

Przygotowanie mianowanych zawiesin szczepów wzorcowych znajdujących zastosowanie w badaniach mikrobiologicznych

Krystyna Mysłowska, Katarzyna Bucala-Śladowska*

Mikrobiologia jest nauką, w której nie mamy zbyt wielu wzorców odniesienia. Jednym z nich są szczepy wzorcowe, a dokładnie ich mianowane zawiesiny.

Szczepy wzorcowe zwane inaczej szczepami odniesienia lub referencyjnymi to drobnoustroje zdefiniowane co najmniej do rodzaju i gatunku, skatalogowane i opisane zgodnie z ich cechami i – jeszcze lepiej – z podaniem źródła pochodzenia, pozyskane z uznanej krajowej lub międzynarodowej kolekcji.

Jednym z najważniejszych etapów pracy ze szczepami wzorcowymi jest ich pasażowanie czyli przesiewanie. Jeden pasaż określa się jako przeniesienie organizmów z żywej hodowli do świeżego podłoża, z towarzyszącym wzrostem drobnoustrojów po procesie inkubacji. Jakakolwiek forma kolejnej hodowli jest traktowana jako pasaż. Tak więc każdy etap związany ze wzrostem drobnoustroju jest liczony jako pasaż.

Nie jest pasażem samo uwodnienie w podłożu płynnym oryginalnego szczepu odniesienia dostarczonego z oficjalnej kolekcji w formie liofilizowanej lub zamrożonej, ponieważ nie towarzyszy mu

Tabela 1. Szczepy wzorcowe zalecane w metodach mikrobiologicznych

Metoda	Zalecane szczepy wzorcowe	
FP X 2014 2.6.1. JAŁOWOŚĆ Badanie żywności stosowanych podłoży oraz test przydatności metody	Bakterie tlenowe	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC* 6538 <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027
	Bakterie beztlenowe	<i>Clostridium sporogenes</i> ATCC 19404
	Grzyby	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231 <i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404
FP X 2014 2.6.12. BADANIE CZYSTOŚCI MIKROBIOLOGICZNEJ PRODUKTÓW NIEJAŁOWYCH (MIKROBIOLOGICZNE BADANIA ILOŚCIOWE) Badanie żywności podłoży hodowlanych oraz przydatność metody liczenia	Bakterie tlenowe	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027
	Grzyby	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231 <i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404
FP X 2014 2.6.13. BADANIE CZYSTOŚCI MIKROBIOLOGICZNEJ PRODUKTÓW NIEJAŁOWYCH (BADANIE OBECNOŚCI OKREŚLONYCH DROBNOUSTROJÓW) Badanie żywności właściwości wybiórczych podłoży hodowlanych oraz przydatność metody badania	Bakterie tlenowe	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739 <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serowar Typhimurium jak ATCC 14028 (alternatywnie <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serowar Abony jak NBRC 100797)
	Bakterie beztlenowe	<i>Clostridium sporogenes</i> ATCC 11437 lub ATCC 19404
	Grzyby	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231
FP X 2014 5.1.3. SKUTECZNOŚĆ OCHRONY PRZECIWDROBNOUSTROJOWEJ (test konserwacji)	Bakterie tlenowe	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027
	Grzyby	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231 <i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404
BADANIE SKUTECZNOŚCI ŚRODKÓW DEZYNFEKCYJNYCH wg norm ISO:	Bakterie tlenowe	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 16404 <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 <i>Escherichia coli</i> ATCC 10536 <i>Enterococcus hirae</i> ATCC 10541
	Grzyby	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231 <i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404

* **Kolekcja szczepów ATCC** (American Type Culture Collection, WDCM 1) – zorganizowana w 1925 roku; znajduje się w Uniwersytecie Boulevard, Manassas w USA, przechowuje się w niej bakterie, grzyby strzępkowe, drożdże, glony, wirusy, plazmidy oraz genomowe DNA). Oprócz szczepów z kolekcji ATCC dopuszcza się stosowanie szczepów z innych uznanych kolekcji.



wzrost. Nie jest też pasażem przesianie takiego szczepu niezwłocznie po uwodnieniu (bez hodowli) do osobnej probówki z podłożem płynnym, na skos lub na płytkę. Pierwszy pasaż będzie stanowić każda z kultur w tych probówkach i płytkach po typowym okresie inkubacji, któremu towarzyszy namnożenie hodowli. Niestety, częstym problemem w laboratoriach jest przygotowanie zawiesiny o konkretnej gęstości. Wiele metod opisanych m.in. w Farmakopei czy też w normach ISO, zakłada wykorzystanie zawiesin drobnoustrojów o ściśle określonej liczbie komórek w 1 ml. Do tych badań należą min.: kontrola żywności podłoży mikrobiologicznych, przydatność metod farmakopealnych w badaniu jałowości oraz czystości mikrobiologicznej produktów niejadalnych, skuteczność ochrony przeciwdrobnoustrojowej (test konserwacji) oraz badanie skuteczności środków dezynfekujących.

Farmakopea Polska wydanie X (2014) tom I w punkcie 5.1.3. SKUTECZNOŚĆ OCHRONY PRZECIWDROBNOUSTROJOWEJ podaje następujący wytyczne odnośnie stosowanej zawiesiny:

Przygotowanie inokulum: 1. (...) zebrać z powierzchni podłoży agarowych kolonie bakterii i *Candida albicans* zmywając je jałowym roztworem chlorku sodu OD (9 g/l) i przenieść do odpowiedniego naczynia. Dodać taką objętość roztworu chlorku sodu, aby uzyskać zawiesinę zawierającą 10^8 komórek drobnoustroju w 1 ml. Hodowlę *Aspergillus brasiliensis* zmyć z powierzch-

ni podłoża jałowym roztworem chlorku sodu OD (9 g/l) z dodatkiem polisorbátu 80 OD (0,5 g/l) i doprowadzić gęstość zawiesiny zarodników do ok. 10^8 komórek w 1 ml dodając ten sam roztwór.

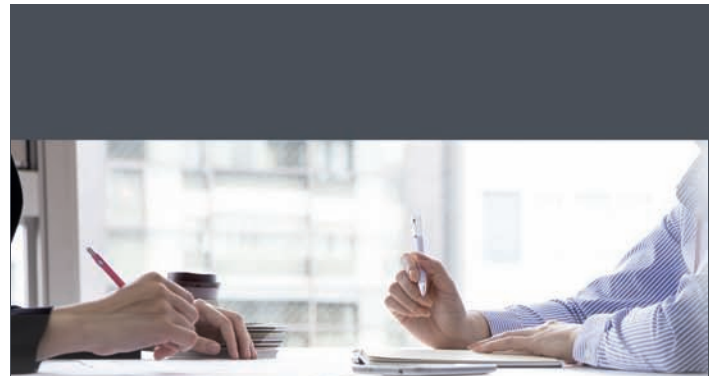
2. (...) zaszczepić serię pojemników z produktem badanym, dodając zawiesinę każdego szczepu do odrębnego pojemnika, aby otrzymać 10^5 do 10^6 komórek drobnoustroju w 1 ml lub 1 g preparatu (...)

Natomiast w rozdziale 2.6.1. JAŁOWOŚĆ oraz 2.6.12. BADANIE CZYSTOŚCI MIKROBIOLOGICZNEJ PRODUKTÓW NIEJAŁOWYCH (MIKROBIOLOGICZNE BADANIA ILOŚCIOWE) i 2.6.13. BADANIE CZYSTOŚCI MIKROBIOLOGICZNEJ PRODUKTÓW NIEJAŁOWYCH (BADANIE OBECNOŚCI OKREŚLONYCH DROBNOUSTROJÓW), farmakopea zakłada użycie do kontroli podłoży jak i do wykonania testu przydatności – zawiesiny i ilości komórek nie większej niż 100 CFU.

Najczęściej stosowanym w laboratorium urządzeniem wykorzystywanym do przygotowania zawiesin drobnoustrojów o konkretnej gęstości jest densytometr.

Densytometr umożliwia oznaczenie gęstości drobnoustrojów podczas dwóch pomiarów. Wiązka światła padającego przechodzi przez probówkę i przeprowadzane są dwa pomiary: światła rozproszonego S i światła przepuszczonego T. Stosunek S/T jest wprost proporcjonalny do gęstości zawiesiny bakteryjnej.

Należy pamiętać, że stężenie bakterii uzależnione jest od wielkości mikroorganizmów. W związku z różnicami



POLSKIE CENTRUM AKREDYTACJI

„Kompetencje, Wiarygodność,
Bezstronność, Bezpieczeństwo”

Sygnatariusz EA MLA, IAF MLA, ILAC MRA

www.pca.gov.pl

Polskie Centrum Akredytacji

ul. Szczotkarska 42
01-382 Warszawa

Tel. +48 22 355 70 00
Faks + 48 22 355 70 18

w wielkości komórek bakterii a szczególnie grzybów drożdżopodobnych i pleśni – wykonanie zawiesin musi być wystandaryzowane. Podane w tabeli wartości są proporcjonalne do wartości średnich stężeń bakterii uzyskanych dla Gram-ujemnych pałeczek. Dla drożdży, ze względu na ich duże rozmiary, wartości te należy podzielić przez 30. Zastosowanie pomiaru gęstości optycznej do oceny ilości drobnoustrojów w zawieszynie jest szybkim, skutecznym i powtarzalnym sposobem, pod warunkiem jednak, że spełnione zostaną następujące parametry:

- odpowiedni stan fizjologiczny mikroorganizmu (18 – 24 godzinna hodowla na odpowiednich podłożach w przypadku bakterii i *Candida albicans* oraz 7 dniowa w przypadku *Aspergillus brasiliensis*, pasaż drobnoustrojów nie dalszy niż piąty);
- standaryzacja oznaczeń gęstości dla każdego szczepu;
- przygotowanie jednorodnej zawiesiny – szczególnie w przypadku *Aspergillus brasiliensis* (zawieszyna wykonana w roztworze chlorku sodu i polisorbátu 80) i *Bacillus subtilis* (badania własne wskazują na możliwość prowadzenia hodowli szczepu na bulionie TSB i oznaczenia gęstości tak uzyskanej zawiesiny);
- skalibrowany densytometr;
- używanie właściwych jałowych probówek dostosowanych do konkretnego typu densytometru (płaskodenne, okrągłodenne), probówki muszą być suche i czyste na zewnętrznej powierzchni;
- kalibrowane pipety.

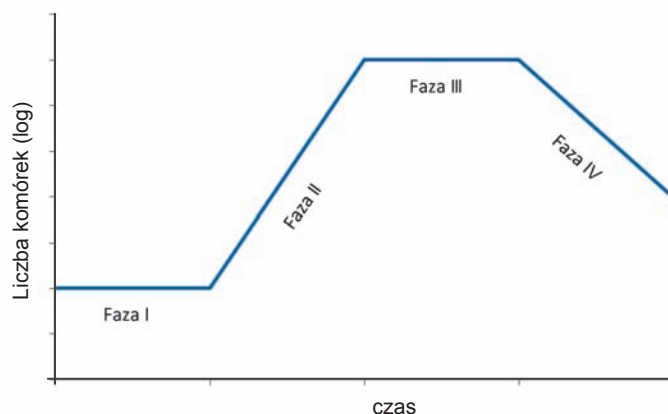
Podany w literaturze czas inkubacji hodowli mikroorganizmów, z której należy przygotować zawieszinę jest ważnym parametrem wpływającym na żywotność drobnoustrojów. Mikroorganizmy wysiane na powierzchnię płytki agarowej lub obecne w zaszczepionym bulionie w próbówce, namnażają się do momentu wyczerpania składników odżywczych w podłożu czy też do takiego nagromadzenia produktów własnej przemiany materii, które nie pozwalają na dalszy rozwój.

Wzrost drobnoustrojów w takiej hodowli okresowej, graficznie przedstawia krzywa wzrostu drobnoustrojów (Wykres 1). Czas trwania poszczególnych faz wzrostu jest zależny od rodzaju bakterii i warunków hodowli. Krzywa ma kształt sigmoidalny i można w niej wyróżnić następujące fazy wzrostu:

Faza I zwana fazą adaptacyjną (zastoju) – trwająca od momentu zaszczepienia pożywką. Bakterie przygotowują się do podziałów, ilość składników w podłożu jest duża a liczba podziałów jeszcze niewielka.

Faza II – faza wzrostu wykładniczego (faza logarytmiczna), podczas której bakterie dzielą się bardzo szybko – w czasie trwania tej fazy należy pobrać zawieszinę komórek która będzie wyjściową do kolejnych rozcieńczeń.

Faza III czyli faza stacjonarna, charakteryzuje się stałą liczbą komórek w hodowli w związku z malejącą liczbą składników odżywczych i wzrastającą ilością metabolitów w podłożu.



Wykres 1. Krzywa wzrostu hodowli bakterii

Faza IV – faza zamierania (końcowa), w której ilość produktów przemiany materii w podłożu staje się toksyczna a brak składników odżywczych prowadzi do śmierci hodowli.

Standaryzacja oznaczania gęstości polega na przygotowaniu zawiesin o wybranych gęstościach. Zwykle dla bakterii są to 0,5 McF i 1 McF, dla grzybów 2 McF i 3 McF. Z tak przygotowanych zawiesin wykonuje się szereg kolejnych 10-krotnych rozcieńczeń i wysiewa na odpowiednie podłoża. Po określonym czasie inkubacji zlicza się wyrosłe drobnoustroje, wybierając płytki gdzie liczba kolonii dla bakterii mieści się w zakresie 30 do 300 CFU a grzybów 10 do 150 CFU i przelicza się na ilość w stosunku do początkowej wysiewanej zawiesiny.

Norma PN-EN ISO 7218 Mikrobiologia żywności i pasz. Wymagania ogólne i zasady badań mikrobiologicznych podaje w punkcie 10.2.4., że przy metodzie posiewu powierzchniowego stosuje się rozmaz głaszczką, wysiewając na płytkę zwykle ilość 0,1 ml lub 0,5 ml. Norma ta

zaleca stosowanie posiewu powierzchniowego, ponieważ morfologia kolonii rosnących na powierzchni agaru jest łatwiejsza do obserwacji i pozwala zaobserwować ewentualne zanieczyszczenie zawiesiny. Drobnoustroje nie są także wystawione na działanie ciepła płynnej pożywki jak ma to miejsce przy posiewie wgłębnym, co pozwala również na uzyskanie wyższej liczby kolonii. Aby pozwolić na równomierne rozprowadzenie posiewanej zawiesiny, zalecane jest używanie poduszonych pożywek agarowych, tak aby inokulum zostało zaabsorbowane w ciągu 15 minut. Do rozmazu stosowane są głaszczki wykonane ze szkła, plastiku lub metalu. Ważne jest, aby inokulum zostało rozprowadzone tak szybko jak to możliwe na powierzchni agaru, bez dotykania ścianek szalki Petriego. Posiane płytki przykryte wieczkiem należy pozostawić na 15 minut w temperaturze pokojowej w celu zaabsorbowania inokulum. Następnie płytki należy odwrócić do góry dnem i umieścić w cieplarni, w od-



Tabela 2. Korelacja pomiędzy skalą McFarlanda a stężeniem bakterii oraz gęstością optyczną

Standardowa skala McFarlanda	Stężenie bakterii X 10 ⁸ /ml	Teoretyczna gęstość optyczna przy 550 nm
0,5	1,5	0,125
1	3	0,25
2	6	0,50
3	9	0,75
4	12	1,00
5	15	1,25
6	18	1,50
7	21	1,75

powodniej temperaturze. Podczas inkubacji w warunkach tlenowych i w ciepłarkach bez cyrkulacji powietrza, zalecane jest ustawianie płytek Petriego w stosy nie wyższe niż 6 płytek, oddalone od siebie i od ścian ciepłarki o co najmniej 25 mm. W ciepłarkach wyposażonych w cyrkulację powietrza, wysokość stosów oraz odległości między nimi muszą zostać ustalone podczas kwalifikacji

urządzenia. Po inkubacji zaleca się niezwłoczne obejrzenie płytek. Dodatkowo mogą być one przechowywane w lodówce do 48 godzin, o ile nie określono tego inaczej w odpowiednich normach. Z powyższych danych wynika, że jeśli do badania potrzebujemy zawiesiny o gęstości ok. 10⁸ komórek w 1 ml, to w przypadku *Escherichia coli* wystarczy przygotować

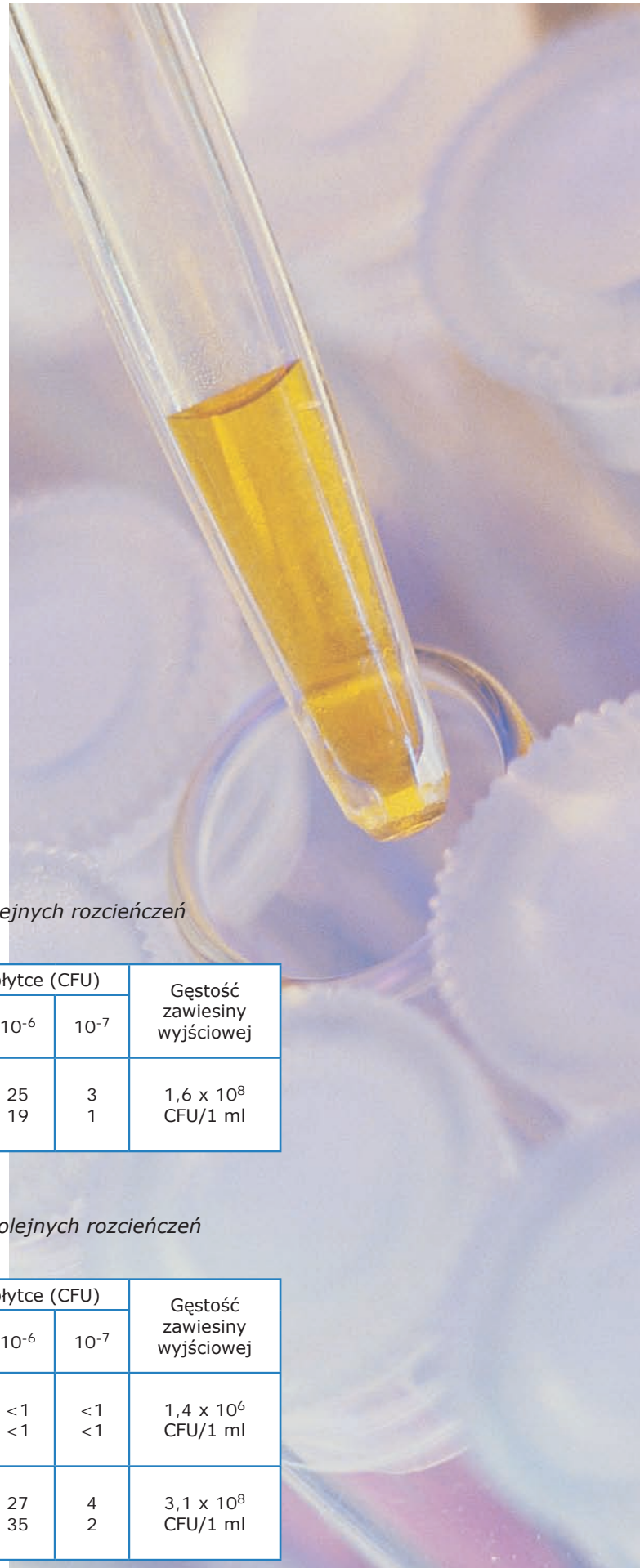
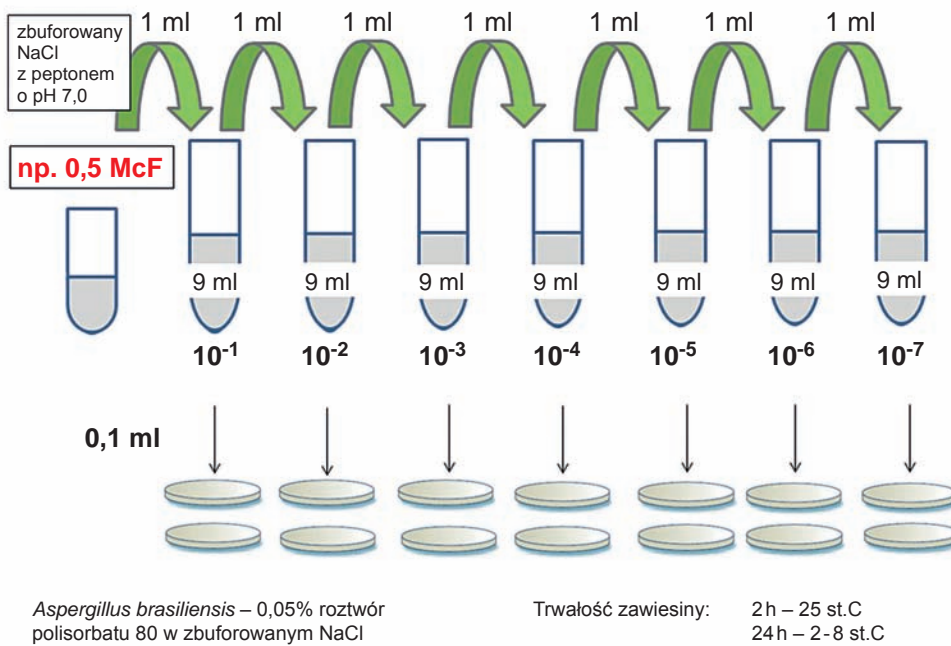


Tabela 3. Ilość kolonii *Escherichia coli* wyhodowanych z kolejnych rozcieńczeń (badania własne)

Szczep wzorcowy/ gęstość/ilość zawiesiny wysiana na płytkę	Kolejne rozcieńczenia / suma kolonii na płytce (CFU)							Gęstość zawiesiny wyjściowej
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739 0,5 McF 0,1 ml na płytce	>300 >300	>300 >300	>300 >300	>300 >300	176 143	25 19	3 1	1,6 x 10 ⁸ CFU/1 ml

Tabela 4. Ilość kolonii *Candida albicans* wyhodowanych z kolejnych rozcieńczeń (badania własne)

Szczep wzorcowy/ gęstość/ilość zawiesiny wysiana na płytkę	Kolejne rozcieńczenia / suma kolonii na płytce (CFU)							Gęstość zawiesiny wyjściowej
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231 0,5 McF 0,1 ml na płytce	>150 >150	>150 >150	135 120	17 12	1 2	<1 <1	<1 <1	1,4 x 10 ⁶ CFU/1 ml
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231 3 McF 0,1 ml na płytce	>150 >150	>150 >150	>150 >150	>150 >150	>150 >150	27 35	4 2	3,1 x 10 ⁸ CFU/1 ml



Schemat 1. Przygotowanie mianowanych zawiesin szczepów wzorcowych (kontrola referencyjna)

zawiesinę 0,5 w skali McFarlanda, natomiast dla *Candida albicans* musi to być 3 w skali McFarlanda.

Przygotowanie mianowanej zawiesiny drobnoustrojów jest krytycznym etapem znalezienia mikrobiologicznej. Wstęp-

ne wyniki dla kontroli referencyjnej będącej kontrolą gęstości zawiesiny otrzymujemy najwcześniej po 24 go-

dzinach a zawiesina, czy też jej rozcieńczenia używane są do badania bezpośrednio po przygotowaniu. Dlatego też konieczne jest wystandaryzowanie przygotowania zawiesin, aby uniknąć konieczności powtarzania badania, z powodu użycia zawiesiny o niewłaściwej gęstości.

Dodatkowo należy bezwzględnie pamiętać o konieczności wykonywania kontroli referencyjnej za każdym razem gdy pracujemy z zawiesinami drobnoustrojów. Przypomnijmy Państwu o tym w kolejnym opracowaniu dotyczącym przydatności metod farmakopealnych.

* Mgr Krystyna Mysłowska, mgr Katarzyna Bucała-Śladowska – Centrum Badań Mikrobiologicznych i Autoszczepionek im. dr. Jana Bobra, Kraków

BazTech – kopalnia wiedzy

Baza danych o zawartości polskich czasopism technicznych BazTech jest bibliograficzno-abstraktową bazą danych rejestrującą od 1998 r. artykuły z 645 polskich czasopism z zakresu nauk technicznych, ścisłych i ochrony środowiska. BazTech rozwija się w kierunku pełnotekstowej bazy cytowań. Do opisów artykułów dodawane są bibliografie załącznikowe (od 2006 r.), a na podstawie odrębnych umów z wydawcami rekordy uzupełniane są o pełne teksty artykułów. Tymi działaniami baza wpisuje się w ruch otwartej nauki.

W bazie zamieszczone są również artykuły z archiwalnych numerów LAB. Szukaj pod adresem: yadda.icm.edu.pl/baztech/

