

Beata Krawczyk, Roman Kotłowski,
Magdalena Wysocka, Marta Skwarecka

WYBRANE ZAGADNIENIA Z MIKROBIOLOGII KLINICZNEJ I ŚRODOWISKOWEJ

teoria i ćwiczenia laboratoryjne

pod redakcją Beaty Krawczyk

Gdańsk 2021

PRZEWODNICZĄCY KOMITETU REDAKCYJNEGO
WYDAWNICTWA POLITECHNIKI GDAŃSKIEJ

Dariusz Mikielwicz

RECENZENT

Dorota Martysiak-Żurowska

REDAKCJA JĘZYKOWA

Agnieszka Frankiewicz

SKŁAD I PROJEKT OKŁADKI

Ireneusz Jelonek

Wydanie I – 2019

Wydano za zgodą
Rektora Politechniki Gdańskiej

Oferta wydawnicza Politechniki Gdańskiej jest dostępna pod adresem
<https://www.sklep.pg.edu.pl>

Utwór nie może być powielany i rozpowszechniany, w jakiegokolwiek formie
i w jakikolwiek sposób, bez pisemnej zgody wydawcy.

© Copyright by Wydawnictwo Politechniki Gdańskiej
Gdańsk 2021

ISBN 978-83-7348-845-8

Od autorów

Skrypt przeznaczony jest dla studentów różnych kierunków studiów licencjackich, inżynierskich i magisterskich. Rekomendujemy go zwłaszcza studentom kierunku *biotechnologia* w celu rozszerzenia wiedzy z zakresu mikrobiologii o zagadnienia związane z wykrywaniem i identyfikacją drobnoustrojów metodami klasycznej mikrobiologii. Niniejszy podręcznik prezentuje problemy związane z drobnoustrojami istotnymi dla zdrowia człowieka, zawiera opisy metod służących ich identyfikacji oraz stanowi rodzaj przewodnika po wybranych rodzajach bakterii.

Skrypt składa się z 14 ćwiczeń laboratoryjnych, które mogą być pomocne w uczeniu się samodzielnego myślenia i wyciągania wniosków w trakcie mikrobiologicznego postępowania diagnostycznego. Aby przygotować się do realizacji zaproponowanych zajęć laboratoryjnych, student powinien wcześniej odbyć kurs z mikrobiologii podstawowej (ogólnej) i poznać podstawowe techniki mikrobiologiczne oraz budowę bakterii. Opisane ćwiczenia pozwolą poszerzyć wiedzę o metody stosowane w diagnostyce laboratoryjnej.

Autorzy

Spis treści

Wykaz stosowanych skrótów	9
---------------------------------	---

ĆWICZENIE 1

Pozyskiwanie czystych kultur bakteryjnych z hodowli mieszanych – ewaluacja trzech technik oraz kontrola czystości środowiska pracy.....	13
Wstęp teoretyczny	13
Zagadnienia do przygotowania.....	14
Materiały	14
1.1. Pozyskiwanie czystych kultur bakteryjnych z hodowli mieszanych	14
1.2. Tworzenie subkultur bakterii.....	15
1.3. Badanie wpływu temperatury na wytwarzanie barwników bakteryjnych	16
Wykonanie	16
1.4. Kontrola czystości środowiska.....	16
Raport i opracowanie wyników.....	17
Literatura	17

ĆWICZENIE 2

Zasady diagnostyki mikrobiologicznej i studia morfologiczne nieznannej bakterii	18
Wstęp teoretyczny	18
Zagadnienia do przygotowania.....	18
Materiały	18
2.1. Barwienie i obserwacja mikro- i makroskopowa mikroorganizmów	19
2.2. Wykrywanie form przetrwalnych bakterii	21
Procedura barwienia	22
2.3. Wykrywanie materiałów zapasowych – barwienie granulozy.....	23
2.4. Barwienie granuli cytoplazmatycznych	23
Raport i opracowanie wyników.....	23
Literatura	24

ĆWICZENIE 3

Analiza żywotności komórek bakteryjnych	25
Wstęp teoretyczny	25
Zagadnienia do przygotowania.....	26
Materiały	27
3.1. Metoda płytkowa stosowana do oznaczania liczby drobnoustrojów.....	27
Raport i opracowanie wyników.....	28
3.2. Metoda mikroskopii fluorescencyjnej	29
Wykonanie	29
Raport i opracowanie wyników.....	29
Literatura	30

ĆWICZENIE 4

Charakterystyka fizjologiczna bakterii: testy fermentacji i oksydacji.....	31
Wstęp teoretyczny	31
Zagadnienia do przygotowania.....	32
Materiały	32
4.1. Badanie zdolności bakterii do fermentacji	33
4.2. Badanie zdolności bakterii do oksydacji	37
Raport i opracowanie wyników.....	39
Literatura	40

ĆWICZENIE 5

Charakterystyka fizjologiczna bakterii – reakcje hydrolityczne	41
Wstęp teoretyczny	41
Zagadnienia do przygotowania.....	41
Materiały	41
5.1. Test na hydrolizę skrobi.....	42
5.2. Test na hydrolizę kazeiny	43
5.3. Test na hydrolizę tłuszczów	43
5.4. Test na hydrolizę tryptofanu do indolu	43
5.5. Test na hydrolizę mocznika.....	44
Raport i opracowanie wyników.....	45
Literatura	45

ĆWICZENIE 6

Charakterystyka fizjologiczna bakterii – testy biochemiczne.....	46
Wstęp teoretyczny	46
Zagadnienia do przygotowania.....	46
Materiały.....	46
6.1. Test na wytwarzanie siarkowodoru (H ₂ S)	47
6.2. Test na wykorzystanie cytrynianu sodu jako jedyne źródła węgla.....	47
6.3. Deaminacja fenyloalaniny (test PPA)	48
6.4. Test IMViC.....	48
6.5. Podłoże mleczne z lakmusem	49
Raport i opracowanie wyników.....	50
Raport z charakterystyki fizjologicznej bakterii (ćwiczenie 4–6) – podsumowanie	50
Literatura	50

ĆWICZENIE 7

Gram-ujemne patogeny jelitowe. Identyfikacja pałeczek z rodziny Enterobacteriaceae i zminiaturyzowane testy biochemiczne	51
Wstęp teoretyczny	51
Zagadnienia do przygotowania	53
7.1. Testy próbówkowe i płytkowe	53

7.2. Zminiaturyzowane testy biochemiczne.....	55
Literatura	63
ĆWICZENIE 8	
Izolacja i identyfikacja fenotypowa bakterii z rodzaju <i>Staphylococcus</i>	64
Wstęp teoretyczny	64
Zagadnienia do przygotowania	67
Materiały	67
8.1. Wzrost na podłożu z mannitolem i 7,5% NaCl	68
8.2. Badanie właściwości hemolitycznych oraz oznaczanie typu hemolizy.....	69
8.3. Test na wytwarzanie katalazy	69
8.4. Test na fermentację D-trehalozę	69
8.5. Oznaczanie czynnika CF i test na koagulazę	69
8.6. Test wrażliwości na lizostafinę.....	70
8.7. Test na fermentację cukrów na podłożu Hugh–Leifsona	70
8.8. Test na wykrywanie DNazy.....	71
8.9. Testy wrażliwości na antybiotyki: furazolidon, nowobiocynę, polimiksynę B	71
Raport i opracowanie wyników.....	72
Literatura	72
ĆWICZENIE 9	
Diagnostyka paciorkowców i enterokoków	74
Wstęp teoretyczny	74
Zagadnienia do przygotowania	75
Materiały	76
9.1. Obserwacja morfologii kolonii na podłożu agarowym oraz badanie właściwości hemolitycznych paciorkowców na podłożu krwawym	77
9.2. Testy fizjologiczne – identyfikacja różnych grup streptokoków	79
9.3. Identyfikacja enterokoków oraz różnicowanie w obrębie rodzaju <i>Enterococcus</i>	82
9.4. Inne testy stosowane w identyfikacji paciorkowców	85
Raport i opracowanie wyników.....	85
Literatura	87
ĆWICZENIE 10	
Badanie lekowrażliwości bakterii przy użyciu metod fenotypowych.....	88
Wstęp teoretyczny	88
Materiały	93
10.1. Jakościowe badanie wrażliwości szczepów z wykorzystaniem metody dyfuzyjno-krążkowej.....	93
10.2. Ilościowe określanie wrażliwości szczepów na antybiotyki	93
Raport i opracowanie wyników.....	94
10.3. Oznaczanie oporności na metycylinę dla szczepów <i>S. aureus</i> (szczepy MRSA).....	95

Raport i opracowanie wyników.....	97
Literatura	97
ĆWICZENIE 11	
Test na wytwarzanie reduktazy przez bakterie mlekowe	98
Wstęp teoretyczny	98
Zagadnienia do przygotowania.....	99
Materiały	99
Wykonanie	99
Raport i opracowanie wyników.....	100
Literatura	100
ĆWICZENIE 12	
Identyfikacja bakterii obecnych w wodzie środowiskowej	101
Wstęp teoretyczny	101
Zagadnienia do przygotowania.....	101
Materiały.....	102
12.1. Test domniemania.....	102
12.2. Test potwierdzający.....	104
12.3. Test końcowego potwierdzenia.....	106
12.4. Zastosowanie podłoża chromogennego do badania próbek wody	106
Raport i opracowanie wyników.....	107
Literatura	108
ĆWICZENIE 13	
Komensalizm, synergizm i antagonizm mikroorganizmów.....	109
Wstęp teoretyczny	109
Zagadnienia do przygotowania.....	109
Materiały	109
13.1. Komensalizm.....	110
13.2. Synergizm bakteryjny	111
13.3. Antagonizm mikrobiologiczny	114
Raport i opracowanie wyników.....	114
Literatura	115
ĆWICZENIE 14	
Budowa ekosystemu na podstawie kolumny Winogradskiego	116
Wstęp teoretyczny	116
Zagadnienia do przygotowania.....	117
Materiały.....	117
Wykonanie	118
Raport i opracowanie wyników.....	119
Literatura	119

Wykaz stosowanych skrótów

- a* – współczynnik posianej ilości materiału
ADON – adonitol
ADP – adenozyno-5'-difosforan
ARAB – arabinoza
ATP – adenozyno-5'-trifosforan
B. cereus – *Bacillus cereus*
B. subtilis – *Bacillus subtilis*
BE – podłoże z żółcią i eskuliną
C – suma kolonii na wszystkich płytkach wybranych do liczenia
C. freundii – *Citrobacter freundii*
CAMP – test synergistycznej hemolizy
CCA (*chromogenic coliform agar*) – podłoże chromogenne do oceny ilościowej Enterobacteriaceae
CIT – cytrynian
CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute) – Instytut Standardów Klinicznych i Laboratoryjnych
d – wskaźnik rozcieńczenia odpowiadający pierwszemu liczonemu rozcieńczeniu
DMSO – dimetylosulfotlenek
DNAza – deoksyrybonukleaza
DSLБ – bulion odżywczy z laktozą o podwójnym stężeniu laktozy
DUL – dulcyt
E. aerogenes – *Enterobacter aerogenes*
E. avium – *Enterococcus avium*
E. casseliflavus – *Enterococcus casseliflavus*
E. coli – *Escherichia coli*
E. durans – *Enterococcus durans*
E. gallinarium – *Enterococcus gallinarium*
EMB (*eosin methylene blue*) – pożywka zawierająca błękit metylenowy i eozyne Y
ENDO – podłoże różnicujące dla bakterii z rodziny Enterobacteriaceae
ESBL (*extended spectrum β-lactamases*) – β-laktamazy o rozszerzonym spektrum substratowym
ETA, ETB, ETD – eksfoliatyny, toksyny epidermolityczne
EUCAST (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) – Europejski Komitet ds. Testowania Podatności na Antybiotyki
FAD – dinukleotyd flawinoadeninowy
Fc (*fragment crystallizable*) – fragment przeciwciała
GAS (*group A streptococcus*) – paciorkowiec ropotwórczy z grupy A
GBS (*group B streptococcus*) – paciorkowiec ropotwórczy z grupy B
GLU – glukoza
HLAR (*high level aminoglycoside resistance*) – szczepy odporne na wysokie stężenia aminoglikozydów
IgA – immunoglobulina A
IgG – immunoglobulina G
IgM – immunoglobulina M
IMViC – I: reakcja na indol, M: test na redukcję metylenu, V: test Vogesa–Proskauera, C: test na rozkład cytrynianu
j.t.k., cfu (*colony forming units*) – jednostki tworzące kolonie
KPC (*Klebsiella pneumoniae carbapenemase*) – szczepy *Klebsiella* odporne na karbapenemazy

LA (*Luria-Bertani agar*) – podłoże odżywcze z agarem
LAC – laktoza
LB (*Luria-Bertani broth*) – bulion odżywczy
LYS – lizyna
MBC (*minimal bactericidal concentration*) – minimalne stężenie bakteriobójcze
MBL (*metalo-β-laktamazy*) – enzymy hydrolizujące wiązanie β-laktamowe w cząsteczce karbapenemów
MBRT (*methylene blue reduction time*) – czas redukcji błękitu metylenowego
mecA – gen warunkujący oporność gronkowców na metycylinę
MH – bulion MH II
MHA – agar II Muellera-Hinton
MIC (*minimal inhibitory concentration*) – minimalne stężenie hamujące wzrost
MLSB (*macrolides, lincosamides, and streptogramin B*) – szczepy odporne na makrolidy, linkozamidy i streptograminy B
MR (*methyl red test*) – test redukcji czerwieni metylenowej
MRSA (*methicilin-resistant Staphylococcus aureus*) – szczepy odporne na metycylinę
MR-VP – bulion peptonowo-glukozowy
MSCRAMM (*microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*) – białka powierzchniowe rozpoznające adhezyjne cząsteczki macierzy
MSSA (*methicilin sensitive Staphylococcus aureus*) – szczepy wrażliwe na metycylinę
N₁ – liczba płytek z pierwszego liczonego rozcieńczenia
N₂ – liczba płytek z drugiego liczonego rozcieńczenia
NAD – dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy
NADH – forma zredukowana dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego
NF (*necrotising fasciitis*) – martwicze zapalenie powięzi
NPL – najbardziej prawdopodobna liczba drobnoustrojów
O/R – potencjał oksydacyjno-redukcyjny
OD – gęstość optyczna
ORN – ornityna
P. fluorescens – *Pseudomonas fluorescens*
P. vulgaris – *Proteus vulgaris*
PA – fenyloalanina
PBP (*penicillin-binding protein*) – białko wiążące penicylinę
PI – jodek propidyny
PPA – kwas fenylopirogronowy
PYR – test pozwalający wykryć enzym L-pyrolidonyloaryloamidazę
S. agalactiae – *Streptococcus agalactiae*
S. anginosus – *Streptococcus anginosus*
S. aureus – *Staphylococcus aureus*
S. bovis – *Streptococcus bovis*
S. canis – *Streptococcus canis*
S. constelatus – *Streptococcus constelatus*
S. dysgalactiae – *Streptococcus dysgalactiae*
S. epidermidis – *Staphylococcus epidermidis*
S. equi – *Streptococcus equi*
S. intermedius – *Streptococcus intermedius*
S. lactis – *Streptococcus lactis*

S. milleri – *Streptococcus milleri*
S. mutans – *Streptococcus mutans*
S. pneumoniae – *Streptococcus pneumoniae*
S. pyogenes – *Streptococcus pyogenes*
S. salivarius – *Streptococcus salivarius*
S. saprophyticus – *Staphylococcus saprophyticus*
S. viridans – *Streptococcus viridans*
SCC*mec* (*staphylococcal chromosomal cassette mec*) – chromosomalna kasetta zaliczana do wysp genowych z genem *mecA*
SIM (*sulfide indole motility*) – podłoże na wykrywanie siarkowodoru, indolu, ocenę ruchliwości
SORB – sorbitol
SS (*Salmonella Shigella agar*) – podłoże do izolacji pałeczek *Salmonella* i *Shigella*
SSLB – bulion odżywczy z laktozą
sp. (*species*) – gatunki
STSS (*streptococcal toxic shock syndrome*) – paciorkowcowy zespół wstrząsu toksycznego
SXT (*trimethoprim and sulfamethoxazole*) – trimetoprim i sulfametaksazol
SYTO 9 – zielony barwnik fluorescencyjny
TP – temperatura pokojowa
TSA (*trypticase soy agar*) – agar tryptozowo-sojowy
TSB TSB (*trypticase soy broth*) – bulion tryptozowo-sojowy
TSST – toksyna odpowiedzialna za zespół wstrząsu toksycznego
TSYEB – bulion kazeinowo-sojowy z ekstraktem drożdżowym
TTC – chlorek 2,3,5-trifenyloctetrazoliowy
VBNC (*viable but non-culturable*) – bakterie żyjące, lecz niedające się hodować w danym momencie
VP – reakcja Vogesa–Proskauera
VRBL – podłoże agarowe z żółcią, czerwienią obojętną i fioletem krystalicznym
WB – podłoże Wilsona–Blaira