

---

---

## Ćwiczenie 4

### Czynniki bakteriobójcze

#### 1. Odczyt - szeregów i ich interpretacja

2. Pokaz właściwości biochemicznych hemoliza typu  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  na podłożu z krwią.

#### 3. Bakteryjne czynniki bakteriobójcze: bakteriocyny: kolicyny a) Wytwarzanie kolicyn przez *E. coli* - ćwiczenie wykonują wszystkie pary

Na przykrywkę odwróconej do góry dnem płytki Petriego z bakteriami (kolicynogeny szczep *Escherichia coli*) wlać 1 ml chloroformu. Celem tego zabiegu jest zabicie bakterii. Po pół godzinie odkryć płytkę aby chloroform mógł wyparować. Do próbki zawierającej 3 ml rozpuszczonego agaru górnego dodać 0.1 ml hodowli bakteryjnej (szczep wskaźnikowy *Escherichia coli* A77). Zawartość próbki wylać na powierzchnię płytki agarowej i inkubować 24 godziny w temperaturze 37°C. Po tym czasie zaobserwować strefy zahamowania wzrostu szczepu wskaźnikowego wokół szczepu kolicynogenego.

#### 4. Grzybowe czynniki bakteriobójcze: Antybiotyki. Oznaczenie wrażliwości bakterii na antybiotyki.

Antybiotyki są substancjami o działaniu przeciwbakteryjnym wytwarzanymi przez drobnoustroje (bakterie, grzyby) albo otrzymywanymi syntetycznie lub półsyntetycznie. Mają one zdolność hamowania wzrostu i zabijania takich mikroorganizmów jak bakterie, grzyby i niektóre pierwotniaki.

a) **Antybiogram** - każda para wykonuje antybiogram dla jednego rodzaju bakterii.

Na płytkę Petriego z podłożem agarowym nanieść 100  $\mu$ l hodowli bakteryjnej i dokładnie rozprowadzić jałową bagietką po powierzchni podłoża. Następnie, posługując się pensetą umieścić na płytce krążki bibułowe nasycone antybiotykami (5 krążków z pośród wielu dostępnych). Odległość pomiędzy poszczególnymi krążkami powinna wynosić około 2 cm. Płytki pozostawić na dwie godziny w temperaturze pokojowej (w tym czasie antybiotyki dyfundują do podłoża) a następnie inkubować 24 godziny w temperaturze 37°C. Po tym czasie porównać skuteczność działania antybiotyków w stosunku do badanych bakterii a ponadto określić, które antybiotyki najskuteczniej działają na dany drobnoustrój.

Bakterie wykorzystywane w tym ćwiczeniu to: *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella anatum*, *Klebsiella oxytoca*, *Staphylococcus aureus*.

#### 5. Chemiczne: Chemioterapeutyki. Oznaczenie wrażliwości bakterii na sulfonamidy.

Sulfonamidy są amidami kwasu paraaminobenzoowego (PABA) o działaniu przeciwbakteryjnym. Sulfonamidy obniżają przemianę materii i hamują rozmnażanie się bakterii czyli działają bakteriostatycznie. Związki te są inhibitorami kwasu paraaminobenzoowego, który normalnie bierze udział w syntezie kwasu foliowego. Sulfonamidy wchodząc w ciąg reakcji prowadzących do powstania kwasu foliowego interferują z tą syntezą i w ten sposób bakterie zostają pozbawione czynnika wzrostowego. Na działanie sulfonamidów są wrażliwe tylko te bakterie, które posiadają zdolność do syntezy kwasu foliowego.

A) **Antybiogram** - każda para przygotowuje antybiogram dla jednego rodzaju bakterii (1 płytka na parę). Płytkę Petriego z podłożem agarowym przygotować jak w punkcie 4 a. W doświadczeniu używamy bakterie wymienione w punkcie 4a. Następnie na płytkę nanieść krążki bibułowe nasycone sulfonamidami (trimetoprim, biseptol: trimetoprim+sulfametaksazol). Płytki pozostawić na dwie godziny w temperaturze pokojowej (w tym czasie sulfonamidy dyfundują do podłoża) a następnie inkubować 24 godziny w temperaturze 37°C. Po tym czasie porównać skuteczność działania sulfonamidów w stosunku do badanych bakterii a ponadto określić, które sulfonamidy najskuteczniej działają na dany drobnoustrój.

#### **6. Oznaczanie wrażliwości bakterii na fitoncydy - 1 płytka na parę**

Fitoncydy są substancjami o działaniu bakterio-, grzybo- i pierwotniakobójczym. Wytwarzane są przez rośliny wyższe. Ze względu na działanie toksyczne (w wysokim stężeniu) na komórki ssaków nie znalazły zastosowania w lecznictwie. Fitoncydy w dużych ilościach występują w cebuli, czosnku, chrzanie i koprze. Płytkę Petriego z podłożem agarowym przygotować jak w **punkcie 4a** (w ćwiczeniu wykorzystujemy bakterie wymienione w **punkcie 4a**). W środku płytki wyciąć krążek agaru, w powstałej w ten sposób studzińce umieścić posiekany czosnek lub cebulę. Płytki inkubować 24 godziny w temperaturze 37°C. Określić wrażliwość badanych bakterii na fitoncydy.

#### **7. Omówienie skuteczności działania wybranych środków dezynfekcyjnych.**

#### **8. Przygotowanie jałowo płytek z pożywką LA.**