



Instrukcje do ćwiczeń oraz zakres materiału realizowanego na wykładach z przedmiotu

## **Mikrobiologia**

na kierunku

*chemia kosmetyczna*

## Zakres materiału (zagadnienia) w ramach wykładów z przedmiotu mikrobiologia na kierunku chemia kosmetyczna

- 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.
- Klasyfikacja antybiotyków i mechanizmy działania antybiotyków. Rodzaje oporności.
- Mikroflora bakteryjna skóry

## Ćwiczenie nr 1

**Temat:** Przepisy BHP obowiązujące w laboratorium mikrobiologicznym. Metody sterylizacji i dezynfekcji. Podłoża mikrobiologiczne.

### Część teoretyczna

1. Metody sterylizacji i ich znaczenie w mikrobiologii.
2. Sterylizacja a pasteryzacja.
3. Dezynfekcja i metody dezynfekcji.
4. Definicja podłoża mikrobiologicznego i jego cechy.
5. Podział podłoży mikrobiologicznych.

### Część praktyczna

1. Przygotowywanie podłoży płynnych i stałych.
2. Sterylizacja podłoży mikrobiologicznych parą wodną pod zwiększonym ciśnieniem (agar wzbogacony).
3. Sterylne rozlewanie podłoża stałego na płytki Petriego.

Rozłożyć jałowe szalki Petriego denkiem do dołu wokół palnika, uchylić wieczko i wlać ok. 25 ml rozpuszczonego sterylnego agaru wzbogaconego, ewentualnie przepalić. Odczekać do zestalenia się podłoża, po czym odwrócić płytki denkiem do góry.

Przygotowane podłoża inkubować w temperaturze 37°C przez 24 godziny (kontrola sterylności).

## Ćwiczenie nr 2

**Temat:** Techniki posiewów mikrobiologicznych, metody hodowli, fazy wzrostu hodowli drobnoustrojów.

### Część teoretyczna

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

### Część praktyczna

1. Techniki posiewów mikrobiologicznych.

- Posiew na bulion wzbogacony

Wyżarzyć eze, ostudzić i pobrać na oczko posiewany materiał. Zanurzyć oczko ezy w probówce z bulionem i energicznie potrząsnąć.

- Posiew redukcyjny

Wyżarzyć ezę mikrobiologiczną, wystudzić i pobrać na oczko posiewany materiał (nieco bakterii z hodowli stałej). Wykonać posiew wg omawianego schematu.

- Posiew murawowy metodą płytek mazanych

Pipetą automatyczną pobrać 100 µl rozcieńczonej zawiesiny bakterii, nanieść na płytkę z podłożem stałym i dokładnie rozprowadzić sterylną głaszczką po powierzchni płytki. Wszystkie posiewy inkubować w temp. 37°C.

## Ćwiczenie nr 3

Temat: Morfologia makro- i mikroskopowa. Struktura komórki bakteryjnej.

### Część teoretyczna

1. Cechy charakteryzujące morfologię makroskopową bakterii
2. Wzrost bakterii na podłożu stałym i płynnym
3. Sposoby barwienia bakterii
4. Rodzaje barwników stosowanych podczas barwienia drobnoustrojów
5. Pojęcie zdolności rozdzielczej i apertury numerycznej oraz rola olejku immersyjnego w mikroskopii
6. Budowa komórki bakteryjnej i znaczenie jej części składowych

### Część praktyczna

- Przygotowanie preparatów mikrobiologicznych.

Przygotować szkiełko podstawowe (odtłuścić alkoholem i opalić w płomieniu palnika), nanieść na nie kroplę wody destylowanej. Wyżarzoną eżą mikrobiologiczną pobrać nieco bakterii i wykonać rozmaz (powinien być cienki). Rozmaz utrwalić w płomieniu palnika.

- Barwienie bakterii metodą Grama.

Wysuszony rozmaz bakterii barwić wg procedury:

- 1,5 min. fiolet krystaliczny
- 1,5 min. płyn Lugola
- spłukać pod wodą bieżącą, odbarwić i ponownie spłukać
- 8 sek. fuksyna, po czym preparat spłukać wodą

Wszystkie preparaty osuszyć i oglądać pod immersją przy powiększeniu obiektywu 100x.

### Odczyt wyników

Wykonaj opis morfologii makroskopowej posiewanych bakterii (posiew z poprzedniego ćwiczenia). Zwróć uwagę cechy charakteryzujące typ wzrostu na podłożu płynnym i stałym.

Wykonaj rysunek obrazu mikroskopowego barwionych bakterii, zalicz je do odpowiedniej grupy.

## Ćwiczenie nr 4

**Temat:** Analiza mikroflory skóry.

### Część teoretyczna

1. Pojęcie diagnostyki mikrobiologicznej
2. Komercyjne mikrometody wielotestowe w identyfikacji bakterii
3. Rola prawidłowej mikroflory człowieka
4. Drogi infekcji
5. Podstawowe czynniki wirulencji bakterii i ich rola w wywołaniu infekcji

### Część praktyczna

1. Pobranie wymazu z różnych obszarów skóry.

Wymaz wykonać sterylną wymazówką. Wymazówkę zwilżyć lekko jałowym roztworem soli fizjologicznej. Dokładnie zetrzeć fragment skóry (możliwie duży), w taki sposób aby pobrać wymaz każdą stroną wymazówki. Materiał posiewać na odpowiednie podłoża stałe:

Agar z krwią – wykrywanie drobnoustrojów hemolizujących

Podłoże Chapmana – wykrywanie i różnicowanie gronkowców

Podłoże Baird-Parker – wykrywanie *Staphylococcus aureus*

Podłoże Sabourauda – wykrywanie grzybów drożdżoidalnych

### Odczyt wyników

Oceń wzrost drobnoustrojów na poszczególnych pożywkach. Zwróć uwagę czy pojawia się strefa hemolizy na podłożu z krwią i czy zachodzi rozkład mannitolu na podłożu Chapmana.

## Ćwiczenie nr 5

**Temat:** Analiza mikrobiologiczna kosmetyków.

### Część teoretyczna

1. Objawy zakażenia produktów kosmetycznych.
2. Składniki produktów kosmetycznych hamujące aktywność drobnoustrojów.
3. Wskaźniki skażenia kosmetyków.
4. Mikrobiologiczne wymagania ilościowe dla kosmetyków przeznaczonych dla dzieci i w okolicy oczu oraz dla pozostałych preparatów.
5. Metody badań mikrobiologicznych środków kosmetycznych.

### Część praktyczna

1. Określenie całkowitej liczby tlenowych drobnoustrojów mezofilnych metodą płytkową.  
Na powierzchni jałowej płytki Petriego z podłożem agarowym (agar wzbogacony) wysiać 0,1 ml rozcieńczonej próbki odpowiadającej 0,01 g wyrobu (rozcieńczyć buforowanym roztworem chlorku sodu z peptonem o pH 7,0) i rozprowadzić jałową głaszczką. Szalki inkubować w 30-35°C przez 3 dni w przypadku bakterii, 20-25°C przez 5 dni w przypadku grzybów, chyba że bardziej wiarygodne zliczenia są osiągalne w krótszym czasie. Następnie policzyć liczbę wyhodowanych kolonii i przeliczyć liczbę mikroorganizmów na gram lub mililitr badanego wyrobu.
2. Wykrywanie określonych drobnoustrojów będących wskaźnikami zakażenia produktu kosmetycznego.
  - *Pseudomonas aeruginosa* – posiew (wg. powyższej procedury) na podłoże z cetrimidem.  
Na podłożu z cetrimidem typowe kolonie *P. aeruginosa* są płaskie, przejrzyste, żółto-zielonkawe do niebieskich.
  - *Staphylococcus aureus* – posiew (wg. powyższej procedury) na podłoże Baird-Parkera.  
Na podłożu Baird-Parkera typowe kolonie *S. aureus* są czarne, błyszczące, wypukłe, otoczone przejrzystym obszarem, który może opalizować.
  - *Candida albicans* – posiew (wg. powyższej procedury) na podłoże Sabouard-dekstrozowe.  
Na podłożu Sabouard-dekstrozowym typowe kolonie *C. albicans* są białe do beżowych, kremowe, wypukłe.

## Ćwiczenie nr 6

**Temat:** Przeżywalność bakterii w produktach kosmetycznych.

### Część teoretyczna

1. Wpływ detergentów na bakterie
2. Wpływ konserwantów i związków dezynfekujących na bakterie

### Część praktyczna

1. Przygotuj zawiesinę bakterii *E. coli* i *S. epidermidis* w soli fizjologicznej (zawiesina o zmętnieniu 1 w skali McFarlanda).
2. Przygotuj szereg rozcieńczeń zawiesiny (do  $10^{-8}$ ) i wysiej 4 ostatnie (po 100  $\mu$ l) na podłoże stałe.
3. Zaszczep produkty kosmetyczne (odżywka do włosów w płynie, płyn do płukania ust, mydło w płynie) przygotowaną zawiesiną w proporcji 1:50.

### Odczyt wyników

Oceń przeżywalność bakterii w produktach kosmetycznych. W tym celu wykonaj posiew tych preparatów na pożywki mikrobiologiczne.



## Ćwiczenie nr 7

**Temat:** Analiza mikrobiologiczna produktów kosmetycznych.

### Część teoretyczna

1. Objawy zakażenia produktów kosmetycznych.
2. Składniki produktów kosmetycznych hamujące aktywność drobnoustrojów.
3. Wskaźniki skażenia kosmetyków.
4. Mikrobiologiczne wymagania ilościowe dla kosmetyków przeznaczonych dla dzieci i w okolicie oczu oraz dla pozostałych preparatów.
5. Metody badań mikrobiologicznych środków kosmetycznych.

### Część praktyczna

1. Określenie całkowitej liczby tlenowych drobnoustrojów mezofilnych metodą płytkową. Na powierzchni jałowej płytki Petriego z podłożem agarowym (agar wzbogacony) wysiać 0,1 ml rozcieńczonej próbki odpowiadającej 0,01 g wyrobu (rozcieńczyć buforowanym roztworem chlorku sodu z peptonem o pH 7,0) i rozprowadzić jałową głaszczką. Szalki inkubować w 30-35°C przez 3 dni w przypadku bakterii, 20-25°C przez 5 dni w przypadku grzybów, chyba że bardziej wiarygodne zliczenia są osiągalne w krótszym czasie. Następnie policzyć liczbę wyhodowanych kolonii i przeliczyć liczbę mikroorganizmów na gram lub mililitr badanego wyrobu.
2. Wykrywanie określonych drobnoustrojów będących wskaźnikami zakażenia produktu kosmetycznego.
  - *Pseudomonas aeruginosa* – posiew (wg. powyższej procedury) na podłoże z cetrymidem. Na podłożu z cetrymidem typowe kolonie *P. aeruginosa* są płaskie, przejrzyste, żółto-zielonkawe do niebieskich.
  - *Staphylococcus aureus* – posiew (wg. powyższej procedury) na podłoże Baird-Parkera. Na podłożu Baird-Parkera typowe kolonie *S. aureus* są czarne, błyszczące, wypukłe, otoczone przejrzystym obszarem, który może opalizować.
  - *Candida albicans* – posiew (wg. powyższej procedury) na podłoże Sabouard-dekstrozowe. Na podłożu Sabouard-dekstrozowym typowe kolonie *C. albicans* są białe do beżowych, kremowe, wypukłe.