
Ćwiczenie 3

Identyfikacja bakterii: metody hodowli bakterii i szeregi biochemiczne

1. Hodowla *Escherichia coli* na podłożu płynnym. Krzywa wzrostu bakterii *E. coli* MG1655.

Doświadczenie ma na celu monitorowanie wzrostu dwóch szczepów bakterii metodą spektrofotometryczną oraz dokładne określenie ich liczby metodą seryjnych rozcieńczeń. Należy przygotować hodowlę szczepu *E. coli* MG1655, zaszczipiając 50 ml jałowego bulionu 2.5ml bakterii z hodowli nocnej. Hodowle inkubować w wytrząsarce wodnej w temp 37°C. Co pół godziny (oraz w czasie zero) kolejna para pobiera 2 ml hodowli w celu określenia stopnia wzrostu hodowli poprzez pomiar absorbancji w spektrofotometrze (λ - 600nm). Bakterie z pomiarów 1, 2, 3, 4 i 5 posłużą również do określenia miana bakterii (ich liczby w 1 ml).

2. Obliczanie miana bakterii metodą seryjnych rozcieńczeń

Do 5-ciu ponumerowanych jałowych probówek rozlać po 0.9 ml jałowego roztworu soli fizjologicznej (0.85% NaCl). Do pierwszej probówki dodać 0.1ml hodowli bakteryjnej z odpowiedniego pomiaru Następnie przenieść **0.1 ml** rozcieńczonej **10x** zawiesiny bakteryjnej do następnej probówki i ponownie dokładnie wymieszać. Analogicznie wykonać pozostałe rozcieńczenia (do 10^{-6}). Przy każdym kolejnym rozcieńczeniu miano bakterii zmniejsza się dziesięciokrotnie. **Z trzech ostatnich rozcieńczeń pobrać po 0.1 ml zawiesiny bakteryjnej a następnie dokładnie rozprowadzić jałową głaszczką po powierzchni płytek z agarem wzbogaconym. Płytki inkubować 24 godziny w temperaturze 37°C. Na następnych zajęciach należy policzyć kolonie, które wyrosły na płytkach. Zakładając, że pojedyncza kolonia powstaje z jednej komórki bakteryjnej można **określić liczbę żywych komórek** obecnych w 1 ml badanej hodowli (**miano bakterii**) posługując się następującym wzorem:**

$$N = \frac{n}{R \times V}$$

gdzie: **N** - oznacza miano hodowli bakteryjnej (liczba bakterii w 1 ml)

n - liczbę kolonii, które wyrosły na płytce przy danym rozcieńczeniu

R – rozcieńczenie (10^{-x}) (x - krotność rozcieńczenia, 1,2,3,4,5 itd)

V – objętość posianej próby w ml

3. Metody hodowania bakterii beztlenowych.

Metody historyczne:

a) Oddlenianie biologiczne metodą Fortnera - **DEMONSTRACJA** - **jedna płytka na grupę.**

Płytkę z podłożem agarowym podzielić na dwie części przez narysowanie na spodzie szalki kreski.

Na jednej części posiać bakterie, które są bezwzględnie tlenowcami (*Serratia marcescens*) a na drugiej bakterie beztlenowe (*Clostridium sp.*). Następnie płytkę Petriego przykryć odwróconą przykrywką i zakleić szczelnie plasteliną. Inkubować przez 24 godziny w temperaturze 37°C. Jako pierwsze wyrastają bakterie tlenowe, które w miarę wzrostu zużywają dostępny tlen przygotowując tym samym warunki do rozwoju

bakterii beztlenowych.

Metody historyczne, obecnie nieużywane:

b) Odtlenianie z użyciem świecy

c) Hodowla w próżni z wykorzystaniem anaerostatu

Metody wykorzystywane obecnie:

d) Odtlenianie metodą chemiczną - DEMONSTRACJA - jedna płytką na grupę.

Na płytkę z podłożem agarowym posiać bakterie beztlenowe (*Clostridium sp.*). Z bibuły przygotować małą kopertę, którą następnie napełnić mieszaniną odtleniającą (0.5 g pyrogallolu, 0.25 g węgla potasu, 1 g ziemi okrzemkowej) zwilżoną wodą destylowaną i przykleić do pokrywki płytki Petriego. Następnie płytkę Petriego przykryć odwróconą przykrywką i zakleić szczelnie plasteliną. Inkubować przez 24 godziny w temperaturze 37°C. Mieszanina zredukowanych związków chemicznych pochłania tlen umożliwiając rozwój bakterii beztlenowych.

e) Hodowla na podłożu płynnym z tioglikolanem sodu.

Usunąć tlen z podłoża poprzez zagotowanie i szybkie oziębienie pożywki. Posiać bakterie beztlenowe (*Clostridium sp.*), powierzchnię pożywki przykryć cienką warstwą parafiny (w celu utrudnienia dostępu powietrza) i zamknąć gumowym korkiem. Probówki inkubować 24 godziny w temperaturze 37°C.

Tioglikolan sodu jest związkiem zredukowanym, który utleniając się zużywa tlen obecny w podłożu umożliwiając rozwój bakterii beztlenowych.

f) Hodowla w specjalnych torbach wytwarzających atmosferę sprzyjającą wzrostowi bakterii beztlenowych – DEMONSTRACJA – jedna płytką na grupę

Posiać bakterie na podłożu krwawe lub LA. Umieścić płytkę w szczelnej torbie. Otworzyć aluminiową torebkę zabezpieczającą. Wyjąć generator i natychmiast umieścić go w torbie. Umieścić klamrę zaciskową na torbie, następnie szybko ją zamknąć. Inkubować tak przygotowaną hodowlę w odpowiedniej temperaturze. Drugą płytkę, kontrolną, inkubować w odpowiedniej temperaturze w warunkach tlenowych.

4. Identyfikacja bakterii (szereg biochemiczny) - badanie właściwości biochemicznych pałeczek z rodziny *Enterobacteriaceae*.

Za pomocą ezy posiać bakterie z odpowiedniej zawiesiny (1 szczep na parę):

1. *Escherichia coli*
2. *Proteus mirabilis*
3. *Klebsiella pneumoniae*

na następujące podłoża:

- **Podłoże Kliglera** – badanie zdolności bakterii do rozkładu glukozy, laktozy, wytwarzania siarkowodoru, wytwarzania gazu*
- **Podłoże MIU** – określanie ruchliwości bakterii, badanie zdolności bakterii do wytwarzania indolu i ureazy
- **Podłoże z laktozą** (pod parafiną) – badanie zdolności bakterii do fermentacji laktozy
- **Podłoże z mannitolem** - badanie zdolności rozkładu mannitolu
- **Trypton water** - badanie zdolności bakterii do wytwarzania indolu.
- **Podłoże Kliglera** – badanie zdolności bakterii do rozkładu glukozy, laktozy, wytwarzania siarkowodoru, wytwarzania gazu*

Podłoże przygotowywane w probówkach w postaci półskosów (barwy brązowo - pomarańczowej lub podobnej – interpretacja koloru wedle uznania). Posiew badanego szczepu należy wykonać poprzez wkłucie w części słupkowej oraz po powierzchni skosu. Odczyt powinien być dokonywany po 24 godz.

Rozkład glukozy przejawia się zażółceniem części słupkowej podłoża, natomiast rozkład laktozy – zażółceniem skosu podłoża. A zatem:

- żółty słupek + żółty skos = rozkład glukozy i laktozy
- żółty słupek + skos brązowo – pomarańczowy lub ciemniejszy = rozkład glukozy i brak rozkładu laktozy

- brązowo – pomarańczowy słupek i dowolny skos – wariant w naszym przypadku niemożliwy, gdyż wszystkie pałeczki z rodziny *Enterobacteriaceae* rozkładają glukozę. Wytwarzanie siarkowodoru przejawia się powstawaniem czarnego strątu siarczku żelaza. Wytwarzanie wodoru lub dwutlenku węgla podczas rozkładu cukrów uwidacznia się przez tworzenie pęcherzyków, rozerwanie lub podnoszenie podłoża – jest to tylko podłoże pomocnicze do określania wytwarzania gazu przez bakterie, dlatego brak tych cech nie może być interpretowany jako gaz (-).

- **Podłoże MIU** – określanie ruchliwości bakterii, badanie zdolności bakterii do wytwarzania indolu i ureazy.

Półpłynne podłoże barwy jasno żółto-pomarańczowej (lub wedle uznania). Podłoża nie należy odwracać ani wstrząsać. Posiew badanego szczepu należy wykonać eż przez pionowe wkłucie do końca podłoża. **NIE MIESZAĆ** podłoża eż i **NIE WKŁUWAC SIĘ KILKAKROTNI**E.

Po inkubacji należy w pierwszej kolejności odczytać test na ruchliwość bakterii i wytwarzanie ureazy. Na końcu należy odczytać test na wytwarzanie indolu.

Ruchliwość bakterii: jeśli w podłożu widoczny jest wzrost bakterii tylko wzdłuż linii wkłucia – bakterie nie wykazują ruchu. Jeśli obserwuje się zmętnienie (wzrost) bakterii w całej objętości podłoża, świadczy to o zdolności ruchu przez bakterie.

Wytwarzanie ureazy: zmiana barwy jasno żółto-pomarańczowej na czerwono-różową świadczy o wytwarzaniu ureazy.

Wytwarzanie indolu: po odczytaniu powyższych cech do podłoża należy dodać kilka kropli odczynnika Kovac'sa – pojawienie się czerwono-różowego pierścienia na powierzchni podłoża świadczy o wytwarzaniu indolu.

- **Trypton water** - badanie zdolności bakterii do wytwarzania indolu.

Podłoże płynne barwy lekko żółtej. Zawiesinę lub masę bakteryjną rozetrzeć na ściankach probówki tuż przy powierzchni.

Zawarty w podłożu tryptofan przekształcany jest za pośrednictwem tryptofanazy w indol, który po dodaniu odczynnika Kovac'sa powoduje tworzenie czerwono-różowego pierścienia na powierzchni podłoża

- **Podłoże z laktozą** (pod parafiną) – badanie zdolności bakterii do fermentacji laktozy.

Podłoże płynne barwy fioletowej pod cienką warstwą parafiny. Zawiesinę lub masę bakteryjną rozetrzeć na ściankach probówki tuż przy powierzchni, a następnie zmieszać z podłożem pod parafiną.

Zmiana barwy podłoża z fioletowej na żółtą świadczy o zdolności do fermentacji laktozy.

- **Podłoże z mannitolem** - badanie zdolności rozkładu mannitolu.

Podłoże barwy jasno brązowej. Zawiesinę lub masę bakteryjną rozetrzeć na ściankach probówki tuż przy powierzchni. Zmiana barwy podłoża (prawdopodobnie na różową) świadczy o rozkładzie mannitolu.

5. Przygotowanie jałowo płytek z pożywką LA

Szereg biochemiczny – posiew i interpretacja wyników.

- **Podłoże Kliglera** – badanie zdolności bakterii do rozkładu glukozy, laktozy, wytwarzania siarkowodoru, wytwarzania gazu*

Podłoże przygotowywane w probówkach w postaci półskosów (barwy brązowo - pomarańczowej lub podobnej – interpretacja koloru wedle uznania). Posiew badanego szczepu należy wykonać poprzez wkłucie w części słupkowej oraz po powierzchni skosu. Odczyt powinien być dokonywany po 24 godz.

Rozkład glukozy przejawia się zażółceniem części słupkowej podłoża, natomiast

rozkład laktozy – zażółceniem skosu podłoża. A zatem:

- żółty słupek + żółty skos = rozkład glukozy i laktozy
- żółty słupek + skos brązowo – pomarańczowy lub ciemniejszy = rozkład glukozy

i brak rozkładu laktozy

• brązowo – pomarańczowy słupek i dowolny skos – wariant w naszym przypadku niemożliwy, gdyż wszystkie pałeczki z rodziny *Enterobacteriaceae* rozkładają glukozę.

Wytwarzanie siarkowodoru przejawia się powstawaniem czarnego strątu siarczku żelaza.

Wytwarzanie wodoru lub dwutlenku węgla podczas rozkładu cukrów uwidacznia się przez tworzenie pęcherzyków, rozerwanie lub podnoszenie podłoża – jest to tylko podłoże pomocnicze do określania wytwarzania gazu przez bakterie, dlatego brak tych cech nie może być interpretowany jako gaz (-).

- **Podłoże MIU** – określanie ruchliwości bakterii, badanie zdolności bakterii do wytwarzania indolu i ureazy.

Półpłynne podłoże barwy jasno żółto-pomarańczowej (lub wedle uznania). Podłoża nie należy odwracać ani wstrząsać. Posiew badanego szczepu należy wykonać eż przez pionowe wkłucie do końca podłoża. **NIE MIESZAĆ** podłoża eż i **NIE WKŁUWAC SIĘ KILKAKROTNIĘ**.

Po inkubacji należy w pierwszej kolejności odczytać test na ruchliwość bakterii i wytwarzanie ureazy. Na końcu należy odczytać test na wytwarzanie indolu.

Ruchliwość bakterii: jeśli w podłożu widoczny jest wzrost bakterii tylko wzdłuż linii wkłucia – bakterie nie wykazują ruchu. Jeśli obserwuje się zmętnienie (wzrost) bakterii w całej objętości podłoża, świadczy to o zdolności ruchu przez bakterie.

Wytwarzanie ureazy: zmiana barwy jasno żółto-pomarańczowej na czerwono-różową świadczy o wytwarzaniu ureazy.

Wytwarzanie indolu: po odczytaniu powyższych cech do podłoża należy dodać kilka kropli odczynnika Kovac'sa – pojawienie się czerwono-różowego pierścienia na powierzchni podłoża świadczy o wytwarzaniu indolu.

- **Trypton water** - badanie zdolności bakterii do wytwarzania indolu.

Podłoże płynne barwy lekko żółtej. Zawiesinę lub masę bakteryjną rozetrzeć na ściankach probówki tuż przy powierzchni.

Zawarty w podłożu tryptofan przekształcany jest za pośrednictwem tryptofanazy w indol, który po dodaniu odczynnika Kovac'sa powoduje tworzenie czerwono-różowego pierścienia na powierzchni podłoża

- **Podłoże z laktozą** (pod parafiną) – badanie zdolności bakterii do fermentacji laktozy.

Podłoże płynne barwy fioletowej pod cienką warstwą parafiny. Zawiesinę lub masę bakteryjną rozetrzeć na ściankach probówki tuż przy powierzchni, a następnie zmieszać z podłożem pod parafiną.

Zmiana barwy podłoża z fioletowej na żółtą świadczy o zdolności do fermentacji laktozy.

- **Podłoże z mannitolem** - badanie zdolności rozkładu mannitolu.

Podłoże barwy jasno brązowej. Zawiesinę lub masę bakteryjną rozetrzeć na ściankach probówki tuż przy powierzchni. Zmiana barwy podłoża (prawdopodobnie na różową) świadczy o rozkładzie mannitolu.