



Instrukcje do ćwiczeń oraz zakres materiału realizowanego na wykładach z przedmiotu

Mikrobiologia

na kierunku

biologia

Organizacja zajęć laboratoryjnych (ćwiczeń) z przedmiotu **mikrobiologia**

Na zajęcia laboratoryjne z przedmiotu mikrobiologia realizowanego dla kierunku biologia składają się trzy bloki tematyczne:

B1 – Podstawy hodowli i analizy bakterii

B2 – Podstawy biochemii bakterii

B3 – Wpływ czynników fizycznych i chemicznych na bakterie

B4 – Podstawy mikrobiologii środowiskowej

C1	Przepisy BHP obowiązujące w laboratorium mikrobiologicznym. Metody sterylizacji i dezynfekcji. Podłoża mikrobiologiczne.
C2	Techniki posiewów mikrobiologicznych, metody hodowli i liczenia drobnoustrojów
C3	Morfologia makroskopowa. Barwienie bakterii (część 1)
C4	Barwienie bakterii (część 2)
C5	Wykrywanie właściwości biochemicznych bakterii
C6	Metabolizm energetyczny bakterii
C7	Wpływ czynników fizycznych na bakterie
C8	Oznaczanie lekowrażliwości bakterii (część 1)
C9	Oznaczanie lekowrażliwości bakterii (część 2)
C10	Analiza mikrobiologiczna powietrza
C11	Analiza mikrobiologiczna wody
C12	Analiza mikrobiologiczna gleby
C13	Kolokwium z wiedzy praktycznej
C14	Kolokwium z wiedzy teoretycznej

Na zajęciach ósmym (C8) **kolokwium** z wiedzy teoretycznej z zakresu materiału realizowanego w ramach bloków B1 i B2

Zakres materiału (zagadnienia) w ramach wykładów z przedmiotu mikrobiologia na kierunku biologia

- Historia odkryć w dziedzinie mikrobiologii.
- Klasyfikacja nauk mikrobiologicznych.
- Budowa komórki bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych
- Budowa ściany komórkowej grzybów
- Wybrane czynniki chorobotwórczości bakterii Gram+ i Gram-
- Budowa i klasyfikacja wirusów.
- Cykl lityczny i lizogenny bakteriofagów. Fagoterapia – wady i zalety
- Metabolizm bakterii chemolitotroficznych.
- Metabolizm bakterii chemoorganotroficznych.
- Organizacja genomów bakterii, przekazywanie informacji genetycznej.
- Charakterystyka wybranych metod serologicznych i genetycznymi stosowanych w diagnostyce mikrobiologicznej
- Patomechanizm wybranych chorób o podłożu bakteryjnych, rola:
 - *Helicobacter pylori*
 - *Pseudomonas aeruginosa*
 - *Staphylococcus aureus*
- Klasyfikacja antybiotyków i mechanizmy działania antybiotyków. Rodzaje oporności.
- Przegląd nowych terapii przeciwbakteryjnych i przeciwgrzybiczych

Ćwiczenie nr 2

Temat: Techniki posiewów mikrobiologicznych, metody hodowli i liczenia drobnoustrojów

Część teoretyczna

1. Pojęcie czystej kultury
2. Metody otrzymywania czystych kultur
3. Rodzaje posiewów i ich rola w mikrobiologii
4. Typy hodowli drobnoustrojów
5. Krzywa wzrostu hodowli i jej fazy
6. Pojęcie CFU (jednostek tworzących kolonie)

Wykonanie ćwiczenia

1. *Posiew na bulion wzbogacony*

Wyżarzyć eże, ostudzić i pobrać na oczko posiewany materiał (pobrać nieco bakterii z hodowli stałej). Odkorkować probówkę z jałowym bulionem wzbogaconym, opalić jej ujście w płomieniu palnika a następnie zanurzyć oczko eży w pożywce i energicznie potrząsnąć

2. *Posiew rysowy na skos agarowy (skos Kliglera)*

Wyżarzyć eżę, wystudzić i pobrać na oczko posiewany materiał. Wykonać posiew wg omawianego schematu

3. *Posiew redukcyjny*

Wyżarzyć eżę mikrobiologiczną, wystudzić i pobrać na oczko posiewany materiał. Wykonać posiew wg omawianego schematu.

4. *Metoda seryjnych rozcieńczeń i płytek mazanych – liczenie drobnoustrojów*

Pobrać wyżarzoną i ostudzoną eżę pojedynczą kolonię i zawiesić w 10 ml bulionu wzbogaconego. Przygotować szereg rozcieńczeń powyżej hodowli według omawianego schematu w probówkach typu endorff Pipetą automatyczną pobrać 100 µl zawiesiny bakterii w jałowej soli fizjologicznej, nanieść na płytkę z podłożem stałym i dokładnie rozprowadzić sterylną głaszczką po powierzchni płytki.

Wszystkie posiewy inkubować w temperaturze 37°C przez 24 godziny.

Piśmiennictwo

Różalski A, Ćwiczenia z mikrobiologii ogólnej: część I teoretyczna. wydanie II rozdział 8

Notatki.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

Ćwiczenie nr 5

Temat: Wykrywanie właściwości biochemicznych bakterii

Zagadnienia teoretyczne

1. Podział drobnoustrojów ze względu na sposoby odżywiania się i zdobywania energii
2. Właściwości bakterii: glikolityczne, proteolityczne, glikolityczna, utleniająco-redukcyjne i inne
3. Praktyczne wykorzystanie właściwości biochemicznych drobnoustrojów

Wykonanie ćwiczenia

1. Wykrywanie właściwości glikolitycznych (inkubacja 24 godz.)
Posiew kłuty bakterii na podłoże Kliglera
2. Wykrywanie właściwości proteolitycznych (inkubacja 24 godz.)
Posiew redukcyjny na podłoże z dodatkiem 10% odtłuszczonego mleka
3. Wykrywanie właściwości lipolitycznych (inkubacja 4 dni)
Posiew na podłoże stałe z dodatkiem Tween 80
4. Wykrywanie właściwości utleniająco-redukcyjne (obecność katalazy)
Na denko szalki Petriego nanieść kroplę wody utlenionej, do kropli dodać eż odrobinę bakterii

Odczyt wyników

1. Wykrywanie właściwości glikolitycznych
Odczyt z podłoża Kliglera:
rozkład glukozy – żółty słupek; rozkład glukozy i laktozy – zażółcenie całego podłoża; brak rozkładu cukrów – nie zmieniona barwa podłoża (czerwone) – rozkład aminokwasów z peptonu (właściwości proteolityczne, wtórna alkalizacja podłoża); wytwarzanie H₂S – zaciemnienie podłoża; gazowanie porozrywanie podłoża przez pęcherzyki gazu
Odczyt z podłoża z dodatkiem mannitolu:
2. Wykrywanie właściwości proteolitycznych
rozkład białek mleka (kazeina) – strefa przejaśnienia wokół kolonii bakterii
3. Wykrywanie właściwości lipolitycznych
rozkład Tween 80 – strefa wytrąconego wapnia („mydło wapniowe”)
4. Wykrywanie właściwości utleniająco-redukcyjne
obecność katalazy – pojawienie się pęcherzyków gazu (tlen)

Wyniki umieścić w tabeli.

Drobnoustrój	Właściwości							
	Glikolityczne				Proteolityczne		Lipolityczne	Oksydo-redukcyjne
	Glukoza	Laktoza	H ₂ S	Gaz	Pepton	Kazeina		

+ reakcja dodatnia, - brak reakcji

Piśmiennictwo

Różalski A, Ćwiczenia z mikrobiologii ogólnej: część I teoretyczna. wydanie II rozdział 15

Ćwiczenie nr 6

Temat: Metabolizm energetyczny bakterii

Zagadnienia teoretyczne

1. Znaczenie terminów: metabolizm, katabolizm, anabolizm
2. Podział bakterii ze względu na sposoby pozyskiwania energii.
3. Fermentacja – przebieg i znaczenie.
4. Oddychanie – przebieg i znaczenie.
5. Przebieg i znaczenie glikolizy (szlak Embdena-Meyerhofa-Parnasa)

Wykonanie ćwiczenia

1. *Określenie stosunku bakterii do tlenu*

Sporządzić zawiesinę bakterii w soli fizjologicznej (zawiesina o gęstości 1 w skali McFarlanda). Podłoża płynne 1 i 2 (1 – bulion odżywczy z dodatkiem 0,5% glukozy - wysoki słup podłoża; 2 – bulion odżywczy - niski słup podłoża) zaszczepić zawiesiną bakterii.

Uwaga! Przed posiewem próbówki z wysokimi słupami podłoża należy zagrzać we wrzącej łaźni wodnej, a następnie szybko schłodzić.

Po posiewie – wysoki słup podłoża zalać 1 ml jałowej parafiny, aby uniemożliwić dostęp powietrza.

2. *Określenie sposobu metabolizowania glukozy*

Wykonać posiew kłuty na dwie próbówki z podłożem Hugh-Leifsona a następnie jedną z nich nawarstwić 1 ml parafiny.

3. *Określenie zdolności bakterii do oddychania azotanowego (metabolizowania azotanu (V) do azotanu (III))*

Podłoże płynne z azotanem sodu zaszczepić 200 µl zawiesiny bakterii. Podłoże nawarstwić 1 ml parafiny.

Odczyt wyników

1. *Określenie stosunku bakterii do tlenu*

Obserwować wzrost lub jego brak w poszczególnych próbówkach. Określić czy badane bakterie są mikroorganizmami tlenowymi czy beztlenowymi.

2. *Określenie sposobu metabolizowania glukozy*

Określ typ rozkładu cukrów przez szczepy bakterii, na podstawie obserwacji hodowli na pożywce Hugh-Leifsona. Rozkład cukrów w podłożu powoduje wytworzenie kwasu. Zakwaszenie podłoża powoduje natomiast odbarwienie błękitu bromotymolowego zawartego w podłożu. W jednej próbówce podłoże jest pokryte parafiną – w próbówce panują warunki beztlenowe; w drugiej (bez parafiny) – tlenowe. Jeżeli badany organizm utlenia glukozę będzie produkować kwas tylko w otwartej próbówce (bez parafiny). Jeśli przeprowadza fermentację będzie produkować kwas zarówno w próbówce z podłożem pokrytym parafiną jak i w próbówce bez parafiny.

3. *Określenie zdolności bakterii do oddychania azotanowego*

Do próbówki dodaj kilka kropel odczynnika Griessa (roztwór kwasu sulfanilowego i α -naftyloaminy w kwasie octowym). Czerwone lub różowe zabarwienie świadczy o reakcji dodatniej (obecność azotanu (III) a tym samym o wykorzystywaniu azotanów jako akceptora elektronów. Wynik ujemny potwierdzić dodając do próbek szczyptę pyłku cynkowego. Pojawienie się różowego lub czerwonego zabarwienia świadczy o obecności nierozłożonych azotanów. Brak zabarwienia świadczy o wyniku dodatnim.

Piśmiennictwo

Różalski A, Ćwiczenia z mikrobiologii ogólnej: część I teoretyczna. wydanie II rozdział 15

Ćwiczenie nr 7

Temat: Wpływ czynników fizycznych na bakterie

Zagadnienia teoretyczne

1. Pojęcie tolerancji na zmiany warunków wzrostu i zakresy tolerancji
2. Wpływ pH, ciśnienia osmotycznego, temperatury, promieniowania UV na drobnoustroje
3. Psychrofile, psychrotrofy, mezofile, termofile i hipertermofile; alkalofile, neutrofile i acydofile
4. Sposoby reagowania drobnoustrojów na niekorzystnych warunki wzrostu: białka CSP i HSP, krioprotektanty, białka przeciwzamarzaniowe, sposoby zachowania płynności błon biologicznych.
5. Fotoreaktywacja, system SOS
6. Możliwości przystosowawcze drobnoustrojów

Wykonanie ćwiczenia

1. Wpływ temperatury na drobnoustroje. Posiew *E. coli*, *B. subtilis*, *S. lutea* i *S. epidermidis* na 3 podłoża bulionowe i inkubacja 30-minutowa w temperaturze: - 20°C, 55°C, 100°C; następnie inkubacja 24-godzinna w 37°C.
2. Wpływ promieniowania UV na drobnoustroje. Posiew *E. coli* i *S. epidermidis* na płytki z podłożem stałym (posiew na „murawę”) i naświetlanie 1 i 30 minut UV po nakryciu krążkiem z otworami; inkubacja 24-godzinna w temperaturze 37°C.
3. Wpływ pH na drobnoustroje. Posiew ww. bakterii na podłoża bulionowe o pH: 2, 5, 10.

Odczyt wyników

1. Uzupełnij tabelę.

Drobnoustrój	Temperatura (°C)			UV		pH		
	-20	55	100	1 min	30 min	2	5	10
<i>E. coli</i>								
<i>S. lutea</i>								
<i>B. subtilis</i>								
<i>S. epidermidis</i>								

Piśmiennictwo

Różalski A, Ćwiczenia z mikrobiologii ogólnej: część I teoretyczna. wydanie II rozdział 16

Notatki.....

.....

.....

.....

.....

Ćwiczenie nr 8

Temat: Oznaczanie lekowrażliwości bakterii (część 1)

Zagadnienia teoretyczne

1. Klasy antybiotyków
2. Mechanizmy działania antybiotyków z różnych grup
3. Mechanizmy oporności bakterii na antybiotyki z różnych grup
4. Antybiotyki a chemioterapeutyki
5. Niebezpieczeństwa związane z narastaniem oporności na preparaty przeciwbakteryjne (szczepy wielolekooporne – MDR, gronkowce MRSA, enterokoki VRE, prątki gruźlicy XDR)

Wykonanie ćwiczenia*1. Wykonanie antybiogramu*

W jałowej soli fizjologicznej sporządzić zawiesinę badanych bakterii, tak aby uzyskać zmętnienie równe 1^o w skali McFarlanda. Następnie nanieść 100 µl zawiesiny na powierzchnię stałego podłoża Müeller-Hintona i za pomocą wyjałowionej głaszczki rozprowadzić zawiesinę dokładnie i jednolicie na powierzchni pożywki. Po inokulacji (po wyschnięciu zawiesiny ale nie później niż 15 min. od posiewu) umieścić na powierzchni podłoża krążki nasączone antybiotykami/chemioterapeutykami i lekko je docisnąć. Należy zwrócić uwagę, żeby każdy krążek miał zapewniony dobry kontakt z agarem i żeby odległość między poszczególnymi krążkami była nie mniejsza niż 2 cm.

Posiewy inkubować przez 24 h w temp. 37°C.

Odczyt wyników

Zmierzyć wielkość średnicy strefy zahamowania wzrostu wokół krążka nasyczonego antybiotykiem. Jest to miara wrażliwości badanego szczepu na dany antybiotyk. Oceny wrażliwości dokonuje się według norm NCCLS M2-A7 ze stycznia 2000r. lub według standardów EUCAST.

Gatunek bakterii	antybiotyk/chemioterapeutyk				

Piśmiennictwo

Różalski A, Ćwiczenia z mikrobiologii ogólnej: część I teoretyczna. wydanie II rozdział 18

Notatki.....

.....

Ćwiczenie nr 9

Temat: Oznaczanie lekowrażliwości bakterii (część 2)

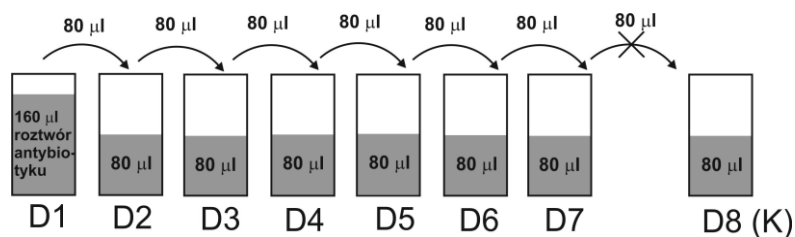
Zagadnienia teoretyczne

1. Pojęcie MIC i MBC
2. Efekt bakteriobójczy i bakteriostatyczny antybiotyków
3. Antybiotyki naturalne, półsyntetyczne i syntetyczne

Wykonanie ćwiczenia

1. Przygotowanie szeregu rozcieńczeń antybiotyku

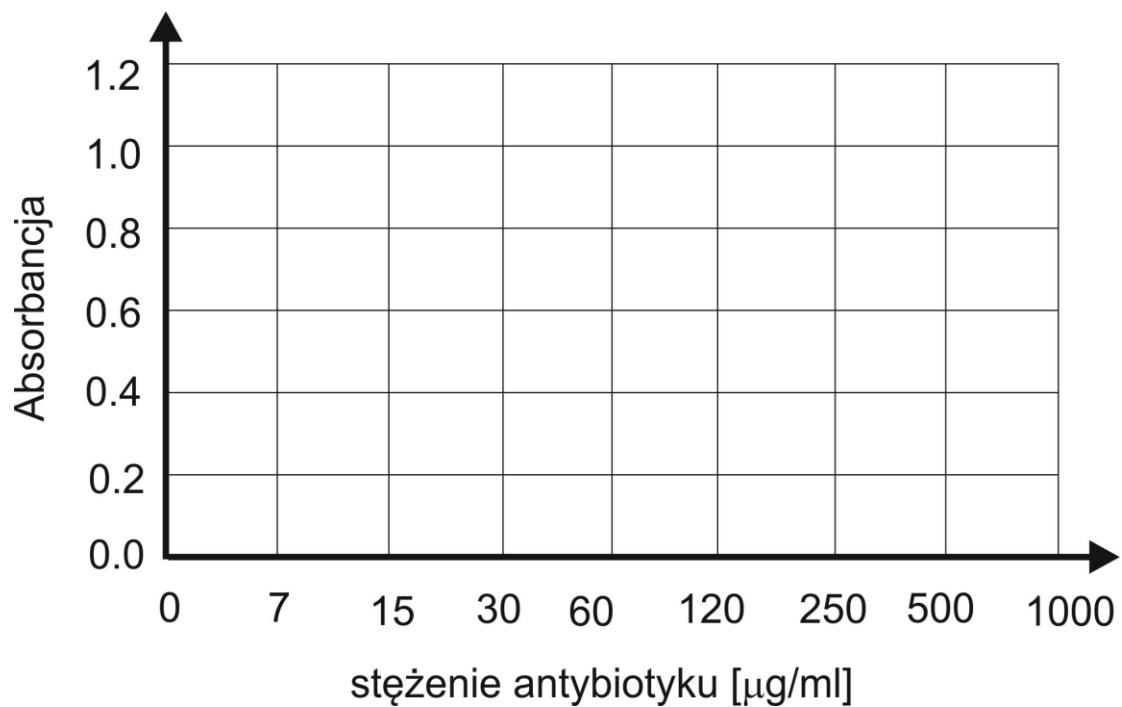
W 96 dołkowej płytce titracyjnej przygotować szereg rozcieńczeń antybiotyku w podłożu LB (metoda seryjnych rozcieńczeń) według schematu:



Do szeregu rozcieńczeń antybiotyku dodać 20 µl hodowli płynnej bakterii. Zmierzyć absorbancję przed i po 24 h inkubacji w temp. 37°C przy długości fali 600 nm.

Odczyt wyników

Uzupełnić wykres – sporządzić dwie krzywe tj. pomiar przed i po 24 h inkubacji



Piśmiennictwo

Różalski A, Ćwiczenia z mikrobiologii ogólnej: część I teoretyczna. wydanie II rozdział 18

Ćwiczenie nr 10

Temat: Analiza mikrobiologiczna powietrza

Część teoretyczna

1. Powietrze jako środowisko bytowania drobnoustrojów.
2. Czynniki wpływające na liczbę drobnoustrojów w powietrzu.
3. Charakterystyka mikroorganizmów występujących w powietrzu.
4. Sposoby rozprzestrzeniania się drobnoustrojów w powietrzu.
5. Znaczenie mikroorganizmów bytujących w powietrzu szpitali, aptek.
6. Charakterystyka metod mikrobiologicznego badania powietrza – met. sedymentacyjna, met. zderzeniowa (wolumetryczna).

Wykonanie ćwiczenia

1. *Badanie mikrobiologiczne powietrza metodą sedymentacyjną (PN-89-Z-04111/02; PN-89-Z-04008/08)*
 - Oznaczanie ogólnej liczby bakterii – otwarte płytki z agarem wzbogaconym ekspozować 10 minut w wybranych stanowiskach na wysokości ok. 150 cm, następnie zamknąć i inkubować 24 h w temp. 37°C.
 - Wykrywanie obecności gronkowców mannitolo-dodatnich - otwarte płytki z podłożem Chapmana ekspozować 30 minut w wybranych stanowiskach na wysokości ok. 150 cm, następnie zamknąć i inkubować 24 – 48 h w temp. 37°C.
 - Wykrywanie obecności *Pseudomonas fluorescens* – otwarte płytki z podłożem King B ekspozować 30 minut w wybranych stanowiskach na wysokości ok. 150 cm, następnie zamknąć i inkubować 48 h w temp. 26°C.
 - Oznaczanie liczby grzybów mikroskopowych na podłożu Sabourauda z chloramfenikolem (PN-89-Z-04111/03) – otwarte płytki z podłożem ekspozować 10 minut w wybranych stanowiskach na wysokości ok. 150 cm, zamknąć i inkubować co najmniej 3 doby (jeśli nie obserwuje się wzrostu, przedłużyć czas inkubacji do 7 dni) w temp. 26°C.

Policzyć ilość kolonii bakterii na podłożach a następnie przeliczyć wg wzoru:

$$A = \frac{a \times 10^4}{\Pi \times r^2 \times 0,2 \times t} \text{ gdzie:}$$

A – liczba bakterii /grzybów mikroskopowych w 1m³ powietrza atmosferycznego,

a – średnia liczba kolonii na płytkach Petriego,

$\Pi \times r^2$ – powierzchnia płytki Petriego (cm²),

t – czas ekspozycji (min.),

0,2 – współczynnik przeliczeniowy czasu ekspozycji.

Stanowisko	Ilość bakterii na podłożu			
	Agar wzbogacony	Chapmana	King B	Sabourauda

Ćwiczenie nr 11

Temat: Analiza mikrobiologiczna wody

Zagadnienia teoretyczne

1. Czynniki determinujące rozwój drobnoustrojów w środowisku wodnym
2. Procesy zachodzące w zbiornikach wodnych
3. Drobnoustroje charakterystyczne dla zbiorników wodnych
4. Bakterie allochtoniczne zbiorników wodnych
5. Zasady analizy sanitarnej wody

Wykonanie ćwiczenia

1. *Oznaczanie ogólnej liczby bakterii mezofilnych i psychrofilnych w 1 ml wody wodociągowej i rzecznej/studziennej*

Wykonać posiew badanych wód metodą płytek lanych.

Na dwie sterylne szalki Petriego (na denko) nalać pipetą automatyczną 1 ml badanej wody i zalać rozpuszczonym i ochłodzonym do ok. 50°C agarem wzbogaconym, odczekać do zastygnięcia i odwrócić. Posiewy inkubować 72h w temp. 37°C (jedna płytka – bakterie mezofilne) i 3 dni w temp. 26°C (druga płytka – bakterie psychrofilne).

2. *Oznaczanie wskaźnika zanieczyszczenia wody bakteriami grupy coli metodą filtrów membranowych (FM) wg PN-75/C-04615.06.*

Wyjałowioną pęsetą przenieść sterylny filtr na porowatą płytkę aparatu filtracyjnego, założyć lejek i wlać odpowiednią objętość badanej wody, włączyć pompę próżniową i otworzyć kran aparatu filtracyjnego. Po przesączeniu próbki wody spłukać dokładnie ściany lejka buforowaną jałową wodą (około 20 ml), wyłączyć próżnię i zdjąć lejek. Filtr przenieść jałowo na płytkę Endo i położyć go powierzchnią filtracyjną ku górze; filtr powinien szczelnie przylegać do powierzchni podłoża, inkubować w temp. 37°C przez 20±2 godziny, jeśli stwierdza się brak wzrostu po 20 godz., płytki pozostawić w cieplarni na następne 24 godziny

Odczyt wyników

1. Oznaczanie ogólnej liczby bakterii w 1 ml wody wodociągowej i rzecznej/studziennej. Policzyc ilość kolonii wyrosłych na podłożu, a wybrane zabarwić metodą Grama.
2. Oznaczanie wskaźnika coli metodą filtrów membranowych.

Liczba wyrosłych na filtrze typowych kolonii określana jest **wskaźnikiem coli (X)**, który oblicza się wg

następującego wzoru:
$$X = \frac{a \cdot 100}{V}$$

gdzie: a – liczba typowych kolonii, V – objętość przesączonej próbki w ml.

Piśmiennictwo

Różalski A, Ćwiczenia z mikrobiologii ogólnej: część I teoretyczna. wydanie II rozdział 24.2

Notatki.....

.....

.....

.....

Ćwiczenie nr 12

Temat: Analiza mikrobiologiczna gleby

Zagadnienia teoretyczne

1. Gleba jako środowisko bytowania drobnoustrojów
2. Rola i znaczenie bakterii występujących w glebie
3. Czynniki wpływające na ilość mikroflory glebowej
4. Cechy charakterystyczne bakterii glebowych
5. Krążenie azotu w przyrodzie
6. Symbioza bakterii z roślinami motylkowymi
7. Promieniowce (*Actinomycetales*)

Wykonanie ćwiczenia

1. Oznaczanie ogólnej liczby bakterii w glebie

Odważyć po 50g każdej z badanych rodzajów gleby i przenieść do kolb z jałową wodą destylowaną (rozcieńczenie 10^{-1}), zawiesinę gleb wytrząsać ok. 5 min. a następnie odczekać do opadnięcia większych cząstek. Wykonać rozcieńczenia 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} ; z trzech ostatnich wylać po 1 ml na denka płytek Petriego a następnie zalać podłożem stałym, z glukozą i kazeinianem sodu, rozpuszczonym i ochłodzonym do ok. 50°C. Inkubować 3 dni w temp. 25°C.

2. Wykrywanie w glebie obecności promieniowców

Z wykonanych rozcieńczeń wylać po 1 ml na denka płytek Petriego a następnie zalać podłożem stałym LB rozcieńczonym 100- i 1000-krotnie, odczekać do zestalenia się pożywki i inkubować 3 dni w temp. 25°C.

Odczyt wyników

Policzyć ilość kolonii bakterii wyrosłych z każdego rodzaju gleby, metodą Grama zabarwić wybrane kolonie. Uzupełnić tabelę

Próbka gleby	Ilość kolonii po 3 dniach inkubacji			Średnia ilość kolonii w 50g gleby
	Rozc. 10^{-4}	Rozc. 10^{-5}	Rozc. 10^{-6}	
I				
II				
III				

Określić występowanie promieniowców na podstawie ich charakterystycznych cech morfologicznych.

Piśmiennictwo

Różalski A, Ćwiczenia z mikrobiologii ogólnej: część I teoretyczna. wydanie II rozdział 24.1

Notatki.....

.....