geblomme, antibiotika m.v..

l) Ophældning på plader, 8 - 15 mL pr. plade.

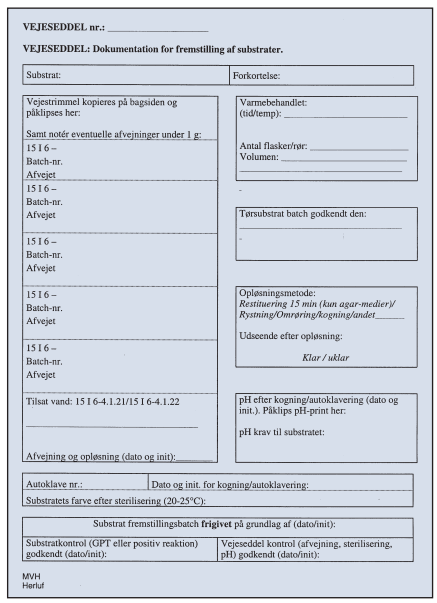
m) Eventuel tørring af plader.

n) Plader, der ikke bruges med det samme, kan gemmes i køleskab, indpakket i plastposer.

Færdigfremstillede rehydrerede substrater kan også købes færdigsteriliserede i flasker. Købt på denne form skal man kun gennemføre punkterne i) til n) fra den ovenstående liste.

Endelig kan nævnes at man også kan købe de fleste substrater som færdigstøbte plader, der umiddelbart er klar til brug. Det skal bemærkes, at sådanne færdigplader selvfølgelig ikke kan bruges til dyrkning af bakterier ved dybdeudsæd.

Som et led i kvalitetssikringen er det en god idé at bruge en eller anden form for "substratsedler", der udfyldes i forbindelse med substratfremstillingen og som kan virke som dokumentation for at substratet er korrekt fremstillet. På figur 6.4. ses et eksempel på, hvordan en sådan substratseddel kan være udformet.



VEJESEDDEL nr.: _____

VEJESEDDEL: Dokumentation for fremstilling af substrater.

Substrat:	Forkortelse:

Vejestrimmel kopieres på bagsiden og påklipses her:

Samt notér eventuelle afvejninger under 1 g:

15 I 6 –
Batch-nr.
Afvejet

15 I 6 –
Batch-nr.
Afvejet

15 I 6 –
Batch-nr.
Afvejet

15 I 6 –
Batch-nr.
Afvejet

15 I 6 –
Batch-nr.
Afvejet

Tilsat vand: 15 I 6-4.1.21/15 I 6-4.1.22

Afvejning og opløsning (dato og init):

Varmebehandlet:
(tid/temp): _____

Antal flasker/rør: _____
Volumen: _____

Tørsubstrat batch godkendt den:

Opløsningsmetode:
Restituering 15 min (kun agar-medier)/
*Rystning/Omrøring/kogning/andet*_____

Udseende efter opløsning:

Klar / uklar

pH efter kogning/autoklavering (dato og init.). Påklips pH-print her:

pH krav til substratet:

Autoklave nr.:	Dato og init. for kogning/autoklavering:
Substratets farve efter sterilisering (20-25°C):	

Substrat fremstillingsbatch **frigivet** på grundlag af (dato/init):

Substratkontrol (GPT eller positiv reaktion) godkendt (dato/init):	Vejeseddel kontrol (afvejning, sterilisering, pH) godkendt (dato/init):

MVH
Herluf

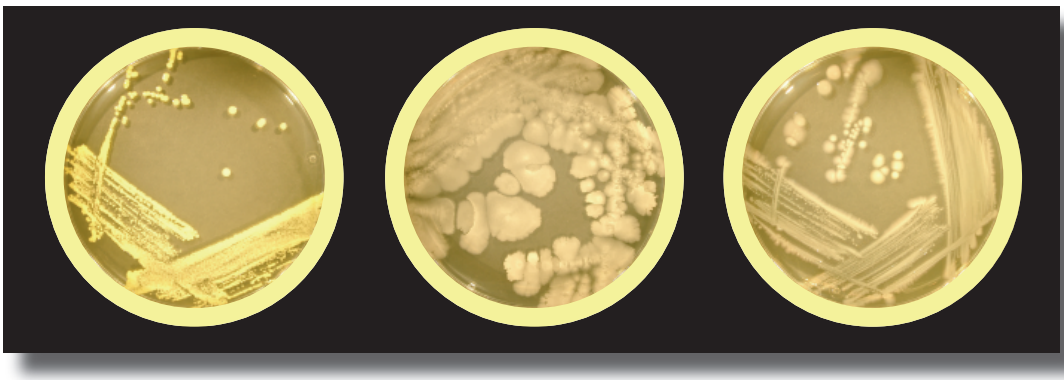
Fig.6.4. Eksempel på "substratseddel".

6.6. Substratoversigt

I det følgende er beskrevet nogle få udvalgte eksempler på substrater med angivelse af navn, forkortelse, selektivt og indikativt pricip, samt deres specielle anvendelsesområder. Substraternes sammen-

sætning er kun angivet i meget grove træk. For en mere udførlig substratoversigt henvises til diverse substrathåndbøger.

PCA = Plate Count agar



Eksempler på forskellig kolonimorfologi på PCA

Anvendelse:

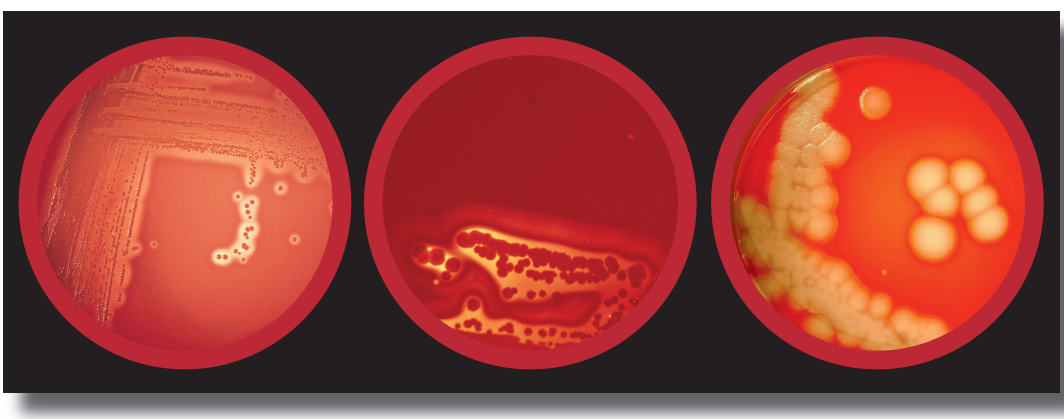
Beriget substrat, der ofte anvendes som en slags universalsubstrat for bakterier.

Sammensætning:

Pepton – let tilgængelig N-kilde. Glucose – let tilgængelig C- og energikilde. Gærekstrakt – vækststoffer og mineralsalte. Agar – geleringsmiddel. pH 7,0.

PCA er et alsidigt bakterienæringssubstrat, der opfylder næringskravene for en meget stor del af bakterierne.

BA = Blod-Agar



Forskellige former for hæmolyse.

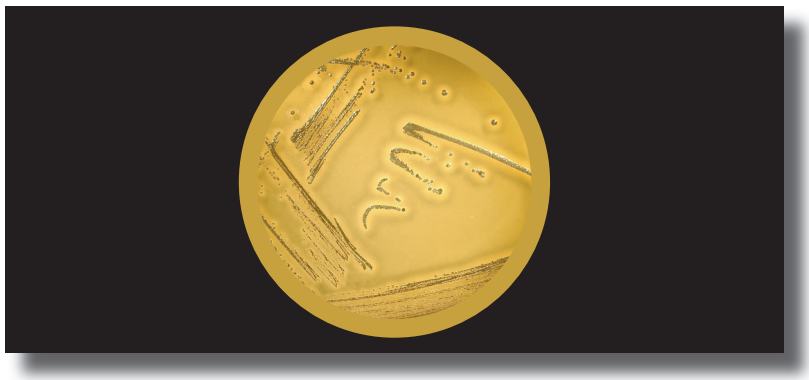
Blod-agar fremstilles ved tilsætning af 5 – 8 % blod til basissubstratet – fåre-, heste- eller kalveblod er mest almindeligt. Substratet

bruges til dyrkning af kræsne bakterier samt til bestemmelse af hæmolyseformer.

Substratet er specielt rigt på næringsstoffer – er et beriget substrat – og giver derfor gode vækstbetingelser for mange bakterier.

Blod-agar kan ved tilsætning af forskellige antibiotika gøres selektivt over for forskellige bakteriearter. Et eksempel herpå er tilsætning af polymycin til blod-agar ved bestemmelse af *Bacillus cereus*. Se mere om hæmolyse i afsnit 5.15

Baird-Parker-Agar (traditionel)



Sorte kolonier med opklaringszone: Staph. aureus

Baird-Parker-Agar (traditionel):

Sammensætning:

Grundsubstrat
Li-chlorid
K-tellurit
Na-pyruvat
Glycin
Æggeblommeemulsion

Anvendelse:

Selektivt-indikativt substrat til påvisning af *Staph aureus*.

Selektivt princip:

Li-chlorid og tellurit virker hæmmende på væksten af de fleste andre bakterier, mens pyruvat og glycin fremmer væksten af stafylokokker.

Indikativt princip:

Stafylokokkerne reducerer tellurit til tellur, der giver en sortfarvning af kolonierne. Efter 1 – 2 døgns forløb fremkalder *Staph. aureus* desuden opklarings- og udfældningszoner i substratet som følge af en spaltning af protein og lecithin (phospholipid).

Baird-Parker-Agar RPF (RPF = RabbitPlasmaFibrinogen)

Grundsubstrat
Li-chlorid
K-tellurit
Na-pyruvat
Glycin
Kanin-plasma + bovint fibrinogen

Anvendelse:

Selektivt-indikativt substrat til påvisning af *Staph aureus*.

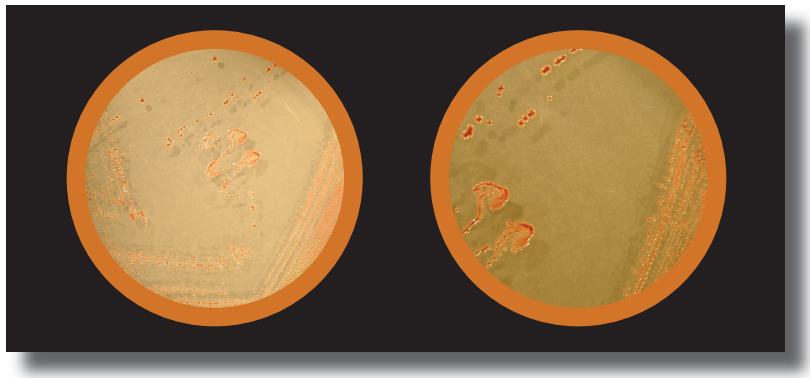
Selektivt princip:

Li-chlorid og tellurit virker hæmmende på væksten af de fleste andre bakterier, mens pyruvat og glycin fremmer væksten af stafylokokker.

Indikativt princip:

Stafylokokkerne reducerer tellurit til tellur, der giver en sortfarvning af kolonierne. Efter 1 – 2 døgns forløb fremkalder koagulasepositive *Staph. aureus* desuden dannelse af udfældningszoner i substratet af koaguleret kaninplasma og bovint fibrin (vedrørende baggrunden for koagulaseaktiviteten: se delafsnit 5.7.)

Slanetz & Bartley Agar



Røde kolonier med bleg rand: Enterococcus

Sammensætning:

Grundsubstrat
NaN_3 (natriumazid)
TTC (tetrazoliumchlorid)

Anvendelse:

Selektivt/indikativt substrat til påvisning af enterokokker.

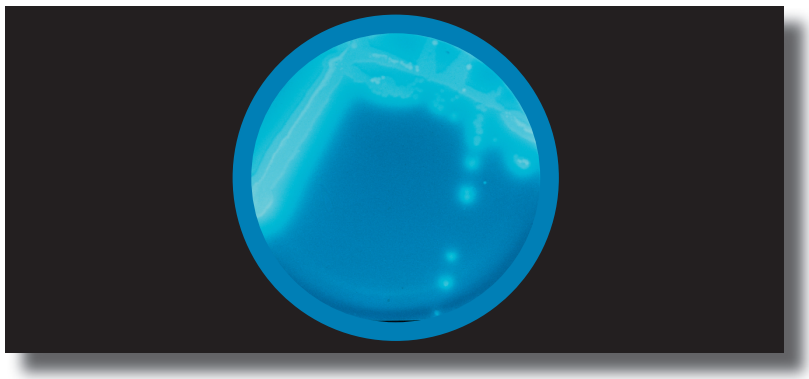
Selektivt princip:

NaN_3 hæmmer aerobe og fakultativt anaerobe mikroorganismer, men tillader vækst af mikroaerofile og anaerobe mikroorganismer.

Indikativt princip:

Enterokokker reducerer det farveløse TTC til rødt formazan, så de optræder med røde kolonier.

King Agar B



Fluorescerende vækst: Pseudomonas

Sammensætning:

Grundsubstrat
Glycerol
Mg_2SO_4

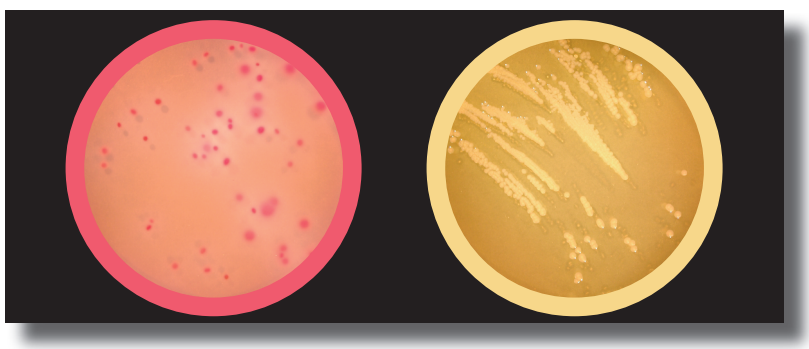
Anvendelse:

Indikatorsubstrat til påvisning af *Pseudomonas*.

Indikativt princip:

Indholdet af glycerol og Mg-ioner fremmer dannelsen af fluorescerende farvestoffer hos *Psudomonas*. Disse farvestoffer tydeliggøres ved aflæsning af pladerne under UV-lys (350 nm).

RVG = Rød-VioletGalde Agar



Rød: E.coli; Blege: Klebsiella

Sammensætning:

Grundsubstrat
Crystalviolet
Galdesalte
Lactose
Neutralrødt

Anvendelse:

Selektivt/indikativt substrat til påvisning af koliforme bakterier.

Selektivt princip:

Crystalviolet og galdesalte hæmmer de grampositive bakterier og tillader fortrinsvis vækst af gramnegative enterobakterier, som er galderesistente.

Indikativt princip:

Ved lactoseforgæringen sænkes pH, hvilket medfører, at der omkring kolonierne dannes komplekser af galdesyrer og substratets farvestoffer. Ikke-lactoseforgærende enterobakterier vokser derimod med blege kolonier.

Rambach Agar

Rød: Salmolla; Blågrøn: E.coli; Blege kolonier: Proteus

Sammensætning:

Grundsubstrat
Propylen glycol
Galdesalte
Chromogen mix
Neutralrødt

Anvendelse:

Selektivt/indikativt substrat til påvisning af *Salmonella*.

Selektivt princip:

Indholdet af galdesalte hæmmer de grampositive bakterier og tillader fortrinsvis vækst af gramnegative enterobakterier, som er galderesistente.

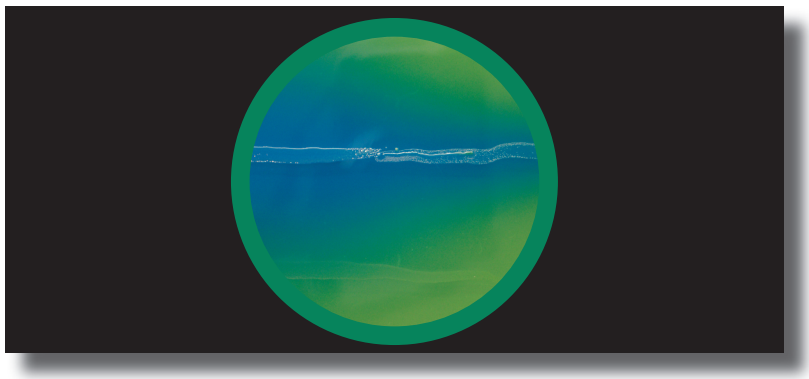
Indikativt princip:

Lactosepositive enterobakterier (koliforme) spalter det kromogene stof xgal under dannelse af x og gal (se afsnit 6.4.) som udfældes og giver kolonierne en grøn- blå farve.

Lactosenegative og propylen glycol negative, fx *Proteus*, vokser med ufarvede/gullige kolonier.

Lactosenegative og propylen glycol positive, *Salmonella*, forgærer propylen glycol under syredannelse. Dette får neutralrødt til at skifte fra farveløs til rød.

Simmons Citrat-Agar



Citratpositiv bakterie

Sammensætning:

$NH_4H_2PO_4$
NaCl
$C_6H_5O_7Na_3$ (= Na-citrat)
Bromthymolblåt
Agar

Anvendelse:

Et fuldt defineret selektivt substrat til identifikation af bakterier, specielt enterobakterier.

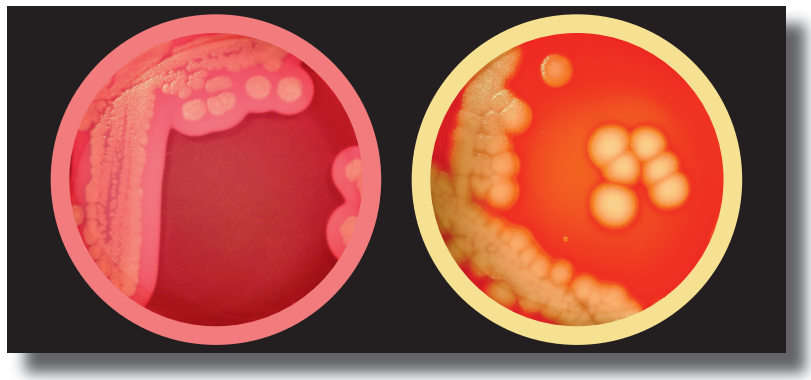
Selektivt princip:

Citrat er den eneste C- og energikilde, hvorfor det kun er de bakterier, der kan udnytte citrat, som kan vokse herpå. Omdannel-

sen af citrat medfører et stigende pH, som bevirker et indikatorskift (grøn → blå).

Cereus-Selektiv Agar efter Mossel

Med udfældningszoner: Bac. cereus; Uden udfældningszoner: Anden Bacillus



Sammensætning:

Grundsubstrat
Polymyxin
Æggeblommeemulsion
Mannitol
Phenolrødt

Anvendelse:

Selektivt/indikativt substrat til påvisning af *B.cereus*.

Selektivt princip:

B.cereus er lecithinasepositiv og vil derfor spalte æggeblommefedt og danne udfældningszoner omkring kolonierne. Endvidere er *B.cereus* mannitol-negativ, hvorfor den ikke vil danne syre og derfor vokser med røde kolonier.

TSC(E) = Tryptose-Sulfit-Cycloserin (Egg-yolk)

Sammensætning:

Grundsubstrat
$NaHSO_3$
Fe^{3+}-citrat
Cycloserin
(Æggeblommeemulsion)

Anvendelse:

Selektivt/indikativt substrat til påvisning af *Cl.perfringens* i fødeva-

rer. Substratet kan bruges uden (TSC) eller med (TSCE) æggeblommeemulsion.

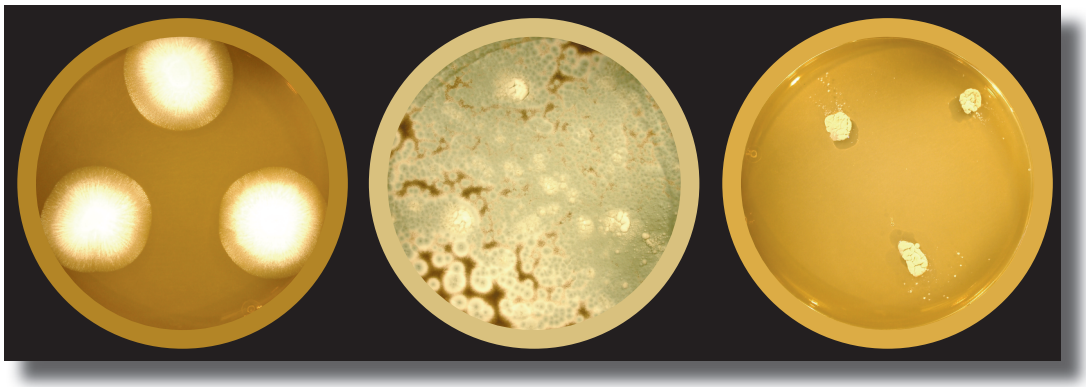
Selektivt princip:

Anaerobe dyrkningsforhold. Cycloserin forhindrer vækst af de fleste andre bakterier og hæmmer *Cl.perfringens* så meget, at den kun vokser med meget små kolonier med en lille sværtningsevne.

Indikativt princip:

Fe^{3+} reduceres til Fe^{2+} ($Fe^{3+} \rightarrow Fe^{2+}$) og sulfit reduceres til sulfid ($SO_3^{2-} \rightarrow S^{2-}$), hvorefter de dannede stoffer reagerer under dannelse af sorte kolonier bestående af FeS ($Fe^{2+} + S^{2-} \rightarrow FeS$). I TSCE dannes der tillige udfældningszoner som følge af en spaltning af æggeblommens lecithin (lecithinaseaktivitet).

MEA = Malt Ekstrakt Agar



Eksempler på skimmelsvampevækst på MEA.

Sammensætning:

Maltekstrakt
Agar
Vand
pH 5,6

Anvendelse:

Selektivt substrat til dyrkning af gær- og skimmelsvampe.

Selektivt princip:

Det forholdsvis lave pH 5,6 virker hæmmende på væksten af de allerfleste bakterier. Maltekstrakten virker vækstfremmende på gær- og skimmelsvampe.

6.7. Repetitionsspørgsmål

1. Hvordan justerer man pH i et substrat?
2. Hvad er et selektivt substrat?
3. Hvad er agars smelte- og størkningstemperatur?
4. Hvorfor kan stafylokokker meget dårligt vokse på RVG- agar?
5. Hvad er indikativt substrat?
6. Hvilken funktion har gærekstrakt i mikrobiologiske substrater?
7. Hvad betyder det, når der ved et substrat står "basis"?
8. Hvad er et beriget substrat?
9. Hvorfor skal dehydrerede færdigsubstrater, der indeholder agar, henstå med koldt vand før opkogning?
10. Hvordan skal færdigstøbte plader opbevares?
11. Hvad forstås ved udtrykket "grundsubstrat"?
12. Hvad er den selektive faktor i Slanetz agar?
13. Hvorfor er det så vigtigt, at man overholder de foreskrevne tider og temperaturer for autoklavering af substrater?
14. Hvad er et fuldstændig defineret substrat?
15. Hvorfor bør man ikke afkøle smeltede agarsubstrater under vandhanen?
16. Nævn et eksempel på en lettilgængelig N-kilde til mikrobiologiske substrater.
17. Hvorfor tilsættes sukkeropløsninger som regel først, når substratet er blevet autoklaveret?
18. Hvad er et dehydreret substrat?