



Ćwiczenie 3 i 4

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 żywności, wybiórczości itp. Ze względu na łatwość użycia cenione są podłoża rozprowadzane na płytkach Petriego czy w sterylnych butelkach lub próbkach.

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;
- 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 redox;
- 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 pęknięcia komórek, natomiast w podłożu hipertonicznym (o wyższym ciśnieniu osmotycznym, niż w komórkach) następuje kurczenie się plazmy komórkowej i oddzielanie od ściany komórkowej (plazmoliza);
- przejrzystość (z wyjątkiem podłoży zawierających substancje nierozpuszczalne).



Podział podłoży

✓ *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 itp.;
- **syntetyczne** – złożone ze związków chemicznych organicznych i nieorganicznych o ściśle określonym i znanym składzie chemicznym (jakościowym i ilościowym);
- **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;
- **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;

Agar (czynnik zestalający) - wielocukier zawierający galaktozę, resztę siarczanową, jony Ca^{+2} i Mg^{+2} (uzyskuje się go z krasnorostów). Upląnnia się w wodzie w temperaturze 95- 99°C, zestala się natomiast w temperaturze 45-49°C. 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 konkretnej grupy drobnoustrojów (substancje wybiórcze/selektywne), na których uzyskuje się wzrost innej 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 Christiensa 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);
- **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 Gramujemnych: azydek sodu, sole żółci (hamują rozwój Gramujemnych pałeczek z poza przewodu pokarmowego, deoksyholan sodu);
- hamujące rozwój bakterii Gramodatnich: 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 zakwaszenia podłoża do np. pH 3,5 (w podłożu syntetycznym Davisa do hodowli grzybów).

Wskaźniki zmiany pH – przykłady:

Purpura bromokrezolowa, czerwień obojętna, błękit chiński, błękit bromotymolowy, czerwień fenolowa

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 $\frac{3}{4}$ objętości kolby, próbówki);
- kolby i próbówki zakorkować korkami z waty, ligniny lub z aluminium;
- wyjałowić.

Gotowe do użycia podłoża mogą występować w następującej formie:

- płynnej w próbówkach lub kolbkach;
- upłynnionej np. upłynnione słupki agaru odżywczego w próbówkach, upłynnione podłoża agarowe wykorzystywane w posiewach do płytek Petriego metodą wgłębną;
- zestalonej w próbówkach (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 próbkach
 - za pomocą ezy (posiewy namnażające, oczko ezy może zetknąć się z podłożem);
 - przy użyciu pipety – badania ilościowe np. obecności (posiew 1 cm³ materiału, pipeta nie może zetknąć się z podłożem);
- ✓ posiewy do podłoży zestalonych w próbkach (do słupków metodą kłutą za pomocą igły bakteriologicznej, posiew stosowany np. przy badaniu zapotrzebowania mikroorganizmów na tlen, na skosy metodą powierzchniową za pomocą ezy);
- ✓ posiewy do upłynnionych podłoży agarowych w próbkach (posiew za pomocą pipety, m.in. tzw. metoda wstrząsana do badania właściwości gazotwórczych szczepu oraz oznaczanie obecności przetrwalnikujących laseczek beztlenowych z rodzaju *Clostridium*);
- ✓ posiewy do płytek Petriego
 - metoda wgłębna (posiew 1 cm³ materiału do jałowej płytki, następnie zalania posiewu upłynnionym i ostudzonym do ok. 45°C podłożem agarowym, mieszanie materiału z podłożem, stosowana przy oznaczaniu liczby);
 - powierzchniowa (wylanie do jałowej płytki upłynnionego podłoża, zestalenie podłoża, podsuszenie podłoża, posiew 0,1 cm³ materiału na powierzchnię podsuszonego podłoża, wtarcie posiewu za pomocą bagietki w kształcie litery L w podłoże, stosowane przy oznaczaniu liczby, dodatkowo można określić morfologię uzyskanych kolonii);
 - izolacyjna (wylanie do jałowej płytki upłynnionego podłoża, zestalenie podłoża, podsuszenie podłoża, posiew materiału za pomocą ezy na tzw. cztery takty, inaczej posiew redukcyjny, stosowana w celu rozizolowania materiału i uzyskania pojedynczych kolonii celem dalszej identyfikacji)



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 CO₂) – 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 próbkach i płytkach Petriego) lub zalanie posiewu warstwą jałowego oleju parafinowego (tylko w próbkach);
- hodowla w anaerostatach (szczelnie zamkniętych „słojach”, do których przed zamknięciem wkłada się saszetki z substancjami pochłaniającymi tlen - anaeroculty);
- hodowla w specjalnych cieplarkach ze zmodyfikowaną atmosferą;
- hodowla z zastosowaniem tzw. korka pyrogalloyowego (po posiewie, wystającą nad próbkę część korka z waty odcina się nożyczkami, pozostałą część wsuwa się w głąb próbki na ok. 0,5 cm, nanosi na nią 0,5 cm³ nasyconego roztworu sodu i 0,5 cm³ roztworu kwasu pyrogalloyowego (kwas w środowisku alkalicznym pochłania tlen), po czym próbkę zamyka się wyjąłowym korkiem gumowym, stosowana w czasie hodowli na skosach).

Temperatura inkubacji

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



Część praktyczna – ćwiczenie 3:

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

Materiał stanowią 3 kultury A, B, C i D – każde stanowisko bada jedną kulturę.

Posiewy wykonać do następujących podłoży:

Kultura A

- bulion z glukozą – posiew eżą,
- agar odżywczy – posiew metodą izolacyjną,
- YGC-agar – posiew metodą izolacyjną,
- inkubacja w temp. 25°C przez 96 godzin.

Kultura B

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

Kultura C

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

Kultura D

- agar odżywczy (2 płytki) – posiew metodą izolacyjną (posiewy wykonać z kultury przed pasteryzacją i po pasteryzacji w temperaturze 80°C przez 15 minut),
- inkubacja w temp. 30°C przez 48 godzin.

2. Badanie stosunku do tlenu szczepów (1/2 grupy)

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 (1/2 grupy)

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



- posiew 1 cm³ hodowli do upłynnionego słupka bulion agar z glukozą

Warunki inkubacji:

Pseudomonas fluorescens - 30°C przez 48 godzin,

Escherichia coli - 37°C przez 48 godzin,

Clostridium butyricum - 37°C przez 48 godzin

Część praktyczna – ćwiczenie 4:

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	YGC-agar	VRBL-agar	podłoże Slanetza
A							
B							
C							
D							

Tabela 2

Szczep	Właściwości gazotwórcze	Stosunek do tlenu
<i>Pseudomonas fluorescens</i>		
<i>Escherichia coli</i>		
<i>Clostridium butyricum</i>		