

PROTOKOŁY DO ĆWICZEŃ

ĆWICZENIE NR 1

FERMENTACJA OCTOWA - PRODUKCJA OCTU JABŁKOWEGO. POMIAR ILOŚCI DROBNOUSTROJÓW.

1. Produkcja octu jabłkowego

- Fermentacja octowa to proces utleniania alkoholu etylowego do kwasu octowego w warunkach tlenowych. Proces ten jest katalizowany przez enzymy wytwarzane przez bakterie fermentacji octowej głównie należące do rodzaju *Acetobacter*, *Gluconobacter* i *Gluconacetobacter*. Bakterie te występują naturalnie, np. na skórce owoców, jednak w produkcji przemysłowej octu stosuje się czyste kultury tych bakterii. Do produkcji octu w warunkach domowych można wykorzystać m.in. jabłka.
- Należy pokroić 0,5 kg jabłek i wsypać do wyparzonego wcześniej słoika. Następnie zalać przegotowaną wodą z cukrem (50 g cukru; 0,5 litra wody). Całość wymieszać i przykryć czystą bawełnianą tkaniną. Odstawić na 3 tygodnie (temp. pokojowa) - fermentacja burzliwa. Po tym czasie należy przelać ocet do nowych słoików w celu dokończenia procesu fermentacji oraz klarowania się octu na okres 1-2 tygodni. Po zakończeniu procesu produkcji należy zmierzyć ilość wyprodukowanego kwasu octowego i procentowość uzyskanego octu miareczkując ocet 0.1 M NaOH w obecności fenoloftaleiny.

2. Pomiar ilości drobnoustrojów

Metody bezpośredniego liczenia drobnoustrojów

- Liczenie drobnoustrojów przy użyciu komory BÜRKERA
- Komory do liczenia drobnoustrojów pod mikroskopem to najczęściej szklane płytki z wyciętym wgłębieniem, podzielonym na kwadraty lub prostokąty o znanej powierzchni. Po naniesieniu rozcieńczenia do komory dokonuje się liczenia komórek widocznych w obrazie mikroskopowym, a następnie przelicza się ich liczbę na 1 cm³ badanego materiału. Najczęściej stosuje się komory BÜRKERA i THOMA.

Liczbę komórek (L) w komorze Bürkera przelicza się według wzoru:

$$L = 2,5 \times 10^5 \times a \times n$$

gdzie: a - średnia liczba komórek w małym kwadracie, n - rozcieńczenie badanej próbki

Metody hodowlane stosowane do oznaczania liczby drobnoustrojów

- Oznaczanie najbardziej prawdopodobnej liczby drobnoustrojów (NPL)
Oznaczanie liczby drobnoustrojów metodą płytkową. Metoda oznaczania liczby drobnoustrojów na podłożu stałym zakłada, że liczba powstających kolonii odpowiada liczbie żywych komórek w badanej próbce. Wynik podaje się w jednostkach tworzących kolonie - jtk (ang. CFU - colony forming units) w 1 g lub 1 cm³ produktu.

1) posiewy wgłębne

Na płytce Petriego nanosi się po 1 cm³ wybranych kolejnych rozcieńczeń w dwóch powtórzeniach, a następnie wylewa się określone podłoże ogrzane do temp. 42-44°C w łaźni wodnej. W przypadku badania w kierunku bakterii mezofilnych płytki inkubuje się w 30°C przez 72 godziny lub w temperaturach optymalnych dla wybranych grup drobnoustrojów. Do odczytu wybiera się płytki z 2 kolejnych rozcieńczeń, na których wyrosło od 30 do 300 kolonii.

Liczbę drobnoustrojów (L) w 1 cm³ lub 1 g próbki oblicza się wg wzoru:

$$L = \frac{C \times d}{(N1 + 0,1N2)}$$

gdzie: C - suma kolonii na wszystkich płytkach wybranych do liczenia, N1 - liczba płytek z pierwszego liczonego rozcieńczenia, N2 - liczba płytek z drugiego liczonego rozcieńczenia, d - wskaźnik rozcieńczenia odpowiadający pierwszemu (najniższemu) liczonemu rozcieńczeniu

Do odczytu wyników, można wybrać jedno rozcieńczenie, zliczyć kolonie na płytkach z równoległych powtórzeń, wyliczyć średnią liczbę kolonii w rozcieńczeniu i przeliczyć na 1 cm³ lub 1 g próby, mnożąc przez odwrotność rozcieńczenia.

2) posiewy powierzchniowe

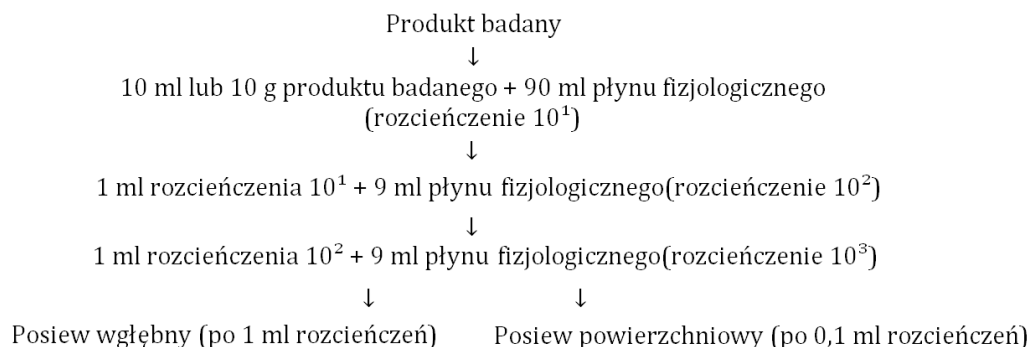
Na płytce Petriego z zestalonym podłożem nanosi się po 0,1 cm³ wybranych, kolejnych rozcieńczeń próby w dwóch powtórzeniach. Materiał rozprowadza się jałową gąszczką na powierzchni całego podłoża, aż do wyschnięcia. Przy oznaczaniu liczby bakterii mezofilnych płytki inkubuje się w temp. 30°C przez 72 h, przy oznaczaniu innych grup drobnoustrojów należy stworzyć optymalne warunki temperaturowe i czasowe potrzebne do wzrostu drobnoustrojów. Do odczytu wybiera się płytki z 2 kolejnych rozcieńczeń, na których wyrosło od 15 do 150 kolonii.

Liczbę drobnoustrojów (L) w 1 cm³ lub 1 g próbki oblicza się wg wzoru:

$$L = \frac{C \times d \times a}{(N1 + 0,1N2)}$$

gdzie: C - suma kolonii na wszystkich płytkach wybranych do liczenia, N1 - liczba płytek z pierwszego liczonego rozcieńczenia, N2 - liczba płytek z drugiego liczonego rozcieńczenia, d - wskaźnik rozcieńczenia odpowiadający pierwszemu (najniższemu) liczonemu rozcieńczeniu, a - współczynnik posianej ilości materiału przy posiewie 0,1 cm³, a=10

Schemat wykonania rozcieńczeń i posiewów metodą wgłębną powierzchniową



- Określenie ilości bakterii na podstawie zmętnienia zawiesiny według skali McFarlanda. Oryginalne standardy zawierają określone ilości chlorku baru i kwasu siarkowego razem. Mieszanie tych dwóch związków powoduje zmętnienie roztworu wskutek powstawania osadu siarczanu baru.

Zmętnienie odpowiadające 0.5 w skali McFarlanda powstaje poprzez zmieszanie 0,05 ml - 1,175% dwuwodnego chlorku baru (BaCl₂ x 2 H₂O), z 9,95 (H₂SO₄) ml 1% kwasu siarkowego.

Określanie ilości bakterii na podstawie absorbancji przy długości fali λ=600 nm.

Standard McFarland	0.5	1	2	3	4
1,0% chlorek baru (ml)	0,05	0,1	0,2	0,3	0,4
1,0% Kwas siarkowy (ml)	9,95	9,9	9,8	9,7	9,6
gęstość komórek (1x10 ⁸ cfu/ml)	1,5	3,0	6,0	9,0	12,0
% Transmitancji	74,3	55,6	35,6	26,4	21,5
Absorbancja	0,132	0,257	0,451	0,582	0,669

Ćwiczenie 1 - karta zaliczeniowa

Test	Wzory	<i>Candida albicans</i>
Komora Bürkera		
Posiew wgłębny		
Posiew powierzchniowy		
Gęstość optyczna w skali McFarlanda		
Absorbancja (długość fali = 600nm)		

Ocena uzyskanego octu		
Zapach		
Barwa		
Zmętnienie		
Odczyn		
Ilość wytworzonego kwasu octowego i procentowość octu	Obliczenia:	Odpowiedź:

Imię i nazwisko:
Zaliczenie:

ĆWICZENIE NR 2

FERMENTACJA ALKOHOŁOWA - PRODUKCJA BIAŁEGO WINA

1. Kontynuacja ćwiczenia nr 1

Odczyt wykonanych posiewów oraz interpretacja wyników.

2. Produkcja białego wina

- Fermentacja alkoholowa to beztlenowy proces przekształcenia glukozy do alkoholu etylowego. W szlaku metabolicznym tego procesu kluczowym enzymem jest dehydrogenaza alkoholowa. Proces produkcji wina na skalę przemysłową zawdzięczamy użyciu drożdżom z rodzaju *Saccharomyces*, które występują naturalnie na winoroślach.
- Do produkcji domowego białego wina należy użyć białych winogron, które trzeba dokładnie umyć i odszypułkować. Następnie za pomocą odpowiedniego narzędzia zgnieść owoce uzyskując moszcz. Do moszczu dodać drożdże i cukier zawieszony w wodzie zgodnie z instrukcją producenta. Ostatnim etapem jest zakorkowanie balona z fermentującym winem z wykorzystaniem specjalnej rurki, aby wytworzyć warunki beztlenowe. Wino należy odstawić na okres min. 4 tygodnie. Po tym czasie wino można przefiltrować i zmierzyć procentowość alkoholu w uzyskanym produkcie.

3. Przygotowanie materiału na ćwiczenia nr 3: Izolacja bakterii z gleby

- W celu izolacji bakterii z gleby należy odważyć 10 g próbki gleby w warunkach sterylnych i dodać do kolbki z 90 ml jałowej soli fizjologicznej, wytrząsać intensywnie przez 10 minut (otrzymane w ten sposób rozcieńczenie to 10^{-1}). Próbę pozostawić na 10 min w celu sedymentacji makrocząstek glebowych, a po zsedymetowaniu próbki wykonać kolejne rozcieńczenia (od 10^{-2} do 10^{-7}) w probówkach z 900 μ l soli fizjologicznej. Z przygotowanych, roztworów wykonać posiewy powierzchniowe (na płytki Petriego z zestalonym podłożem stałym nanieść po 0,1 ml z rozcieńczeń 10^{-4} - 10^{-7}). Inkubować płytki przez 7 dni.

Ćwiczenie 2 - karta zaliczeniowa

Ocena uzyskanego wina	
Zapach	
Barwa	
Zmętnienie	
Procentowość alkoholu w winie	

Imię i nazwisko:

Zaliczenie:

ĆWICZENIE NR 3

SKRINING BAKTERII O POTENCJALNYCH WŁAŚCIWOŚCIACH DEGRADUJĄCYCH WIELOPIERŚCIENIOWE WĘGLOWODORY AROMATYCZNE (WWA)

1. Selekcja kolonii bakteryjnych o odmiennej morfologii. Opisanie cech morfotycznych wybranych kolonii.
 2. Izolacja DNA wybranych kolonii bakteryjnej wg instrukcji dołączonej do zestawu do izolacji DNA.
 3. Przygotowanie mieszaniny do reakcji real-time PCR i nastawienie reakcji
- A. Przygotować osobne mieszaniny reakcyjne dla każdego analizowanego genu próbówce typu Eppendorf (1,5 ml).

Odczynnik	Objętość na jedną próbkę [μ l]
qPCR Master Mix (2x)	7,5
Forward Primer	1,2
Reverse Primer	1,2
Woda wolna od nukleaz	4,1
RAZEM	14,0

- B. Do każdego dołka nakładać po 14 μ l odpowiedniego mixu oraz 1 μ l wyizolowanego DNA.
C. Umieścić płytkę w termocyklerze
D. Ustawić następujące warunki reakcji

Etap	Temperatura [$^{\circ}$ C]	Czas	Ilość cykli
Wstępna denaturacja	94	5 min	1
Denaturacja	94	30 s	
Przyłączanie starterów	53	45 s	35
Wydłużanie	72	30 s	

- E. Odczytać wartość Ct reakcji.

Ćwiczenie 3 - karta zaliczeniowa

Charakterystyka kolonii wybranego szczepu bakterii	
Miejsce izolacji	
Średnica kolonii, kolor, powierzchnia, wzniosłość, brzeg, cechy charakterystyczne	
Obecność genów odpowiedzialnego za syntezę enzymów degradujących WWA (wartości Ct)	
Czy wybrany szczep bakterii ma potencjał degradujący WWA?	

Imię i nazwisko:

Zaliczenie:

ĆWICZENIE NR 4
ANALIZA MIKROBIOLOGICZNA ŻYWNOSCI

1. Mikroflora wybranych produktów żywnościowych

Wykonanie posiewów wybranych produktów spożywczych: wędlina, ser, sok owocowy jednodniowy, mięso drobiowe, jogurt, kapusta kiszona

A. Oznaczanie liczby bakterii z grupy coli metodą płytkową wg normy PN-ISO 4832:3007

Procedura:

Roztwór fizjologiczny z peptonem (10 g/ml + 90 ml rozcieńczenia) - zawiesina wyjściowa
↓
Agar z fioletem krystalicznym, czerwienią obojętną, żółcią i laktozą (VRBL) - posiew metodą zalewową 2 etapową:
- 1 ml próbki produktu płynnego lub 1 ml zawiesiny wyjściowej przenieść na 2 płytki, zalać 15 ml pożywki VRBL o temp. 45°C. Po zestaleniu płytki zalać 4 ml pożywki VRBL o temp. 45°C (inkubacja odwróconych płytek - 37°C - 24 h)
↓
W przypadku obecności nietypowych kolonii pobrać 5 kolonii i posiać do probówek z bulionem z zielenią brylantową i żółcią (+ rurki Durhama) - inkubacja 37°C - 24 h

Wynik:

Podłoże VRBL - ciemno-purpurowo-czerwone kolonie otoczone czerwoną strefą wytrącaną żółci (wynik+)
Bulion z zielenią brylantową i żółcią + rurki Durhama – wytworzenie się gazu i zmętnienie (wynik +)

B. Oznaczanie liczby drożdży i pleśni metodą płytkową wg normy PN-ISO 21527-1:2009

Procedura:

Metoda liczenia kolonii w produktach o aktywności wody $>$ niż 0,950,1% wody peptonowej (x g/ml próby + 9 ml rozcieńczalnika)
↓
Płytkę agarową z dichloranem, różem bengalskim i chloramfenikolem (DRBC) lub podłoże Sabourada
- posiew 0,1 ml próbki produktu płynnego oraz wykonanie kolejnych rozcieńczeń dziesiętnych
- posiew na 1 płytkę Petriego po 0,1 ml zawiesiny wyjściowej.
Inkubacja wieczkiem do góry 25°C - 5 dni
↓
W celu ułatwienia oznaczenia niskiej liczby drożdży i pleśni można zwiększyć objętość posiewanego inokulum do 0,3 ml i posiewać na 3 równoległe płytki

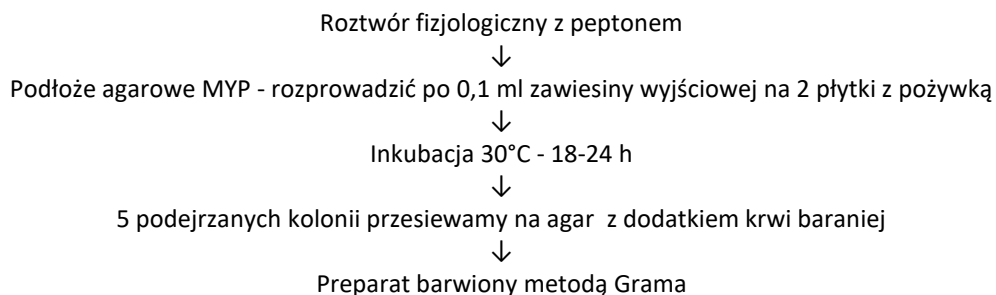
C. Oznaczanie liczby gronkowców koagulazo-dodatnich wg normy PN- EN ISO 6888:1:2001+A 1:2004

Procedura:

Roztwór fizjologiczny z peptonem
↓
Podłoże agar Baird-Parkera- posiew metodą powierzchniową po 0,1 ml zawiesiny na 2 płytki lub 1 ml zawiesiny na jedną dużą płytkę agarową
↓
Inkubacja 37°C - 24 h - 48h
↓
Z każdej płytki przenieść 5 kolonii typowych lub 5 kolonii nietypowych do bulionu mózgowo-sercowego - inkubacja 37°C - 24h
↓
Test koagulazy, Staphkit

D. Oznaczanie liczby *Bacillus cereus* metodą płytkową wg normy PN-EN ISO 7932:2005

Procedura:



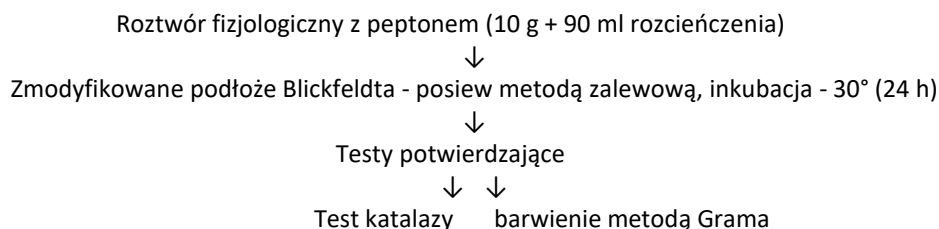
Wynik:

Podłoże MYP - duże, różowe kolonie (zdolność do fermentacji mannitolu) otoczone strefą zmętnienia (wytwarzanie lecytynazy)

Podłoże agar z dodatkiem krwi baraniej - zdolność do wytwarzania hemolizy

E. Określenie liczby bakterii kwaszących typu mlekowego wg. Normy PN-90-A-75052/07:1990

Procedura:



Ćwiczenie 4 - karta zaliczeniowa

Test	Obserwacje i wnioski
Określenie liczby bakterii z grupy coli	
Określenie liczby drożdży i pleśni	
Określenie liczby gronkowców koagulazododatnich	
Określenie liczby bakterii <i>Bacillus cereus</i>	
Określenie liczby bakterii kwaszących typu mlekowego	

Imię i nazwisko:

Zaliczenie:

ĆWICZENIE NR 5

ANALIZA MIKROBIOLOGICZNA WODY, POWIETRZA I POWIERZCHNI, RĄK PRACOWNIKÓW

1. Kontynuacja ćwiczenia nr 4 - odczyt i interpretacja wyników

2. Analiza mikrobiologiczna wody

A. Określenie liczby bakterii tlenowych rosnących w temp. 22°C

1ml wody wodociągowej posiać metodą posiewu wgłębnego na szalkę Petriego, a następnie zalać upłynnionym agarem odżywczym. Płytki inkubować w temp. 22°C przez 24h. Po inkubacji zliczyć wyrosłe kolonie.

B. Określenie liczby bakterii tlenowych rosnących w temp. 37°C

1ml wody wodociągowej posiać metodą posiewu wgłębnego na szalkę Petriego, a następnie zalać upłynnionym agarem odżywczym. Płytki inkubować w temp. 37°C przez 24h. Po inkubacji zliczyć wyrosłe kolonie.

C. Oznaczanie ilościowe *Escherichia coli* i bakterii grupy coli PN-EN ISO 9308-1 (metoda filtracji membranowej)

Przefiltrować 100 cm³ przez filtry membranowe o średnicy porów 0,45 μm. Filtry umieścić na płytkach z podłożem Chromogenic Coliform Agar (CCA) i inkubować w temp 37°C przez 24 godziny. Po inkubacji sprawdzić wyrosłe kolonie i wykonać szybkie testy na wytwarzanie oksydazy. (Niebieskie kolonie → (bakterie *E. coli*); różowe kolonie i oksydaza (+) → bakterie z grupy coli).

D. Oznaczanie liczby enterokoków kałowych PN-EN ISO7899-2:2004

Przefiltrować 100 cm³ wody przez filtr membranowy. Filtr umieścić na płytce z podłożem SB (Slanetsa Bartleya). Płytki inkubować w temp. 37°C przez 24 godziny. Po inkubacji przełożyć filtr na ciepłe podłoże agarowe z żółcią eskuliną i azydkiem. Inkubacja 1-2h / 44°C. Ciemne kolonie, zmiana barwy podłoża z żółtego na brązowy → enterokoki kałowe.

3. Analiza mikrobiologiczna powietrza i powierzchni

A. Ocena czystości powietrza metodą sedymentacyjna

Płytki z podłożem agar odżywczy oraz podłoże Sabourauda ustawić w miejscu gdzie chcemy przeprowadzić badanie powietrza. Płytki otworzyć i pozostawić na 5, 10 lub 15 minut podczas których następuje sedymentacja komórek na powierzchnię płytki. Po tym czasie zamknąć płytki i wstawić do inkubacji. Po inkubacji zliczyć wyrosłe kolonie, a liczbę bakterii i grzybów w 10 litrach powietrza (X) obliczyć ze wzoru:

$$X = \frac{a \times 100}{(b \times c)},$$

gdzie: a - liczba kolonii wyrosłych na płytce; b - powierzchnia płytki; c - współczynnik czasu ekspozycji wynoszący 1 dla 5 min, 2-10 min, 3-15 min.

Wynik:

	Pomieszczenie produkcyjne przemysłu spożywczego	Sale wykładowe i sale ćwiczeń
Liczba bakterii tlenowych	500-600 jtk/m ³	Nie więcej niż 2000 jtk/m ³
Liczba grzybów	0-50 jtk/m ³	Nie więcej niż 2000 jtk/m ³

B. Badanie czystości powierzchni z zastosowaniem płytek kontaktowych (Count-tact)

Zdjąć pokrywkę płytki i przyłożyć podłoże bezpośrednio do badanej powierzchni, po czym nałożyć pokrywkę i inkubować. Po inkubacji zliczyć kolonie wyrosłe na powierzchni podłoża.

4. Analiza czystości mikrobiologicznej rąk pracowników

A. Określenie liczby bakterii tlenowych mezofilnych

Wykonać wymaz z wewnętrznej strony dłoni, a następnie wymazówkę umieścić w kolbie z solą fizjologiczną i wytrząsać 5 minut. Pobrać po 1 cm³ popłuczyn i metodą umieścić na sterylnej płytce Petriego. Płytkę zalać upłynnionym agarem odżywczym i inkubować w temp. 30°C przez 72 godziny. Po inkubacji policzyć wyrosłe kolonie i przeliczyć na 40 cm³ płynu.

B. Wykrywanie obecności gronkowców koagulazo-dodatnich

Wykonać wymaz z wewnętrznej strony dłoni, a następnie wymazówkę umieścić w kolbie z solą fi-zjologiczną i wytrząsać 5 minut. Pobrać po 1 cm³ popłuczyn i posiać metodą powierzchniową na płytkę z podłożem Chapmana. Inkubować 37°C przez 24 h. Po inkubacji określić obecności żółtych kolonii, a następnie wykonać test koagulazy.

Wymagania:

Liczba bakterii tlenowych mezofilnych	Stopień czystości rąk	Obecność gronkowców koagulazo-dodatnich
<100	Ręce czyste	Nb.
100-1000	Ręce dostatecznie czyste	Nb.
>1000	Ręce brudne	Nb.

Ćwiczenie 5 - karta zaliczeniowa

Test	Obserwacje i wnioski
Określenie liczby bakterii tlenowych rosnących w temp. 22°C	
Określenie liczby bakterii tlenowych rosnących w temp. 37°C	
Określenie pałeczek grupy coli metodą filtrów membranowych	
Określenie liczby enterokoków kałowych	
Ocena czystości powietrza metodą sedymentacyjna	
Ocena czystości powietrza z zastosowaniem płytek kontaktowych (Count-tact)	
Określenie liczby bakterii tlenowych mezofilnych na rękach	
Określenie obecności gronkowców koagulazo-dodatnich	

Imię i nazwisko:
Zaliczenie:

ĆWICZENIE NR 6
EKSTRAKCYJA PIOCYJANINY

1. Kontynuacja ćwiczenia nr 5
2. Odczyt wykonanych posiewów oraz interpretacja wyników.

A. Piocyjanina jest pigmentem uznawanym za czynnik wirulencji *Pseudomonas aeruginosa*. Jednak metabolit ten ma różne potencjalne zastosowania np. w produkcji energii w mikrobiologicznych ogniwach paliwowych, wytwarzaniu czujników i ekranów OLED czy terapii przeciwnowotworowej.

Procedura ekstrakcji piocyjaniny – metoda chloroform/HCl

1. 48-godzinną hodowlę *Pseudomonas aeruginosa* w pożywce king A należy poporcjować po 1,5 mL do probówek typu eppendorf.
2. Zwirować hodowlę 5min/10000 rpm
3. Przenieść 1 ml supernatantu do nowych probówek, ostrożnie dodać 0,6 mL chloroformu.
4. Probówki wytrząsać przez 30 min na wytrząsarce.
5. Zebrać 0,5 ml fazy chloroformowej (niebieska) do nowych probówek.
6. Dodać ostrożnie 0,25 ml 0,2N HCl, zworteksować.
7. Wirować 5min/10000rpm.
8. Zmierzyć absorbancję fazy kwasu (różowa) przy długości fali $\lambda=520$ nm.
9. Odnieść swój odczyt do krzywej kalibracyjnej i obliczyć ilość wyprodukowanej piocyjaniny na objętość hodowli wyjściowej.

Ćwiczenie 6 - karta zaliczeniowa

Ilość wyprodukowanej piocyjaniny - obliczenia

Odpowiedź:

Imię i nazwisko:

Zaliczenie: