



Cultivarea bacteriilor

Cultivarea bacteriilor: creșterea bacteriilor pe medii de cultură în condiții in vitro.

Medii de cultură: complexe de substanțe care permit creșterea și multiplicarea bacteriilor (conțin substanțe nutritive, au pH corespunzător, umiditate corespunzătoare, sunt sterile, trebuie asigurată aero/anaerobioza)

Însămânțare: punerea în contact a unei culturi bacteriene sau a unui produs patologic cu mediile de cultură.

Colonie bacteriană: aglomerare de bacterii vizibilă cu ochiul liber, formată din multiplicarea unei singure bacterii de pe mediul de cultură

Izolare: repicarea unei singure colonii pe alte medii de cultură cu scopul de a obține cultură pură

Clasificarea mediilor de cultură

După consistență:

- lichide (repartizate în eprubete)
- solide (geloza dreaptă, înclinată, în placă)
- semisolide (în eprubete)

După conținutul de substanțe nutritive:

A. Medii naturale: conțin substanțe nutritive în forma lor naturală, fără a fi prelucrate în prealabil:

- mediul cu bilă, mediul cu lapte, mediul cu ouă (Dorset), ser coagulat de bou (Löffler)

B. Medii artificiale:

a. Medii de bază – pentru germeni nepretențioși

- **bulion simplu** – macerat de carne, peptonă, NaCl 0,5%
- **apa peptonată** – peptonă și NaCl 0,5%
- **geloza simplă** – bulion + agar-agar (un extract de alge care asigură consistența solidă, nu are proprietăți nutritive)



b. Medii compuse

- 1) **Medii complexe:** mediu de bază + substanțe organice (sânge, ser, glucoză), sunt folosite pentru cultivarea germenilor pretențioși
 - **geloza sânge**, geloza ser
 - bulion sânge, bulion ser, bulion glucozat

- 2) **Medii de îmbogățire:** conțin agenți selectivi, care inhibă dezvoltarea unor bacterii dar permit creșterea altora
 - mediul **Pike** pentru îmbogățirea streptococilor: bulion glucozat cu cristal violet (inhibă dezvoltarea stafilococilor), azid de Na (inhibă Gram negativii), +/- sânge
 - mediul **hiperclorurat** pentru îmbogățirea stafilococilor: bulion + NaCl 7,5%
 - mediul **OCST** pentru bacilul difteric: ou, cistină, ser, telurit de potasiu

- 3) **Medii speciale:** au compoziție specială, permit cultivarea unor bacterii pretențioase
 - mediul **Löwenstein-Jensen** – pt. cultivarea micobacteriilor – ou, cartofi, verde malachit, asparagină, glicerină
 - mediul **Sabouraud** – pt. cultivarea levurilor: geloză + maltoză/glucoză + antibiotice
 - mediul **Schaedler** – pt. anaerobi – geloză sânge + glucoză
 - mediul **chocolat** – neisserii, hemofili: geloză sânge, sângele se adaugă la geloza topită și răcită la 60-70°C

- 4) **Medii selective și diferențiale:** substanțe selective (inhibă creșterea unor bacterii) + zaharuri/polialcoolii + indicator; sunt folosite pentru izolare și identificare
 - mediul **Leifson** (ADCL – agar dezoxicholat citrat, lactoză) - pt. enterobacterii: săruri biliare + lactoză + roșu neutru;
 - mediul **Levine** (EMB – eosine – methyl blau) - pt. enterobacterii, E. coli: eozină + albastru de metilen + lactoză;
 - mediul **SS** – Salmonella-Shigella: săruri biliare + verde briliant + lactoză + roșu neutru + săruri de fier
 - mediul **MacConkey** – pt. enterobacterii: săruri biliare + roșu neutru + cristal violet + lactoză
 - mediul **Chapman** - pt. stafilococi: NaCl 7,5% + manitol + roșu fenol
 - mediul **ABE** – pentru enterococi Agar + Bilă + Esculină



- 5) **Medii diferențiale:** permit identificarea bacteriilor pe baza unor procese biochimice
- **geloza lactozată:** lactoză + albastru de bromtimol – se studiază fermentarea lactozei
 - **mediul lichid cu indicator Andrade:** un zahăr + indicator Andrade – se studiază fermentarea zaharurilor
 - mediul **SIM** (hidrogen sulfurat, indol, mobilitate): conține agar *semisolid* pentru studiul mobilității, bogat în *triptofan* pentru studiul producerii de indol și conținut de *săruri de fier* pentru detectarea producerii de H₂S
 - mediul **TSI** (triple sugar iron) conține *glucoză, lactoză, zaharoză* pentru studiul fermentării acestora, *sulfat de Fe* pentru detectarea producerii de H₂S
 - mediul **Simmons** – mediu cu citrat pentru studiul folosirii citratului ca unica sursă de carbon
 - **mediul cu uree** – uree + roșu fenol pentru detectarea ureazei

Metode de însămânțare

- Pe medii solide
 - însămânțare prin epuizare (se obțin colonii izolate)
 - însămânțare în sector (se obțin colonii confluențe)
 - însămânțare prin înțepare
- Pe medii lichide
 - omogenizarea unei colonii în mediu lichid

Însămânțarea prin epuizare

Obținerea culturii primare

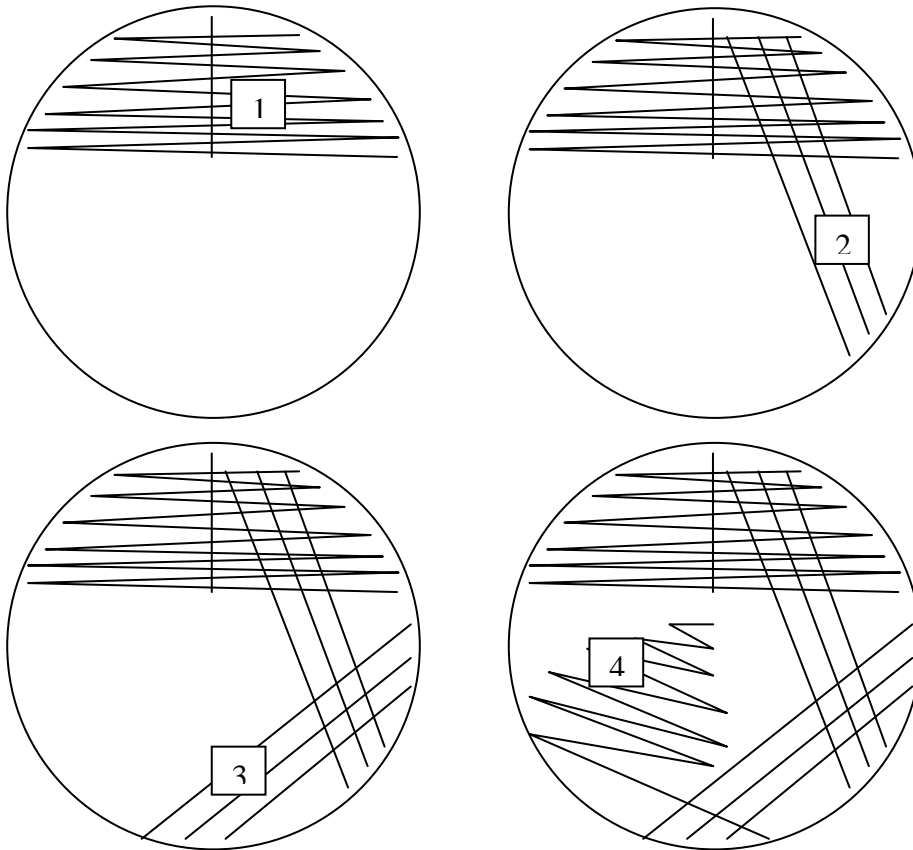
- Se încarcă ansa de platină sterilizată cu produs patologic
- Se descarcă ansa pe mediu de cultură:
 - se însămânțează un prim sector [1]
 - din primul sector însămânțat se trasează câteva striuri paralele în sensul acelor de ceasornic [2]
 - se continuă însămânțarea prin striuri paralele [3], terminându-se printr-un striu în zig-zag [3]



- după fiecare etapă se sterilizează ansa, fără a se încălca în produs patologic!
- În ultimul sector bacteriile sunt dispersate, astfel încât după incubare se vor forma **colonii izolate**

Obținerea culturii pure

- Se replică o singură colonie din cultura primară pe un mediu de cultură proaspăt, fie prin epuizare, fie prin însămânțare în sector



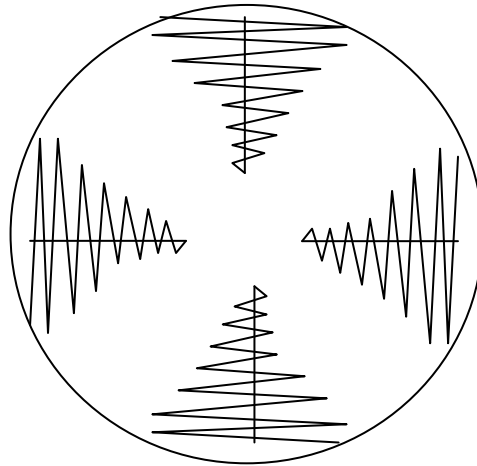


Însămânțarea în sector

Pe o placă pot fi însămânțate mai multe specii bacteriene

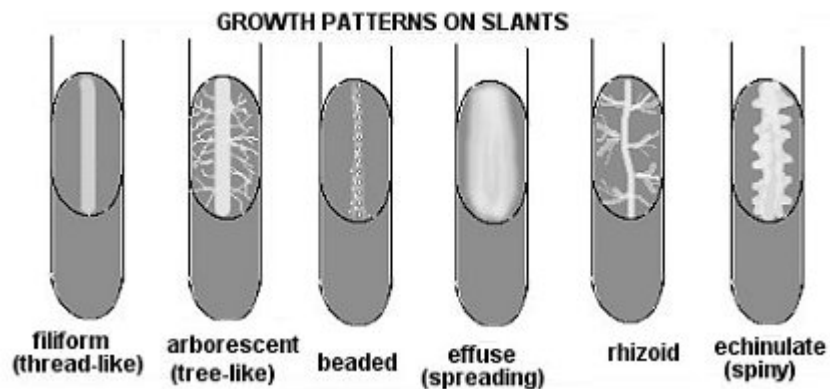
Prin însămânțare în sector nu se obțin colonii izolate !

- Se încarcă ansa de platină sterilizată cu produs patologic
- Se descarcă ansa pe mediu de cultură sub forma unui sector de cerc



Însămânțarea pe medii în coloană înclinată

- Se încarcă ansa de platină sterilizată cu produs
 - Se descarcă ansa pe partea înclinată a mediului de cultură sub forma unui striu
- NU se obțin colonii izolate, bacteriile cresc sub diferite modele

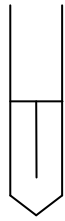




Însămânțarea prin înțepare

Se practică pentru însămânțarea mediilor solide turnate în coloană dreaptă

- Se încarcă acul de inoculare cu produs
- Se înțeapă mediul în direcție verticală pe o distanță de $\frac{3}{4}$ din înălțimea coloanei



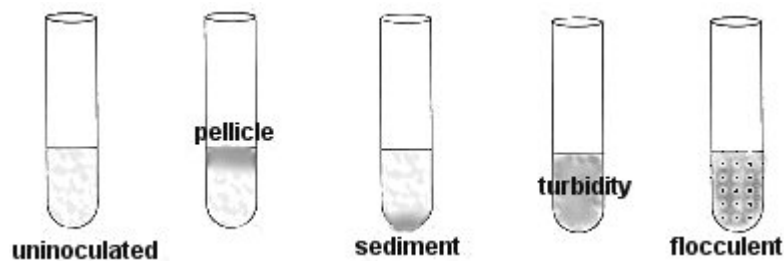
Însămânțarea în mediu lichid

- Se încarcă ansa de platină sterilizată cu produs
- Se omogenizează produsul recoltat în mediul de cultură lichid

Caractere de cultură

a. În medii lichide:

- tulburarea uniformă a mediului: *Staphylococcus*, *Salmonella* etc.
- depozit grunjos sau nisipos la fundul tubului, mediul rămâne clar: *Streptococcus* spp.
- depozit floconos, mediul rămâne clar: *B. anthracis*
- mediul prezintă vâl subțire la suprafață: *Corynebacterium diphtheriae*
- membrană groasă rugoasă, plisată la suprafață, restul lichidului limpede: *Mycobacterium tuberculosis*
- inel aderent pe pereții tubului: *Escherichia coli*
- peliculă la suprafață, sub aceasta mediul este colorat verde-albastru: *Pseudomonas* spp.





b. Pe medii solide

În cazul germenilor cu creștere rapidă (timp de generație 20-30 minute) după 18 ore de incubare la 35-37C, dintr-o singură bacterie ia naștere colonia.

La colonii notăm:

- mărimea
- forma: *rotunde, stelate etc.*
- aspectul marginilor: *regulate, neregulate, cu prelungiri în cap de meduză.*
- suprafața coloniei: *bombată, granulată, plată, cu depresiune centrală, cu ridicătură centrală, sau marginală etc.*
- aspectul: *lucios, mat, mucoid, aspect curgător uleios, vitros etc.*
- consistența: *vâscoasă, filantă*
- dacă se emulsionează ușor sau nu în ser fiziologic
- transparența sau opacitatea coloniei
- pigmentarea coloniei
- apariția unei zone colorate sau incolore în jurul coloniei
- eventual lichefierea mediului

Tipuri de colonii pe medii solide

1. Colonii tip „S” (smooth)

- colonii rotunde
- margini regulate, bombate
- suprafața netedă, translucidă
- reprezintă forma normală pentru majoritatea **bacteriilor patogene**, fiind dotată cu calități optime de structură antigenică și de patogenitate.

2. Colonii tip „R” (rough)

- colonii neregulate
- plate, uscate
- suprafața zbârcită
- forma R reprezintă o formă de degradare, însoțită de modificări structurale profunde, de modificări antigenice și de scăderea virulenței
- este caracteristică, în general, **bacteriilor nepatogene**
- există și **3 excepții** la care forma R caracterizează specii patogene: *Bacillus anthracis, Mycobacterium tuberculosis, Corynebacterium diphtheriae*

3. Forme intermediare: S-R , R-S



4. Colonii tip „M”

- aspect mucos
- foarte mari
- foarte bombate
- foarte lucioase
- cu tendință de curgere și de confluare
- caracteristice bacteriilor care posedă capsulă (de ex. Klebsiella)

5. Colonii untoase

- colonii mari
- rotunde
- suprafață mată
- aspect untos

6. Colonii pufoase

- caracteristice mucegaiurilor

7. Fenomen de cățărare

- Speciile Proteus: pe medii simple (fără substanțe inhibitoare) crește sub forma unui vâl care acoperă toată suprafața mediului
- dacă tulpinile însămânțate pe același mediu de cultură sunt diferite atunci peliculele formate nu se intersectează, apare un spațiu de demarcare, fenomen numit DIENEȘ.
- dacă tulpinile de Proteus sunt la fel atunci cele două pelicule se vor contopi



Studiul caracterelor biochimice ale germenilor

I. Studierea metabolismului glucidic

A. PE MEDII SELECTIV-DIFERENȚIALE

a. Fermentarea manitei pe mediul Chapman

- fermentarea manitei se face cu producere de acid,
- culoarea indicatorului (roșu fenol) virează în galben
- se diferențiază stafilococii
 - patogeni - manitopozitivi
 - nepatogeni – manitonegativi

b. Fermentarea lactozei pe mediul Leifson / MacConkey

- fermentarea lactozei se face cu producere de acid
- culoarea indicatorului (roșu neutru) virează în roșu
- se diferențiază enterobacteriile patogene de nepatogene

B. PE MEDII DIFERENȚIALE

a. Fermentarea lactozei pe geloză lactozată

- fermentarea lactozei se face cu producere de acid,
- culoarea indicatorului (albastru de bromtimol) virează în galben

b. Fermentarea zaharurilor pe mediul lichid cu indicator Andrade

- in mediul lichid se introduce un glucid
- fermentarea lui duce la formare de acid
- culoarea indicatorului (inițial albastru) virează în roșu
- evidențierea producerii de gaz se face cu tub Durham

c. Fermentarea zaharurilor pe mediul TSI

- fermentarea glucozei se studiază pe porțiunea dreaptă
 - fermentarea glucozei se face cu producere de acid,
 - culoarea indicatorului (roșu fenol) virează în galben
- fermentarea lactozei, zaharozei se studiază pe porțiunea înclinată



- fermentarea glucozei se face cu producere de acid,
- culoarea indicatorului (roșu fenol) virează în galben

II. Studiarea metabolismului proteic

A. Producerea de indol

- degradarea proteinelor (triptofanul) se face cu producere de indol,
- indolul în contact cu reactivul Erlich (galben) formează de nitrozoindol (roșu).

Metode de evidențiere:

a. Extragerea indolului cu eter

- în apă peptonată însămânțată + eter + reactiv Kovacs
 - inel roșu – indol pozitiv
 - inel galben – indol negativ

b. Benzi pentru reacția indolului

- benzi de hârtie de filtru impregnate cu reactiv Kovacs (galbene)
- se atașează la dopul eprubetei cu apă peptonată sau mediul SIM
 - banda devine roșie – indol pozitiv
 - banda rămâne galbenă – indol negativ

B. Producerea de H₂S.

- descompunerea proteinelor se poate face cu producere de H₂S,
- H₂S în contact cu săruri de fier sau plumb formează sulfuri de culoare neagră.

Metode de evidențiere:

a. Benzi pentru H₂S

- benzi de hârtie de filtru impregnate cu acetat de plumb (albe)
- se atașează la dopul eprubetei cu apă peptonată însămânțată
 - banda devine neagră – H₂S pozitiv
 - banda rămâne albă – H₂S negativ

b. Pe mediul TSI

- mediul conține săruri de fier și proteine
- se însămânțează prin înțepare
- apariția unui inel negru între porțiunea dreaptă și cea înclinată - H₂S pozitiv



c. Pe mediul SIM

- mediul conține săruri de fier
- se însămânțează prin înțepare
- apariția unui zone negre în jurul înțepăturii - H₂S pozitiv

d. Pe mediul PISU cu cistină

- mediul conține cistină și acetat de plumb
- se însămânțează prin înțepare
- apariția unui halou cafeniu în jurul înțepăturii - H₂S pozitiv

C. Testul urezei.

- se studiază pe mediul cu uree,
- scindarea ureei se face cu producere de amoniac,
- mediul devine alcalin, culoarea indicatorul (roșu fenol) virează în roșu.

III. Evidențierea altor enzime bacteriene

A. Evidențierea catalazei

- catalaza descompune apa oxigenată în apă și oxigen
- oxigenul eliberat se evidențiază prin formarea bulelor de gaz
- metoda: cultura de cercetat se suspendă pe o lamă într-o pic. de H₂O₂
- apariția bulelor – catalază pozitiv

B. Evidențierea oxidazei

- enzimele oxidative acționează asupra unor substanțe producând compuși colorați
- metode de evidențiere: cu tetrametil parafenilen diamină
 - benzi impregnate cu reactiv
 - pe benzile umezite cu apă distilată se depune o parte din colonie
 - culoarea virează în mov închis – oxidază pozitiv
 - reactivul se picură direct pe coloniile suspecte



C. Evidențierea hemolizei

- se face pe geloză sânge
- tipuri de hemoliză:
 - Hemoliza α , incompletă
 - hemoglobina este descompusă doar până la methemoglobină
 - apare ca o zonă verzuie în jurul coloniei.
 - Hemoliza β , completă
 - sângele este descompus total,
 - în jurul coloniei este o zonă clară, transparentă

D. Evidențierea coagulazei

- coagulaza este o enzimă bacteriană extracelulară și determină coagularea plasmei
- metode de evidențiere
 - pe lamă
 - o cantitate mică din colonie se depune într-o picătură de plasmă
 - apariția de coaguli mici - coagulază pozitiv
 - în tuburi
 - în eprubete cu plasmă citratată se adaugă cultura în bulion,
 - se incubează la termostat 24 de ore
 - apariția de coaguli – coagulază pozitiv

IV. Alte teste biochimice

A. Mobilitatea germenilor se studiază pe mediul SIM

- însămânțare prin înțepare:
 - mobilitate negativ - mediul rămâne clar
 - mobilitate pozitiv – mediul se tulbură

B. Folosirea citratului ca sursă de carbon

- se studiază pe mediul Simmons.
- dacă germenii folosesc citratul în metabolism, cresc și alcalinizează mediul,
- culoarea indicatorului (albastru de bromtimol) virează în albastru.



C. Producerea de pigment.

- Pigmenți intracelulari – nu difuzează în mediu, vor colora doar colonia (stafilococul)
- Pigmenți extracelulari – difuzează în mediu, colorează și mediul (Pseudomonas).

D. Mirosul unii germeni au miros caracteristic:

- Proteus – fetid
- Candida – drojdie
- Esherichia coli – varză acră
- Pseudomonas – miros aromat
- Shigella – miros de spermă