

Ćwiczenia z Mikrobiologii dla Biotechnologii zostały opracowane przez dr Dorotę Dziadkowiec i dr Annę Krasowską na podstawie ćwiczeń z Mikrobiologii dla II roku Biologii ułożonych w połowie lat 90-tych przez dr Elżbietę Panek przy współpracy dr Elżbiety Morzejko. Instrukcje do ćwiczeń napisała dr Dorota Dziadkowiec przy współpracy dr Anny Krasowskiej.

PLAN ĆWICZEŃ Z MIKROBIOLOGII OGÓLNEJ

dla II roku Biotechnologii 2011/2012

Ćwiczenie 1. Hodowla mikroorganizmów *in vitro* -

podłoża mikrobiologiczne i sterylizacja.

Hodowla mikroorganizmów *in vitro* - techniki posiewu.

Ćwiczenie 2. Technika mikroskopowania - metoda Grama.

Kształt i charakterystyczne układy drobnoustrojów.

Sprawozdanie 1

Ćwiczenie 3. Barwienia złożone (metoda negatywowo-pozytywowa).

Hodowla mikroorganizmów *in vitro* -

Izolacja czystych hodowli. Określanie liczby bakterii w hodowli.

Sprawozdanie 2

Ćwiczenie 4. Identyfikacja bakterii w mieszanej hodowli – **praktyczne zaliczenie** części ćwiczeń dotyczącej barwień.

Kolokwium 1

Ćwiczenie 5. Wpływ czynników fizycznych i chemicznych środowiska na bakterie.

Ćwiczenie 6. Metabolizm bakterii:

Rozkład związków wielkocząsteczkowych. Wiązanie N₂.

Rozkład związków drobnocząsteczkowych.

Ćwiczenie 7. Bakteriofagi.

Kolokwium 2

Ćwiczenie 8. Odczyt wyników i zaliczenie ćwiczeń. do ustalenia

7 spotkań po 3 godziny zegarowe i jedno (8) 45minut.

Zasady BHP w pracowni mikrobiologicznej:

- odpowiedni ubiór:

zapięte fartuchy bawełniane, spięte włosy, uwaga na lakier do paznokci przy pracy z palnikami, nie wolno używać tuszu do rzęs, gdy pracuje się z mikroskopem

- zachowanie w pracowni:

każdy pracuje samodzielnie, na siedząco, nawet w przypadku podziału zadania na zespoły; uważamy na palniki gazowe – proszę się nie nachylać nad nimi i nie podawać przedmiotów w poprzek stołów laboratoryjnych; nie wolno chodzić po pracowni trzymając w ręce zakażone ezy, pipety itp.; przy pracy z drobnoustrojami uważać należy na potencjalnie zakażone ręce lub sprzęty np. długopis – proszę nie brać ich do ust, ani nie pocierać skóry;

po zakończonych ćwiczeniach koniecznie należy umyć ręce

w przypadku pytań, niejasności, czy problemów proszę zwracać się do prowadzącego

- wymagane wyposażenie:

długopis, ołówek, marker do pisania po szkle, zeszyt czysty lub w kratkę, zapalki lub zapalniczka

O wszelkich wypadkach należy bezzwłocznie powiadomić prowadzącego!!!

Ćwiczenie 1. **Hodowla mikroorganizmów *in vitro* -
podłoża mikrobiologiczne i sterylizacja.**

1. Przygotowujemy 2 rodzaje pożywek:

a) bulion zwykły (BZ) 80 ml (dwie podgrupy)

gotowe podłoże BZ - do odpowiedniej naważki (**25 g** podłoża na **1 L**) dodajemy wody destylowanej, zakręcamy butelkę i jałowimy w autoklawie

skład: pepton, ekstrakt mięsny, enzymatyczny hydrolizat kazeiny, ekstrakt drożdżowy, NaCl

b) agar odżywczy (AO) 500 ml (dwie podgrupy)

gotowe podłoże BZ - do odpowiedniej naważki (**25 g** podłoża na **1 L**) dodajemy naważkę

agar-agar'u tak, by końcowe stężenie wynosiło 2%

do kolby dodajemy wody destylowanej, zabezpieczamy ją korkiem i folią aluminiową i jałowimy w autoklawie

skład: pepton, ekstrakt mięsny, enzymatyczny hydrolizat kazeiny, ekstrakt drożdżowy, NaCl, 2% agar-agar

2. Przygotowujemy płytki Petriego z agarem odżywczym (AO)

a) z kolby z rozpuszczoną sterylną pożywką wylewamy porcje po około 20 ml do jałowych płytek Petriego,

b) pozostawiamy płytki do zastygnięcia po czym na powierzchni płytki z pożywką każda osoba nanosi odcisk palca (**jedna płytka na podgrupę**), płytki te zanosimy do cieplarki i inkubujemy w 37 °C przez 24 godziny, a resztę płytek przechowujemy w chłodni do następnych ćwiczeń.

Hodowla mikroorganizmów *in vitro* - techniki posiewu.

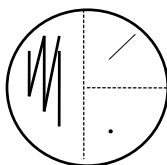
Izolacja czystych hodowli.

1. Techniki posiewów eżą - każda osoba wykonuje wszystkie podpunkty

a) posiewamy eżą inokulum pobrane z płynnej hodowli *Escherichia coli* do jednej probówki z 5 ml bulionu. (z płynnej do płynnej)

b) posiewamy eżą inokulum pobrane ze stałej hodowli *E. coli* do drugiej probówki z 5 ml bulionu. (ze stałej do płynnej)

c) posiewamy eżą z hodowli płynnej *E. coli* na płytkę z podłożem stałym AO w sposób podany na rysunku. Osoby wskazane przez prowadzącego wykonują posiew z płynnej hodowli *Proteus sp.* (z płynnej na stałą)



2. Izolacja czystych hodowli bakterii metodą płytkową z zastosowaniem posiewu redukcyjnego.

Każda osoba wysiewa na **dwie** płytki w sposób pokazany przez prowadzącego **jedną** z poniższych płynnych, mieszanych zawiesin:

a) *E.coli* / *Micrococcus luteus*

2 płytki AO

b) *E. coli* / *Salmonella enteritidis*

1 płytka AO i 1 płytka MC (Mac Conkey'a)

Wszystkie posiewy inkubujemy w 37 °C przez 24 godz.

Ćwiczenie 2. **Technika mikroskopowania - mikroskop świetlny zwykły.**

Kształt, wielkość i ruch drobnoustrojów.

Barwienie Grama –złożone barwienie pozytywowe.

Wszystkie preparaty oglądamy z zastosowaniem obiektywu imersyjnego (**100x**).

1. Każda osoba przygotowuje preparaty z **dwóch** z następujących mieszanych zawiesin płynnych:

Staphylococcus aureus + Escherichia coli

Bacillus mycoides + Salmonella enteritidis

Escherichia coli + Corynebacterium sp.

Micrococcus luteus + Escherichia coli

Bacillus sphaericus + Escherichia coli

Streptococcus sp. + Salmonella enteritidis

Oglądamy preparaty wykonane przez koleżanki i kolegów, wykonujemy rysunki wszystkich preparatów i po skończonych ćwiczeniach oddajemy je prowadzącemu do oceny - **sprawozdanie 1.**

Ponadto sporządzamy w zeszycie **tabelkę** dzieląc obejrzone mikroorganizmy na bakterie **gram⁺ i gram⁻**.

Metoda Grama.

- a) przygotowujemy **utrwalony** preparat na odłuszczonej szkiełku podstawowym;
- b) zalewamy preparat **fioletem krystalicznym** i pozostawiamy na **2 minuty**;
- c) наносimy na preparat **płyn Lugola** i pozostawiamy na **2 minuty**;
- d) spłukujemy wodą;
- e) odbarwiamy preparat w **70% etanolu**;
- d) spłukujemy wodą;
- e) dobarwiamy **rozcieńczoną fuksyną** i pozostawiamy na **30 sekund**;
- f) spłukujemy wodą;
- g) suszymy preparat za pomocą bibuły i oglądamy pod imersją (**100x**).

Ćwiczenie 3. Technika mikroskopowania – Barwienia złożone.

Wszystkie preparaty oglądamy z zastosowaniem obiektywu imersyjnego (100x).

Barwienie proste - negatywowe

1. Metoda negatywna z nigrozyną.

Oglądamy gotowy, barwiony negatywnie preparat *Rhodospirillum rubrum*

Barwienie pozytywno - negatywowe.

2. Obserwacja otoczek u *Klebsiella sp.*

a) na jeden koniec szkiełka podstawowego наносimy sterylną eżą 1-2 krople pf,

b) zawieszamy eżą w kropli odrobinę masy bakteryjnej, ale **NIE rozmazujemy zawiesiny na szkiełku,**

c) do zawiesiny dodajemy sterylną eżą 2 krople rozcieńczonej fuksyny, lekko mieszamy i wstawiamy do kameryki wilgotnej na **25** minut,

d) wyjmujemy preparat, dodajemy sterylną eżą 1 kroplę nigrozyny i rozmazujemy po powierzchni szkiełka podstawowego krótszą krawędzią drugiego szkiełka,
(od razu wyrzucamy to szkiełko do naczynia na brudne preparaty!!!)

e) preparat suszemy na powietrzu i oglądamy z zastosowaniem imersji

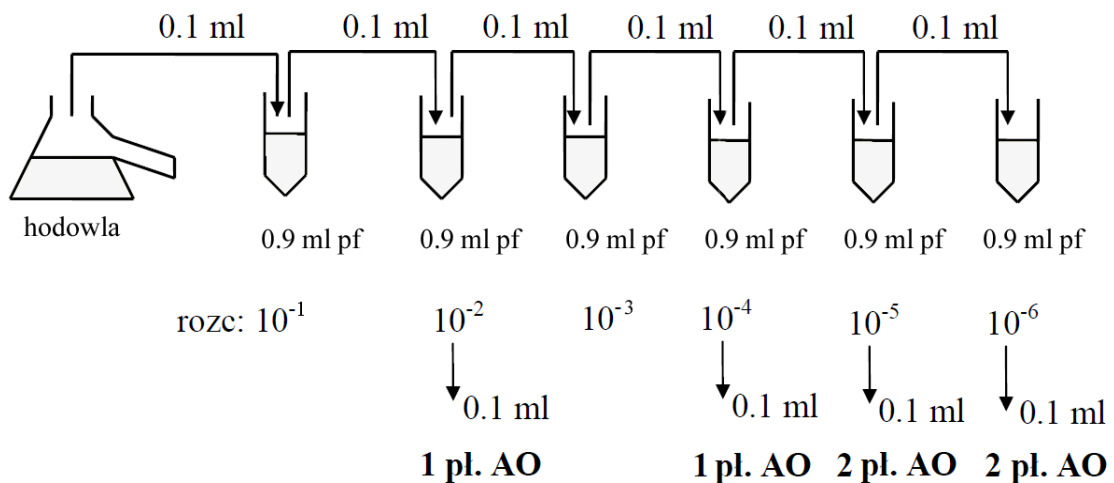
Hodowla mikroorganizmów *in vitro* -

Określanie liczby bakterii w hodowli.

1. Oznaczanie liczby bakterii w hodowlach płynnych metodą płytkową z zastosowaniem rozcieńczeń.

a) do 6 jałowych probówek Eppendorfa rozlewamy sterylnie po 0.9 ml płynu fizjologicznego (pf).

b) dokonujemy sterylnego rozcieńczenia i posiewów hodowli *E. coli* zgodnie ze schematem na płytce z agarem odżywczym (AO):



c) płytki inkubujemy w 37 °C przez 24 godziny, a na następnych ćwiczeniach liczymy wyrosłe kolonie.

2. Mierzmy na speku OD przy długości fali 560 nm dla gotowych rozcieńczeń hodowli wyjściowej (posłużą one do sporządzenia krzywej standardowej zależności gęstości optycznej hodowli od ilości komórek na ml).

Opracowane wyniki tego eksperymentu (1&2) należy oddać prowadzącemu **najpóźniej na zajęciach nr 6 - sprawozdanie 2.**

Ćwiczenie 4. **Identyfikacja bakterii w mieszanej hodowli – praktyczne zaliczenie części ćwiczeń dotyczącej barwień.**

1. Kolokwium 1

2. Odczyt wyników doświadczenia wykonanego podczas ćwiczenia 3 -

a) liczymy kolonie wyrosłe na płytkach AO z takich rozcieńczeń, gdzie ilość kolonii wynosi od około 10 do 100, czyli jest łatwo policzalna.

b) na tablicy sporządzamy tabelę z wynikami całej grupy - jest to podstawa do sporządzenia **sprawozdania nr 2.**

3. Każdy student otrzymuje probówkę zawierającą **mieszaninę 3 szczepów bakterii**, sporządza preparat i wybarwia go metodą Grama.

Następnie **wykonuje DUŻY rysunek** obrazu mikroskopowego i **opisuje** mikroorganizmy znajdujące się w mieszaninie (nazwa mikroorganizmu oraz sposób wybarwienia w metodzie grama).

Rysunek oddaje się prowadzącemu - **praktyczne zaliczenie** części ćwiczeń dotyczącej barwień.

Ćwiczenie 5. Wpływ czynników fizycznych i chemicznych środowiska na bakterie.

Wpływ czynników fizycznych.

1. Wpływ temperatury.

a) każda podgrupa posiewa na powierzchnię **3 płytek AO** sterylną wymazówką na sektory 4 prekultury:

Pseudomonas aeruginosa, *Pseudomonas fragi*, *Serratia marcescens* i *Micrococcus luteus*

b) każdą płytkę inkubujemy 24 godz. w innej temperaturze: **28 °C 37 °C lub 45 °C**

c) porównujemy różnice w intensywności wzrostu badanych szczepów w zależności od temperatury inkubacji

2. Wpływ promieniowania UV na bakterie.

a) każda podgrupa wysiewa na powierzchnię **3 płytek AO na sektory** sterylną wymazówką prekultury 3 bakterii:

Escherichia coli, *Serratia marcescens* i *Bacillus sphaericus*

Uwaga: promieniowanie UV jest szkodliwe dla oczu i skóry! Zakładamy okulary i gumowe rękawiczki zanim rozpoczniemy następny etap eksperymentu.

b) zamkniętą płytkę ustawiamy na lampie UV denkiem do góry i naświetlamy przez:

0 sek. (kontrola), 30 sek., 1 min. (**jedna podgrupa**)

1 min., 3 min. i 5 min (**druga podgrupa**)

c) płytki inkubujemy 24 godz. w **28 °C**.

3. Wpływ stężenia NaCl

na wzrost *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas aeruginosa*.

Każda osoba posiewa **jeden** szczep na **dwa** podłoża testowe: Bz 0.5% NaCl i Bz 7% NaCl.

a) pobieramy próbówki z bulionem odżywczym (Bz) zawierającym 0.5% NaCl i 7% NaCl.

b) posiewamy po **50 µl** prekultury badanych mikroorganizmów do dwóch próbówek o różnym stężeniu soli.

c) próbówki inkubujemy przez 24 godz. w temp. **37 °C**.

Wpływ czynników chemicznych.

4. Wpływ fioletu krystalicznego.

a) 2 osoby z każdej podgrupy wysiewają sterylną wymazówką na sektory prekultury 2 bakterii *E. coli* i *Staphylococcus aureus* na powierzchnię 1 płytki AO zawierającej 3 mg/L (jedna osoba) i 0.5 mg/L (druga osoba) fioletu krystalicznego

b) płytki odwracamy denkiem do góry i inkubujemy w temp. 37 °C przez 24 godz.

Trzecia osoba z podgrupy wykonuje doswiadczenie 5.

5. Wpływ substancji antybakteryjnych wydzielanych przez rośliny (fitoncydy)

a) trzecia osoba z każdej podgrupy posiewa na powierzchnię płytki AO 150 µl jednej płynnej prekultury *E. coli* albo *Staphylococcus aureus* i za pomocą głaszczka rozprowadza próbę po całej powierzchni pożywki

b) miażdżymy ząbek czosnku i nakładamy na środek płytek, lekko przyciskając.

c) płytki inkubujemy w temp. 37 °C przez 24 godz. **bez odwracania!**

6. Wpływ antybiotyków.

a) każda osoba posiewa na powierzchnię płytki AO 150 µl płynnej prekultury jednego z niżej wymienionych szczepów bakterii, za pomocą głaszczka rozprowadza próbę po całej powierzchni pożywki hodowli

Escherichia coli *Staphylococcus aureus* *Pseudomonas aeruginosa*

b) przy pomocy jałowej pęsety wyjmujemy z fiolki krążek z odpowiednim antybiotykiem i umieszczamy na powierzchni pożywki z posianymi bakteriami.

Należy pamiętać o każdorazowym opalaniu pęsety!

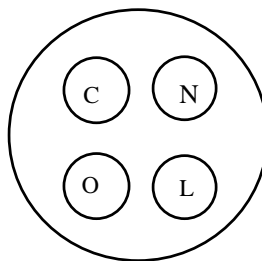
Antybiotyki stosowane w teście:

Netilmicin (N - 30 µg w krążku)

Linezolid (L - 30 µg w krążku)

Ofloxacin (O - 5 µg w krążku)

Cefotaximum (C - 30 µg w krążku)



c) płytki odwracamy denkiem do góry i inkubujemy w temp. 37 °C przez 24 godz. Na następnych ćwiczeniach porównujemy wielkość stref zahamowania wzrostu.

Ćwiczenie 6. **Metabolizm bakterii.**

Rozkład związków wielkocząsteczkowych. Wiązanie N₂.

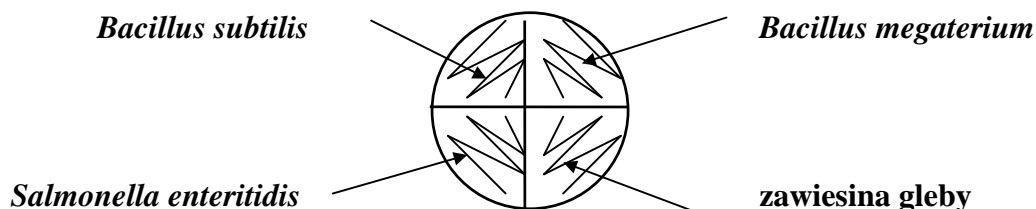
zestaw 4 płytek na jedną podgrupę

1. Rozkład skrobi.

Podłoże testowe: agar odżywczy + skrobia.

Posiewamy cztery szczepy bakterii na sektory jednej płytki z podłożem testowym. Inokulum pobieramy eżą z hodowli na podłożu stałym i posiewamy **ryśa wężykowatą.**

Szczepy bakterii:

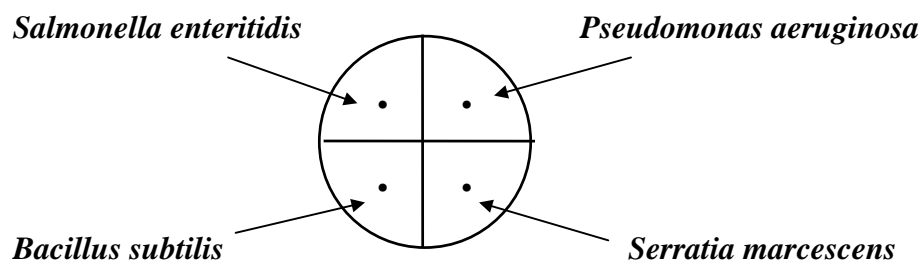


Brak skrobi w podłożu wynikający z jej rozkładu dokonywanego przez mnożące się bakterie wykrywamy przy pomocy płynu Lugola (roztwór J w KJ).

2. Rozkład tłuszczów:

Podłoże testowe: stałe podłoże z Tween'em 80 (H₂O, pepton, NaCl, CaCl₂, Tween 80, agar-agar).

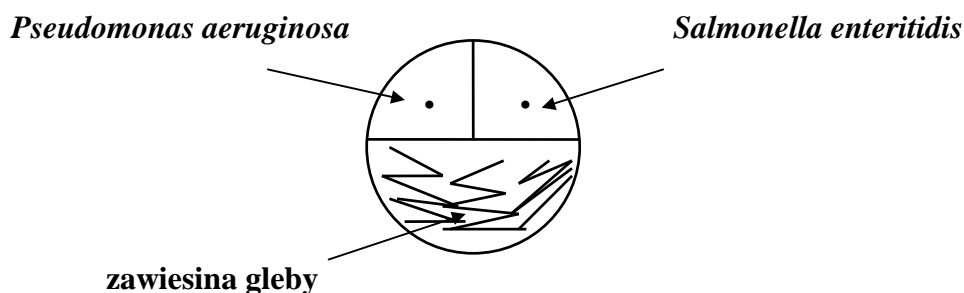
Posiewamy cztery szczepy bakterii na sektory jednej płytki z podłożem testowym. Inokulum pobieramy eżą z hodowli na podłożu stałym i **posiewamy punktowo.**



3. Rozkład kazeiny:

Podłoże testowe: agar mleczny (H₂O, 10% mleko, agar-agar).

Posiewamy **punktowo** dwa szczepy bakterii pobrane eżą z hodowli na podłożu stałym na sektory płytki z podłożem testowym. Na drugą połowę płytki posiewamy **3 razy rysa** **wężykowata** zawiesinę gleby.



4. Zdolność do wiązania azotu cząsteczkowego:

Podłoże testowe: stałe podłoże bez źródła azotu (H₂O, mannitol, K₂HPO₄, MgSO₄, NaCl, CaCO₃, agar-agar).

Posiewamy **rysa wężykowata** dwa szczepy bakterii pobrane eżą z hodowli na podłożu stałym na sektory płytki z podłożem testowym. Na drugą płytkę posiewamy **3 razy rysa** **wężykowata** zawiesinę gleby.



Wszystkie płytki inkubujemy w temp. 28°C przez 3 doby.

Rozkład związków drobnocząsteczkowych – zróźnicowanie metaboliczne pałeczek *Enterobacteriaceae*.

Rozkład **glukozy i laktozy** przez pałeczki *Enterobacteriaceae*.

Każda **osoba** posiewa **jeden** z wymienionych poniżej szczepów na **dwa** podłoża testowe.

Escherichia coli

Salmonella enteritidis

Shigella flexneri

Enterobacter aerogenes

1. Próba fermentacyjna z **glukozą**:

Podłoże testowe: pepton, K_2HPO_4 , glukoza, purpura bromokrezolowa (indykator pH),
 H_2O , rurka Durhama.

Niewielkie inokulum pobieramy eżą z hodowli stałej na płytce AO.

2. Próba fermentacyjna z **laktozą**:

Podłoże testowe: pepton, K_2HPO_4 , laktoza, purpura bromokrezolowa (indykator pH),
 H_2O , rurka Durhama.

Niewielkie inokulum pobieramy eżą z hodowli stałej na płytce AO.

Szereg biochemiczny do identyfikacji pałeczek *Enterobacteriaceae*.

Każda **podgrupa** (2 osoby) posiewa **jeden** z wymienionych poniżej szczepów na pasek API wg instrukcji producenta.

Escherichia coli

Enterobacter aerogenes

Proteus vulgaris

Salmonella enteritidis

Posiewy inkubujemy w $37^\circ C$ przez 24 godziny.

Dokonujemy **odczytu testów API** założonych poprzedniego dnia przez wcześniejsze grupy.

Dodatkowo za pomocą sterylnej wymazówki wykonujemy **posiew redukcyjny materiału z gardła na podłoże krwawe**, płytki inkubujemy w $37^\circ C$ przez 24 godziny.

Ćwiczenie 7. Bakteriofagi.

1. Wykazanie swoistości bakteriofaga w stosunku do szczepu bakteryjnego żywiciela.

a) każda osoba posiewa na płytkę AO 100 μ l hodowli **jednego** z trzech szczepów bakterii:

Shigella flexneri 4a15

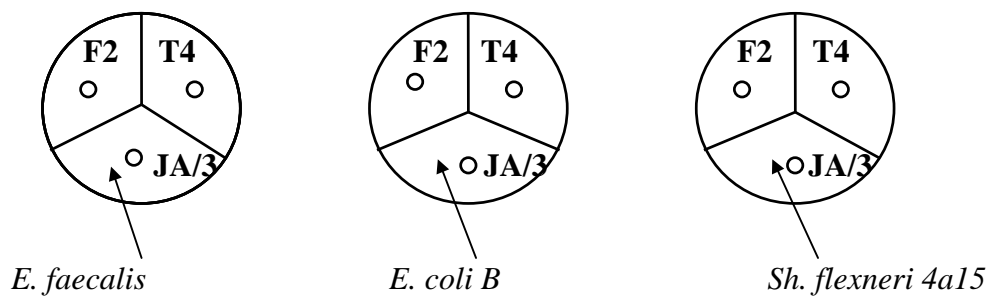
Escherichia coli B

Enterococcus faecalis

Próbkę hodowli rozgłaskujemy na całej powierzchni płytki do całkowitego wsiąknięcia.

b) na denku płytki zaznaczamy trzy sektory. Nakrapiamy mikropipetą, na środek sektorów, po 10 μ l zawiesin bakteriofagów: **T4**, **F2** oraz **JA/3**, zgodnie ze schematem.

Płytki pozostawiamy do całkowitego wsiąknięcia próbek fagów.



Wszystkie płytki inkubujemy **24 godz. w temp. 37 °C**.

2. Określenie miana bakteriofaga **T4** metodą płytek dwuwarstwowych.

a) **każda podgrupa** rozlewa sterylnie do 6 probówek Eppendorfa (każdy student do 2 probówek) **bulion odżywczy** w ilościach podanych na schemacie;

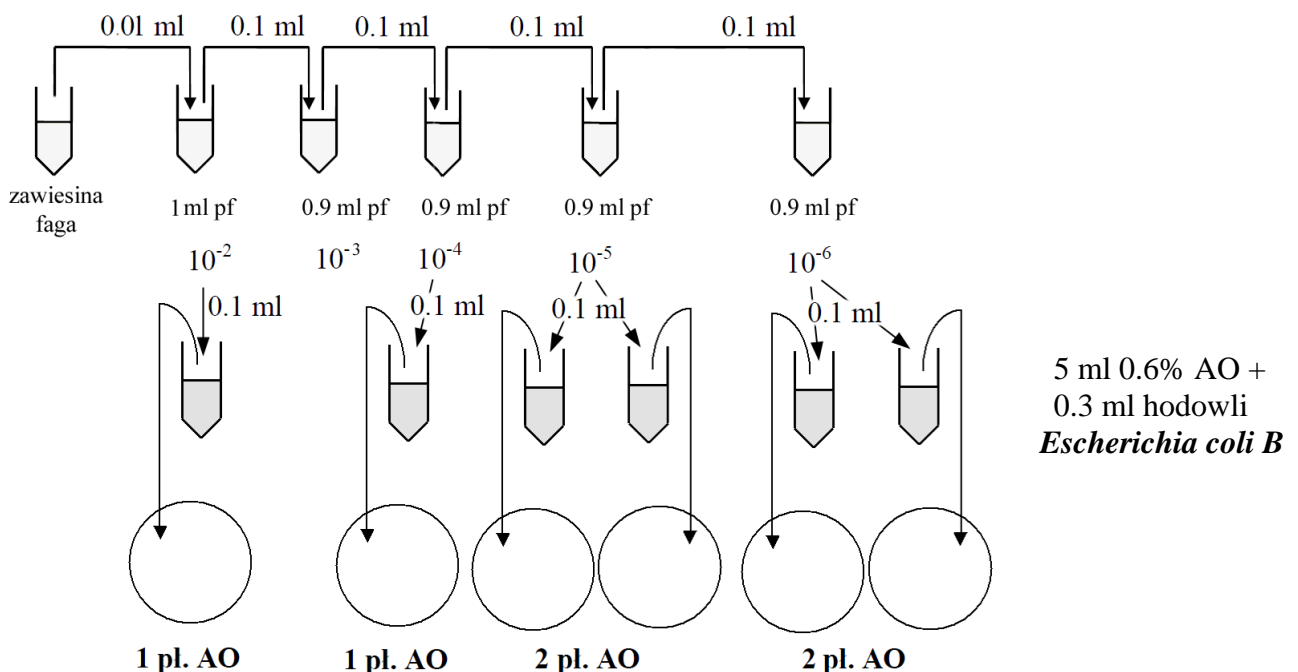
b) przy pomocy mikropipet dokonujemy sterylnego rozcieńczenia zawiesiny bakteriofaga **T4** zgodnie ze schematem;

Przy rozcieńczaniu zawiesin bakteriofagów obowiązują te same reguły, które obowiązują przy rozcieńczaniu płynnych hodowli bakterii.

c) wyjmujemy z **łaźni** probówkę z **rozpuszczonym 0.6% AO** i sterylnie wlewamy do niej **0.3 ml** hodowli **szczepu *Escherichia coli B*** i równie szybko **0.1 ml** odpowiedniego **rozcieńczenia bakteriofaga** . Po zamieszaniu na wstrząsarce, **wylewamy całość na płytkę z AO**. **Płytkę pozostawiamy do zastygnięcia!!!**

d) identycznie postępujemy z próbkami pozostałych rozcieńczeń bakteriofaga **T4** (patrz schemat).

Wszystkie płytki **inkubujemy 24 godz. w temp. 37 °C**.



Bakterie chorobotwórcze

(według Podstaw Mikrobiologii Lekarskiej pod redakcją prof. Leona Jabłońskiego)

BAKTERIE GRAM+

Staphylococcus aureus (gronkowiec złocisty) - skórne i narządowe zakażenia ropne, zatrucia pokarmowe,

Diplococcus pneumoniae (dwoinka zapalenia płuc),

Streptococcus pyogenes - płonica,

Clostridium tetani (laseczka tężca),

Clostridium perfringens (laseczka zgorzeli gazowej),

Clostridium botulinum (laseczka jadu kiełbasianego),

Bacillus anthracis (laseczka wąglika) - śmiertelna choroba zwierząt kopytnych,

Corynebacterium diphtheriae (maczugowiec błonicy),

Mycobacterium tuberculosis (prątek gruźlicy),

Mycobacterium leprae (prątek trądu).

BAKTERIE GRAM-

Neisseria gonorrhoeae (dwoinka rzeżączki),

Neisseria meningitidis (dwoinka zapalenia opon mózgowych),

Shigella dysenteriae i *Shigella flexneri* - czerwotka bakteryjna,

Salmonella typhi - dur brzuszny,

Klebsiella pneumoniae (pałeczka zapalenia płuc),

Pseudomonas aeruginosa (pałeczka ropy błękitnej) - ropne zakażenia ran i narządów

wewnętrznych,

Bordetella pertussis - koklusz (krztusiec),

Yersinia pestis - dżuma,

Vibrio cholerae (przecinkowiec cholery),

Treponema pallidum (krętek blady) - kiła,

Borrelia recurrentis - endemiczny dur powrotny (przenoszone przez kleszcze),

Erwinia amylovora i *Erwinia carotovora* - gatunki chorobotwórcze dla roślin.

STRUKTURY KOMÓRKOWE

OTOCZKI

Ze względu na skład chemiczny dzieli się je na:

polisacharydowe (*Escherichia coli*)

polipeptydowe (*Bacillus anthracis*)

mieszane (*Klebsiella sp.*).

Rola biologiczna otoczek.

STRUKTURY WŁÓKNISTE

rzęski - ruch

fimbrie - adhezja

pili (pilusy) - koniugacja

Budowa, rozmieszczenie na komórce, funkcja biologiczna.

Przykłady mikroorganizmów zdolnych do czynnego ruchu.

FORMY PRZETRWAJĄCE BAKTERII

endospory (*Bacillus sp.*, *Clostridium sp.*)

konidia (*Streptomyces sp.*, niektóre sinice)

mikrocysty (bakterie śluzowe)

akinety (sinice)

cysty (*Azotobacter sp.*)

Budowa, właściwości biologiczne, cechy warunkujące ciepłooporność, kiełkowanie (germinacja) endospor.

MATERIAŁY ZAPASOWE

wolutyna (najczęściej spotykany, n.p. *Corynebacterium sp.*)

kwasy poli-beta-hydroksymasłowe (*Bacillus*, *Pseudomonas*, *Azotobacter spp.*)

glikogen (sinice i pałeczki jelitowe)

skrobia (*Neisseria sp.*, *Clostridium sp.*)

cyjanoficyna (sinice)

wtręty krystaliczne (białka, węglan wapnia, siarka pierwiastkowa).

Streptomyces sp.

S. griseus, *S. scabies* - powodują choroby roślin

Szeroko rozpowszechnione w glebie, odpowiedzialne za zapach „mokrej ziemi”.

Morfologia.

Bakterie gram+, wytwarzają pseudogrzynię pożywkową i powietrzną z przegrodami poprzecznymi oraz konidia poukładane w łańcuszki na końcu konidioforu.

Aktywność kataboliczna.

Tlenowce. **Produkują antybiotyki.** Zdolne do rozkładu lateksu, chityny, ligniny, celulozy, hemicelulozy, skrobi i pektyn.

STERYLIZACJA

Prowadzenie hodowli tylko wybranego przez nas gatunku bakterii wymaga niedopuszczenia do wzrostu organizmów obcych, konieczna jest więc praca w tak zwanych warunkach jałowych. Wszystkie narzędzia, szkło laboratoryjne, pożywki itp. powinny być **STERYLNE**, tzn. pozbawione wszelkich form organizmów żywych **zarówno form wegetatywnych jak i przetrwalnych** (endospor bakterii, zarodników grzybów).

Proces zabicia w 100% wszelkich form żywych nazywamy STERYLIZACJĄ.

Steryлизację przeprowadza się następującymi metodami:

1. metody fizyczne (podwyższona temperatura, promieniowanie jonizujące i UV)
2. metody chemiczne
3. metody mechaniczne

METODY FIZYCZNE

PODWYŻSZONA TEMPERATURA

drobne narzędzia, np. ezy steryлізуje się przez wyżarzenie w płomieniu palnika zawsze przed i po każdorazowym użyciu.

szklane głaszczki, pęsety, skalpele zanurzamy w alkoholu, podpalamy, wyjmujemy z płomienia i czekamy na zanik niebieskawego płomienia.

puste szkło laboratoryjne (probówki, kolby, płytki Petriego, pipety) steryлізуjemy w tzw. „suchym gorącym” w piecach lub suszarkach w wysokich temperaturach, przy czym w zależności od temperatury wymagany jest różny czas sterylizacji, np. 140⁰C - 3 godz. 170⁰C - 1 godz.

Przedmioty w ten sposób jałowione muszą zostać przed steryлизacją

zabezpieczone przed powtórny m zakazaniem:

probówki, kolby - korkiem i foliowym kapturkiem

szklane pipety i szalki Petriego - w metalowych tubusach.

W suszarkach **nie wolno** sterylizować szkła z elementami gumowymi, ze szlifami czy szkła miarowego, **ani pożywek mikrobiologicznych** oraz wyrobów z plastiku - temperatura jest zbyt wysoka!

Szkło też można sterylizować w autoklawach, ale potem trzeba je jeszcze wysuszyć, więc jest to mniej wygodne.

pożywki bakterijne, roztwory, narzędzia, elementy szklane i gumowe, plastikowe końcówki do pipet automatycznych, probówki Eppendorfa oraz inne, które nie zniosłyby temperatury „suchego gorąca” sterylizuje się w tzw. „**wilgotnym gorącym**” w urządzeniach zwanych **AUTOKLAWAMI**. Proces polega na przetrzymywaniu pożywek pod podwyższonym ciśnieniem w nasyconej parze wodnej o temperaturze wyższej od temperatury wrzenia wody:

0.5 atm - temp. 112⁰C

1.0 atm. - temp. 120⁰C

Czas sterylizacji zależy od objętości jałowionych roztworów.

Pożywki muszą zostać przed sterylizacją zabezpieczone przed powtórny zakażeniem korkiem i foliowym kapturkiem. Kończówki i probówki Eppendorfa jałowimy w specjalnych zamykanych pojemnikach czy słoiczkach.

roztwory zawierające antybiotyki, cukry, aminokwasy, witaminy, żelatynę, itp., czyli **składniki wrażliwe na temperaturę powyżej 100⁰C** sterylizuje się **innymi metodami**, np. **przez sączenie**. Po wyjałowieniu podłoża chłodzi się je do temp. ok. 55⁰C (temperatura topnienia agar-agaru) i dodaje jałowy roztwór antybiotyku, witamin, itd.

Jednokrotne ogrzewanie pożywki w temperaturze 100⁰C przez czas około 30 min. nazywamy PASTERYZACJĄ - w procesie tym niszczymy tylko formy wegetatywne drobnoustrojów, **nie jest to więc sterylizacja!!!** Czyli **aparat Kocha NIE SŁUŻY do sterylizacji**, jedynie do podgrzewania, rozpuszczania podłoży.

Proces trzykrotnego takiego podgrzewania pożywki w odstępach 24 godzin, niszczący zarówno formy wegetatywne jak i przetrwalne nazywamy TYNDALIZACJĄ – w dobie autoklawów jest to już metoda historyczna.

PROMIENIOWANIE Gamma i UV

promieniowanie gamma - wrażliwy na temperaturę sprzęt jednorazowego użytku, plastikowe szalki Petriego, materiały opatrunkowe. Stosuje się też do zabezpieczania żywności przed zepsuciem (sery, ryby, wędliny pakowane w folię, konserwy).

promieniowanie UV - odkażanie powietrza i powierzchni sprzętów w laboratoriach, salach operacyjnych.

METODY MECHANICZNE

Filtry i sączi zaopatrzone w pory mniejsze niż średnica komórek bakteryjnych stosuje się do jałowienia składników wrażliwych nawet na temp. 100⁰C np. surowicy, roztworów niektórych aminokwasów, cukrów, mocznika, antybiotyków i witamin.

PODŁOŻA MIKROBIOLOGICZNE

Podłoże mikrobiologiczne (pożywka mikrobiologiczna) jest mieszaniną odpowiednio dobranych składników tworzących środowisko, w którym szybko i charakterystycznie wzrastają posiane na nie drobnoustroje.

Do składników tych należą przede wszystkim hydrolizaty białkowe, wyciągi z tkanek zwierzęcych i roślinnych, węglowodany, sole mineralne i organiczne.

Pożywka musi spełniać kilka podstawowych warunków:

- a) zawierać przyswajalne **źródła pierwiastków biogennych** C, N, H, P, S, mikroelementów oraz substancji wzrostowych
- b) posiadać odpowiednie **pH**.
- c) być **izotoniczna** względem komórek bakteryjnych - najczęściej osiąga się to przez dodanie odpowiedniej ilości NaCl.
- d) być **klarowna** - jest to szczególnie ważne w hodowlach płynnych, gdzie wzrost mikroorganizmów określa się na podstawie stopnia zmętnienia pożywki.
- e) być **sterylna**.

PODZIAŁ POŻYWEK

a) ze względu na pochozenie składników:

- **naturalne** (zawierają najczęściej wyciągi z tkanek roślinnych lub zwierzęcych, hydrolizaty białkowe, peptony, czyli zbiór aminokwasów i krótkich peptydów, krew, itp., nie znamy dokładnie ich składu chemicznego)

- **syntetyczne** (sporządzone z czystych związków chemicznych odważonych w ściśle określonych ilościach, np. glukoza, sole mineralne)

- **półsyntetyczne** (zawierające oba typy składników, np. bulion odżywczy)

b) ze względu na wartość odżywcza:

- podłoża **pełne** - zawierające komplet potrzebnych mikroorganizmom substancji odżywczych w formie złożonych związków organicznych (najczęściej składniki naturalne, zawiera źródła pierwiastków w postaci gotowych monomerów - aminokwasy, cukry proste, witaminy, zasady azotowe)

- podłoża **minimalne** - zawierające minimum prostych związków, o ściśle określonym składzie, z których mikroorganizmy same syntetyzują wszystkie składniki komórki.

c) ze względu na konsystencję:

- **stałe** (zestalone 2% agar-agar)em)

- **półpłynne** (zestalone 0,6% agar-agar)em)

- **płynne**

AGAR-AGAR to polimer galaktozy otrzymywany z morskich krasnorostów, jest obojętny chemicznie, rozpuszcza się w temperaturze ok. 95⁰C, a zestala się w około 45-48⁰C.

Większość mikroorganizmów go nie rozkłada.

Proszę nie mylić z agarem odżywczym, czyli pożywką uniwersalną do hodowli wielu mikroorganizmów!

d) ze względu na rodzaj i sposób wzrostu mikroorganizmów:

- podłoża **uniwersalne**

rośnie na nich większość standardowo hodowanych w laboratoriach mikroorganizmów, np. agar odżywczy lub bulion wzbogacony (odżywczy) o składzie: wyciąg mięsny, hydrolizat kazeiny, hydrolizat drożdżowy, pepton, chlorek sodu (np. agar odżywczy) - **Co jest ŹRÓDŁEM WĘGLA w tej pożywce?**

- podłoża **wybiórcze**

zawierające składnik, który wybiórczo hamuje wzrost części mikroorganizmów (może to być zwiększone stężenie soli, antybiotyków lub barwnik), lub **nie zawierające jakiegoskładnika koniecznego** do wzrostu danej grupy mikroorganizmów (np. źródła węgla, witamin).

- podłoża **różnicujące**

zawierające wszystkie niezbędne substancje jak podłoża uniwersalne, ale **ponadto** posiadające składnik pozwalający na **odróżnienie wyglądu** kolonii jednego rodzaju mikroorganizmów od drugiego (agar skrobiowy, podłoże z Tweenem 80).

Istnieją podłoża **wybiórczo-różnicujące**, np. podłoże **MacConkey'a**

wybiórcze - zawiera **fiolet krystaliczny**, który hamuje wzrost bakterii gram +

różnicujące - zawiera **laktozę**, którą organizmy zdolne do tego fermentują z wytworzeniem produktów kwaśnych, oraz **indykator pH**, który reaguje zmianą barwy na zakwaszenie -

takie organizmy, np. *E.coli*, rosną w postaci czerwonych kolonii; organizmy niezdolne do fermentacji laktozy, np. *Salmonella sp.* rosną na **alternatywnych źródłach węgla** zawartych w obecnym w tym podłożu **peptonie**.

HODOWLE BAKTERYJNE

CZYSTA HODOWLA - hodowla (klon) wywodząca się z jednej komórki bakteryjnej lub formy przetrwalnej, składająca się więc z komórek tylko jednego gatunku mikroorganizmów. Metody otrzymywania czystych hodowli:

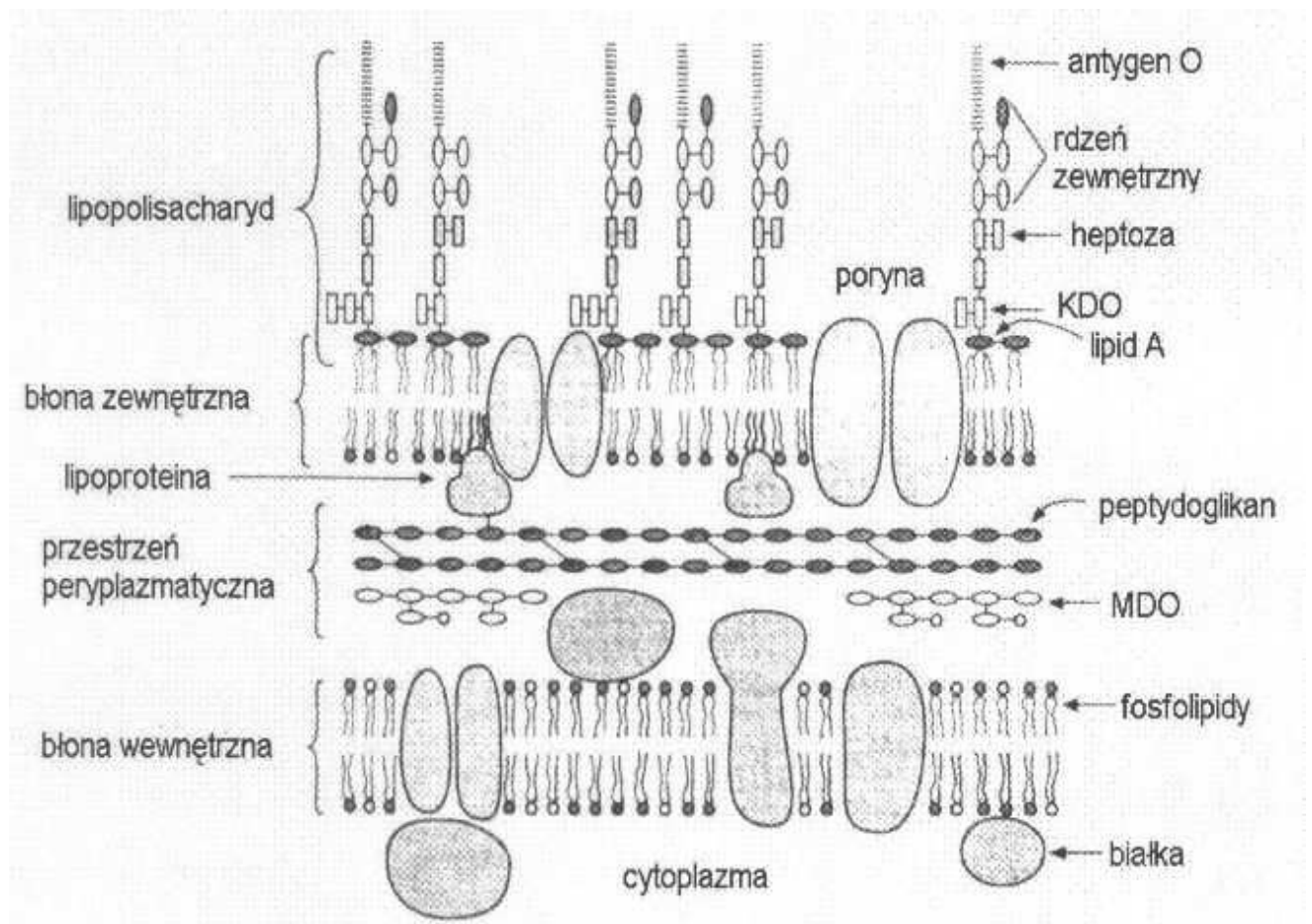
1. bezpośrednie (mikromanipulator)
2. pośrednie (metoda seryjnych rozcieńczeń hodowli wyjściowej w płynie fizjologicznym, posiew redukcijny).

WZROST HODOWLI - składa się nań zarówno powiększanie rozmiarów komórek drobnoustrojów dzięki procesom biosyntezy jak i przyrost ilości komórek w skutek ich podziałów.

Typy hodowli (definicje):

1. zsynchronizowana - metody otrzymywania
2. ciągła - chemostat, turbidostat
3. okresowa - fazy wzrostu (wykres):
adaptacyjna (faza lag), młodości fizjologicznej, wzrostu wykładniczego (faza log), zwolnionego wzrostu, równowagi, zamierania, wykładniczego zamierania

schemat budowy ściany komórkowej bakterii gram -



WIĄZANIE N₂ ATMOSFERYCZNEGO

Następujące organizmy zdolne są do wiązania azotu atmosferycznego:

symbionty roślin motykowych

Rhizobium

Bradyrhizobium

Azorhizobium

symbionty innych roślin (paprocie, rośliny zielne, drzewa)

Actinomycetes

Frankia

Anabena

Nostoc

wolno żyjące

bezwzględne tlenowce

Azotobacter

Azomonas

Alkaligenes

Azospirillum

względne beztlenowce

K. pneumoniae

B. polymyxa

bezwzględne beztlenowce

Desulfovibrio

Clostridium

metanogeny

fototrofy

anoksygenne

Chromatium

Rhodospirillum

Clorobium

oksygenne

Cyanobacteria

Wiązanie N₂ przeprowadza kompleks:

reduktaza nitrogenazy (Fe białko) i nitrogenaza (Mo-Fe białko).

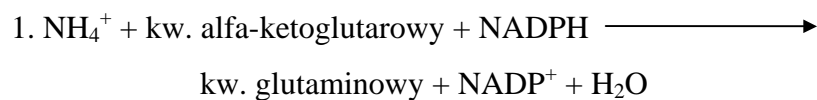
U niektórych mikroorganizmów posiada ona wanad zamiast molibdenu

(*Azotobacter vinelandii*, *Xanthobacter autotrophicum*) lub samo żelazo (*Azotobacter vinelandii*).

Kompleks ten jest bardzo silnie hamowany przez tlen. Ochronia go:

- * wiązanie azotu tylko w warunkach beztlenowych
- * bardzo silna aktywność oddechowa bakterii wiążących azot w warunkach tlenowych.
- * wytwarzanie H₂ (dzięki obecności hydrogenazy wiąże się on z O₂ dając wodę - tylko bakterie z rodzaju *Rhizobium* jej nie posiadają)
- * obecność leghemoglobiny w tkance roślin zainfekowanych bakteriami z rodzaju *Rhizobium*.
- * wiązanie N₂ w specjalnie przystosowanych komórkach, np. heterocystach (sinice), do których nie wnika tlen i które go nie produkują, bo nie mają II systemu fotosyntezy.

Powstałe jony NH₄⁺ mogą zostać zasymilowane na dwóch drogach:

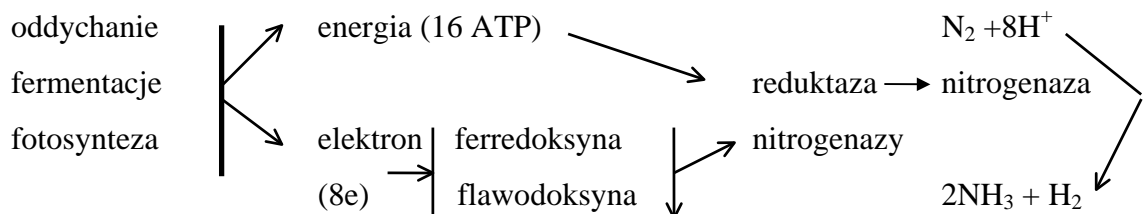


enzym: dehydrogenaza kw. glutaminowego



enzym: syntetaza glutaminy

SCHEMAT

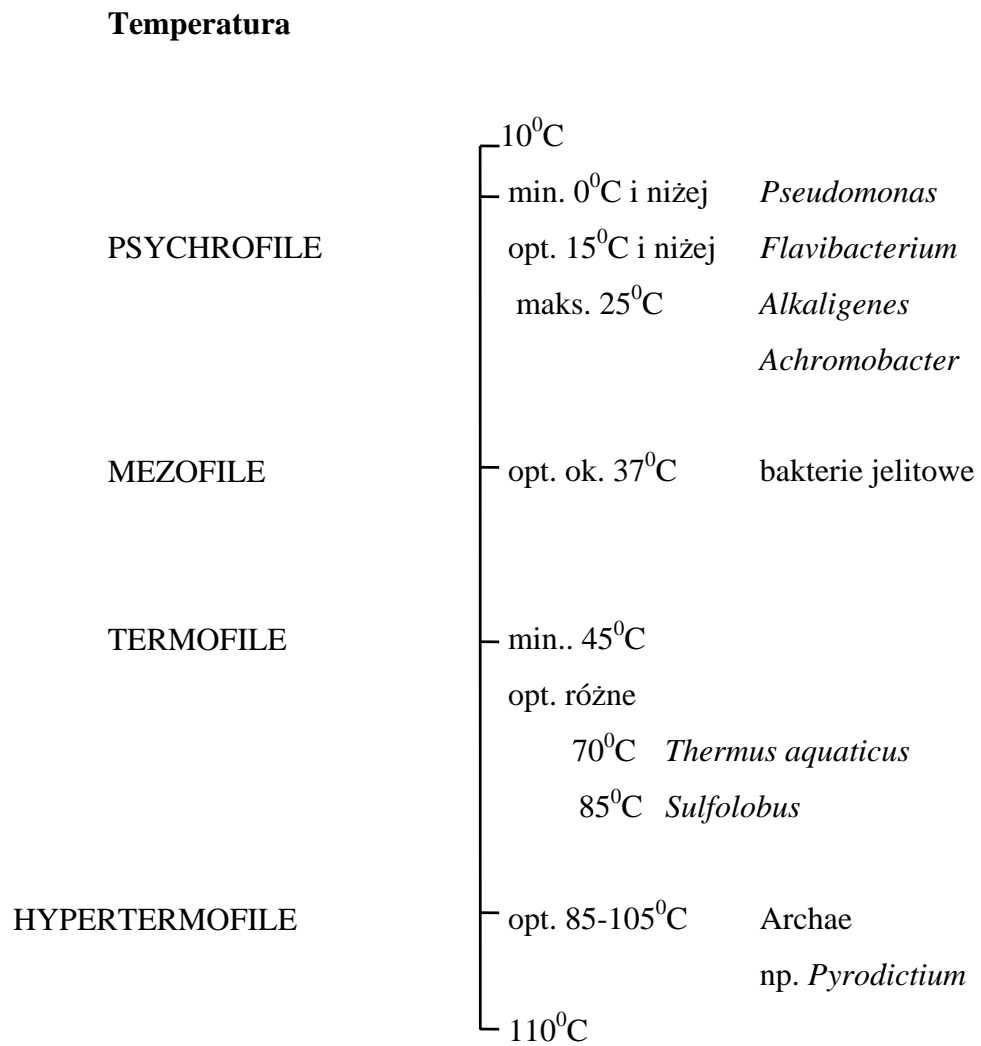


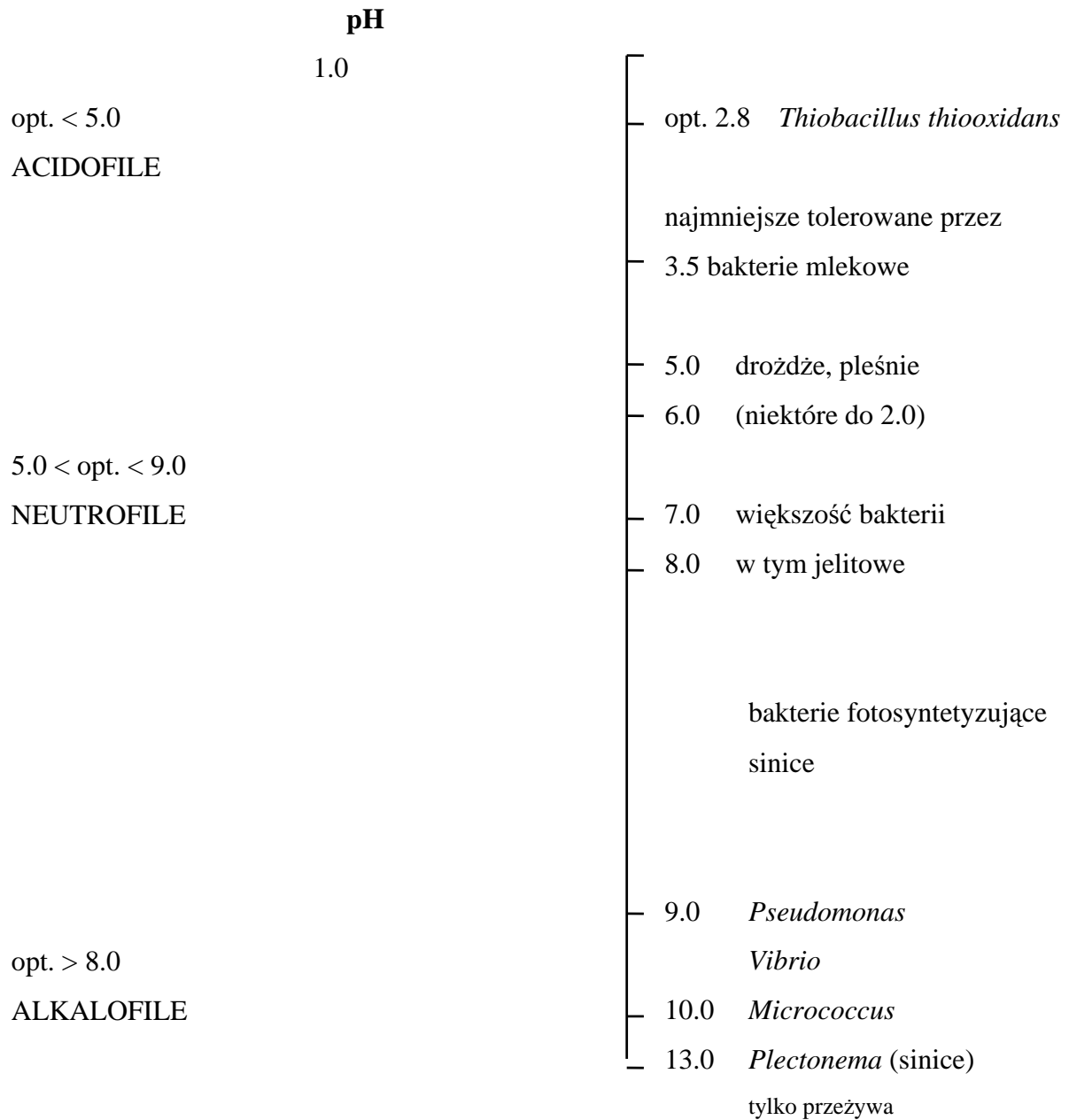
MIKROORGANIZMY A CZYNNIKI ŚRODOWISKA

punkty kardynalne - minimum, optimum, maksimum

pojęcie czynnika ograniczającego

zakres tolerancji





Wewnętrzne pH nie jest tak drastyczne:

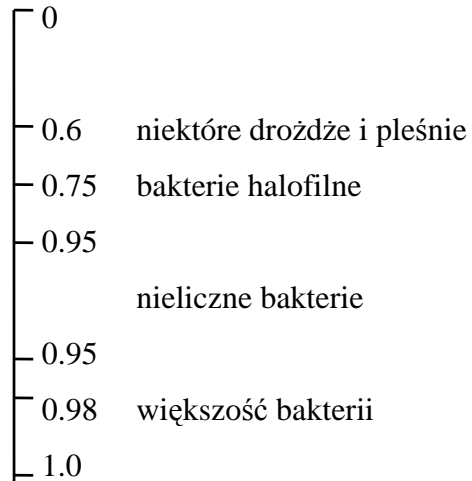
acidofile 6.0-7.0

neutrofile lekko bardziej zasadowe niż zewnętrzne

alkalofile od 1 do 2 jednostek niższe niż zewnętrzne

Aktywność wody

$$a_w = \frac{\text{ciśnienie pary wodnej roztworu}}{\text{ciśnienie pary wodnej czystej wody}}$$



0.98 - aktywność wody morskiej w 25°C

stężenie NaCl (w molach)

większość bakterii	0.0 - 1.0
grzybów	(opt. 0.2 - 0.3)
glonów	
halofile bakterie właściwe (<i>Ectothiorodospira</i>)	1.5-5.0
Archae (<i>Halobacteriae</i>)	2.0-5.5
glony (<i>Dunaliella</i>)	2.0-5.5

Czynnikami ograniczającym wzrost może też być zbyt duże stężenie cukrów (glukoza, sacharoza).

Promieniowanie UV

Powoduje ono:

- * tworzenie się dimerów tyminy i cytozyny
- * powstanie wiązań krzyżowych między niciami DNA
- * powstawanie połączeń między białkami a DNA
- * tworzenie się wolnych rodników i nadtlenków.

Obronę przed tymi ostatnimi stanowi:

- * obecność absorbujących energię barwników karotenoidowych
- * obecność dysmutazy nadtlenków i katalazy.

Metale ciężkie

Hg, Pb, Cu, Cd, Zn, Mn, Co, Au, Ag.

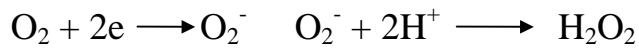
Metody neutralizacji szkodliwego działania metali ciężkich:

- * wytrącanie zewnątrzkomórkowe
- * zahamowanie pobierania do wnętrza komórki lub aktywne wydalanie
- * wewnątrzkomórkowe tworzenie kompleksów
- * chemiczne transformacje (utlenianie /redukcja, metylacja /demetylacja) - geny dla tych enzymów bardzo często zlokalizowane są na plazmidach

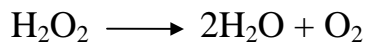
O₂

Toksyczność tlenu wynika z obecności w komórkach następujących związków:

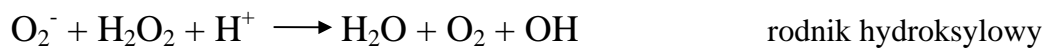
1. enzymów flawinowych



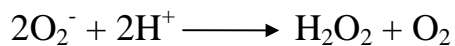
ochronna funkcja **katalazy**



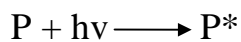
2. oksydaz (np. oksydaza NADPH)



ochronna funkcja **dysmutazy nadtlenkowej**



3. barwników uczulających na światło (np. chlorofil, cytochromy)



ochronna funkcja **karotenoidów** - przejmowanie wzbudzonych elektronów z barwników uczulających i singletów tlenowych.

Antybiotyki - substancje wytwarzane przez drobnoustroje, które wybiórczo i już w niskich stężeniach hamują wzrost lub zabijają inne drobnoustroje. Są to związki o charakterze wtórnych metabolitów, to znaczy że ich synteza rozpoczyna się po zahamowaniu wzrostu wytwarzającego je organizmu.

Klasa chemiczna	Nazwa	Produkujący organizm	Mechanizm działania
β - laktamy	penicyliny	<i>Penicilium</i> spp.	hamowanie syntezy peptydoglikanu
	cefalosporyny	<i>Cephalosporium</i> spp.	
makrolidy	erytromycyna	<i>Streptomyces erythreus</i>	hamowanie translacji
	neomycyna	<i>S. halstidii</i>	
aminoglikozydy	streptomycyna	<i>S. griseus</i>	hamowanie translacji
	neomycyna	<i>S. fradiae</i>	
tetracykliny	tetracyklina	<i>S. aureofaciens</i>	hamowanie translacji
polipeptydy	polimyksyna	<i>Bacillus polymyxa</i>	uszkodzenie błon cytoplazmatycznych
	bacytracyna	<i>B. subtilis</i>	hamowanie syntezy peptydoglikanu
polieny	nystatyna	<i>S. nouresii</i>	uszkodzenie błon cytoplazmatycznych zawierających sterole
-	chloramfenikol	<i>S. venezuelae</i>	hamowanie translacji

Istnieją też antybiotyki hamujące replikację DNA (mitomycyny) i jego transkrypcję

Bakteriocyny - substancje antybiotyczne o charakterze białkowym i stosunkowo wąskim spektrum działania. Bakteriocyny wytwarzane przez pałeczki jelitowe zwane są **kolicynami**. Wrażliwość drobnoustrojów na daną kolicynę uwarunkowana jest istnieniem w ścianie komórkowej specyficznych dla tej kolicyny receptorów. Szczepy wytwarzające daną kolicynę są odporne na jej działanie, mimo że nadal posiadają specyficzne dla niej receptory. Geny warunkujące wytwarzanie kolicyn znajdują się najczęściej na plazmidach.

Przykładowe typy zadań na ćwiczenia z Mikrobiologii

1. Na płytkach, na które posiano:

a. 100 μ l

b. 200 μ l

c. 50 μ l

z rozcieńczenia

a. 10^{-8}

b. $1/2 \times 10^{-7}$

wyrosło 24, 35 i 40 kolonii. Ile było bakterii w 1 ml hodowli wyjściowej?

(tu będzie w sumie 6 rozwiązań)

2. Jak należy rozcieńczyć hodowlę zawierającą 1.0×10^8 komórek/ml, aby po wysiewie na płytki po 100 μ l otrzymać 50 kolonii?

(proszę obliczyć rozcieńczenie a następnie narysować szereg rozcieńczeń, podać ile trzeba do probówek dodać PF i ile hodowli, tak jak było to podawane w instrukcji do ćwiczeń)