Ćwiczenie 4 i 5

Temat: Metody hodowli drobnoustrojów

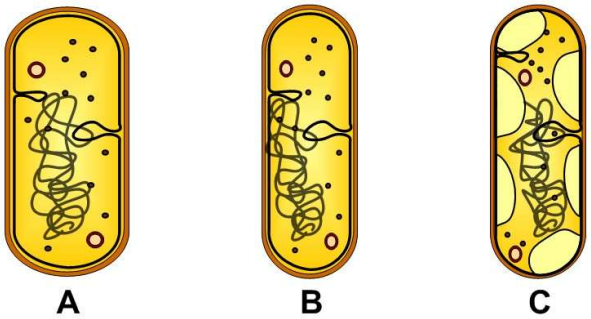
Podłoża hodowlane

Do wykrywania mikroorganizmów, ich namnażania i identyfikacji w warunkach *in vitro* służą podłoża (inaczej pożywki) hodowlane. Są to mieszaniny dobranych składników, zawierające odpowiednie związki odżywcze, które pozwalają na wzrost i namnażanie się wielu rodzajów lub jednej grupy mikroorganizmów. Mogą to być pożywki płynne (bez dodatku czynnika zestalającego - żelującego) lub podłoża stałe, zawierające w składzie agar (1-2%).

Pożywki przygotowuje się w laboratoriach mikrobiologicznych z poszczególnych komponentów (z zachowaniem składu ilościowego) lub (zdecydowanie częściej) z gotowego podłoża rozprowadzanego w postaci sproszkowanej przez firmy biotechnologiczne. Podłoża te każdorazowo dostarczane są z atestem jakościowym (dla każdej serii) oraz certyfikatem żyzności, wybiórczości itp. Ze względu na łatwość użycia cenione są podłoża rozprowadzane na płytkach Petriego czy w sterylnych butelkach lub probówkach.

Cechy prawidłowego podłoża

- ✓ odpowiedni skład (**źródła pierwiastków biogennych**: węgla, azotu, wodoru, tlenu, fosforu, siarki; **źródła energii**; **soli mineralnych** sodu, wapnia, potasu; mikroelementów: manganu, cynku, miedzi, molibdenu; **substancje wzrostowe**: aminokwasy, witaminy) umożliwiający wzrost hodowanych mikroorganizmów;
- ✓ izotoniczność (uzyskanie przez dodatek NaCl ciśnienia zbliżonego do panującego w komórce – w podłożu hipotonicznym (o niższym ciśnieniu osmotycznym, niż w komórkach) może dojść do pęcznienia, a nawet pękania komórek, natomiast w podłożu hipertonicznym (o wyższym ciśnieniu osmotycznym, niż w komórkach) następuje kurczenie się plazmy komórkowej i oddzielanie od ściany komórkowej (plazmoliza);



Rysunek 1 – Komórka w środowisku **A)** hipotonicznym (woda), **B)** izotonicznym (0,85% NaCl), **C)** hipertonicznym (2% NaCl).

- ✓ przejrzystość (z wyjątkiem podłóż zawierających substancje nierozpuszczalne);
- ✓ obecność składników różnicujących i/lub wybiórczych – w podłożach specjalnych;

- ✓ jałowość (metody wyjaławiania omówiono w przewodniku do ćwiczenia 1);
- ✓ odpowiednie pH (najczęściej 7,2-7,4) i potencjał oksydoredukcyjny.

Podział podłóż

✓ ***ze względu na pochodzenie poszczególnych składników***

- **naturalne** – podłoże o nie w pełni zdefiniowanym składzie chemicznym zawierające wyciągi z tkanek roślinnych lub zwierzęcych, np. bulion, brzeczka, mleko, ziemniak, sok owocowy itp.;
- **syntetyczne** – złożone ze związków chemicznych organicznych i nieorganicznych o ściśle określonym i znanym składzie chemicznym (jakościowym i ilościowym), np. podłoże Davisa;
- **półsyntetyczne** – mieszane;

✓ ***ze względu na zawartość składników odżywczych***

- **minimalne** – zawierają tylko składniki pokarmowe, które są niezbędne do podtrzymania wzrostu drobnoustrojów;
- **pełne** – zawierają wszystkie niezbędne substancje odżywcze, umożliwiające dobry wzrost drobnoustrojów (np. bulion odżywczy);
- **wzbogacone** – podłoża z dodatkiem krwi, surowicy lub innych składników, zawierające dodatkowe czynniki wzrostowe, które umożliwiają hodowlę i rozwój drobnoustrojów słabo rosnących *in vitro*;

✓ ***ze względu na konsystencję***

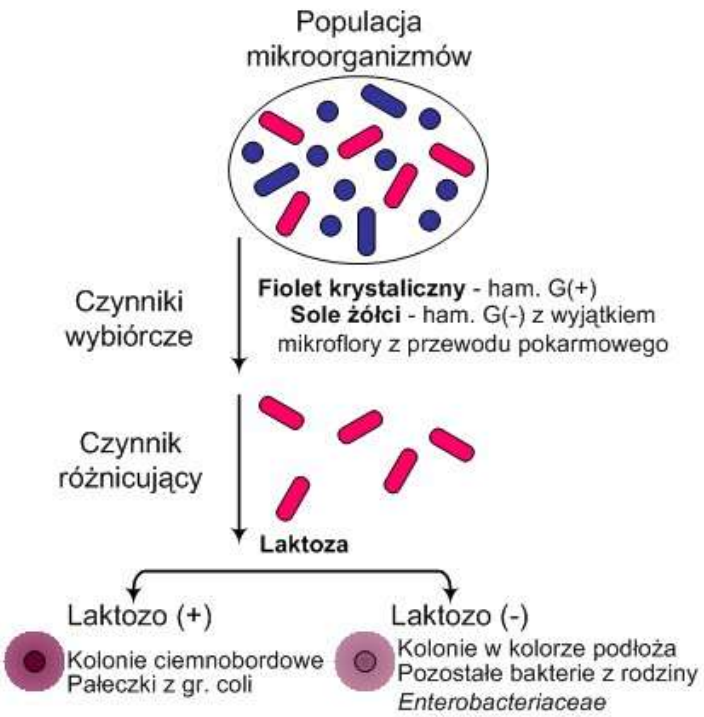
- **płynne** – służą głównie do namnażania drobnoustrojów oraz oznaczania ich obecności;
- **półpłynne** – zawierają 0,1-0,7% agaru, służą m.in. do badania zdolności ruchu bakterii;
- **stałe** – zawierają 1,5-2% agaru, służą m.in. do izolacji drobnoustrojów, ich różnicowania oraz oznaczania liczby i obecności;

Agar (czynnik zestalający) - wielocukier zawierający galaktozę, resztę siarczanową, jony Ca^{+2} i Mg^{+2} (uzyskuje się go z krasnorostów). Upłynnia się w wodzie w temperaturze 95-99ºC, zestala się natomiast w temperaturze 45-49ºC. Drobnoustroje występujące w żywności nie rozkładają go (nieliczne glebowe mogą prowadzić rozkład agaru). W środowisku kwaśnym ulega hydrolizie i traci zdolność do tworzenia żelu.

✓ ***ze względu na przeznaczenie i zastosowanie***

- **namnażające** – służą do otrzymywania hodowli o wysokiej populacji drobnoustrojów badanego szczepu; najczęściej są to podłoża płynne, wśród nich występują podłoża

- **namnażająco-wybiórcze** pozwalające na namnożenie jednego rodzaju lub gatunku drobnoustrojów (przykłady: bulion, brzeczka, podłoże Giolitti-Cantoni do namnażania *Staphylococcus aureus*, podłoże RVS do selektywnego namnażania *Salmonella* sp.);
- **wybiórcze (selektywne)** – podłoża zawierające dodatek substancji hamujących wzrost mikroflory towarzyszącej (substancje wybiórcze/selektywne), na których uzyskuje się wzrost konkretnej grupy drobnoustrojów (przykłady: pożywka z żółcią, laktozą i zielenią brylantową dla pałeczek grupy coli, pożywka z azydkiem sodu, fioletem krystalicznym, glukozą i purpurą bromokrezolową wg Burzyńskiej dla paciorkowców *Enterococcus* sp., podłoże Slanteza i Bartleya z TTC do oznaczania liczby paciorkowców *Enterococcus* sp., YGC-agar – agar z chloramfenikolem dla grzybów);
- **różnicujące** – są to podłoża identyfikujące i diagnostyczne pozwalające na rozróżnienie dwóch typów bakterii pod względem np. określonej zdolności rozkładu substratu różnicującego – np. laktozy, mocznika – (przykłady: podłoże z laktozą i błękitem chińskim wg Demetera dla bakterii kwaszących, podłoże Christiensena do badania rozkładu mocznika), w podłożach tych obok substratu różnicującego znajduje się wskaźnik zmian pH, który zmienia swoją barwę na skutek przeprowadzonej przemiany i wytworzonych produktów kwaśnych lub zasadowych;
- **wybiórczo-różnicujące** – są to podłoża łączące w sobie cechy podłoża wybiórczego i różnicującego, tzn. uzyskuje się w nich wzrost konkretnej grupy drobnoustrojów, którą można zróżnicować pod względem jakiejś cechy, w badaniach żywności podłoża z tej grupy najczęściej stosuje się do wykrywania pałeczek z rodziny *Enterobacteriaceae* (przykłady: VRBL-agar, MacConkey);



Rysunek 2. Efekt posiewu na podłoże wybiórczo-różnicujące na przykładzie podłoża VRBL-agar.

- **transportowe** – stosowane najczęściej w bakteriologii klinicznej, wykorzystywane w czasie transportu prób do laboratorium tak aby układ mikroflory w pobranym materiale nie uległ zmianie przy jednoczesnym zapewnieniu przeżywalności drobnoustrojów.

Składniki wybiórcze (selektywne) - przykłady:

- ✓ hamujące rozwój bakterii Gram-ujemnych: sole żółci (hamują rozwój Gram-ujemnych pałeczek z poza przewodu pokarmowego), dezoksycholan sodu, azydek sodu;
- ✓ hamujące rozwój bakterii Gram-dodatnich: fiolet krystaliczny, zieleń brylantowa, zieleń malachitowa;
- ✓ hamujące rozwój bakterii w podłożach do hodowli grzybów: chloramfenikol, oxytetracyklina;
- ✓ wybiórczość podłoża można zwiększyć poprzez dodatek większej koncentracji NaCl, a także poprzez zakwaszenie podłoża do np. pH 3,5 (w podłożu syntetycznym Davisa do hodowli grzybów).

Wskaźniki zmiany pH – przykłady:

Zakresy zmiany barwy wskaźników w zależności od pH																
Lp.	Wskaźnik	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	Zieleń malachitowa	0-2														
2	Zieleń brylantowa	0-2,6														
3	Czerwień krezolowa	0,2-1,8							7-8,8							
4	Błękit tymolowy		1,2-2,8							8-9,6						
5	Czerwień metylowa					4,4-6,2										
6	Purpura bromokrezolowa						5-6,8									
7	Lakmus						5-8									
8	Błękit bromotymolowy							6-7,6								
9	Czerwień fenolowa								6,4-8,2							
10	Czerwień obojętna							6,8-8								

Przygotowując podłoża należy:

- ✓ używać szkła odpowiednio umytego i wypłukanego, często wyjałowionego;
- ✓ przestrzegać ściśle przepisów przygotowywania pożywek (odważać dokładnie składniki, uważać na kolejność ich dodawania);
- ✓ używać tylko wody destylowanej;
- ✓ ustalić odpowiednie pH podłoża;
- ✓ do wyjaławiania w autoklawie rozlać je w odpowiednich objętościach (nigdy nie więcej niż ¾ objętości kolby, probówki);
- ✓ kolby i probówki zakorkować korkami z waty, ligniny lub z aluminium;
- ✓ wyjałowić.

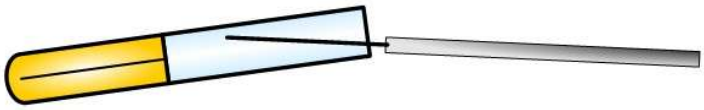
Gotowe do użycia podłoża mogą występować w następującej formie:

- ✓ płynnej w probówkach lub kolbkach;
- ✓ upłynnionej np. upłynnione słupki agaru odżywczego w probówkach, upłynnione podłoża agarowe wykorzystywane w posiewach do płytek Petriego metodą wgłębną;
- ✓ zestalonej w probówkach (słupki i skosy);
- ✓ zestalonej w płytkach Petriego wykorzystywane do posiewów metodami powierzchniową i izolacyjną.

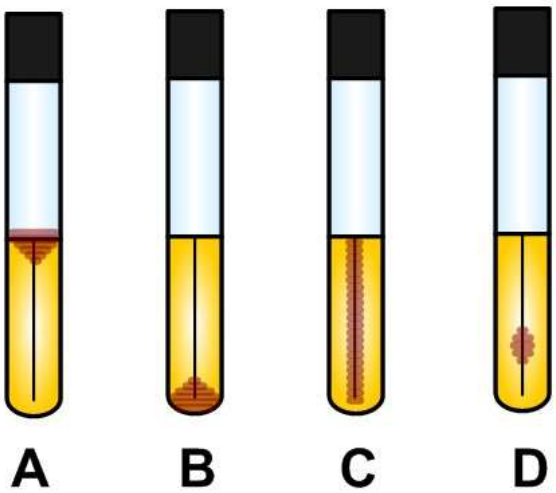
Metody posiewów

W zależności od stosowanego podłoża (jego konsystencji) oraz celu oznaczenia, w analizie mikrobiologicznej stosuje się następujące metody posiewów:

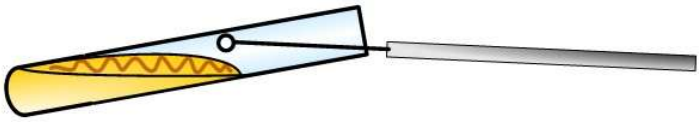
- **posiewy do pożywek płynnych w probówkach** za pomocą ezy (posiewy namnażające, oczko ezy styka się z podłożem);
- przy użyciu pipety – badania ilościowe np. obecności (posiew 1 cm^3 materiału, pipeta nie może zetknąć się z podłożem);
- **posiewy do podłóż zestalonych w probówkach** (**do słupków** metodą kłutą za pomocą igły bakteriologicznej, posiew stosowany np. przy badaniu zapotrzebowania mikroorganizmów na tlen, **na skosy** metodą powierzchniową za pomocą ezy);



Rysunek 3 – Posiew metodą kłutą za pomocą igły bakteriologicznej.

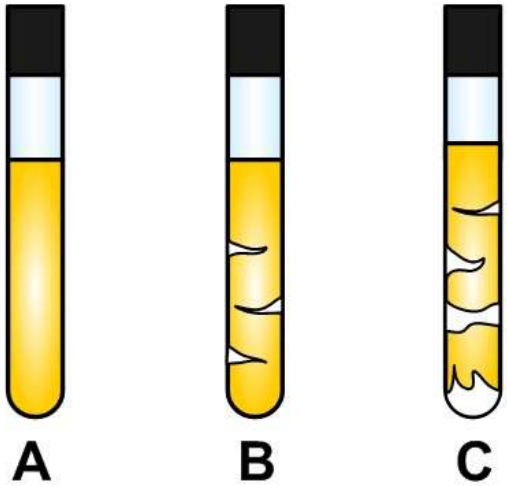


Rysunek 4 - Hodowle na słupkach agarowych bez glukozy **A)** – szczep tlenowy, **B)** – szczep beztlenowy, **C)** – szczep względnie beztlenowy, **D)** – szczep mikroaerofilny.



Rysunek 5 – Posiew na powierzchnię skosu przy użyciu ezy bakteriologicznej.

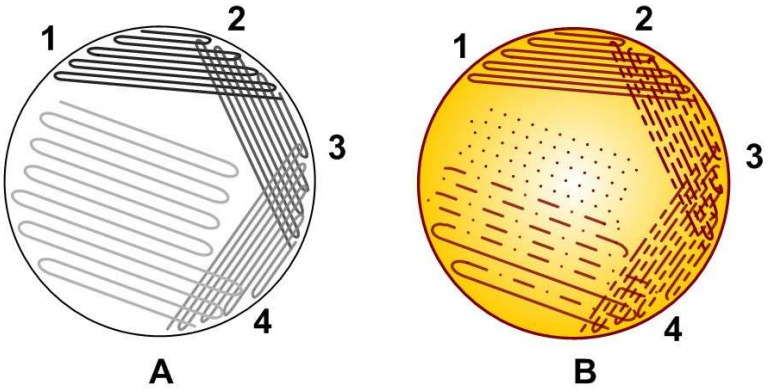
- **posiewy do upłynnionych podłóż agarowych w probówkach** (posiew za pomocą pipety, m.in. tzw. metoda wstrząsana do badania właściwości gazotwórczych szczepu oraz oznaczanie obecności przetrwalnikujących laseczek beztlenowych z rodzaju *Clostridium*;



Rysunek 6 – Badanie właściwości gazotwórczych na podłożu stałym, **A)** szczep nie wytwarzający gazów, **B)** i **C)** szczepy posiadające właściwości gazotwórcze.

posiewy do płytek Petriego

- **metoda wgłębna** (posiew 1 cm^3 materiału do jałowej płytki, następnie zalania posiewu upłynnionym i ostudzonym do ok. 45ºC podłożem agarowym, mieszanie materiału z podłożem), stosowana przy oznaczaniu liczby drobnoustrojów;
- **powierzchniowa** (wylanie do jałowej płytki upłynnionego podłoża, zestalenie podłoża, podsuszenie podłoża w cieplarce, posiew 0,1 cm^3 materiału na powierzchnię podsuszonego podłoża, wtarcie posiewu za pomocą bagietki w kształcie litery L w podłoże), stosowane przy oznaczaniu liczby drobnoustrojów, dodatkowo można określić morfologię uzyskanych kolonii;
- **izolacyjna** (wylanie do jałowej płytki upłynnionego podłoża, zestalenie podłoża, podsuszenie podłoża w cieplarce, posiew materiału za pomocą ezy na tzw. cztery takty, inaczej posiew redukcyjny), stosowana w celu rozizolowania materiału i uzyskania pojedynczych kolonii celem dalszej identyfikacji.



Rysunek 7 – Posiew metodą izolacyjną **A)** technika posiewu, **B)** efekt wzrostu (pojedyncze kolonie na czwartym takcie posiewu).

Metody hodowli

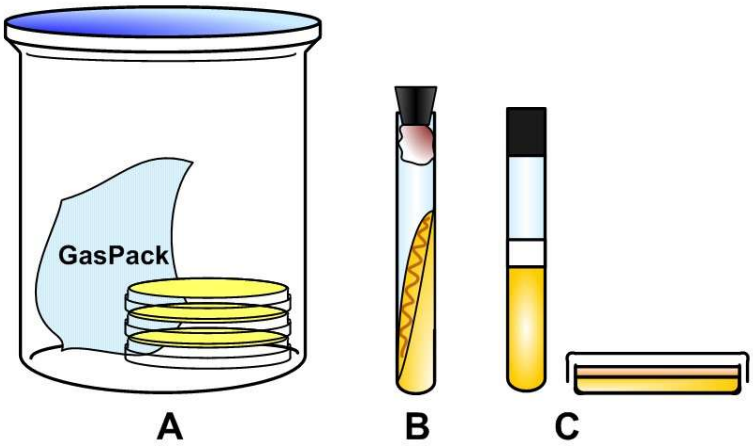
Dostęp tlenu

Zależnie od sposobu oddychania mikroorganizmów, zapewnia się odpowiednie warunki prowadzonych hodowli:

- ✓ tlenowe - dla ścisłych tlenowców i większości względnych beztlenowców;
- ✓ beztlenowe - dla ścisłych beztlenowców;
- ✓ ze zmodyfikowaną atmosferą (5-10% tlenu, zwiększona zawartość CO_2) – dla mikroaerofili.

Sposoby zapewniania beztlenowych warunków hodowli

- ✓ hodowla w wysokim słupie;
- ✓ zalanie posiewów **drugą warstwą** podłoża agarowego lub warstwą agaru wodnego (stosuje się w hodowlach prowadzonych w probówkach i płytkach Petriego) lub zalanie posiewu warstwą jałowego oleju parafinowego (tylko w probówkach);
- ✓ hodowla w **anaerostatach** (szczelnie zamkniętych „słojach", do których przed zamknięciem wkłada się saszetki z substancjami pochłaniającymi tlen – anaeroculty/Gas Packi);
- ✓ hodowla w specjalnych cieplarkach ze zmodyfikowaną atmosferą;
- ✓ hodowla z zastosowaniem tzw. **korka pyrogallolowego** (po posiewie, wystającą nad probówkę część korka z waty odcina się nożyczkami, pozostałą część wsuwa się wgłąb probówki na ok. 0,5 cm, nanosi na nią 0,5 cm^3 nasyconego roztworu sody i 0,5 cm^3 roztworu kwasu pyrogallolowego - kwas w środowisku alkalicznym pochłania tlen - po czym probówkę zamyka się wyjałowionym korkiem gumowym), stosowana do hodowli mikroorganizmów na skosach.



Rysunek 8 - Sposoby zapewniania beztlenowych warunków hodowli **A)** hodowla w anaerostacie, **B)** hodowla z zastosowaniem korka pyrogallolowego, **C)** zastosowanie oleju parafinowego (probówka) i agaru wodnego (płytka Petriego).

Temperatura inkubacji

Hodowle drobnoustrojów prowadzi się w temperaturach optymalnych w czasie 24-72 godzin (bakterie) i 96 godzin (grzyby).

Część praktyczna – ćwiczenie 4:

1. Posiewy celem wyizolowania z materiału *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Saccharomyces cerevisiae*

Materiał stanowią 3 kultury A, B i C – każde stanowisko bada jedną kulturę. Posiewy wykonać do następujących podłóż:

Kultura A

- ✓ bulion z glukozą – posiew ezą,
- ✓ agar odżywczy – posiew metodą izolacyjną,
- ✓ YGC-agar – posiew metodą izolacyjną,
- ✓ inkubacja w temp. 25ºC przez 96 godzin.

Kultura B

- ✓ pożywka z żółcią, zielenią brylantową, laktozą i rurką Dürhama – posiew ezą,
- ✓ agar odżywczy – posiew metodą izolacyjną,
- ✓ podłoże VRBL-agar – posiew metodą izolacyjną,
- ✓ inkubacja w temp. 37ºC przez 48 godzin.

Kultura C

- ✓ pożywka wg Burzyńskiej z azydkiem sodu, glukozą, fioletem krystalicznym i purpurą bromokrezolową – posiew ezą,
- ✓ agar odżywczy – posiew metodą izolacyjną,
- ✓ podłoże Slanetza i Bartleya – posiew metodą izolacyjną,
- ✓ inkubacja w temp. 37ºC przez 48 godzin.

2. Badanie stosunku do tlenu szczepów

Materiał stanowią 3 monokultury: *Pseudomonas fluorescens*, *Escherichia coli*, *Clostridium butyricum* – każde stanowisko bada jeden szczep.

- posiew metodą kłutą hodowli do słupka bulion agar bez glukozy

3. Badanie właściwości gazotwórczych szczepów

Materiał stanowią 3 monokultury: *Pseudomonas fluorescens*, *Escherichia coli*, *Clostridium butyricum* – każde stanowisko bada jeden szczep.

- posiew 1 cm^3 hodowli do upłynnionego słupka bulion agar z glukozą

<u>Warunki inkubacji</u>:
Pseudomonas fluorescens - 30ºC przez 48 godzin,
Escherichia coli - 37ºC przez 48 godzin,

Clostridium butyricum - 37ºC przez 48 godzin

UWAGA! Każda osoba wykonuje samodzielnie zadania z punktów 1; 2; 3 (dla wybranej kultury).

Część praktyczna – ćwiczenie 5

1. Odczytać wyniki posiewów, zestawić je w tabelach i zinterpretować.

Tabela 1

Kultura	bulion z glukozą	pożywka z żółcią, laktozą i zielenią brylantową	pożywka wg Burzyńskiej	agar odżywczy	YGCagar	VRBLagar	podłoże Slanetza
A							
B							
C							

Należy wykonać preparaty barwione metodą Grama z hodowli na pożywkach płynnych celem potwierdzenia ich selektywności.

Tabela 2

Szczep	Właściwości gazotwórcze	Stosunek do tlenu
Pseudomonas fluorescens		
Escherichia coli		
Clostridium butyricum		

2. Obserwacje hodowli monokultur *Pseudomonas fluorescens*, *Escherichia coli*, *Clostridium butyricum* na skosach agarowych inkubowanych w warunkach tlenowych i beztlenowych (pod korkiem pyrogallolowym).