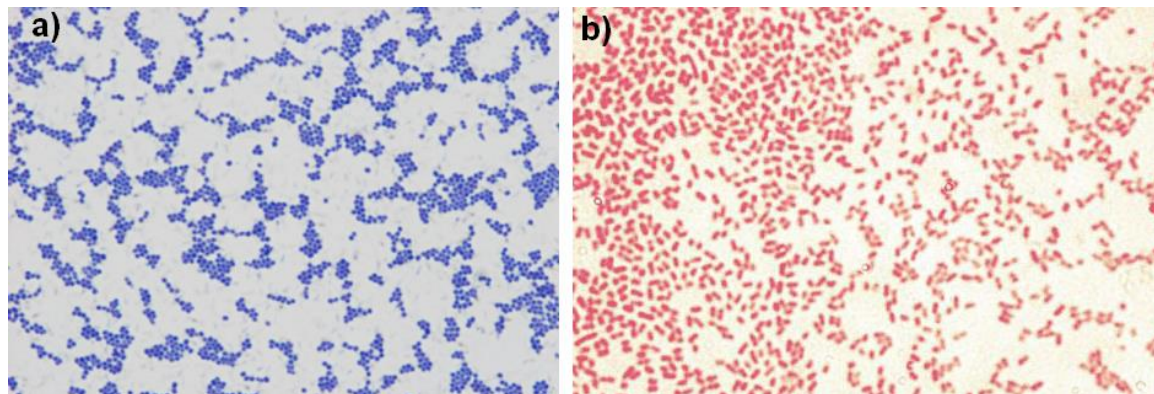
1.1.2.1 Gramovo barvení

Na připravený teplem fixovaný preparát se kápne roztok krystalové violeti a nechá se působit 20 s. Bez opláchnutí preparátu se přidá dostatečné množství Lugolova roztoku, který se slije i s původním barvivem, znovu se nanese Lugolův roztok v dostatečném množství a nechá se působit 20 -30 s.

Preparát se odbarvuje směsí acetonu a ethanolu nebo čistým acetonem, dokud se barvivo odplavuje. Preparát se pak dokonale opláchne destilovanou vodou a dobarvuje zředěným karbolfuchsinem po dobu 30 – 60 s. Nakonec se preparát znovu opláchne a osuší. Mikroskopuje se v olejové imerzi při celkovém zvětšení 1000 x.

Vyhodnocení (viz Obr. 3)

- Grampozitivní mikroorganismy (G^+) jsou modré,
- Gramnegativní mikroorganismy (G^-) jsou růžové,
- Gramlabilní mikroorganismy ($G^{+/-}$): některé jsou grampozitivní, jiné gramnegativní, nebo se buňky barví z části grampozitivně a z části gramnegativně.



Obr. 3 Grampozitivní koky (a) a Gramnegativní tyčinky (b) při celkovém zvětšení 1000 x.

1.1.2.2 KOH test

Stanovení, zda se jedná o grampozitivní nebo gramnegativní bakterie, lze provést pomocí KOH testu. Na podložní skříčko se nanese kapka 3 % hm. roztoku KOH. Do kapky KOH se přidá malé množství suspenze čerstvě nakultivovaných mikroorganismů na agaru a směs se rychle promíchá kličkou nebo párátkem a pokusíme se oddálením kličky (párátka) na vzdálenost 1-2 cm vytáhnout z kapky vlákno. Test se odečítá do 30 sekund po smíchání reagensie s kulturou. Později může být výsledek falešně negativní.

Vyhodnocení

- grampozitivní mikroorganismy (G^+) – vlákna se netvoří (negativní reakce),
- gramnegativní mikroorganismy (G^-) – vlákna se tvoří (pozitivní reakce).

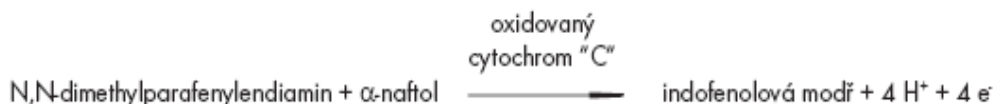
1.1.2.3 Průkaz přítomnosti katalasy

Na podložní skličko se nanese suspenze čerstvě nakultivovaných mikroorganismů na agaru a malé množství 3 % obj. roztoku peroxidu vodíku a vše se promíchá. Pokud je mikroorganismus katalasa pozitivní, dochází k tvorbě bublinek (uvolnění kyslíku). Pokud se bublinky netvoří, mikroorganismus je katalasa negativní.

1.1.2.4 Průkaz přítomnosti oxidasy

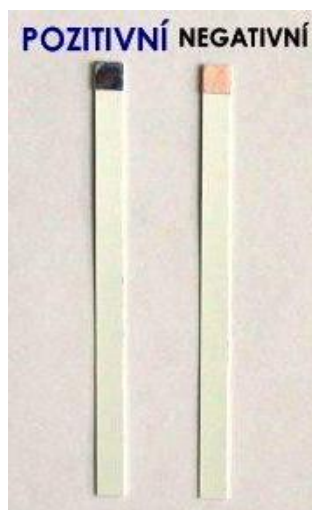
Detekční proužky OXItest (PLIVA-Lachema Diagnostika s.r.o., ČR) jsou určeny pro detekci bakteriální cytochromoxidasy. Přítomnost cytochromoxidasy je detekována barevnou reakcí N,N-dimethyl-1,4-fenylendiaminu s α -naftolem za vzniku indofenolové modři. Za oxidaci či redukci cytochromů je odpovědné železo, obsažené v molekule cytochromu, proto pro provedení testu je nutné použít plastickou nebo platinovou kličku.

Průběh reakce



Citlivost reakce lze zvýšit použitím Činidla pro test OXIDASA: na zónu proužku se před nanesením testovaného kmene přikápně činidlo tak, aby byla reagenční zóna navlhčena bez přebytku. Test se provádí přímým roztěrem čisté bakteriální kultury na impregnovanou zónu proužku, eventuálně otiskem kolonie přímo na kultivační půdě. Reakce se odečte do 1 minuty.

Výsledná barva pozitivní reakce je modrá, příp. slabě modrá; negativní reakce je bezbarvá, růžová, žlutá až žlutozelená (viz Obr. 4).



Obr. 4 Vyhodnocení Oxitestu (důkaz průkazu cytochromoxidasy).

2. Identifikace neznámé bakterie pomocí API testu

API 50 CH je standardizovaný systém spojující 50 biochemických testů ke studiu sacharidového metabolismu mikroorganismů. API 50 CH se používá ve spojení s API 50 CHL Medium pro identifikaci rodu *Lactobacillus* a příbuzných rodů a ve spojení s API 50 CHB/E Medium k identifikaci rodu *Bacillus* a příbuzných rodů, čeledi *Enterobacteriaceae* a *Vibrionaceae*.

Princip

API 50 CH se sestává z 50 mikrozkušavek používaných ke studiu fermentace substrátů patřících do třídy sacharidů a jejich derivátů (heterosidy, polyalkoholy, uronové kyseliny).

Fermentační testy se inokulují bakteriální suspenzí v API 50 CHL Medium nebo API 50 CHB/E Medium, které substráty rehydratují. Během inkubace se fermentace odhalí prostřednictvím změny barvy ve zkumavce, což je způsobeno tvorbou kyseliny za anaerobních podmínek a detekuje se pomocí indikátoru pH přítomném ve zvoleném médiu. První zkumavka, která neobsahuje žádnou aktivní složku, se používá jako negativní kontrola. API 50 CH lze použít k testování dvou dalších cest:

- Oxidace, která se projeví změnou barvy v jamce, což je zapříčiněno aerobní tvorbou kyseliny a detekuje se pomocí indikátoru pH přítomného ve zvoleném médiu.
- Asimilace, která se projeví růstem organismu v jamce, pokud se substrát používá jako jediný dostupný zdroj uhlíku.

V tomto případě bude volba média použitého pro inokulaci proužků záviset na metabolismu a nutričních požadavcích testované mikrobiální kultury.

Příprava testovacích proužků

- *Příprava inkubačního boxu:* Připraví se miska a víčko, na prodlouženou patku misky se zapíše označení testovaného kmene.
- *Inokulace voštinových jamek:* Do voštinových jamek misky se aplikuje okolo 10 ml destilované nebo demineralizované vody, čímž se vytvoří vlhká atmosféra.
- *Příprava testovacích proužků:* z obalu se vyjmou 2 testovací proužky (0-19 a 30-39) a rozdělí se na 4 menší (0-9, 10-19, 20-29 a 30-39) a všechny 4 se umístí na inkubační misku. Z obalu se vyjme menší zbývající testovací proužek (40-49) a uloží se vedle ostatních v inkubační misce, čímž je testovací sada úplná.

Příprava suspenze buněk

- *Promytí buněk:* Čerstvě nakultivované kmeny v MRS bujónu (5 ml) se odstředí (3680 g, 4 °C, 15 min). Supernatant se odlije a suspenze se promyje fyziologickým roztokem (5 ml) a opět se odstředí za stejných podmínek.
- *Příprava inokula:* K suspenzi buněk se přidají 2 ml sterilní vody a suspenze se protřepe. Několik kapek jistého počtu (n) této suspenze se převede do zkumavky s 5 ml sterilované vody tak, aby optická densita odpovídala McFarland standardu 2 - vytvoří se tak suspenze S.
- *Otevření ampule API 50 CHL:* Před použitím se zkontroluje, zda jsou ampule nepoškozeny a nechají se před použitím ohřát na teplotu místnosti. Na ampuli se nasadí

bezpečnostní krytka, konec palce se umístí na rýhovanou část krytky a stiskem směrem dopředu se odlomí vršek ampule.

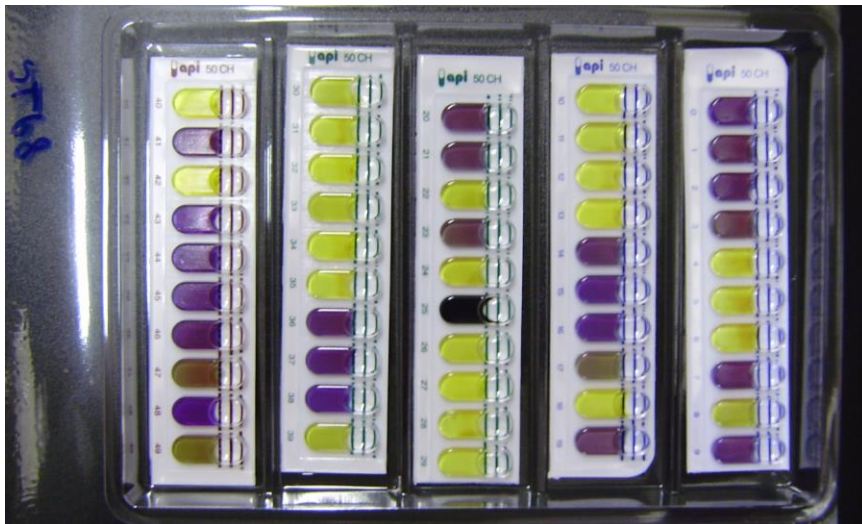
- *Inokulace ampule API CHL*: Objem ampule se přelije do sterilní zkumavky, do zkumavky se převede dvojnásobný počet kapek (2n) suspenze S. Tato suspenze se promíchá a musí se použít ihned po přípravě.

Inokulace testovacích proužků a kultivace

- *Inokulace testovacích proužků*: Inkubační box se mírně nakloní dopředu a špička pipety se postaví proti stěně jamky, aby se zabránilo vzniku bublin při dávkování bakteriální suspenze. Do 50 zkumavek se postupně aplikuje sterilní pipetou bakteriální suspenze po rysku a převrství se sterilním parafinovým olejem.
- *Inkubace testovacích proužků*: Proužky se inkubují při teplotě 37 °C po dobu 24 - 48 h.

Odečítání a interpretace

- *Odečítání testovacích proužků*: Testovací proužky se odečítají po stanovených časech inkubace v závislosti na studovaném mikroorganismu a typu reakce. Pozitivní test odpovídá acidifikaci detekované tak, že indikátor (bromkresolový purpur) obsažený v médiu se zbarví do žluta. U eskulinového testu (zkumavka č. 25) se pozoruje změna barvy z purpurové na černou (viz Obr. 5).
- *Interpretace*: Každý test se interpretuje (pozitivní (+), negativní (-), neurčitý (?)) a výsledek se zapíše do výsledkové tabulky. Výsledky představují biochemický profil, který při zadání do identifikačního softwaru APILab (BioMerieux) poskytuje druhovou identifikaci mikroorganismu.



Obr. 5 Příklad výsledků API testu.

2 IDENTIFIKACE BAKTERIÍ

Při identifikaci se pracuje s čistou bakteriální kulturou u které se hodnotí fenotypové a genotypové vlastnosti.

Fenotypové znaky využívané pro identifikaci bakterií

1. Morfologie buněk – tvar, velikost, vzájemné uspořádání, pohyblivost, barvitelnost podle Grama, acidorezistence (barvením), tvorba pouzdra, tvorba spór, umístění bičíků.

2. Kultivační vlastnosti – morfologie kolonií na agarovém médiu, charakter růstu v tekutém médiu

3. Fyziologické vlastnosti – vztah k volnému kyslíku, typ metabolismu glukózy (O-F test), teplotní optimum pro růst, tolerance k NaCl a těžkým kovům, citlivost k antibiotikům, citlivost k žlučovým solím

4. Biochemická aktivita – hodnotí se produkce enzymů přímo (kataláza, oxidasa, ureáza, koaguláza, beta-galaktozidáza) nebo nepřímo důkazem produktů enzymatického štěpení (zkouška na indol, sirovodík, acetoin), využívání anorganického uhlíku (citrát), redukce dusičnanů, hydrolýza škrobu, želatíny

5. Antigenní struktura – bakteriální buňky jsou složeny z mnoha různých antigenů. Pro praktické použití je možné určovat přítomnost těchto antigenů (specifické povrchové proteiny nebo lipopolysacharidy) sérologickými metodami. Například rod *Salmonella* lze na podkladě rozdílů v antigenní struktuře rozdělit na 2 500 různých sérotypů.

6. Chemické složení lze použít jako doplňující znak pro identifikaci některých bakterií. Jedná se o metody, kterými se stanovuje např. celkový profil proteinů buněčné stěny; elektroforetický profil enzymů, které jsou produkty jednoho genu; dále lze využít chromatografie lipidů, fosfolipidů a mykolových kyselin apod.

1. METODY TESTOVÁNÍ BIOLOGICKÝCH VLASTNOSTÍ BAKTERIÍ

A. Fyziologické vlastnosti:

pohyblivost, vztah k volnému kyslíku a k teplotě, růst v různých koncentracích NaCl a další vlastnosti

B. Biochemická (enzymatická) aktivita:

1. Oxidoreduktasy: katalasa, oxidasa, nitrátreduktasa, fenylalanindeaminasa

2. Hydrolasy: glykosidasy ("pestrá řada cukrů"), proteasy a peptidázy (např. hydrolýza želatiny "želatinasa", elastasa), amidasy (ureasa, arginindihydrolasa)

3. Lyasy: tryptofanasa (zkouška na produkci indolu), cysteindesulfhydrasa (zkouška na tvorbu H₂S), dekarboxylasy (V-P test, MR test, lyzín-dekarboxylasa, ornitín-dekarboxylasa)

Morfologické vlastnosti bakterií a jejich růst na kultivačních půdách není dostačující k přesnému určení izolovaných kultur. Proto v diagnostické praxi používáme další, exaktnější metody, kterými určujeme celý soubor jejich biologických vlastností. Vedle základních fyziologických vlastností (pohyblivost, vztah k O₂) jde zejména o průkaz enzymatické aktivity bakterií, kdy určujeme nejrůznějšími testy přítomnost produktů vznikajících při utilizaci uhlohydrátů, odbourávání bílkovin a jiných substrátů. Testy jsou většinou založeny na barevných reakcích, proto často označujeme sérii takovýchto testů jako tzv. "pestrou řadu".

FYZIOLOGICKÉ VLASTNOSTI

1. Vyšetření na pohyblivost

Lze k tomu použít nativní preparát připravený z vyšetřované kultury, který po překrytí krycím sklíčkem mikroskopujeme v zástinu nebo na temném poli. Nezkušený pracovník může pohyblivost zaměnit s Braunovým pohybem, kdy se bakterie chvějí vlivem dopadu molekul.

Další metodou je stanovení pohyblivosti vyšetřované kultury kultivačním vyšetřením. Vyšetřovaná kultura se přitom očkuje do polotuhé agarové půdy s 0.1-0.5 % agaru a má různé způsoby provedení:

a) do semisolidního (polotuhého) média ve zkumavce očkujeme bakteriální kulturu vpichem do hloubky 4-5 cm, po inkubaci (1-3 dny) pohyblivé kultury prorůstají z vpichu celým médiem a vytvářejí zákal. Nepohyblivé kultury rostou jen ve vpichu. Důležitým diagnostickým znakem může být zjištění závislosti pohyblivosti na inkubační teplotě (např. *Yersinia enterocolitica* je pohyblivá při 22° C a nepohyblivá při 37° C).

b) do polotuhého média ve skleněných trubičkách tvaru písmene "U" očkujeme testované kultury na povrch média jednoho ramene "U" rourky. Jsou-li kultury pohyblivé, tak během inkubace prorůstají médiem do druhého ramene "U" rourky. Metoda má i tzv. Hajnovu modifikaci, kdy stejný princip nahradíme skleněnou trubičkou vloženou do polotuhého média ve zkumavce.

Příklady:

- odlišení blízkých rodů z č. Enterobacteriaceae (laktosapozitivních, VP test pozitivních)

Enterobacter pohyb +

Klebsiella pohyb –

2. Vztah k volnému kyslíku

Hodnotíme:

- a) [kultivací bakteriálního kmene vpichem do anaerobního agaru s resazurinem](#)
- b) [při posuzování typu utilizace glukózy v tzv. O-F testu \(5\) \(oxidace -fermentace\)](#)

ad a) anaerobní agar s resazurinem obsahuje thioglykolát sodný (redukční složku) a resazurin (indikátor kyslíku). Čerstvé médium se rozlévá na vysoko do bujónových zkumavek nebo se dříve připravená média regenerují varem (redukce prostředí média). Testované kultury se kultivují vpichem do celého sloupce média, po 24 h inkubace se hodnotí růst. [Striktně aerobní bakterie rostou v povrchové vrstvě média, která se barví resazurinem do červena, striktně anaerobní bakterie rostou jen v dolní části média](#), fakultativně anaerobní bakterie rostou v celém sloupci média a mikroaerofilní druhy rostou na rozhraní obou vrstev.

ad b) O-F testem zjistíme u testované kultury typ utilizace glukózy a současně můžeme prokázat i vztah k volnému O₂. K testu používáme obohacené agarové médium s glukózou a bromthymolovou modří (indikátor pH), které plníme do zkumavek, rychle zchladíme a do každé druhé zkumavky přidáme sterilní parafinový olej. Testovaný kmen očkujeme vpichem vždy do dvou zkumavek (s parafinovým olejem a bez p. oleje). Po inkubaci hodnotíme rozklad glukózy, který se projeví jako okyselení média (původně zelené médium zežloutne).

Hodnocení:

- **oxidace** - [zežloutnutí média bez parafinového oleje](#)
- **fermentace** - [zežloutnutí média v obou zkumavkách](#)

[Kultura nevyužívá glukózu](#) - u náročnějších druhů bakterií budou média v obou zkumavkách beze změny barvy, méně náročné bakterie štěpí protonový základ média, tím médium alkalizují a to zmodrá.

Příklady:

- striktní aerob = *Bacillus* spp., fakultativní anaerob = *E. coli* (č. Enterobacteriaceae),
- striktní anaerob = *Clostridium tetani*, mikroaerofilní bakterie = rod *Campylobacter*

3. Odolnost bakterií k různým koncentracím NaCl

Jedná se o vlastnost druhově nebo skupinově specifickou. Například stafylokoky rostou v přítomnosti 10% NaCl. Tzv. halofilní jsou např. i vibria.

OXIDOREDUKTASY

1. Zkouka na katalasu

Tento enzym vlastní aerobní a fakultativně anaerobní bakterie, které jsou vybaveny cytochromovým systémem. Hlavní význam tohoto enzymu spočívá ve zneškodňování peroxidu vodíku, který je pro bakterie toxický. Katalasa rozkládá H₂O₂ na vodu a kyslík.

Provedení: z několika modifikací se nejčastěji užívá ponoření bakteriální kultury na bakteriologické kličce do kapky 3-10% H₂O₂ na podložním skle nebo lépe víčku Petriho misky. V pozitivním případě kultura uvolňuje z peroxidu bublinky kyslíku . Je možno přikápnout peroxid přímo na vyšetřované kolonie nebo do čisté bujónové kultury. Příklady:

- a) ve skupině G⁺ koků: r. *Staphylococcus* je katalasa + a rod *Streptococcus* je katalasa -
- b) ve skupině G⁺ tyčinek tvořících endospóry: rod *Bacillus* katalasa + rod *Clostridium* katalasa –
- c) převážná většina G⁻ bakterií je kataláza pozitivní

2. Zkouška na oxidasu a cytochromoxidasu

Při této zkoušce máme na mysli průkaz enzymů nepřímé biologické oxidace, které jsou zapojeny v respiračním řetězci. Jejich průkaz spočívá v oxidaci a barevné změně oxidačního činidla, ke kterému je přidána zkoušená kultura. Rozlišujeme tedy dvě zkoušky, které se liší v použití činidel: oxidázové činidlo: 1% roztok tetrametyl-p-fenylendiamin hydrochloridu v dest. vodě cytochromoxidázové činidlo: 1% r oztok dimetyl-p-fenyl- endiamin chloridu v destilované vodě

Provedení:

- filtrační papírek navlhčíme několika kapkami činidla
- hranou podložního sklíčka (párátkem, plastovou kličkou) odebereme, přeneseme a vetřeme bakteriální kulturu do skvrny činidla na filtračním papíru (je třeba použít čerstvé kultury)

Hodnocení:

V pozitivním případě dochází do jedné minuty k modrému zabarvení oxidázového testu nebo u cytochromoxidasového testu k červenofialovému zabarvení do dvou minut

Příklady:

Oba testy jsou zaměnitelné a mají význam pro diferenciaci zejména G⁻ bakterií. Většina z nich je oxidasa +. Negativní reakci dávají kultury příslušníků č. Enterobacteriaceae a rodu *Acinetobacter*.

3. Zkouška na redukci nitrátů

Bakterie rostoucí v médiu obsahujícím nitráty mohou tyto redukovat na různé složky (nitrity, NH₃ až volný dusík) enzymem nitrátoreduktázou.

Provedení:

vyšetřovanou kulturu očkujeme do nitrátového bujónu (MPB s 0.1% KNO₃) a po 24 h (až 5 dnech) inkubace přidáme 1 - 2 kapky Gries-Ilosvayova reagens (roztok naftylaminu v kys.octové a sulfanilové)

Hodnocení:

- [o redukci nitrátů na nitrity svědčí vznik karmínově červeného zbarvení](#)
- v případě negativního nálezu (bez barevné reakce) přidáme do bujónu zinkový prášek, kterým potvrdíme negativní výsledek tehdy, když dojde k barevné změně (zinek redukoval nezměněný nitrát na nitrit)
- pokud nedošlo k červenému zbarvení ani po přidání zinkového prášku, pak byl již nitrát redukován na NH₃ a dusík a test je pozitivní.

4. Průkaz fenylalanindeaminázy

Některé bakterie metabolizují fenylalanin oxidativní deaminací na kyselinu fenylpyrohroznovou.

Provedení:

vyšetřovanou bakteriální kulturu kultivujeme na šikmý agar s fenylalaninem, po 24 h inkubace přidáme několik kapek 10% roztoku FeCl₃.

Hodnocení:

[přítomnost kys. fenylpyrohroznové se projeví vznikem trávově zeleného zbarvení.](#)
Negativní výsledek se projeví žlutým zbarvením.

Pozitivní výsledek dávají rody Proteus, Providentia a Morganella.

HYDROLASY

1. Glykosidasy

Peptonová voda se obohatí o 0.5-1% substrátu, kterým jsou sacharidy, glykosidy nebo vícesytné alkoholy, a plní se po 2 ml do aglutinačních zkumavek (u glukosy vkládáme do média ještě plynovku, což je malá a dnem vzhůru obrácená zkumavka) a sterilizujeme varem v Kochově hrnci. Média se očkují 1-3 kapkami 24-hodinové kultury vypěstované v MPB. Inkubace trvá 7 dnů a během této doby denně odečítáme výsledky. Jako indikátor pH v médiu slouží bromthymolovou modř (nebo bromkrezolový purpur). [Pozitivní výsledek se projeví žlutým zbarvením média \(okyselení\).](#)

2. ONPG-test (průkaz beta-galaktosidasy)

K provedení testu si připravíme roztok ONPG (ortonitrophenyl-beta-D-galactopyranosid) tak, že 0.08 g ONPG rozpustíme v 15 ml destilované vody a přidáme 5 ml fosfátového pufru (pH 7,0). Do aglutinačních zkumavek dáme 0,25 ml fyziologického roztoku a v něm

suspendujeme 1 kličku 18 - 24-hodinové kultury z Endova agaru a přidáme 1 kapku toluenu. Dobře protřepeme a uložíme na 5 - 10 minut do vodní lázně při 37° C. Pak přidáme 0.25 ml roztoku ONPG a dáme do termostatu při 37° C. Výsledek odečítáme za 30 minut, za 24 hodin a po 2 dnech.

Hodnocení:

Pozitivní výsledek - žluté zbarvení (z ONPG odštěpený nitrofenol)

Negativní výsledek - bez barevné změny

Test je významný pro rozlišení rodů v čeledi Enterobacteriaceae. Umožňuje rozlišení rodů, které opožděně zkvašují laktosu.

PROTEASY A PEPTIDASY

Z těchto enzymů mají význam pro diagnostiku ty, které jsou vylučovány do prostředí. Na proteolytické vlastnosti izolované bakteriální kultury usuzujeme na základě degradace bílkovin (nejčastěji kaseinu, želatiny, elastinu) v diagnostické půdě.

Hydrolyza (rozpuštění) želatiny: želatina se vyrábí z kolagenních tkání (chrupavky a šlachy) a představuje částečně degradovanou bílkovinu. Mikrobiální želatináza želatinu ztekucuje, což má význam pro druhové určení některých bakterií.

Provedení:

- Zkumavková metoda:** do média, což je masopeptonová želatina (pevná půda) očkujeme vyšetřovaný kmen vpichem a během inkubace (14 dnů) denně sledujeme ztekucení (vždy je nutné před posouzením uložit zkumavky do chladničky a test porovnávat s negativní kontrolou.
- Plotnová metoda - podle FRAZIERA:** médiem je masopeptonový agar a přidavkem 0.4% želatiny. Vyšetřované kmeny očkujeme izolačním způsobem a inkubujeme 3 dny při 37° C. Po inkubaci kulturu převrstvíme 5 - 10 ml 1,2% roztoku HgCl₂ a sledujeme její okraje. Želatinolýza se projeví projasněním média v okolí kultivační čáry.
- Test s karbogel-disky:** vyšetřovaný kmen očkujeme do MPB, do kterého přidáme několik karbogelových disků (želatinou spojený práškový uhlík) . želatinolýza se projeví uvolňováním uhlíku z disků do média . Tato modifikace je využívána i v komerčních testech např. API.

Příklad: *Pseudomonas aeruginosa* - rychlá a výrazná želatinolýza

AMIDASY

Pro diagnostiku má z amidáz hlavní význam ureáza a arginindihydrolasa.

1. Vyšetření na ureázu

Tento enzym štěpí močovinu (NH₂)₂CO ve vodném prostředí na CO₂ a NH₃, výrazná alkalizace média je detekována fenolovou červení, která v tekutém prostředí barví médium do červenofialova. Test lze provádět v tekutém médiu, nebo v agarové půdě (Christensenova

[půda](#)). V klasickém provedení hodnotíme test během 5-ti denní inkubace, časté jsou i nejrůznější rychlé modifikace v kombinaci s dalšími testy.

2. Vyšetření na argininhydrolasu: tento enzym štěpí arginin na ornitin, CO₂ a NH₃, který alkalizuje médium. Změnu pH hodnotíme barevným indikátorem ([bromfenolová červeň](#) nebo [bromkrezolový purpur](#)).

LYASY

Jedná se o enzymy, které katalyzují štěpení sloučenin na dva nebo více štěpů. Patří sem zejména tryptofanáza, cysteindesulfhydráza a dekarboxylázy, kterých využíváme k určení druhové příslušnosti vyšetřované bakteriální kultury.

1. Zkouška na indol

Indol vzniká z aminokyseliny tryptofanu účinkem enzymu tryptofanázy. Jako testovací médium se v klasickém provedení testu používá tryptonová voda, u rychlých metod roztok tryptofanu.

Při klasickém provedení tryptonovou vodu očkujeme 24 h bujónovou kulturou vyšetřovaného kmene a inkubujeme 5 dnů, pak přidáme Kovácsovo činidlo a obsah zkumavky mírně protřepeme. [Asi po 1 minutě hodnotíme barvu stoupající emulze a povrchové vrstvy činidla](#).

Hodnocení:

+ karmínově červené zbarvení

- světle žlutohnědé zbarvení

Příklady:

Escherichia coli + *Salmonella spp.* –

2. Zkouška na sirovodík

Sirovodík vzniká postupným odbouráváním aminokyselin s obsahem síry, zejména cystinu. Rozkladný proces je katalyzován enzymem cysteindesulfhydrázou. Indikátorem unikajícího sirovodíku je filtrační papírek napuštěný octanem olovnatým, který se v pozitivním případě barví černě vznikajícím siričkem olovnatým (při použití cystinového bujónu). V pevných médiích (želatinový agar - Iron agar) je tvorba sirovodíku indikována železnatými nebo železitými solemi, které vytvářejí po reakci se sirovodíkem [černé siričky železa](#). [Zkouška na sirovodík bývá součástí různých kombinovaných testů např. Hajnovy půdy \(TSI\)](#).

Příklady:

většina salmonel + *Escherichia coli* –

3. Voges-Proskauerova zkouška na acetoin (VP test)

Acetoin (acetylmetylkarbinol) se tvoří z kyseliny pyrohroznové účinkem pyruátdekarboxylázy. Vzniklý pokles pH lze dokázat v paralelním pokusu s metylovou červení (MR test), takže zde existuje poměrně velký reciproční vztah. To platí zejména pro příslušníky č. *Enterobacteriaceae*, kde má zjišťování tvorby acetoinu největší význam. Pro zkoušku se používá jednotné médium (MR-VP médium), což je vlastně peptonová voda s 0.5% glukózy.

4. Metylčerveňový test (MR test)

Kyselina pyrohroznová, vznikající jako uzlový produkt při disimilaci glukózy, může být využita k tvorbě chemicky neutrálního acetoinu (VP test), nebo měněna na další kyseliny (mléčná, jantarová, octová, mravenčí), které udržují silnou aciditu média (pH 5 a nižší). Nejvhodnějším indikátorem tohoto signifikantního okyselení je metylová červeň.

Provedení VP a MR testu:

Pro oba testy je společné médium (VP-MR), které po naočkování inkubujeme při 37 °C u enterobakterií 48 h, u ostatních 5 dnů. Po inkubaci médium rozdělíme do dvou zkumavek po 1 ml a provedeme oba testy:

VP test - do 1 ml média s narostlou kulturou přidáme BARRITOVO reagens (0.6 ml 5 % alkoholického roztoku alfa naftolu), protřepeme a přidáme 0.2 ml 40 % vodného roztoku KOH, opět protřepeme.

MR test - ke zbytku kultury přidáme 2 kapky indikátoru, t.j. roztok metylové červeně a po mírném protřepání sledujeme změnu barvy.

Hodnocení:

Pozitivní výsledek

VP	test	MR	test
žlutohnědá směs kultury a činidla se barví od svého povrchu směrem dolů rubínově až temně červeně	obsah karmínově červené barvy	zkumavky nabývá	

Negativní výsledek

VP	test	MR	test
směs má žlutohnědý odstín	obsah	zkumavky se barví žlutě	

Poznámka: časový nástup kladné reakce VP testu podléhá individualitě vyšetřovaného kmene. Z tohoto důvodu definitivní hodnocení provedeme až za 48 hodin.

5. Průkaz dekarboxylace lyzínu a ornitínu

Lyzín je štěpen lyzindekarboxylázou (LDC) na kadaverin a CO₂, zatímco ornitín enzymem ornitindekarboxylázou (ODC) na putrescin a CO₂. V obou případech vznikají organické zásady, na něž usuzujeme z alkalizace média - barevné změny indikátoru pH. Za účelem jímání plyných metabolitů je médium převrstveno sterilním parafinovým olejem. Při klasickém provedení testy inkubujeme 4-5 dnů u komerčních mikrotestů 24 hodin nebo i méně. Posouzení je stejné jako u arginindihydrolázy.

Příklady:

LDC + *Salmonella spp*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*

LDC - *Citrobacter spp*.

ODC + *Enterobacter spp.*, *Proteus mirabilis*, *Yersinia enterocolitica*

ODC - *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Yersinia pseudotuberculosis*

KOMBINOVANÉ TESTY (multitesty)

V diagnostické praxi se z ekonomických důvodů objevuje snaha sdružovat některé testy úpravou složení médií tak, aby v jedné zkumavce bylo možno odečíst dvě i více biochemických vlastností, a to již po 24 hodinách inkubace. Jedná se pouze o orientační vyšetření, kterými lze snadno diferencovat běžné střevní patogeny (salmonely, shigely, yersinie).

Nejužívanější

jsou:

1. TSI agar (Triple Sugar Iron, Hajnův agar)
- obsahuje tři cukry (glukózu, laktózu a sacharózu) a železité soli. TSI agar se rozlévá jako šikmý agar do zkumavek a očkuje se jehlou vpichem do sloupce a na šikmou plochu agaru. Původní barva média je červená. V důsledku štěpení cukrů se mění na žlutou v různém rozsahu (podle druhu zkvašovaných cukrů). Zkvašuje-li kultura pouze glukózu, zežloutne pouze sloupec a šikmá plocha zůstane červená (salmonely). Pokud bakteriální kultura zkvašuje současně s glukózou laktózu nebo sacharózu, zežloutne sloupec i šikmina. Dále je možno v této půdě sledovat tvorbu plynu při štěpení glukózy (potrhání sloupce) a tvorbu sirovodíku (černání kolem vpichu).

2. Urea-indol médium - posouzení tvorby ureázy a tryptofanasy

3. MIU půda - lze posoudit pohyb, tvorbu indolu a ureasy

KOMERČNĚ VYRÁBĚNÉ SOUPRAVY PRO IDENTIFIKACI BAKTERIÍ

Řada zahraničních firem vyrábí rychlé a spolehlivé mikrotesty pro rutinní identifikaci bakterií (např. API, BIOLOG a další). U nás fy Pliva-LACHEMA dodává např. soupravy ENTEROTEST - STAFYTEST - STREPTOTEST - ANAEROTEST a další k identifikaci příslušných skupin bakterií.

Jedná se o miniaturizované a standardizované klasické testy ([ukázka API testu k identifikaci příslušníků č. *Enterobacteriaceae*](#)). Řada zkumavek s klasickými testy je nahrazena destičkami s jamkami, které obsahují dehydratovaný substrát a indikátor pH. Vyšetřovaná kultura se ve formě suspenze pipetuje do příslušné řady testů, čímž dojde k jejich rehydrataci. Následuje inkubace po dobu 24-48 h a výsledky se odečítají posouzením barevných změn přímo nebo po přidání příslušného činidla. Vyhodnocení výsledků a provedení identifikace neznámé bakteriální kultury je možné provést porovnáním se znaky jednotlivých druhů bakterií uvedených v tabulkách. To může být v některých případech náročné a nepřesné. Proto vhodnějším postupem je využití tzv. [číselných kódů](#) nebo přímo vyhodnocení počítačovým programem.

Postupy identifikace bakterií

V podstatě rozeznáváme tři postupy identifikace bakterií. První postup je využíván v rutinních diagnostických laboratořích a vyžaduje zkušenost laboratorních pracovníků. Je založen na zhodnocení morfologie kolonií na základních a selektivně diagnostických agaroch s ohledem na potvrzení nebo vyloučení přítomnosti patogenních bakterií. Například při diagnostice salmonel se vytypují podezřelé kolonie na selektivně diagnostickém agaru (XLD agar) a ty se potvrzují několika testy (pozitivní lyzín-dekarboxyláza, negativní tvorba ureázy a beta-galaktosidázy), které potvrdí nebo vyloučí [předběžnou diagnózu](#). Pokud není laboratorní pracovník dostatečně zkušený a výsledek hodnocení morfologie kolonií na agarových médiích není jednoznačný přistoupí se k druhému postupu. Ten spočívá ve využití sady komerčních testů (např. API) k identifikaci [podezřelých kolonií](#). Třetí postup, který není tak závislý na zkušenostech laboratorních pracovníků, využívá postupnou identifikaci tzv. krok za krokem. Tedy po zhodnocení morfologie kolonií na agarových médiích se bakteriální kultura barví postupem dle Grama nebo jiným diagnostickým barvicím postupem, následuje posouzení základních fyziologických vlastností a enzymatické aktivity rychlými testy (např. OF test, pohyblivost, tvorba katalázy a oxidasy). Na základě získaných výsledků se volí další sestavy testů a to jak komerční sestavy, tak i [další doplňkové testy](#).

Způsoby udržení izolovaného bakteriálního kmene v čisté kultuře

1. Dříve hojně používaným a dosud přetrvávajícím způsobem je pravidelné přeočkovávání. Je nejméně vyhovující, poněvadž může zapříčinit těžkosti s kontaminací, se změnami kultur, nebo s jejich uhynutím.
2. Jednoduché metody uchování kmeny v nízkém stupni metabolismu. Používá se minimálního agaru (šikmý nebo semisolidní), nebo jiná máloživná média, jako např. Dorsetova vaječná půda. Sem patří také uchovávání v sušeném stavu na nosičích (např. skleněné částice, želatinové disky).
3. Udržování při nízkých teplotách - většinu odolnějších mikrobů je možno uchovávat pomalým zmrazením na -20°C . Citlivější mikroorganismy je třeba chránit přidáním glycerolu, případně jiných ochranných látek. Zmražené kultury se dají udržovat při -20 až -80°C , případně v kapalném dusíku při -196°C .

4. Lyofilizace - je dnes asi nejrozšířenější metodou na dlouhodobé uchovávání mnohých mikroorganismů. Její princip je v odnímání vody ze suspenze zmražených buněk ve vhodném médiu buď přidáním zmrazovadel a nebo použitím vakua. Ampulky s lyofilizovanými kulturami (33) se mohou uskladňovat i při pokojové teplotě, nebo výhodněji při 4° C. V lyofilizovaném stavu jsou uchovávány i různé kmeny jednotlivých bakteriálních druhů ve sbírkách mikroorganismů, jako např. Česká sbírka mikroorganismů Masarykovy university v Brně (<http://www.sci.muni.cz/ccm>).