

Cvičení 2
PROTOKOL 1
Příprava a sterilizace živných medií
Aseptická práce
Teorie: desinfekce, antiseptika, sterilizace

Cíl cvičení

- V jakém laboratorním skle budou půdy připravovány?
- K čemu budou tekutá media (bujony) a pevná media (s přidavkem **agaru** 1,5 - 3%) ve zkumavkách (šikmé agary) a Petriho miskách (agarové plotny) v příštím cvičení sloužit?
- Jak bude zajištěna sterilita práce, jak můžeme na laboratorním stole zabránit kontaminaci? (př: sterilní Petriho misky, sterilizace media ve zkumavkách autoklávováním, sterilní rozlévání do misek za žhání hrdla baňky s mediem v plameni kahanu a za co nejkratšího a nejmenšího otevírání sterilní Petriho misky).

Teoretická část

Zásady přípravy mikrobiologických půd:

□ Nutno pracovat s vysterilizovaným nádobím ve sterilním prostředí, co nejrychleji na úkor objemové přesnosti. (tzv. aseptická práce)

Kultivace mikrobů je základním postupem sloužícím k jejich přímému průkazu. Charakteru růstu bakterie je důležitým identifikačním znakem; nevýhodou je však zdlouhavost (jsme závislí na délce růstu daného druhu, př: *Mycobacterium tuberculosis* - 9 týdnů, většina bakterií však 24-48 hodin).

Mikroorganismy (bakterie, kvasinky) se v mikrobiologických laboratořích kultivují na sterilních živných půdách splňujících všechny požadavky na výživu, majících optimální pH, osmotické poměry a optimální redoxpotenciál. Samozřejmostí je dostatek vody pro životní pochody a přítomnost živin: **zdrojů energie** (heterotrofi - zdroj energie je shodný se zdrojem uhlíku, !u fototrofi je zdrojem energie světlo a u litotrofi anorganická látka!), **uhlíku** (cukry, bílkoviny, org.kyseliny, alkoholy; pro autotrofní bakterie je zdrojem uhlíku CO₂!), **dusíku** (amonné ionty, dusičnanové ionty, **AMK**, bílkoviny nebo jejich částečné hydrolyzáty (peptony), málo pak plynný dusík) a **biogenních prvků** (anorganické soli), přičemž hodnoty uvedených podmínek musí zůstat optimální po celou dobu kultivace.

Podle „oddefinovatelnosti“ složení lze media dělit do dvou základních skupin, kdy do první patří **půdy syntetické (definované)** s přesně definovaným složením (ústočné roztoky, zdrojem uhlíku obvykle glukóza, zdrojem dusíku (NH₄)₂SO₄ nebo NH₄Cl, čisté aminokyseliny, vitamíny a růstové faktory). Příkladem jsou minimální media, na nichž rostou jen prototrofi, saprofyti. **Půdy přirozené** (komplexní) mají ve svém základu živný bujon a nejsou chemicky definované, jsou tvořena složkami získanými po kyselé hydrolyze (HCl) kaseinu nebo želatiny nebo po enzymatické (fermentativní) hydrolyze masa (pepsin, trypsin, pankreatin).

Podle konzistence pak rozeznáváme půdy tekuté (mléko, masopeptonový bujon, cukrové půdy, sladina), polotekuté, ztužené a tuhé (mrkev, brambor). **Výhodou tekutých medií**

je snadný přístup vody a živin a bakterie v nich snáze rostou; nevýhodou je růst bakterií projevující se zakalením, sedimentem nebo blankou (dle nároků na kyslík) a nepoznáme tedy, zda se jedná o čistou kulturu nebo směs více druhů, rodů.

Pro přípravu ztužených půd přidáváme k bujonovému základu většinou agar, méně pak želatinu (nevýhoda nižší teploty tání – nemusí zůstat tuhá při pokojové teplotě) či křemičité gely. Výhodou kultivace na pevném mediu na Petriho misce je možnost pozorování IZOLOVANÝCH KOLONIÍ (= klon z jedné buňky), tedy izolovaných kmenů; v jedné kolonii jsou pak stovky miliard buněk. **Kolonie určitého bakteriálního druhu je útvar charakteristický a taxonomicky významný makroskopický znak.**

V jaké koncentraci se ztužovačů půd přidávají? Želatina tvořená bílkovinou (kolagen, osein, chondrogen) je do media přidána v množství 10 - 20% obsahu. Její nevýhodou je, že je ztekucována již za teploty kolem 35°C; tedy v létě se může při pokojové na misce rozpustit a ztratíme nárůst bakterií. Agar je směsí polysacharidů (agaropektinu, agarózy) z mořských řas (*Gelidium*, *Gracilaria*). Pro přípravu půd je ideální – rozpouští se při 90°C a tuhne při 40°C; slouží jen jako gelifikační přísada, **není bakteriemi využíván jako zdroj živin!** Přidává se jako 1- 5% obsahu.

Ne všechny mikroorganismy rostou na všech půdách. **Půdy univerzální** svým složením vyhovují požadavkům na výživu širokého spektra organismů (masopeptonový bujon, sladidinový agar). **Půdy selektivní** svým složením zvyhodňují růst jednoho druhu nebo cílové skupiny organismů, růst ostatních druhů je inhibován (Př: Ashbyho agar – je bez dusíku, roste na něm tedy jen druh bakterie, která umí dusík fixovat ze vzduchu – na agaru tedy cíleně zachytíme rod *Azotobacter*, který umí dusík fixovat a nepotřebuje jej v mediu, *Staphylococcus* medium – obsahuje 10% NaCl, které stafylokokům nevadí, většina rodů je však v růstu inhibována. Do těchto půd je tedy přidána nějaká inhibiční složka nebo naopak některá složka chybí, což zvyhodňuje a cíleně izoluje prokazované rody a druhy). **Půdy selektivně diagnostické** pak svým složením potlačují růst většiny mikroorganismů a umožňují růst jen velmi malé skupině, což se projeví srůstem samotným a změnou barvy media biochemickou reakcí (např. Endova půda).

Příklady kultivačních půd:

- Masopeptonový agar (MPA) - obsahuje výtažek z masa, pepton, sole a agarovou řasu, základem pro další půdy
- Krevní agar (KA) - připravuje se přidáním 5-10% defibrinované zvířecí krve k MPA základu, nejvíce používaná půda, roste na ní většina bakterií na KA lze odečítat hemolýzu, pokud bakterie tvoří hemolýziny - vznik úplného projasnění, u neúplné hemolýzy není projasnění úplné
- Endova půda (Endoagar, EA) - je to selektivně diagnostická půda pro střevní bakterie (čeled' *Enterobacteriaceae*), obsahuje laktózu. Indikátorem jejího kvašení je bazický fuchsin odbarvený siřičitanem sodným. Je-li laktóza kvašena, mění se barva světle fialovočervená do temné fialové vlivem změny pH. Bakterie, které kvasí laktózu mají tmavě fialově zabarvené kolonie, bakterie, které nezkašují mají kolonie růžové.
- XLD (agar) - půda pro záchyt patogenních střevních bakterií (*Shigella*, *Salmonella*). Půda obsahuje laktózu. Laktózu kvasící bakterie jsou žluté, laktóza nekvasící mají kolonie v barvě půdy. Dále lze rozpoznat tvorbu H₂S - černý střed kolonií.
- Sabouraudova půda - záchyt kvasinek a plísní obsahuje glukózu nebo maltozu, pH 5,0
- Fortnerova půda - pro záchyt anaerobů (obsahuje redukující substance)
- Löwenstein-Jensenova půda - pevná půda pro záchyt mykobakterií, obsahuje vejce, glycerin, škrob, malachitovou zeleň.

Jméno obor seminární skupina

- Slanetz-Burtley agar (SB půda)- selektivně diagnostická půda pro bakterie rodu *Enterococcus*. Je chudá na živiny (enterokoky jsou nenáročné oproti jiným bakteriím), kolonie enterokoků mají v masivním nárůstu fialovohnědou barvu.
- Wilson-Blairova půda - selektivní půda pro *Salmonely* (černě kovově lesklé kolonie s černým okolím)
- Claubergova půda - diagnostická půda pro *Corynebacterium diphtheriae* (černé kolonie s kovovým leskem)
- Čokoládový agar - obsahuje krev přidávanou do horkého agaru (80°C), slouží ke kultivaci náročných mikrobů.

Selektivní diagnostická chromogenní media:

- Detekce salmonel: Medium Rappaport a Vassiliadis
- *Staphylococcus aureus*: ORSAB Medium
- Stanovení listerií: Rapid L-Mono medium, Medium Oxford
- *Bacillus cereus*: Medium PEMBA

Až na výjimky uchováváme půdy v lednici tak, aby nevysychaly - dnem vzhůru a zabalené. Čerstvé půdy nesmí mít před očkovaním bakterií mokřý povrch - před začátkem práce se dávají sušit na několik hodin.

Desinfekce, sterilizace, dekontaminace....

Odstranění mikroorganismů z prostředí - dekontaminace - může být zabezpečeno různým způsobem a tomu odpovídá též dosažený efekt. Prostý úklid, mytí nebo praní a žehlení snižuje výskyt mikroorganismů až o 90%. Tím se zvyšuje účinnost následně prováděné desinfekce nebo sterilizace.

- Desinfekce s použitím chemických dezinficiencí nebo fyzikální je definována jako ničení či zneškodňování vegetativních buněk patogenních mikroorganismů na neživých předmětech, ve vnějším prostředí (ve vodě, ve vzduchu apod.) a v infekčním materiálu. Cílem desinfekce je učinit předměty (zevní prostředí) neinfekční. Účinnost desinfekce je závislá na rezistenci mikroorganismů vůči těmto prostředkům. Dobré dezinficiens by mělo mít baktericidní účinek na většinu patogenních mikroorganismů.
- Antiseptise je zneškodňování patogenních zárodků v prostředí živých tkání, v ranách, na sliznicích a na kůži s použitím antiseptik. Je namířena hlavně proti mikrobům vyvolávajícím hnisání. U antiseptik není striktní požadavek na baktericidní účinek jako u dezinficiencí, stačí bakteriostatické působení. Antiseptika musí splňovat požadavek nejedovatosti a dobré snášenlivosti živými tkáněmi. Na rozdíl od dezinficiencí proto podléhají schválení jako každý jiný lék. U antiseptik není nutná dobrá rozpustnost ve vodě.
- Aseptise je souhrn opatření vedoucích ke stavu, kdy v prostředí je minimum mikroorganismů. Aseptise si klade za cíl zabránit přístupu mikroorganismů k živým tkáním při chirurgických operacích a to používáním sterilních nástrojů, obvazových látek, šicího materiálu, pryžových rukavic, přípravou operačního pole, dezinfekcí chirurgových rukou, používáním ústenek apod. Pojem aseptise zahrnuje také laboratorní a výrobní metody, u nichž je snaha zabránit mikrobiální kontaminaci např. u mikrobiologických laboratorních prací a při výrobě některých léků.
- Sterilizace je zničení všech živých mikroorganismů, včetně vysoce rezistentních bakteriálních spor fyzikálními nebo chemickými postupy.

Fyzikální metody sterilace

Vlhké teplo

- Přerušovaná, frakcionovaná sterilizace je sterilizace varem (100°C) působícím po dobu 30 minut v 18-24 hod. intervalech tři dny po sobě. Sterilizovaná látka musí být v mezidobí uložena při pokojové teplotě, aby termorezistentní spóry, které var přežily, mohly vyklíčit. Následující var je pak ničí jako vegetativní formy bakterií.
- Tyndalizace se používá ke sterilizaci termolabilních roztoků bílkovin, které koagulují již při teplotě 60°C. Postup je podobný jako při frakcionované sterilizaci. Roztok se zahřívá ve vodní lázni při 56-58°C (resp. při 60-80°C) po 30-60 minut 3 dny po sobě.
- Sterilizace nasycenou vodní parou pod tlakem (v autoklávu) se provádí nejčastěji za přetlaku 100 kPa při teplotě 120°C po dobu 20-30 minut. Tento způsob sterilizace umožňuje zničit bezpečně všechny formy mikroorganismů. Autokláv je tlakový sterilizátor opatřený vodoznakem pro stav vody ve vyvíječi páry (pokud není přímo napojen na přívod páry z centrálního zdroje). Dále je vybaven pojistným ventilem, dvěma manometry (jeden k měření přetlaku páry ve vyvíječi, druhý v pracovním prostoru), odvodušňovacím ventilem, vodní vývěvou a teploměrem (obr. 1). Dokonalé odvodušnění pracovního prostoru na začátku sterilizace je předpokladem úspěšného autoklávování (směs páry se vzduchem při 120°C a 30 minutové expozici nemá spolehlivý sterilizační efekt). V autoklávu lze sterilizovat různé roztoky, kovové lékařské nástroje, pryžový materiál. Při sterilizaci bakteriologických půd je třeba dát pozor na možnost hydrolýzy disacharidů a poškození termolabilních látek. Suché teplo je méně účinné než pára pod tlakem. Má nižší koeficient vodivosti a proto sterilizace probíhá při vyšší teplotě a po delší expoziční dobu

- Otevřený plamen se používá při žíhání bakteriologické kličky, k likvidaci pokusných zvířat a některých předmětů malé hmotnosti, např. kontaminovaných obvazů.

- Horkovzdušná sterilizace skla, porcelánu, kovů, se provádí v horkovzdušných sterilizátorech. Doba vlastní sterilizace se počítá od okamžiku dosažení předepsaných teplot. V přístrojích s nucenou cirkulací vzduchu sterilizujeme obvykle buď při 160°C 60 minut, nebo při 180°C 20 minut.

STERILIZACE FILTRACÍ

slouží k odstraňování bakterií z tekutin tam, kde je jiný způsob dekontaminace nevhodný. Viry procházejí většinou bakteriálních filtrů.

Podle konstrukce a použitého materiálu dělíme filtry na:

- Azbestové Seitzovy filtry lisované z azbestu a celulózy. Filtry zadržující bakterie jsou označeny EK (Entkeimung). Filtrační vložky jsou jednoúčelové a sterilizují se i s filtračními nálevkami v autoklávu.

- Skleněné jenské filtry z borosilikátového skla ve formě porézních destiček zatavených v nálevkách. Používají se opakovaně. Po použití se čistí konc. kyselinou sírovou nebo chromsírovou a promývají důkladně vodou. Sterilizují se horkým vzduchem nebo v autoklávu.

- Membránové ultrafiltry z nitrocelulózy s různou velikostí pórů a průměru se u nás vyrábějí pod názvem Synpor. Vkládají se do speciálních kovových nálevek a sterilizují se v autoklávu nebo UV zářením germicidní lampou po dobu 20-30 minut ze vzdálenosti asi 50 cm.

Jméno obor seminární skupina

Filtrace výše uvedenými filtry se provádí za použití negativního tlaku pomocí vývěvy.

STERILIZACE ZÁŘENÍM

Ultrafialové záření (UV)

Optimální baktericidní účinek je při vlnové délce kolem 254 nm, kdy je záření maximálně absorbováno nukleovými kyselinami. Jako zářiče se používají obvykle germicidní lampy. UV záření slouží ke sterilizaci vzduchu a pracovních ploch přímo vystavených paprskům. Používá se k vyzařování operačních sálů, aseptických boxů, piteven, odběrových místností v léčebnách tuberkulózy apod. Vyzáření nemůže nahradit úklid pomocí dezinfekčních prostředků. Účinnost UV klesá se čtvercem vzdálenosti ozařovaného objektu.

Ionizující záření

je výhodné, protože penetruje, ale nezahřívá sterilizovaný předmět a nemění vlastnosti většiny sterilizovaných látek. Zdrojem gama záření v praxi je obvykle radioaktivní kobalt (^{60}Co). Gama záření se používá k průmyslové sterilizaci (obvazový materiál, plasty). Mezinárodně stanovená sterilizační dávka je 27 kGy.

Chemické prostředky dezinfekce

- Specifický účinek chemických látek na mikroorganismy se projevuje v závislosti na jejich koncentraci a době působení (expozice).

Kriteria kvality dezinfekčních prostředků pro volbu jejich použití:

- široké spektrum účinku, jen málo látek působí zároveň baktericidně, virocidně i fungicidně,
- při trvalém používání nevzniká rezistence,
- nejsou toxická,
- mají rychlý dezinfekční účinek,
- mají afinitu k mikroorganismům,
- k dezinfikovanému předmětu jsou inertní,
- dezinfekční účinek je stálý za různých změn vnějších podmínek (teplota, vlhkost vzduchu, pH).

Mechanismus účinku

Antimikrobní látky nejčastěji přímo poškozují strukturu mikroorganismů nebo narušují jejich základní metabolické procesy, např. oxidací (sloučeniny chlóru, peroxidy, peroxid kyseliny), redukcí (aldehydy), hydrolýzou (kyseliny, louhy), dehydratací (alkoholy), koagulací bílkovin (alkoholy, fenoly), změnou permeability (detergenční látky).

Zásady a kyseliny:

Silně anorganické kyseliny a zásady se pro své toxické a agresivní účinky používají v praxi zřídka. Např. vápenné mléko, kyselina boritá, kyselina peroctová, persteril (32-36% roztok kyseliny peroctové s 10% H_2O_2 a 1% H_2SO_4).

Oxidační prostředky:

peroxid vodíku, manganistan draselný.

Sloučeniny halogenů:

chlorové vápno, Chloramin B, Dikonit.

Jód a jeho sloučeniny:

jódová tinktura, jodofory, Jodonal B, Jodisol.

Sloučeniny těžkých kovů:

Famosept, Merfen, Merthiolát, Thiomersal.

Alkoholy:

Jméno obor seminární skupina

etanol, n-propanol, etylenoxid.

Aldehydy:

formaldehyd, formalin, glutaraldehyd.

Fenolové deriváty:

krezoly, Lysol, Orthosan BF 12.

Povrchové aktivní látky:

Ajatin, Septonex, Ophthalmo-Septonex.

Pomůcky

2600 mg komerčního masopeptonového media (MPB – meat pepton broth)

agar

destilovaná voda

sterilní Petriho misky

skleněné biologické zkumavky

Erlenmeyerovy baňky

vatové zátky

odměrný válec

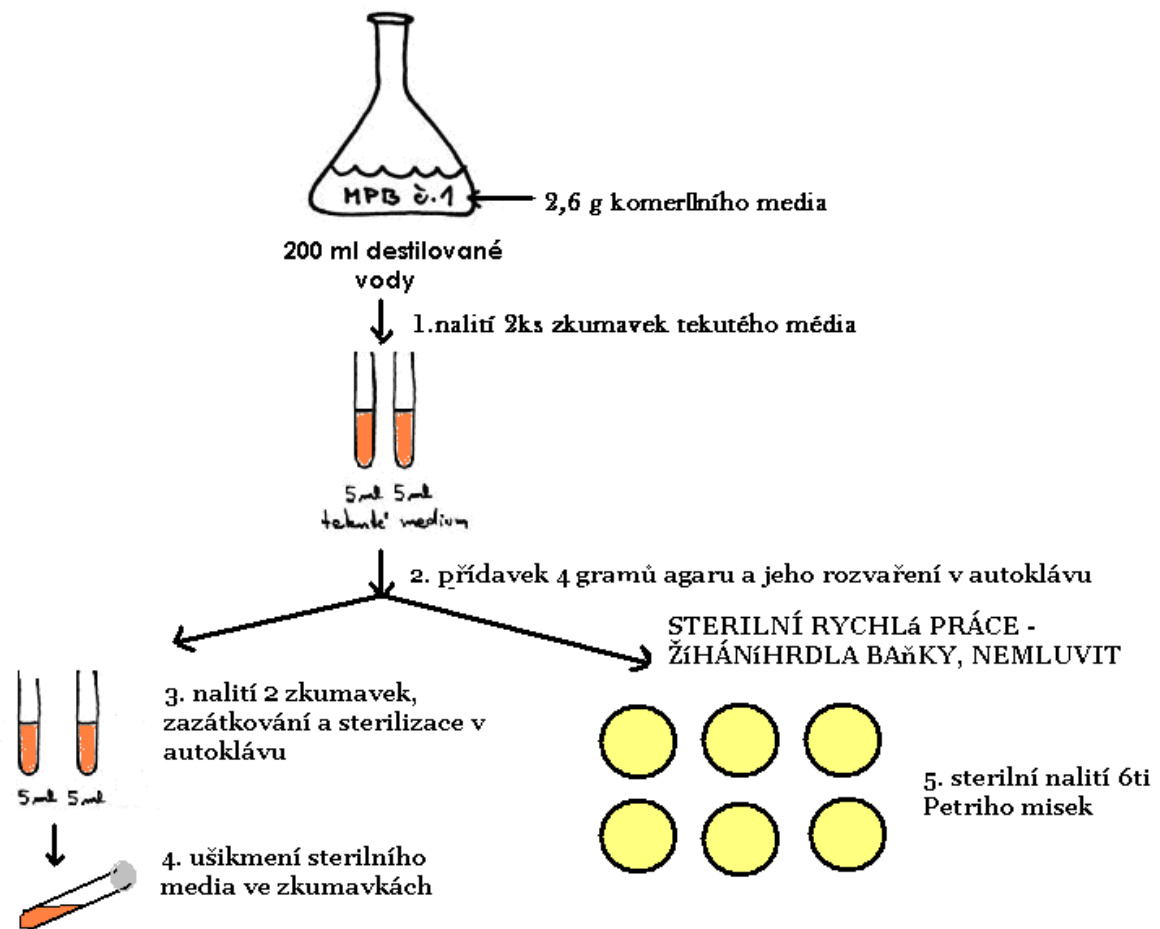
autokláv

Pozn: složení 2600 mg MPB č. 1: Beef extrakt 600 mg, pepton 1 000 mg, NaCl 1 000 mg,
destilovaná voda 200 ml, agar 4 000 mg
pH 6,8 – 7

Postup:

- Pracujeme ve dvojici s objemem 200 ml media
- Na obalu komerčního media je doporučeno navážit 13g půdy na 1 litr vody
- Na 200 ml objemu destilované vody navážíme $13/5 \text{ g} = 2,6 \text{ g}$ media
Možno upravit doporučené pH pomocí několika kapek 1M NaOH nebo 1M HCl
- Z toho objemu odpipetujeme do 2 zkumavek á 5 ml, sterilizace 20 min, 0,15 MPa, 121°C = tekuté medium ve zkumavce se zátkou (kovovou nebo vatovou), která brání následné kontaminaci
- Do zbytku objemu přidáme 4 g agaru (měl by být v koncentraci 1,5 – 3 %, tedy přibližně 16 g na litr media) a dobře promícháme
- Agar v mediu rozvaříme v autoklávu nebo v mikrovlnce
- Do 4 zkumavek odpipetujeme rozvařený agar (á 5 ml) a zazátkujeme, sterilizace
- Zbytek media v Erlenmeyerově baňce zazátkujeme a připravíme znovu pro sterilizaci, bude sloužit pro nalévání Petriho misek
- Sterilní agar MPB rozléváme do 6-ti Petriho misek á cca 20ml (postupujeme rychle, nemluvíme). Baňku po každém nalití ožiháme nad kahanem
- Zkumavky se sterilním agarem ještě za tekutého stavu uložíme do šikmé polohy

Nákres: příprava půd pro pro příští cvičení pro dvojici studentů



Závěr

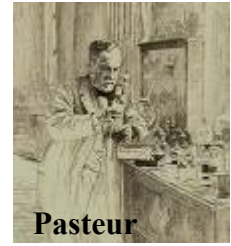
- Jak byla zajištěna sterilita práce?
- Jakou výhodu má šikmý agar oproti agaru v Petriho misce?
- Proč se charakter růstu kolonií hodnotí na Petriho misce a nikoli v bujónu?

Připravená media budou v příštím cvičení sloužit nejen k očkování, ale i k následnému makroskopickému pozorování kultur mikroorganismů.

Zajímavosti

Louis Pasteur a Robert Koch

- zakladatelé lékařské bakteriologie
- pracovali nejprve s tekutými půdami



Pasteur – vývar z kvasnic



Byla to však chudá
media pro většinu
patogenních
bakterií

Robert Koch používal
komorovou vodu
z očí jatečního
dobytka, zavedl
kultivaci na želatině



❖ Později Koch zavedl kultivaci na extraktu z hovězího masa zpevněném **želatinou**.
Kultivaci na pevné půdě tak mohl zjistit počet druhů bakterií (dle vzhledu kolonie) a počet buněk ve vzorku (= počet kolonií) a získat čistou kulturu.

Nevýhoda želatiny: ztekucování při 25°C a vlivem bakteriálních enzymů.

- ❖ Walter Hesse - na radu své manželky nahradil želatinu **agarem**.

Petriho misky - zavedeny Richardem Petrim v r.1887.

Masový výtažek je sice nabit růstovými faktory, ale na živiny je poměrně chudý.

- ❖ Frederick Löffler (spoluobjevitel původce záškrtu) - vylepšil masový extrakt přidávkem **peptonu** (produkt enzymatického natrávení masa, obsahuje peptidy i volné AMK) a NaCl = **živný bujon**.
- ❖ Komerční sušené kultivační půdy - po r.1914