

KULTIVÁCIA STRIKTNE ANAEROBNÝCH BAKTÉRIÍ V PATOČKOVÝCH NÁDOBÁCH

1. Popis metodiky

Kpt. MVDr. František NIŠTIAR, kpt. MVDr. Peter ZEMENČÍK, Tatiana HUDÁKOVÁ
a Danica SEMANOVÁ

Vojenský veterinárny doškolovací výzkumný ústav, Košice

Úvod

Už dlhšiu dobu je známe, že niektoré autentické baktérie prirodzených, striktné anaerobných ekosystémov — črevné baktérie, bachorové baktérie a pod. — sú za prirodzených podmienok extrémne početné, zatiaľčo veľmi zle rastú in vitro za dodržania bežných podmienok anaerobiózy. Je to zapríčinené ich prísnyimi rastovými požiadavkami a vysokou citlivosťou na kyslík. Najvhodnejším ukazovateľom anaerobiózy je oxidoredukčný potenciál. Oxidoredukčný potenciál predstavuje širokú a stálu škálu, pomocou ktorej je možné študovať vzťahy medzi aerobnými a anaerobnými podmienkami v rôznom systéme. Kyslík pôsobí so zložkami buniek alebo kultivačného média prostredníctvom chemickej reakcie. Následkom tejto reakcie sú zložky buniek alebo kultivačného média silne oxidované. Stupeň oxidácie alebo redukcie chemického systému sa určuje pomocou redox potenciálu.

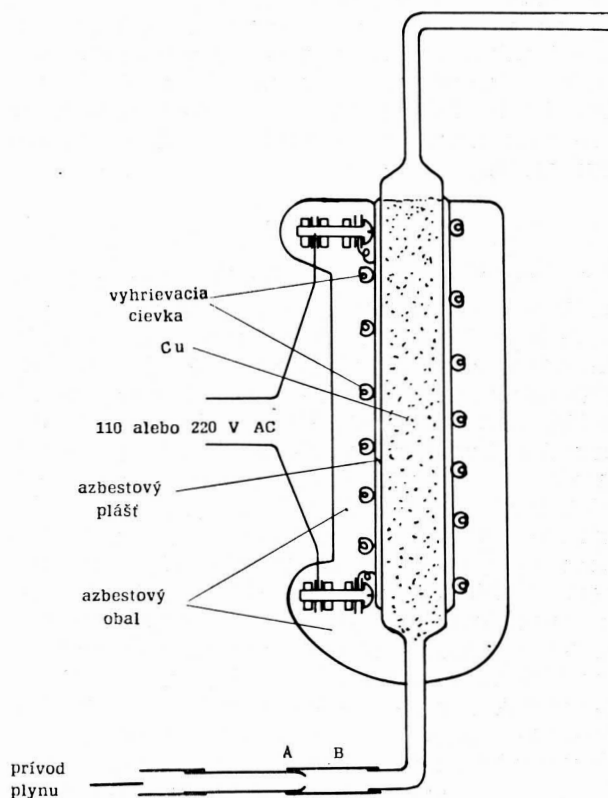
Niektoré z anaerobných mikroorganizmov nie sú zabíjané vysokým redox potenciálom, nie sú však schopné rastu a množenia, ak médium nie je silne redukované. Naproti tomu iné druhy mikroorganizmov sú vysokým redox potenciálom zabíjané, pretože sú u nich ireverzibilne narušené určité esenciálne systémy.

V domácej literatúre Sekaninová [1970, 1973] popísala vhodný spôsob pre kultiváciu fakultatívne anaerobných baktérií. Použila metódu fyzikálnej anaerobiózy pomocou prenosného sterilizátora STE 37/II, čiastočne spojenú s biologickou anaerobiózou.

Zo zahraničnej literatúry je potrebné spomenúť metódu, ktorú popísali Mitsuoka a kol. [1969], a anaerostatovú metódu, popísanú Sinkovicsom [1974]. Obe uvedené metódy majú nevýhodu v značnej náročnosti, ako aj v ekonomike prevádzky.

Za najvhodnejšiu považujeme metodiku, ktorú popísal Hungate [1969]. Pri tejto metóde je vzduch z kultivačných nádob vytlačaný pomocou plynu zbaveného kyslíka. Obyčajne sa používa kyslíčník uhličitý, vodík, dusík alebo zmesi týchto plynov. Najvhodnejší je kyslíčník uhličitý, pretože je ťažší ako vzduch, je relatívne lacný a hodnotný v pufrácii.

Takéto kultúry nevyžadujú špeciálne inkubátory a môžu byť vybrané a skúmané aj bez špeciálnych opatrení zabezpečujúcich anaerobiózu, ak sú dobre zazátkované. Ak sú otvorené (inokulácia, preočkované), anaerobióza



Obr. 1

môže byť kontinuálne udržiavaná počas potrebných úkonov neustálym prívodom plynu zbaveného kyslíka.

Nami popísaná metodika je vlastne modifikáciou metódy, ktorú popísal Hungate v r. 1969.

Metodický postup

Odstránenie kyslíka z plynov pomocou redukovanej medi

Vertikálny stĺpec ohriatej medi (vo forme hrubého medeného prášku) je výborný a ekonomický na odstraňovanie kyslíka z plynov. Bolo vyvinutých veľa modifikácií tejto metódy. My sme zvolili metódu, v ktorej sa meď vloží do skleneného stĺpca z Pyrex skla (obr. 1) s vnútorným priemerom 25 mm, so zúženým vrchom a spodkom, umožňujúcim upevnenie gumenej hadice alebo spojok z mliečného skla. Stĺpec je vyhrievaný elektricky na teplotu okolo 350 °C s cievkou z nikel-chrómového drôtu obaleného okolo stĺpca. Potrebný výkon sa mení v zhode s mierou izolácie. Tok plynu

vstupuje do dolnej časti stĺpca a opúšťa ho cez vrchnú časť. Sklo nad povrchom medi nie je obalené azbestom. To umožňuje vizuálnu kontrolu redukcie medi, čo sa prejavuje jasnou farbou medi oproti tmavej farbe CuO. Redukcia je prevádzaná prevedením vodíka cez stĺpec. Na zamedzenie explózie rúra musí byť naplnená CO₂ kvôli úplnému vytlačeniu kyslíka pred zavedením vodíka. Prechod z jedného plynu na druhý bez vstupu kyslíka je ľahko prevediteľný použitím skrátenej Pasteurovej pipety (obr. 1), ktorá je zavedená v rovine pred medeným stĺpcom. Kysličník uhličitý alebo dusík sa zavádza malou rýchlosťou toku a potrubie je otvorené spojkou v bode A, ak gumenná hadica v bode B je otvorená. Konstrikciou gumennej hadice v bode B je vstup plynu do stĺpca uzatvorený. Gumenná hadica, nesúca pomalý tok vodíka, je zakončená tiež Pasteurovou pipetou. Táto pipeta je vsunutá do uzatvoreného voľného konca gumennej hadice v bode A po vytiahnutí predošlej predplynovej hadice (prívod CO₂ na odstránenie vzduchu zo stĺpca) a vzduch je vytlačený zo spojovacej hadice B držaním hadice za voľný koniec. V momente, keď sa pipeta začína vsúvať do hadice, ktorá je postupne uvoľňovaná tlakom pipety, je možné hadicu znova úplne otvoriť v bode B. Potom, ak je už medzi vodíkom redukovaná, použije sa rovnaký postup pri výmene plynov späť na kysličník uhličitý bez vstupu vzduchu do hadice.

Elektrický prúd je na nikel-chrómove vlákno privádzaný kontinuálne. Náklady na spotrebu elektriny pre vyvinutie potrebného tepla sú nepatrné, ak je správna izolácia.

Obalenie stĺpca tenkou azbestovou vrstvou sa robí tak, že sa najprv obaľuje sklenená rúra okolo bázy a postupuje sa smerom hore až k vrchu hladiny medi. Olovený práškový azbest sa navlhčí a potom sa ním obaľuje v žiadúcej hrúbke okolo rúry a nikel-chrómoveho vlákna. Práškový azbest sa potom vysušil a stal sa tým dostatočne pevný pre podporu a držanie cievky a elektrického vedenia. Sklenený stĺpec a azbest v báze môže byť podporený a blízko vrchu ešte upevnený.

Odstránenie kyslíka z médií a ostatných roztokov

Najjednoduchším spôsobom na odstránenie kyslíka z tepelne stabilných roztokov je ich prevarenie na dobu asi jednej minúty. Potom je možné anaerobiózu ľahko udržať nahradením pary plynom zbaveným kyslíka ako chladivom nádoby.

Ak je roztok tepelne labilný, môže byť z neho kyslík odstránený prebublávaním s plynom zbaveným kyslíka. Rýchlosť odstraňovania kyslíka je tak podstatne pomalšia. Je potrebné prebublávať 30 minút až hodinu.

Príprava anaerobných médií

Médiá je najvhodnejšie pripravovať vo väčších množstvách a potom ich prenášať do kul-



Obr. 2

tivačných nádob pred autoklávovaním alebo po autoklávovaní (obr. 2).

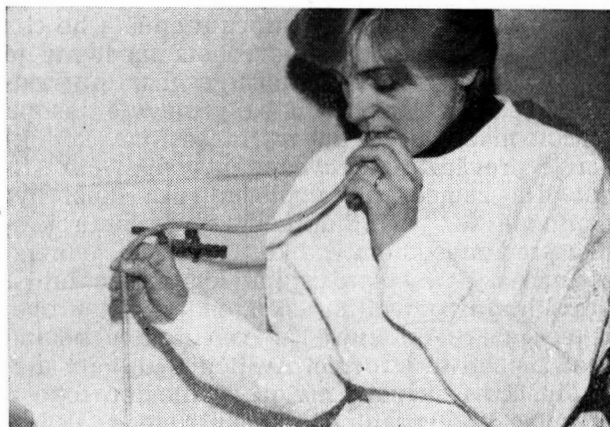
Ako kultivačné kontajnery sú vhodné Patočkové nádoby, vyrobené z ohňovzdorného skla, za použitia butylových zátek. Princíp použitia zátek je na obrázkoch 3 a 4. Gumenná hadica vedúca tok plynu je pripravená distálne k injekčnej ihle, ktorá môže byť plameňom ľahko sterilizovaná. Médium sa najlepšie prenáša pomocou sérologickej pipety, ku ktorej je pripnutá asi 60 cm dlhá ústna hadica (obr. 5). Ovládanie pipety ústnou hadicou umožňuje lepšie vytlačenie kyslíka ako obvyklou technikou. Do pipety pred nasatím média prv nasajeme plyn, čo nám prezradí chuť. Potom je pipeta uzavretá stlačením gumennej hadice medzi palcom a prvým článkom ukazováku (obr. 5). Pipeta je držaná ostatnými dvoma prstami. Pri prebytku určitého množstva média množstvo v uzavretej pipete sa ľahko môže vyrovnáť na požadovaný objem zmenou uhla medzi palcami a ukazovákom. Po získaní práce môže byť kultivačná nádoba, plynovacia ihla a pipeta súčasne a primerane ovládané jedným pracovníkom.

Uzatváranie nádob

Robí sa to vkladáním butylovej zátky pomocou palca a prstu jednej ruky, držiac pritom nádobu s ostatnými tromi prstami, s plynova-



Obr. 3



Obr. 5



Obr. 4



Obr. 6

cou ihlou nehybne uloženou na svojom mieste. Zátka sa vtláči do takej miery, aby bolo možné protiahom vytiahnuť plynovaci ihlu. Schématicky to demonštruje obrázok č. 6. Butylové zátky sú domácej výroby a sú úplne nepriepustné pre kyslík.

Povaha kultivačného média

Zloženie kultivačného média je u jednotlivých druhov baktérií určené. Pre všetky druhy médií však platí, že ich pufračná kapacita musí byť vysoká a musia obsahovať redukčné činidlá. Je dávno známe, že značný úspech v kultivácii by znamenal objavenie niektorých esenciálnych živín pre určité druhy striktné anaerobných baktérií, ktoré sú doposiaľ ešte neznáme a sú súčasťou takých prídavkov, ako sú bachorová tekutina, odpadové vody, kal a pod. [Hungate, 1963].

Myroie a Hungate (1954) preskúmali rad redukčných činidiel, ako sú: vodík, thioglykolát sodný, cystein, NaS, H_2S a ditioničitan. Za najvhodnejšie považujú používať cystein. HCl- Na_2S (je to roztok obsahujúci 2,5 % w/v z každej zložky) alebo cystein HCl samotné.

Z hľadiska pufrácie sa pridáva hydrouhličitan sodný [Dehority, 1971].

Z hľadiska vizuálnej kontroly redox potenciálu média sa doporučuje pridávať do média indikátor redox potenciálu. Najvhodnejšie je pridávať resazurin v koncentrácii 0,0001 %. Je indikátorom redox potenciálu nad $-0,042$ [Bryant, 1963]. Pri potrebnom nízkom redox potenciále je bezfarebný. Zvýšením redox potenciálu mení farbu cez ružovú na modrú.

Sterilizácia

Bežne sa robí tlaková sterilizácia parou pri $120^\circ C$ a 1,5 atm. U zložiek, ktoré sa nemôžu sterilizovať, prevádza sa tlaková filtrácia za anaerobných podmienok a sú privádzané do média tesne pred inokuláciou.

Inokulácia médií a odber kolónií

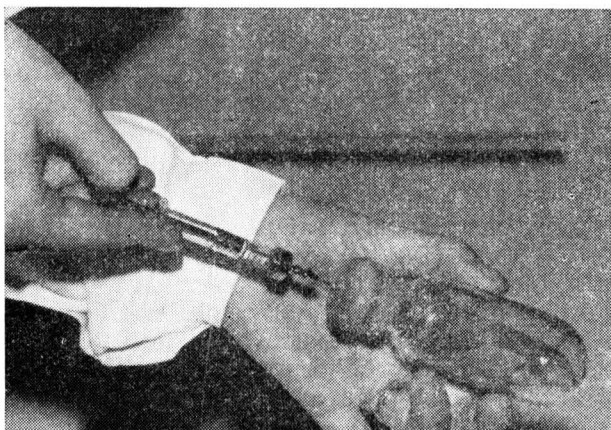
Inokulácia sa prevádza tesne pred stuhnutím rozpusteného média. Takto väčšina kolónií rastie v agare, ale ak veľkosť kolónií vystúpi, siahajú až k plynovej interfáze a rastú ďalej ako povrchové kolónie. Môžu siahať aj k stene skúmavky a rásť vo forme filmu medzi agarom a stenou nádoby. Ihneď po inokulácii otáčame nádoby pod prúdom tečúcej studenej vody alebo v nádobe s ľadovou vodou. Vzhľad kolónií

rovnakého druhu baktérií na rôznych lokalitách sa môže do značnej miery líšiť, čo môže viesť u neskúseného pracovníka k chybným záverom o čistote kultúry, resp. k ťažkej diferenciácii druhov pri primokultivácii. Tieto problémy sa však skúsenosťami odstraňujú. Vzhľad porastených kolónií je na obr. 7. Inokulácia sa prevádza sterilnou anaerobnou striekačkou. Riedenie sa prevádza tiež v Patočkových nádobách za použitia sterilnej anaerobnej striekačky (obr. 8).

Na prenášenie (odpichovanie) kolónií je najvhodnejšia upravená Pasteurova pipeta, do ktorej bol predtým nasatý plyn, a tým sú kolónie aj počas prenášania v pipete chránené pred vplyvom kyslíka (obr. 9).



Obr. 7

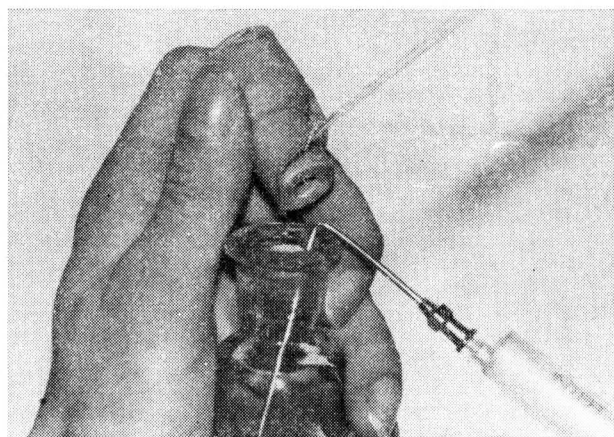


Obr. 8

Kritériá čistoty

Celý rad aerobných baktérií by mohol porásť v prípade zlej anaerobiózy. Tieto kontaminanty nám odhalí indikátor redox potenciálu alebo ich charakteristiky, ako sú: veľkosť kolónie, konzistencia, priehľadnosť, okraje, tvar a pod.

Pri raste kolónií je najlepším ukazovateľom čistoty rýchlosť rastu, druh a typ kolónií. Ak všetky kolónie pochádzajú z jedného druhu,



Obr. 9

počet kolónií v nádobách so sériovým riedením klesá v zhode s mierou riedenia.

Uskladnenie kultúr

Táto otázka ešte nebola uspokojivo preštudovaná. Uskladnenie sa v zásadách nelíši od iných kultivačných metód. Výhodou tejto metódy je, že dobre zazátkované nádoby môžu byť uskladnené prakticky na neobmedzenú dobu bez vysušenia alebo oxidácie kultúr. Podobné výhody sú aj v prípade uskladnenia neinokulovaných sterilných nádob s kultivačným médiom.

Celý rad kmeňov anaerobných baktérií ostáva nažive po dobu niekoľkých mesiacov, ak je kultúra ihneď zmrazená a držaná pri teplote suchého ľadu.

Pri obzvlášť dlhodobom uskladnení je možné kultúry lyofilizovať a uložiť v zatavených ampulkách pod atmosférou kyslíčnika uhličitého alebo iného plynu.

Súhrn

V domácej odbornej literatúre je pomerne málo popísaná a diskutovaná oblasť anaerobnej kultivácie. Preto bola rozpracovaná metóda kultivácie striktno anaerobných baktérií na princípe, ktorý popísal Hungate (1969). Na rozdiel od pôvodného popisu sa použili namiesto skúmaviek Patočkove nádoby, ktoré sa zdajú byť omnoho lepšie pre účely anaerobnej kultivácie.

Poznámka: Rozsiahly podrobný popis metodiky je podaný v prácach Ništiar (1978) a Ništiar, Hudáková a Semanová (1978).

Literatura

1. Bryant, M. P.: Symposium on microbial digestion in ruminants: Identification of groups of anaerobic bacteria active in the rumen. J. Anim. Sci., 22, 1963, s. 801.
2. Dehority, B. A.: Carbon dioxide requirement of various species of rumen bacteria. J. Bact., 105, 1971, s. 70.

3. Hungate, R. E.: Symbiotic association: The rumen bacteria. In: Nutman, P. S. - Mosse, B. (ed.): Symbiotic Associations. Thirteenth Symp. Soc. Gen. Microbiol., Cambridge University Press 1963.
4. Hungate, R. E.: A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. In: Norris, J. R. - Ribbons, D. W. (ed.): Methods in Microbiology, vol. 3B, London, Academic Press Inc. 1969, s. 117.
5. Mitsuoka, T. - Morishita, Y. - Terada, A. - Yamamoto, Sh.: A simple method (plate-in-bottle) for cultivation of strict anaerobes. Japan J. Microbiol., 13, 1969, s. 383.
6. Mylroie, C. - Hungate, R. E. (1954): cit. Hungate, R. E.: Rumen and its Microbes. New York, Academic Press 1966.
7. Ništiar, F.: Štúdium mikrobiálnej syntézy proteínov v bachore oviec pri rôznych dietách. Kandidátska dizertačná práca, VVDVÚ Košice, I. časť, 1978.
8. Ništiar, F. - Hudáková, T. - Semanová, D.: Kultivácia striktné anaerobných baktérií v Patočkových nádobách a Roux fľašiach. Zlepšovací návrh, č. 1. VVDVÚ Košice, 1978.
9. Sekaninová, G.: Beitrag zur Methodik der anaeroben Züchtung nicht sporulierender Anaerobier. Zbl. Bakt. Parasitenkunde I., 213, 1970, s. 142.
10. Sekaninová, G.: K metodice sledování střevní mikroflóry u dětí. Čs. epid. mikrobiol. imunol., 22, 1973, s. 274.
11. Sinkovics, B.: Anaerob kamra a bélbaktériumok tenyésztéséhez. Kisérl. Orvostud., 26, 197, s. 148.

Adresa autorov:

MVDr. František Ništiar

Vojenský veterinárny doškoľovací výskumný ústav

Pošt. priečinok B-35

041 15 Košice