

FIZIOLOGIA BACTERIILOR. METABOLISMUL MICROBIAN. NUTRIȚIA ȘI RESPIRAȚIA BACTERIILOR



- **Fiziologia bacteriană** studiază viața și activitățile bacteriilor – nutriția, respirația, creșterea și multiplicarea, condițiile de cultivare a bacteriilor.
- **Metabolismul bacterian** reprezintă ansamblul de reacții biochimice care au loc în celula vie.
 - **Catabolism** – reacții chimice de descompunere a substanțelor complexe în elemente simple, însoțită de degajarea energiei (metabolism energetic)
 - **Anabolism** – reacții chimice de sinteză a substanțelor complexe din elemente simple, necesită energie (metabolism constructiv, de sinteză)

Particularitățile metabolismului bacterian:

1. Este un metabolism necompartimentat, toate procesele metabolice se desfășoară într-o singură celulă
2. Este foarte flexibil, realizându-se prin diverse căi metabolice (bacteriile se adaptează rapid la condițiile mediului)
3. Este foarte intens (viteza reacțiilor este mare)
4. Produsele intermediare din procesele catabolice pot fi utilizate direct în calitate de precursori pentru reacțiile anabolice (amfibolism)

În toate reacțiile metabolice intervin catalizatori proteici specifici - **enzimele**



• Enzimele bacteriene. Caractere generale:

- Substanțe proteice
- Active în limite largi de temperaturi (0-65 C) și de pH (2-9)
- Specificitate de substrat și de acțiune (reacționează cu un substrat catalizând un tip de reacție)
- Specificitatea este determinată de centrul activ al enzimei, complementar cu receptorul de pe substrat
- Nu se modifică în cursul reacției

Clasificarea enzimelor

- I. Constitutive** (permanente)
 - II. Inductive** (adaptive), se sintetizează în prezența substratului (ex.: lactaza)
 - III. Represive**, sinteza lor este inhibată de acumularea în exces a produsului reacției catalizate
- **După locul de acțiune** (*exoenzime, endoenzime*)
 - **După tipul reacției catalizate** (*oxido-reductaze, hidrolaze, transferaze, liaze, izomeraze, ligaze*)
 - **După impactul asupra ma/o**
 - Enzime metabolice
 - **Enzime de patogenitate**, responsabile de modificări patologice ale țesuturilor, celulelor ma/o : *hialuronidaza, colagenaza, plasmocogulaza, hemolizina, fibrinolizina, lecitinaza, proteaze*, etc.



Importanța practică a studierii enzimelor

1. Rol în identificarea și clasificarea bacteriilor (enzimele determină activitatea biochimică specifică a bacteriilor)
2. Unele substanțe chimice, antibiotice interferează cu activitatea unor enzime, inhibând creșterea bacteriilor (tratament)
3. Determinarea mecanismelor patogenizei infecțiilor (unele enzime sunt responsabile de producerea leziunilor în țesutul gazdei)
4. Aplicarea industrială a enzimelor

NUTRIȚIA BACTERIANĂ

- **Nutriția** – modalitățile prin care bacteriile asimilează din mediu substanțele necesare pentru metabolism.
- **Modul** (tipul) de nutriție la bacterii este **absorbtiv**.
- **Nutrienți** – substanțe, soluțiile cărora pot traversa MCP pentru a fi antrenate în metabolismul celulei. Se obțin din **alimente** prin *solviere* (săruri minerale, CO₂, O₂) sau după o *digestie* prealabilă (proteine, polizaharide, lipide).
- La bacterii digestia este extracelulară (la bacteriile G- în spațiul periplasmic)

- Nutrienții servesc în calitate de **material de construcție și sursă de energie** pentru sinteza compușilor și menținerea vieții bacteriei.

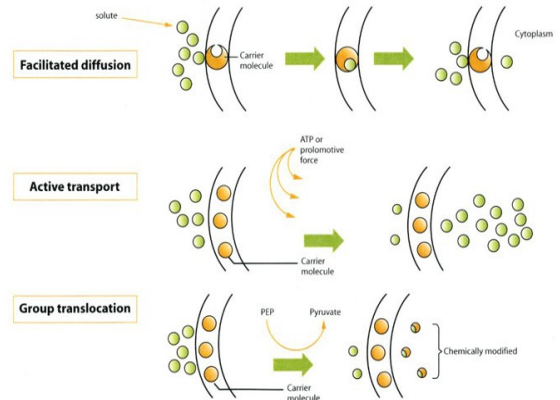
• Transportul transmembranar

1. **Difuzie simplă** (conform gradientului de concentrație, fără utilizarea energiei): O₂, CO₂, acizi grași, nutrienți liposolubili

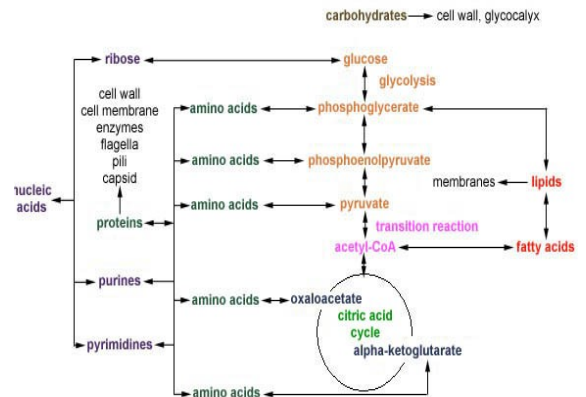
2. **Difuzie facilitată** (conform gradientului de concentrație) – permite transportul transmembranar al moleculelor mari prin intermediul proteinelor de transport specifice - **permeaze**.

3. **Transport activ** (contra gradientului de concentrație, necesită energie). Participă **permeazele și alte proteine de transport** specifice. Nutrienții nu suportă modificări.

4. **Translocație** – substratul este modificat (ex.: fosforilat) în timpul transportului membranar; necesită energie



- Substanțele care au pătruns în citoplasmă sunt descompuse de către enzimele bacteriene conform căilor metabolice proprii fiecărei specii bacteriene (ex.: Embden-Meyerhof, Entner-Doudoroff, ciclul pentozelor, ciclul Krebs, etc). Celula obține energie și precursori care vor fi antrenați în biosinteză (anabolism).
- Excreția metaboliților – difuzie, proteine de transport, liza bacteriei



- **Necesitățile nutritive ale bacteriilor**

- **Necesități elementare**, de bază: **C, H, O, N** în cantități importante; **S, P, Fe, Ca, Mg, K** în cantități mici și urme de **Co, Cu, Zn, Mo**.

Bacteriile **prototrofe** sunt capabile a-și realiza integral sinteza metaboliților esențiali.

- **Necesități specifice**. Bacteriile **auxotrofe** solicită suplimentar compuși organici preformați (**factori de creștere**), care nu pot fi sintetizați de bacterie (ex.: AA, baze purinice, pirimidinice, vitamine). Prezența lor în mediul de cultură este indispensabilă creșterii acestor bacterii.



Clasificarea bacteriilor după sursa de carbon

- Bacterii **autotrofe** – utilizează CO_2 ca unică sursă de carbon (nepatogene)
- Bacterii **heterotrofe** – utilizează carbonul din compușii organici (glucide, acizi grași, alcoolii, etc)
- Bacteriile care utilizează materia organică moartă sunt **saprofite** (reciclarea materiei organice)
- Bacteriile **parazite** (obligate, facultative) trăiesc pe contul organismelor vii, aducându-le prejudicii
- Bacteriile **patogene** reprezintă parazite care afectează grav gazda, provocând maladie sau moarte.



- **Surse de azot**

- AA sau acizi nucleici
- Săruri de amoniu, nitriți, azot atmosferic

- **Surse de substanțe minerale:**

- S - din AA, sulfuri, sulfați;
- P - din fosfați;
- K, Mg, Ca, Na - din săruri minerale;
- Zn, Cu, Mn, Mo – din apă



Clasificarea bacteriilor după sursa de energie

- Bacterii **fototrofe** – utilizează energia solară (fotosint)
- Bacterii **chemotrofe** – folosesc energia degajată din reacțiile chimice de oxido-reducere. Ele necesită un substrat **donor de hidrogen** (e^- și H^+) și un substrat **acceptor de hidrogen**. În transfer participă transportori intermediari de electroni (lanțul respirator, NAD, NADH, FAD, etc.)
- Bacteriile **chemolitotrofe** – donatorul de H este o substanță anorganică
- Bacteriile **chemoorganotrofe** – donatorul de H este o substanță organică (glucoza, lipide...)

Bacteriile patogene sunt chemoorganotrofe



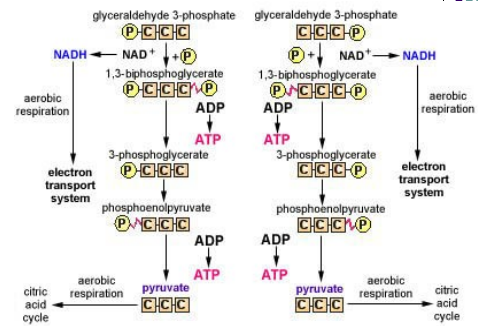
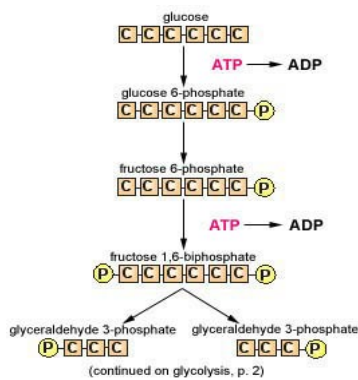
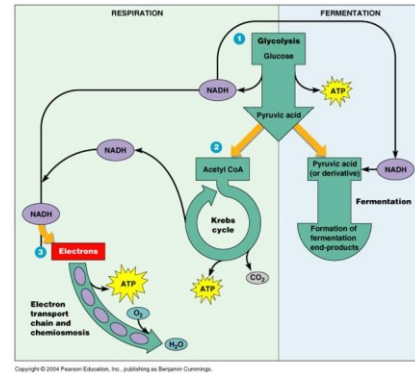
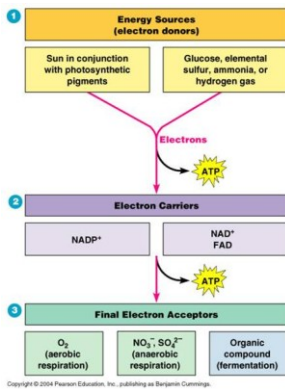
Mecanismele de obținere a energiei la chemoorganotrofe în funcție de acceptorul final de H :

- **Respirație aerobă**. Acceptorul final este oxigenul gazos. Implică lanțul respirator de transport al electronilor asociat MCP. Produs final – H_2O sau H_2O_2 .
- **Respirație anaerobă**. Acceptori finali – compuși anorganici (nitrat, sulfat, S). Transportul de electroni prin lanțul respirator. Produse finale – nitritul, amoniacul, sulfura (în prezența O – H_2O_2).



- **Fermentație**. Substratul organic este metabolizat fără intervenția unui agent oxidant extern. Constă în procese de ox-red care realizează numai o oxidare parțială a substratului, donatorul și acceptorul de H^+ fiind substanțe organice. Astfel se ajunge de la un substrat mai redus la o moleculă mai oxidată (ex.: fermentare lactică, fermentare alcoolică, acidă mixtă, acetoinică, etc). Fermentația se poate desfășura în prezența O_2 , dar fără intervenția acestuia.



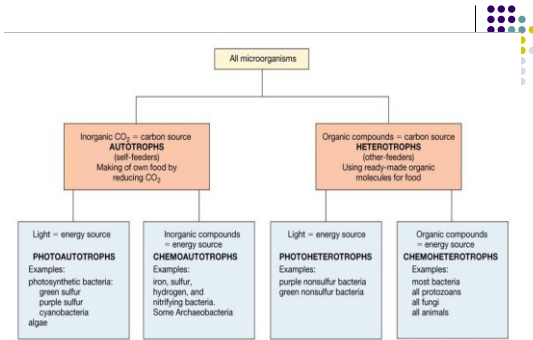


Conservarea energiei

- O parte din energia eliberată se pierde sub formă de căldură sau poate fi utilizată direct sub formă de energie electro-chimică (fpm) la nivelul MCP (ex.: rotația flagelilor, transport transmembranar) sau **stocată** în compuși chimici macroergici "bogați în energie": **ATP** (sintetizat prin fosforilare oxidativă sau fosforilare la substrat), **fosfoenol-piruvat**, **acetilfosfat** și **acetil-CoA**.
- În procesele de respirație se elimină mai multă energie decât din fermentație (în glicoliză dintr-un mol de glucoză - 38 moli ATP, prin fermentație - 2 moli ATP). În procese de fermentare se formează deșeurile rețutate de către celulă.

Clasificarea bacteriilor după sursele de energie și carbon

- I. Bacterii fotoautotrofe (energie solară, CO₂)
- II. Bacterii fotoheterotrofe (en. sol., subst.org)
- III. Bacterii chemoautotrofe
- IV. Bacterii chemoheterotrofe (chemolitoheterotrofe, chemoorganoheterotrofe)



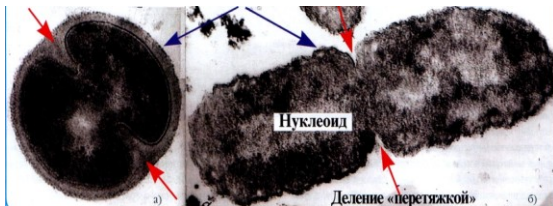
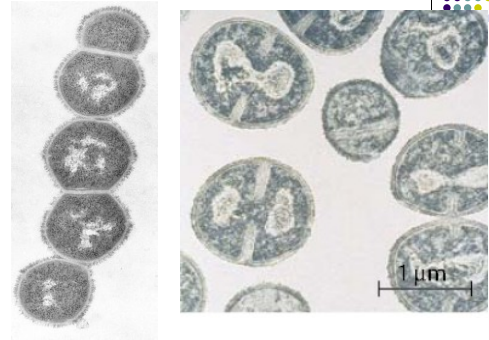
CREȘTEREA ȘI MULTIPLICAREA BACTERIILOR

- **Creșterea** – mărirea coordonată a masei și volumului structurilor bacteriene ca rezultat al proceselor de sinteză
- **Multiplcarea** – creșterea numărului de celule pe o unitate de suprafață sau de volum
 - Diviziune binară
 - Înmugurire (levuri, ciuperci levuriforme)
 - Autoreproducere (virusuri)
 - Spori (micete)
 - Fragmentare (actinomicete)

- **Ciclul celular** – procesele care au loc de la formarea celulei până la următoarea diviziune

1. Faza C – replicarea ADN
2. Faza G – de latență, segregarea cromozomilor
3. Faza D – de diviziune, formarea septului

Replicarea ADN depinde de masa critică a celulei, iar separarea cromozomilor și diviziunea intervin în momentul când celula atinge o lungime - limită



- Perioada dintre 2 diviziuni reprezintă *timpul (perioada) de generație (T_G)*.
- Durata T_G depinde de specie și de condițiile de creștere (condiții optime – viteză maximă)

Bacteria	T _G in vitro (min)	T _G in vivo (ore)
<i>Escherichia coli</i>	20-40	5
<i>Staphylococcus aureus</i>	40	3-5
<i>Vibrio cholerae</i>	10	2-3
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	120-240	24-48

Creșterea bacteriilor în laborator – **cultivare**.

Se cultivă bacteriile pentru izolarea lor din medii naturale (prelevate patologice, alimente, apă, etc).

Izolarea bacteriilor se realizează pentru:

1. Identificarea mi/o (scop de diagnostic)
2. Testarea sensibilității lor față de antibiotice
3. Obținerea unor produși de biosinteză (antibiotice, AA), bioconversie (hormoni steroizi), fermentare (alcooli, acizi organici, etc), producerea vaccinurilor, probioticelor...

Pentru creștere bacteriile au nevoie de nutrienți și condiții fizico-chimice adecvate.

Condițiile (principiile) de cultivare

- Sursă nutritivă adecvată
- Sursă de energie
- Apă
- Temperatura potrivită
- pH adecvat
- Concentrație optimă a oxigenului și a CO₂
- Presiune osmotică adecvată

• **Temperatura de creștere**

Există temperaturi minime, maxime și optime de dezvoltare a bacteriilor. În raport cu temperatura optimă deosebim:

1. Bacterii psihrofile – t° optimă 10-20° C. Cresc și la 0° C.
2. Bacterii mezofile – optimum 30-37° C (limite 15-45° C)
3. Bacterii termofile – optimum 50-60° C (până la 95° C)
4. Bacterii hipertermofile (cresc la 70–110° C)

• **pH**

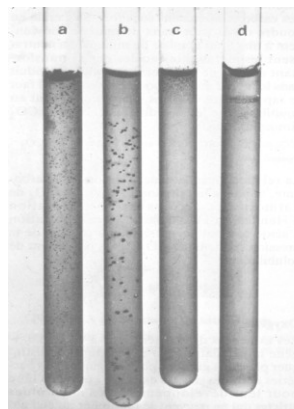
1. Bacterii **neutrofile** (majoritatea, inclusiv cele patogene) – pH 6-7,5
2. Bacterii **acidofile** – pH 2-6 (Lactobacillus)
3. Bacterii **alcalofile** – pH >8 (Pseudomonas, Vibrio)

• **Presiunea osmotică**

1. Bacterii **halotolerante** (osmotolerante) – cresc în concentrații reduse de NaCl (mediu izotonic cu mediul intern al gazdei) – mi/o patogene
2. Bacterii **halofile** – preferă concentrații mari de NaCl (1-30%) – stafilococi, vibrioni (*Vibrio parahaemolyticus*)

• **Oxigenul**

1. Bacterii **strict aerobe** – cresc doar în prezența O₂. Obțin energia prin respirație aerobă
2. Bacterii **microaerofile** – necesită concentrații reduse de O₂ și 2-10% CO₂. Obțin energia prin respirație sau fermentație (Neisseria, Brucella, Campylobacter)
3. Bacterii **strict anaerobe** – cresc doar în absența O₂. Obțin energia prin fermentație sau uneori respirație anaerobă. Toxicitatea O₂ – formarea H₂O₂ a radicalilor superoxizi O₂⁻, sau peroxizi O₂²⁻ pe care anaerobii nu le pot descompune (absența catalazei, superoxid dismutazei, peroxidazei) – Clostridium, Bacteroides
4. Bacterii **anaerobe aerotolerante** – pot crește în prezența O₂, obțin energia prin fermentație, posedă peroxidază (Lactobacillus, streptococi)
5. Bacterii **facultativ anaerobe** – cresc în orice condiții, obțin energia prin respirație sau fermentație



- **Mediile de cultură** – soluții sau substraturi solide care asigură nutriția și condițiile fizico-chimice necesare cultivării bacteriilor. Ele pot fi utilizate pentru cultivarea (izolarea) bacteriilor, testarea sensibilității la antibiotice, stocarea sau transportul culturilor bacteriene.
- **Cerințele față de mediile de cultură**
 - Să asigure necesitățile nutritive și energetice ale bacteriilor
 - Umiditate optimă
 - pH optimă (7,2-7,4) și constant (caracter de tampon)
 - Potențial de oxido-reducere optimă (anaerobi - $rH_2 < 5$, aerobi - $rH_2 > 10$)
 - Să fie izotonice (0,5% NaCl)
 - Să fie sterile și transparente



CLASIFICAREA MEDIILOR DE CULTURĂ

- **După proveniență**
 1. **Empirice, naturale.** Au la bază produse de origine animală sau vegetală (sânge, ser, lapte, ouă, cartof, extracte din carne, cord, creier, ficat, pește, levuri, etc). Compoziția lor chimică precisă nu poate fi controlată
 2. **Sintetice** – includ ingrediente chimice pure, compoziția chimică este cunoscută cu exactitate
 3. **Semisintetice**

- **După consistență**
 1. **Medii lichide** (bulion)– utilizate pentru **obținerea biomasei bacteriene** și a produselor lor (antibiotice, enzime, toxine)
 2. **Medii solide** – conțin 10-15% gelatină sau 2-3% agar-agar (polizaharid extras din alge roșii, t topire 80-100 C, solidificare 42 C). Placa de geloză în cutii Petri este utilizată pentru **izolarea culturilor pure**, geloză înclinată (în pantă) – pentru **acumularea culturilor pure**
 3. **Medii semisolide** – 0,2 – 0,5 % agar-agar. Se utilizează pentru **studierea activității biochimice sau a mobilității bacteriilor**.



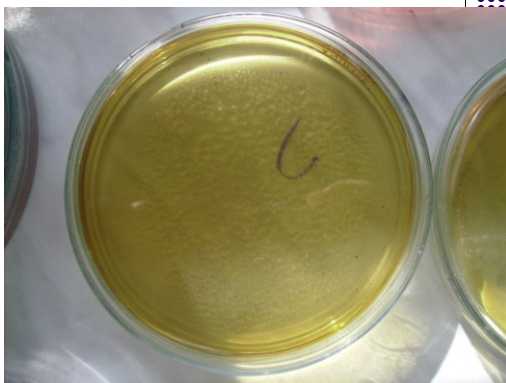
- **După compoziția chimică (complexitate) și destinație**

A. Medii uzuale (universale, simple)

1. **Apă peptonată** (apă+1% peptonă+0,5% NaCl)
2. **Bulion peptonat** – BP (extract apos din carne + 1% peptonă+0,5% NaCl)
3. **Geloza nutritivă** (BP + 2-3% agar-agar)
4. **Gelatina nutritivă** (BP + 10-15% gelatină)

Sunt utilizate pentru creșterea bacteriilor nepretențioase la cultivare

Sterilizarea prin autoclavare: 120 C, 20 min



B. Medii complexe

- I. **Medii electivă** – formate din medii simple cu adăos de componente care permit creșterea mi/o exigente nutritiv (**bulion-ser**, **bulion glucozat**, **geloză-sânge** – *streptococi*, *neisserii*; **ser coagulat** – *corinebacterii*, etc)
- II. **Medii selective** – medii solide cu adăos de componente sau cu condiții fizico-chimice particulare care stimulează creșterea unor specii și inhibă creșterea altor specii (**geloză salină** - *stafilococi*, **geloză alcalină** - *vibrioni*, mediul **Ploskirev** - *Salmonella*, *Shigella*, etc)

Mediile de îmbogățire reprezintă medii selective lichide, utilizate pentru îmbogățirea florei patogene și inhibarea florei de asociație dintr-un prelevat plurimicrobian (ex: materii fecale). Etapă premergătoare însămânțării pe medii selective.

- **Mediul Muller** (BP+Lugol+CaCO₃+hiposulfid)
- **Mediul Kauffmann** (mediul Muller+bilă+verde de briliant) – *Salmonella*
- **Bulion cu selenit** – *Shigella, Salmonella*
- **Apă peptonată alcalină** (pH=8) – *Vibrio cholerae*
- **Kitt-Tarozzi** (BP+0,5% glucoză+bucăți de ficat) – pentru anaerobi



III. Medii diferențial-diagnostice (DD) – permit diferențierea speciilor bacteriene în baza activității lor biochimice (zaharolitice, proteolitice, lipolitice, de oxido-reducere...)

Sunt construite după următoarea schemă:

Bază nutritivă+substrat+indicator (la necesitate)

Medii DD pentru izolarea culturii pure

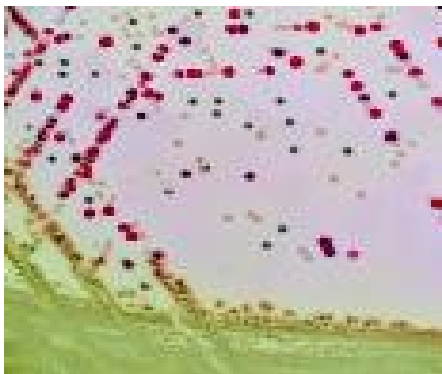
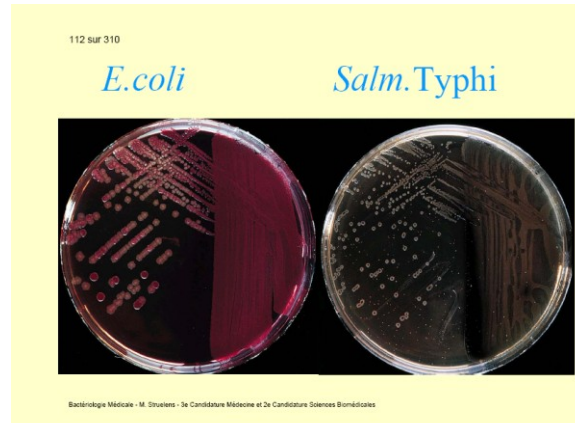
Studierea proprietăților zaharolitice

Endo (geloză+lactoză+fucsină+hiposulfid de Na)

Levin (geloză+lactoză+eozină+albastru metilen)

Ploskirev (geloză+lactoză+roșu neutru+săruri de acizi biliari+verde de briliant)

Coloniile **lactozo-pozitive** vor fi **colorate** (roșii pe Endo, Ploskirev, **albastru-violete** pe Levin)



Studierea proprietăților de oxido-reducere

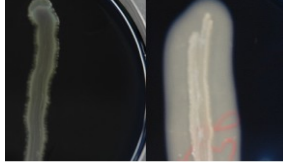
Mediul cu sulfid de Bi – pentru *Salmonella*
(**colonii negre** – reducerea sulfidului în sulfura de Bi)



Mediul Klauberg (geloză-sânge cu telurit de K) –pentru *Corynebacterium diphtheriae* (colonii negre)

Studierea proprietăților lipolitice

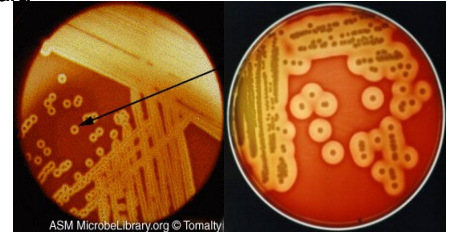
Geloza cu gălbenuș de ou – bacteriile cu lecitinază formează un halou opac în jurul coloniei



Studierea proprietăților hemolitice

Geloza-sânge (geloza+5-15% sânge defibrinat)

În cazul hemolizei în jurul coloniilor apare o zonă clară



Medii DD multitest pentru acumularea culturii pure și identificare preliminară

Russel –geloză+1% lactoză, 0,1% glucoză, indicator

Kligler – identic Russel+sulfat de Fe (detectarea H₂S)

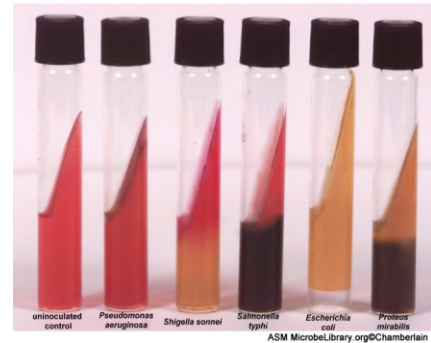
Olkenițki – identic Kligler+1% zaharoză+uree

Indicatorul Andrede – fucsină+NaOH

Scindarea glucidelor (acid - A, acid și gaz - AG) duce la modificarea pH și virajul culorii mediului din roșu în galben.

În pantă se apreciază lactoza/zaharoza (oxidare), în coloană-glucoza (fermentare).

Producerea H₂S – înnegrirea mediului



Medii DD pentru identificarea finală a culturii pure

- **Șirul peștriț Hiss** (lichid sau semi-solid)– un șir de tuburi ce conțin soluții 0,5% de diferite glucide și indicator.

Aprecieră – după modificarea culorii (acid - A) și apariția bulelor de gaz (acid și gaz - AG)

- **Medii cu AA** (lizină, arginină, ornitină) și indicatori

IV. Medii speciale – pentru izolarea unor anumite bacterii (Finn, Popescu, Loewenstein-Jensen –pentru agenții tuberculozei, Sabouraud – fungi)

V. Medii de transport – destinate transportării sau stocării unui material (prelevat), care va fi examinat ulterior.

Mentține în viață bacteriile, fără a favoriza multiplicarea lor.

- **Mediul cu glicerină 30%**

- **Soluție tampon-fosfat**

- **Soluție NaCl 3%**

- **Mediul Cary-Blair**

- **Mediul Stuart** (NaCl, 0,5% agar, tioglicolat de Na, albastru de metilen) – pentru anaerobi, neisserii, etc

- Pentru **cultivarea** bacteriilor o cantitate mică de material ce conține bacterii (**inoculum**) se introduce într-un mediu de cultură (**însămânțare, inoculare**), care ulterior va fi **incubat** în termostat (pentru asigurarea temperaturii optime).
- În timpul incubării (18-24-48 ore.....) bacteriile cresc și se divid, formând o **cultură bacteriană** (*totalitatea bacteriilor acumulate prin multiplicare într-un mediu*).

M.tuberculosis – 3-5 săptămâni

V.cholerae – 6-12 ore

Manifestarea creșterii și multiplicării bacteriilor

- **În mediu lichid**
 - **Turbiditate uniformă**
 - **Formarea unei pelicule** la suprafața mediului (vibrioni, yersinia)
 - **Formarea unui sediment** la fundul tubului sau pe pereți (streptococi, *Bacillus anthracis*)



• Caracteristica coloniilor

Dimensiuni – colonii mici (0,1-1mm), medii (1-2mm), mari (2-3mm)

Contur (marginii) – neted, ondulat, zimțat, lobat, etc

Suprafață – plată, bombată, convexă, ombilicată, etc

Formă – punctiformă, circulară, filamentoasă, neregulată

Culoare (pigmentație) – albă, galbenă, aurie, etc

Densitate – opacă, transparentă, etc

Consistență – cremoasă, untoasă, uscată, mucoidă

- **Cultură pură** – formată din bacterii de aceeași specie (indispensabilă identificării)
- **Cultură mixtă** – compusă din bacterii de specii diferite
- **Tulpină** – populație microbiană constituită din descendenții unei singure izolări în cultură pură, care va fi studiată ulterior.
- **Clonă** – populație care rezultă din multiplicarea unei singure celule

• În mediu solid – formarea coloniilor

Colonie – o aglomerare de bacterii care se dezvoltă dintr-o singură celulă sau un grup de celule (UFC - unitate formatoare de colonii) pe suprafața unui mediu solid

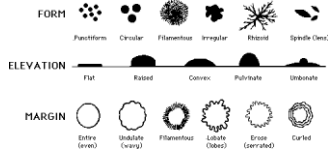
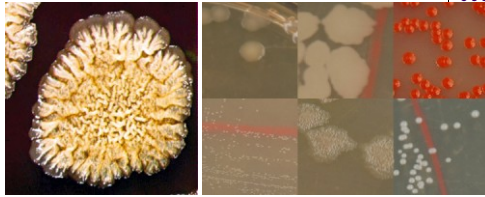
- Fiecare specie bacteriană formează colonii specifice (caracter util în identificare)

• Tipurile de colonii

Colonii S (smooth) – rotunde, netede, umede, lucioase

Colonii R (rough) – margini neregulate, suprafața uscată, rugoasă





Caracterele de cultură ale bacteriilor reprezintă exigențele nutritive (medii, temperatură, pH, aerare, etc), timpul apariției culturii și manifestarea creșterii pe medii lichide și solide

• Dinamica multiplicării bacteriilor în culturi

În funcție de modul de dezvoltare a culturilor bacteriene se disting:

- Culturi discontinue/periodice
- Culturi continue
- Culturi sincrone

Culturile discontinue se obțin la cultivarea bacteriilor în volum limitat de mediu. Astfel de culturi sunt obținute și utilizate în laboratorul microbiologic

Fazele dezvoltării unei culturi discontinue

I. Faza de lag – faza de adaptare la condițiile mediului, bacteriile sunt active metabolic, cresc în dimensiuni, dar nu se divid.

Durata este variabilă (2-4 ore); depinde de starea bacteriei, condițiile mediului, etc

II. Faza logaritmică – bacteriile cresc și se divid cu viteză maximală constantă, curba evoluează exponențial. Bacteriile sunt foarte sensibile la agenți antimicrobieni (culturi utile pentru testarea sensibilității la antibiotice).

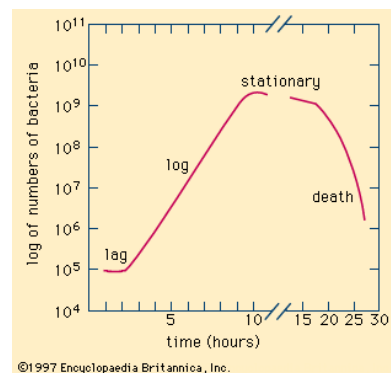
Durata – 8-10 ore

III. Faza staționară – rata celulelor care se multiplică scade treptat, numărul celulelor vii rămâne constant mai multe ore.

Cauza – consumarea nutrienților, acumularea metaboliților toxici.

Morfologia bacteriilor este tipică speciei, apar incluziuni, spori (culturi utile pentru identificare). Sensibilitatea la agenții antimicrobieni scade. Durata – 10-12 ore

IV. Faza de declin (letalitate) – bacteriile mor progresiv



Cultura continuă – se realizează când mediul de cultură este continuu reînnoit și îmbogățit cu oxigen cu evacuarea unei cantități de cultură. Se realizează în *chemostate* sau *turbidostate*, cultura aflându-se permanent în faza exponențială. Se utilizează în microbiologia industrială.

În intestin – culturi continue.

Culturi sincrone – culturi în care bacteriile se divid în același timp

EXAMENUL BACTERIOLOGIC

Examenul bacteriologic constă în inocularea (însămânțarea) prelevatelor pe medii de cultură pentru **izolarea culturilor pure** de bacterii (tulpinilor) care vor fi ulterior **identificate, testate la sensibilitate vis-a-vis de antibiotice**, eventual conservate.

Examenul bacteriologic constă din câteva etape succesive, de la prelevarea (recoltarea) probelor biologice până la remiterea rezultatelor.

Faza pre-analitică (responsabilitatea medicului)

- Prescrierea investigației (în funcție de datele examenului clinic și paraclinic). În ordonanță se fixează identitatea medicului, a pacientului, scopul analizei, manifestările patologice, locul, data apariției, alte date: imunosupresie, tratament cu antibiotice, graviditate, etc.
- Prelevarea probelor
- **Alegerea prelevatului** (de la poarta de intrare, locul multiplicării sau/și din căile de eliminare ale agentului patogen) și **momentul prelevării**

Material de examinat (prelevate) de la pacienți:

- Secreții rino-faringiene, bronșice
- Spută
- Puroi
- Exsudate, transsudate
- Sânge
- LCR
- Urină, secreții genitale
- Mase fecale, bilă, suc duodenal
- Biopsate, punctate
- Material cadaveric, etc

Material de examinat din mediul extern:

- Apă
- Alimente
- Sol
- Aer
- Lavaje
- Vectori, etc

Modul de prelevare (recoltare)

- În recipiente sterile
- Respectând regulile de autoprotecție
- La debutul bolii
- Până la administrarea antibioticelor
- Cantitate suficientă

Transportarea

- Imediată sau utilizând medii de transport, cu respectarea condițiilor speciale după necesitate
- În ambalaj special (cutii metalice, pungi din plastic...)
- În fișa de însoțire să fie indicată identitatea pacientului, vârsta, sexul, natura prelevatului, data, ora prelevării, scopul investigației, ș.a.)

• EXAMENUL BACTERIOLOGIC PENTRU CULTURILE AEROBE

- Prelevatul este supus *examenului macroscopic* (modificarea aspectului, a mirosului, etc) - orientare în diagnostic
- După necesitate, probele sunt supuse pregătirii pentru investigație (diluare, omogenizare, centrifugare, etc)
- *Examinarea microscopică* (preparate native, Gram, Ziehl-Neelsen, Burri-Hins...) – prezența mi/o, forma, cantitatea, G+/-.



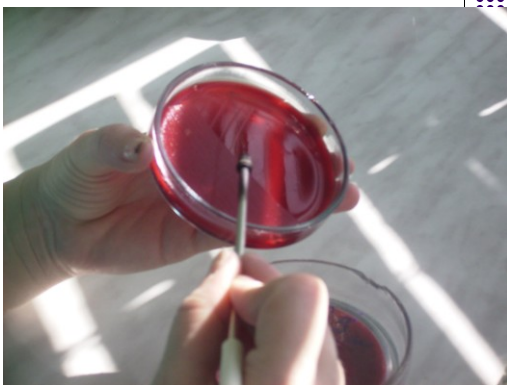
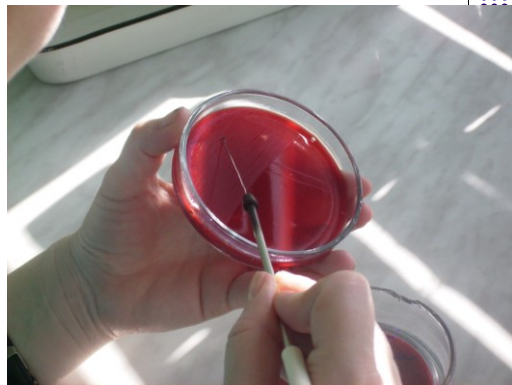
I etapă – IZOLAREA CULTURILOR PURE

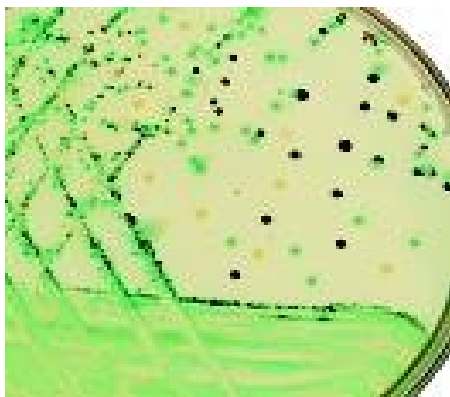
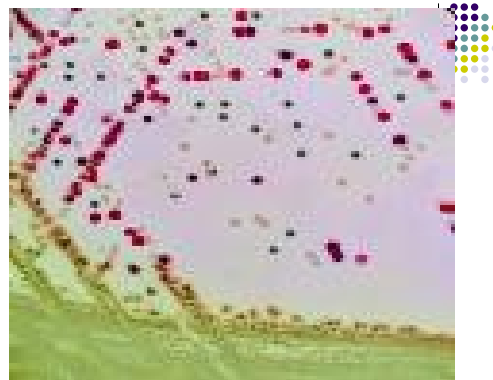
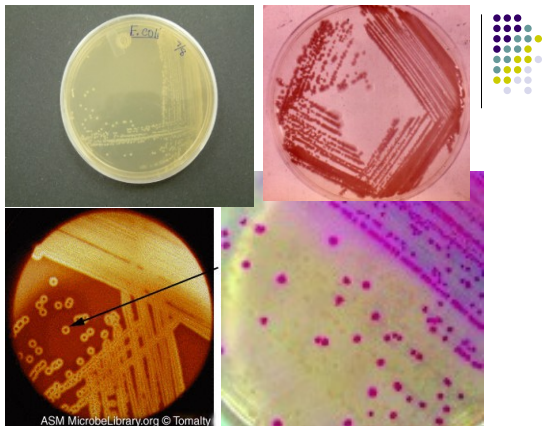
Scopul izolării - de a obține o cultură pură dintr-un melanj de celule bacteriene sau dintr-un produs patologic. O colonie separată constituie o cultură pură.

Tehnici utilizate:

1. Prin epuizarea inoculului pe suprafața gelozei din cutia Petri (însămânțare în striuri paralele, însămânțare în cadrane, etalarea consecutivă pe trei cutii).
2. Metoda diluțiilor logaritmice a inoculului în geloză topită și răcită la 50° C (10^{-1} , 10^{-2} ,...), apoi turnate în cutii Petri sau eprubete.

Incubare în termostat la 37° C, 18-24 h (în funcție de T_G).





Metode speciale de izolare în culturi pure:

- A bacteriilor sporulate: încălzirea prealabilă a prelevatului 80° C – 20 min
- A bacteriilor acido-rezistente: tratarea prealabilă cu acid a prelevatului și neutralizarea ulterioară cu o bază
- A mi/o patogene din prelevate plurimicrobiene: îmbogățirea prealabilă a florei patogene utilizând medii de îmbogățire
- A bacteriilor cu virulență înaltă și pretențioase la cultivare: inocularea la animalele de laborator sensibile

II etapă – ACUMULAREA CULTURII PURE

- Examinarea macroscopică a coloniilor crescute (formă, culoare, dimensiuni, etc)
- Examinarea microscopică (frotiu Gram) a coloniilor suspecte, confirmarea purității culturii
- Repicarea coloniilor suspecte pe geloză în pantă (înclinată) pentru acumularea culturii pure
- Termostat, 37° C, 18-24 ore

III etapă – IDENTIFICAREA CULTURII PURE

- Verificarea purității culturii (frotiu Gram)
 - **Identificarea** culturii pure constă în evidențierea unor caractere specifice ale acestei culturi pentru a o include într-o familie, gen, specie, variantă
- Se studiază caracterele:
- Morfologice
 - Tinctoriale
 - De cultură
 - Biochimice
 - Antigenice (seroidentificarea)
 - De patogenitate
 - Sensibilitatea la bacteriofagi (fago-identificarea)
 - Sensibilitatea la antibiotice

STUDIAREA ACTIVITĂȚII BIOCHIMICE A BACTERIILOR

1. **Activitatea zaharolitică** (șirul Hiss, coagularea laptelui, etc)
2. **Activitatea proteolitică**
 - Degradarea proteinelor native (lichefierea gelatinei sau a serului coagulat, peptonizarea laptelui, etc)
 - Evidențierea enzimelor ce intervin în degradarea AA (decarboxilaze, dezaminaze, desulfhidraze, etc) cu detectarea produsele finale ale descompunerii AA: H_2S , NH_3 , indol, etc...



Depistarea producerii H_2S : formarea sulfurii de fer de culoare neagră în mediile multitest – Kligler, Olkenițki, etc; plasarea unei benzi de hârtie de filtru îmbibată cu **acetat de Pb** deasupra BP în care crește cultura studiată (formarea sulfurii de Pb înnegrește hârtia)

Depistarea **indolului** (produs al hidrolizei triptofanului) – benzi de hârtie îmbibate cu **acid oxalic**. În prezența indolului indicatorul virează în roz.

Depistarea **amoniacului** (ureaza) – hârtia de **turnesol** se colorează în albastru.

Depistarea **catalazei** ($H_2O_2 \dots H_2O + O_2$) (cultura se amestecă cu o picătură de apă oxigenată – apariția bulelor de gaz)



Depistarea **oxidazei** (detectarea prezenței citocromoxidazei din lanțul respirator)

Reactiv – **di (tetra)metil-parafenilen-diamină** (benzi sau rondelile de hârtie îmbibate cu reactiv, creioane, etc)

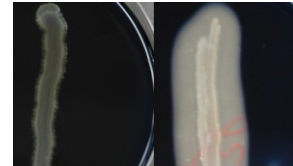
Oxidarea reactivului – culoare violetă-neagră

Oxidazo+ : Neisseria, Vibrio, Pseudomonas

Oxidazo- : Enterobacteriaceae



Depistarea **lecitinazei** – mediu cu gălbenuș de ou 10% - formarea unui halou opac în jurul coloniilor



Depistarea **lipazei** – mediu cu Twin 80 1% – halou opac în jurul coloniilor (precipitarea acizilor grași)

Depistarea **hemolizinei** – geloză-sânge 5-10% - zonă clară în jurul coloniei

Depistarea **ADNazei, fosfatazei**, etc

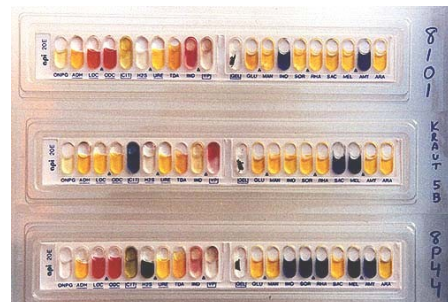
Probele sunt incubate la 37° C, 18-24 h

● Identificarea rapidă

Utilizarea galeriilor miniaturizate standarde (economie de timp, spațiu, material)

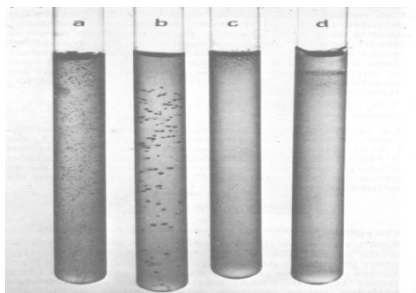
Sistemul API – o galerie din plastic formată din numeroase alveole care conțin fiecare un mediu deshidratat diferit (glucide, AA, etc). Alveolele sunt inoculate cu o suspensie bacteriană testată și incubate. Ulterior la necesitate se adaugă reactiv pentru detectarea metaboliților particulari.

Lectura – conform unui cod de cifre sau computerizat



IV etapă – EVALUAREA REZULTATELOR, FORMULAREA SI ELIBERAREA RĂSPUNSULUI

- Compararea rezultatelor obținute cu caracterele speciilor bacteriene cunoscute pentru a găsi asemănări.
- Exemplu de răspuns: Din proba examinată a fost izolată tulpina de *Corynebacterium diphtheriae*, biovar *gravis*, tox+, sensibilă la, rezistentă la



EXAMENUL BACTERIOLOGIC PENTRU CULTURI ANAEROBE

(clostridiene, neclostridiene)

Condiția principală – cultivare în absența oxigenului

1. Utilizarea mediilor anaerobe (Kitt-Tarozzi regenerat - 100° C, 20 min, răcit, acoperit cu vazelină; însămânțarea în geloză în coloană)
2. Crearea condițiilor de anaerobioză
 - Metoda fizică – utilizarea anaerostatului
 - Metoda chimică – în exicator se introduc substanțe ce fixează oxigenul (pirogalol+bază); utilizarea gas-pachetelor
 - Metoda biologică Fortner – cultivarea concomitentă a aerobilor și anaerobilor



Recoltarea – cu precauție, evitând contactul cu aerul (în seringi, utilizând medii speciale)

I etapă – ÎMBOGĂȚIREA ANAEROBILOR

- Însămânțarea prelevatului în 2 eprubete cu mediul Kitt-Tarozzi regenerat
- Încălzirea unui tub la 80° C, 20 min – distrugerea florei nesporogene
- Incubarea la 37° C, 24-48 h (va avea loc înmulțirea anaerobilor)

II etapă - IZOLAREA CULTURII PURE DE ANAEROBI



- Studierea caracterelor de cultură – tulburarea mediului, descompunerea bucăților de ficat, etc
- Izolarea culturii pure de anaerobi prin metoda **Zeissler** (însămânțarea a 0,1 ml din mediul K-T pe 3 cutii cu geloză-sânge glucozată consecutiv). Incubarea în anaerostat/exicator/gas-pack, 24-48 h

- Metoda **Weinberg** – diluții succesive ale culturii în geloză glucozată lichefiată și aspirarea în tuburi lungi și înguste, închise ermetic. Incubarea în termostat, 24 h



III etapă - ACUMULAREA CULTURII PURE

- Studierea macroscopică a coloniilor
- Examinarea microscopică (frotiu Gram) a coloniilor suspecte
- Repicarea în mediul K-T regenerat pentru acumularea culturii pure
- Incubarea în termostat, 24 h

IV etapă - IDENTIFICAREA CULTURII PURE DE ANAEROBI



- Verificarea purității culturii pure (frotiu Gram)
- Studierea caracterelor culturii pure izolate (cu respectarea condițiilor de anaerobioză)

V etapă - EVALUAREA REZULTATELOR, FORMULAREA ȘI ELIBERAREA RĂSPUNSULUI