

Beata Krawczyk, Roman Kotłowski,  
Magdalena Wysocka, Marta Śpibida

# **WYBRANE ZAGADNIENIA Z MIKROBIOLOGII KLINICZNEJ I ŚRODOWISKOWEJ**

**teoria i ćwiczenia laboratoryjne**

pod redakcją Beaty Krawczyk

Gdańsk 2019

PRZEWODNICZĄCY KOMITETU REDAKCYJNEGO  
WYDAWNICTWA POLITECHNIKI GDAŃSKIEJ  
*Janusz T. Cieśliński*

RECENZENT  
*Dorota Martysiak-Zurowska*

REDAKCJA JĘZYKOWA  
*Agnieszka Frankiewicz*

SKŁAD I PROJEKT OKŁADKI  
*Ireneusz Jelonek*

Wydano za zgodą  
Rektora Politechniki Gdańskiej

Oferta wydawnicza Politechniki Gdańskiej jest dostępna pod adresem  
<http://www.pg.edu.pl/wydawnictwo/katalog>  
zamówienia prosimy kierować na adres [wydaw@pg.edu.pl](mailto:wydaw@pg.edu.pl)

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

© Copyright by Wydawnictwo Politechniki Gdańskiej  
Gdańsk 2019

ISBN 978-83-7348-783-3

## 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 <sub>2</sub> 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
<b>ĆWICZENIE 8</b>	
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
<b>ĆWICZENIE 9</b>	
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
<b>ĆWICZENIE 10</b>	
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
<b>ĆWICZENIE 11</b>	
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
<b>ĆWICZENIE 12</b>	
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
<b>ĆWICZENIE 13</b>	
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
<b>ĆWICZENIE 14</b>	
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*

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  
N<sub>1</sub> – liczba płytek z pierwszego liczonego rozcieńczenia  
N<sub>2</sub> – 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