

Anna Kostka
Dariusz Latowski

MATERIAŁY DO ĆWICZEŃ LABORATORYJNYCH
Z **MIKROBIOLOGII**

dla studentów Ochrony Środowiska na AGH



KAPITAŁ LUDZKI
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI
FUNDUSZ SPOŁECZNY



ROZDZIAŁ PIERWSZY: STERYLIZACJA I DEZYNFEKCJA

1. Zasady BHP

1.1. Ogólne zasady BHP dotyczące pracy w laboratorium

1. Do laboratorium nie wolno wnosić odzieży wierzchniej.
2. W czasie pracy należy używać adekwatnej odzieży ochronnej (fartuch, okulary ochronne, rękawiczki). Zaleca się także odpowiedni, wygodny strój i obuwie (należy unikać butów na wysokim obcasie). Długie włosy powinny być związane. Należy również zdjąć biżuterię z dłoni i nadgarstków.
3. W pracowni i korytarzu nie wolno biegać, jeść, pić, żuć gumy i palić, a po zakończeniu ćwiczeń dokładnie umyć i osuszyć ręce.
4. Studentom nie wolno przebywać w laboratorium bez opieki prowadzącego bądź innej upoważnionej osoby.
5. W razie jakichkolwiek wątpliwości dotyczących wykonywanego ćwiczenia, należy konsultować się z prowadzącym zajęcia.
6. Nie wolno wykonywać eksperymentów i prac nie wchodzących w zakres ćwiczeń.
7. Na stołach laboratoryjnych mogą znajdować się tylko przedmioty niezbędne do realizacji doświadczeń.
8. Przed przystąpieniem do pracy pod dygestorium należy sprawdzić czy działa wyciąg.
9. Przed zapaleniem palnika gazowego należy sprawdzić, czy wąż jest starannie nałożony na kurek i palnik gazowy oraz czy wąż gumowy nie jest uszkodzony.
10. Nie wolno używać naczyń uszkodzonych (pękniętych lub nadtłuczonych).
11. Szkło przeznaczone do ogrzewania w płomieniu musi być na zewnętrznej powierzchni suche, by nie uległo pęknięciu.
12. Nie wolno nachylać się nad naczyniami podczas ich ogrzewania.
13. W czasie ogrzewania cieczy w probówce nie wolno jej wylotu kierować ani na siebie, ani na sąsiadów.
14. Naczynia, które mają być ogrzewane albo mają się podczas zachodzących reakcji rozgrzewać, lub w których wywiązują się gazy, nie mogą być szczelnie zamykane.
15. Probówki bezpośrednio ogrzewane płomieniem należy trzymać za pomocą drewnianych łap do ogrzewania. Łapa musi obejmować probówkę możliwie jak najbliżej jej wylotu, aby uniknąć zapalenia łapy.
16. Ogrzewając ciecz w probówce nad palnikiem należy trzymać probówkę pod kątem, który pozwala na ogrzewanie jak największej powierzchni cieczy a nie tylko dna probówki. Wylot probówki kierujemy w miejsce, w którym nie przybywają ludzie. W czasie ogrzewania, ciecz w probówce delikatnie mieszamy. Probówkę usuwamy z płomienia w momencie, w którym pojawia się pierwszy objaw wrzenia (pęcherzyk gazu) i po chwili ponownie wkładamy do pojawienia się kolejnego pęcherzyka gazu. Czynność powtarzamy raz lub dwa razy.
17. Ogrzewając w probówce ciała stałe, zawartości probówki nie mieszamy.
18. Wprowadzając do probówki przynajmniej dwie substancje, z których chociaż jedna jest w stanie ciekłym, zawartość probówki dokładnie mieszamy przez intensywne wstrząsanie, chyba że procedura doświadczenia wskazuje inne postępowanie.
19. Palnych cieczy nie wolno ogrzewać nad płomieniem.
20. Pojemniki z odczynnikami muszą być zamykane i odkładane zawsze na swoje miejsce.
21. Nie wolno próbować smaku odczynników ani preparatów wydanych do zajęć.
22. Nie należy wachać nieznanych substancji wprost z naczyń. Albo wacha się najpierw korek, albo wachlującym ruchem ręki skierowuje się powietrze z parami badanej substancji do nosa.
23. Substancje chemiczne (zwłaszcza nieznanych) nie wolno dotykać rękoma. Do nabierania odczynników, czy badanych próbek należy używać łyżeczki (szpatułki).
24. Nie wolno wlewać stężonych kwasów i zasad do rozgrzanych cieczy lub naczyń.

25. Nie wolno wlewać stężonego kwasu siarkowego do płynów bez uprzedniego upewnienia się, że płyn nie jest alkaliczny. Przy rozcieńczaniu kwasów, a przede wszystkim kwasu siarkowego, należy wlewać **ZAWSZE kwas do wody** wąskim strumieniem, przy ciągłym mieszaniu. Czynności z kwasami należy wykonywać pod dygestorium z szybą opuszczoną na wysokość łokci.
26. Z takimi substancjami jak: **brom, chlor, chlorowódór, siarkowódór, tlenki azotu, stężone kwasy, lotne rozpuszczalniki organiczne** pracować należy pod dygestorium z szybą opuszczoną do wysokości łokci.
27. Należy zwracać szczególną uwagę podczas pracy z takimi substancjami jak: **fenol, alkaloidy, sole metali ciężkich**.
28. Przeprowadzanie reakcji, odparowywanie cieczy oraz wszystkie czynności, w czasie których wywiązują się pary i gazy, wolno wykonywać tylko pod wyciągiem.
29. Wszystkie czynności ze stężonym **kwasem fluorowodorowym** należy wykonywać w rękawicach gumowych i okularach ochronnych.
30. Przy czynnościach z silnymi truciznami, należy utrzymywać w szczególnej czystości ręce, stół i używane w trakcie pracy przyrządy, aby wykluczyć możliwość zatrucia.
31. Wszelkie przypadki rozbicia szkła, rozlania odczynnika, uszkodzenia sprzętu, skaleczenia, poparzenia lub innego rodzaju kontaktu z odczynnikiem chemicznym, pogorszenia samopoczucia itp. należy natychmiast zgłosić prowadzącemu.
32. Nie wolno pozostawiać pracującej aparatury bez nadzoru.
33. Po umyciu naczyń laboratoryjnych należy je odłożyć do wysuszenia w miejsce do tego przeznaczone.
34. Przed opuszczeniem sali ćwiczeń należy sprawdzić czy wszystkie używane urządzenia zostały prawidłowo wyłączone, szkło umyte a miejsce pracy uporządkowane.
35. Bez zgody prowadzącego zajęcia do pracowni nie wolno wprowadzać osób trzecich ani jej opuszczać (z wyjątkiem sytuacji niezbędnych do ratowania życia i zdrowia).

1.2. Dodatkowe zasady BHP dotyczące pracy w laboratorium mikrobiologicznym

1. Przed rozpoczęciem i po zakończeniu pracy, zalecane jest przemyć stanowiska pracy środkiem dezynfekcyjnym.
2. Szkło i inne przedmioty wielorazowego użytku należy składować w czasie ćwiczeń w wyznaczonym miejscu a na końcu dokładnie umyć według wskazówek prowadzącego. Przedmioty jednorazowego użytku umieścić w przeznaczonym do tego celu pojemniku.
3. Drobną sprzęt metalowy (igły, ezy itp.) należy sterylizować na bieżąco w płomieniu palnika.
4. Płytki, kolby i inne naczynia zawierające hodowle mikrobiologiczne powinny być cały czas zamknięte. Otwierać je można tylko jałowo, w celu pobrania materiału i możliwie na krótki czas.
5. Po zakończeniu pracy z mikroskopem należy natychmiast zetrzeć olejek immersyjny z obiektywu za pomocą bawełnianej szmatki lub chusteczki nasączonej alkoholem albo benzyną.

2. Sterylizacja i dezynfekcja

Sterylizacja lub inaczej wyjaławianiem nazywamy proces zabijania **wszystkich** form żywych drobnoustrojów, zarówno form wegetatywnych, jak i przetrwalnikowych. Sterylizacja niszczy również wirusy.

Dezynfekcja to inaczej odkażanie i prowadzi do zniszczenia drobnoustrojów chorobotwórczych i potencjalnie chorobotwórczych oraz zmniejszenia zanieczyszczenia innymi drobnoustrojami. Do dezynfekcji stosuje się głównie środki chemiczne i temperaturę. W praktyce niszczy ona jedynie formy wegetatywne bakterii, w przeciwieństwie do sterylizacji, która niszczy zarówno formy wegetatywne jak i przetrwalnikowe. Metodami dezynfekcji opartymi na wysokiej temperaturze są: dekoktacja (gotowanie) i pasteryzacja.

3. Przygotowywanie szkła laboratoryjnego do sterylizacji

Umyte i wysuszone szkło laboratoryjne można sterylizować wysoką temperaturą na sucho w suszarce elektrycznej. Probówki, kolby, szalki Petriego itp. przygotowuje się do sterylizacji w następujący sposób:

- otwory probówek itp. zatyka się tamponikami z waty;
- większe otwory, jak np. w przypadku kolb stożkowych, zatyka się dopasowanymi korkami przygotowanymi z warty i gazy (opis ich przygotowania znajduje się w kolejnym punkcie) i zabezpiecza się kapturkiem z folii aluminiowej osłaniającym korek z waty (można też stosować korki dostępne w handlu, wówczas stosowanie folii aluminiowej nie jest konieczne);
- szalki Petriego, probówki itp. zamyka się w specjalnych tubusach lub owija szczelnie papierem, np. gazetowym;
- probówki lub kolby sterylizowane wraz z pożywką zabezpiecza się kapturkiem z folii aluminiowej osłaniającym korek z waty.

Szkło sterylizuje się w suszarkach w temperaturze 140 °C przez 2,5 h, 160 °C przez 2 h lub 170-180 °C przez 1 h. Ze względów praktycznych najwyższych temperatur raczej się unika i stosuje tylko w przypadku pośpiechu. W zbyt wysokiej temperaturze papier kruszeje i wydziela nieprzyjemny zapach spalenizny. Po zakończeniu sterylizacji szkła nie należy od razu wyciągać, gdyż gwałtowna zmiana temperatury może spowodować jego pękanie.

MATERIAŁY: umyte i osuszone szkło laboratoryjne (ilość i rodzaj według polecenia prowadzącego), papier gazetowy, wata kosmetyczna, korki (sposób ich przygotowania podano w kolejnym punkcie), folia aluminiowa

1. Przygotować odpowiednią ilość i rodzaj szkła laboratoryjnego według polecenia prowadzącego zajęcia. W razie potrzeby szkło najpierw dokładnie umyć i osuszyć.
2. Suche szkło przygotować do sterylizacji według wskazówek podanych powyżej.
3. Przygotowane szkło ułożyć w suszarce, ustawić odpowiednią temperaturę i czas trwania procesu.
4. Po zakończeniu procesu sterylizacji odczekać kilkadziesiąt minut aż szkło nieco ostygnie i wyciągnąć z suszarki. Wysterylizowanego szkła nie należy rozpakowywać! Jest to dopuszczalne tylko bezpośrednio przed jego użyciem.
5. Sterylne szkło odłożyć w miejsce wskazane przez prowadzącego lub użyć w doświadczeniu.

4. Przygotowywanie korków z waty

Do sporządzenia korka potrzebna jest wata oraz gaza, dodatkowo także nitka, choć można się bez niej obejść. Przygotowanie korka należy rozpocząć od wydzielenia paska z waty szerokości kilku i długości kilkunastu cm. Pasek ten należy zwinąć w ten sposób, aby dopasować go dość ciasno do wylotu kolby. Dobrze dopasowany korek (nie za luźny i nie za ciasny) przy wyciąganiu z wylotu kolby powinien wydać charakterystyczny dźwięk, podobny do tego, jaki wydaje korek wyciągany z butelki wina. Dopasowany korek należy owinąć gazą i zawiązać tak, żeby się nie rozpadł. Należy obciążyć lub zabezpieczyć zwisające końce gazy lub nitki.

5. Jałowe rozlewanie pożywek

Zachowanie jałowych warunków w trakcie rozlewania pożywek do naczyń, np. szalek Petriego, jest warunkiem koniecznym w trakcie przeprowadzania doświadczeń mikrobiologicznych. Sterylne szkło i pożywka nie mogą zostać zanieczyszczone mikroorganizmami pochodzącymi np. z rąk, czy z powietrza.

MATERIAŁY: sterylna szalka Petriego, sterylna pożywka stała, palnik gazowy

1. Pożywkę stałą należy najpierw rozpuścić przez jej podgrzanie na palniku gazowym lub w aparacie Kocho.
2. Jałowe wylewanie pożywek do szalek odbywa się zawsze w pobliżu płomienia palnika.
3. Najpierw z kolby zawierającej sterylną pożywkę, należy zdjąć aluminiowy kapturek osłaniający korek, umieścić go na jałowej powierzchni blisko palnika, wyjąć korek z waty lub innego tworzywa, wsunąć go w aluminiowy kapturek lub jeśli to możliwe, trzymać w dłoni.
4. Szyjkę otwartej kolby należy opalić w płomieniu palnika.
5. Do drugiej ręki należy wziąć sterylną szalkę, opalić tą jej krawędź, która będzie otwierana a następnie uchylić jej wieczko na tyle, aby można było swobodnie wlać upłynnioną pożywkę. Pożywki należy wlać tyle, aby wypełniła szalkę do około połowy jej wysokości.
6. Po wlaniu pożywki szalkę należy natychmiast zamknąć i pozostawić do zastygnięcia.
7. Szyjkę kolby z pożywką należy ponownie opalić w płomieniu palnika i natychmiast zamknąć.

Pożywki płynne często przygotowuje się od razu w naczyniach, w których będzie prowadzona hodowla mikrobiologiczna i razem z nimi są one sterylizowane. W innym wypadku rozlewa się je do naczyń hodowlanych najczęściej za pomocą sterylnych pipet lub cylindrów miarowych.

6. Testowanie skuteczności różnych środków dezynfekcyjnych

MATERIAŁY: 2 sterylne szalki Petriego, pipeta automatyczna, głaszczka, pisak do szkła, krążki bibułowe, środki dezynfekcyjne, agar odżywczy

1. Wylać jałowo pożywkę agarową na 2 duże szalki Petriego (o średnicy 8-10 cm) i zostawić do zastygnięcia.
2. Za pomocą pisaka do szkła podzielić szalki na 4 ćwiartki, na ich spodniej stronie.
3. Wybrać 8 dowolnych środków dezynfekcyjnych udostępnionych przez prowadzącego ćwiczenia i podpisać odpowiednio ćwiartki szalek symbolem lub nazwą wybranych środków.
4. Przygotować 8 małych krążków z bibuły.
5. Odpipetować do szalek po 200 μ l hodowli bakteryjnej udostępnionej przez prowadzącego i rozproszyc równomiernie na powierzchni agaru za pomocą głaszczki.
6. Każdy z przygotowanych krążków bibułowych zanurzyć w jednym z wybranych środków dezynfekcyjnych i położyć na środku odpowiedniej ćwiartki szalki z agarem.
7. Opisać szalki i wstawić na kilka dni do ciepłarki na 37 °C. Wyniki obserwować na kolejnych zajęciach.

7. Kontrola sterylności podłoży wylewanych w sposób jałowy i niejłowy

MATERIAŁY: sterylna i niesterylna szalka Petriego, sterylna i niesterylna probówka, pisak do szkła, agar odżywczy, bulion odżywczy

1. Przygotować dwie szalki Petriego (jałową i niejłową) oraz dwie probówki (jałową i niejłową). Odpowiednio opisać.
2. W obu szalkach umieścić pożywkę agarową. W jałowej zachowując warunki sterylne, w niejłowej dbając tylko o sterylność pożywki (by móc ją później wykorzystać do innych doświadczeń).
3. W obu probówkach umieścić po około 2 ml jałowego bulionu. W jałowej w sposób sterylny a w przypadku niejłowej dbając tylko o sterylność bulionu.
4. Szalki i probówki wstawić na kilka dni do ciepłarki na 37 °C. Wyniki obserwować na kolejnych zajęciach.

ROZDZIAŁ DRUGI: PODŁOŻA I HODOWLE MIKROBIOLOGICZNE

1. Definicja i cel stosowania pożywek

Pożywki, zwane też podłożami to mieszaniny odpowiednio dobranych składników odżywczych, służące do hodowli drobnoustrojów w warunkach laboratoryjnych (sztucznych). Są to tzw. hodowle w szkle laboratoryjnym, czyli *in vitro* i prowadzi się na nich badania identyfikacyjne oraz doświadczenia. Drobnoustroje takie jak riketsje (jedna z grup bakterii) i wirusy nie rosną na podłożach hodowlanych. Wymagają one żywej komórki, zatem ich hodowle prowadzi się *in vivo*, czyli na żywym organizmie lub na hodowli tkankowej. Pożywki mogą być płynne lub stałe. Stosowanie pożywek pozwala na uzyskanie czystej (składającej się z jednego gatunku lub szczepu) hodowli mikrobiologicznej z mieszanego materiału mikrobiologicznego, co jest warunkiem niezbędnym, jeżeli chcemy prowadzić szczegółowe badania morfologiczne, fizjologiczne, biochemiczne i serologiczne.

2. Warunki stawiane pożywkom

Pożywki mikrobiologiczne muszą spełniać pewne warunki, aby były użyteczne. Ich składniki zatem muszą być tak dobrane, aby: (1) miały odpowiednią wartość odżywczą, (2) wykazywały optymalny odczyn (pH) i potencjał redox, (3) były izotoniczne, (4) przejrzyste i (5) sterylne (jałowe).

3. Test właściwości różnicująco-wybiórczych agaru Endo

MATERIAŁY: 2 sterylne szalki Petriego, eza, pisak do szkła, agar zwykły, agar Endo, 3 hodowle bakteryjne na bulionie udostępnione przez prowadzącego

1. Przygotować jedną dużą szalkę z agarem zwykłym oraz jedną dużą szalkę z agarem Endo.
2. Obydwie szalki podzielić pisakiem do szkła na spodniej stronie na ćwiartki i opisać jak poniżej.
3. Na odpowiednio opisane ćwiartki obydwu szalek pościć jałową ezą hodowle bakteryjne udostępnione przez prowadzącego, o następującym składzie: (A) czysta hodowla *Escherichia coli*, (B) hodowla mieszana zawierająca *E. coli*, (C) hodowla mieszana nie zawierająca *E. coli*.
4. Czwartą ćwiartkę należy pozostawić pustą jako kontrolę sterylności przeprowadzanego doświadczenia.
5. Szalki opisać i wstawić do cieplarki ustawionej na 37 °C na 48 h.
6. Zaobserwować i zinterpretować uzyskane wyniki.

4. Test zapotrzebowania grzyba *Aspergillus niger* na pierwiastki biogenne

Doświadczenie ma na celu pokazanie niezbędności wybranych makroelementów do prawidłowego wzrostu grzyba *Aspergillus niger* (kropidlaka czarnego). W tym celu bada się jego wzrost na podłożach nie zawierających poszczególnych składników a jako kontrolę stosuje się pożywkę pełną.

MATERIAŁY: 5 sterylnych kolb stożkowych o pojemności 50 ml z dopasowanymi korkami z waty, eza, pipeta automatyczna, pisak do szkła, NH_4NO_3 (2 %), KH_2PO_4 (1 %), MgSO_4 (1 %), FeSO_4 (0,5 %) + ZnSO_4 (0,5 %), NaH_2PO_4 (1 %), sacharoza (*in subst.*), woda destylowana, zarodnikujący *Aspergillus niger*

1. Przygotować pożywkę **pełną** według przepisu: 2 % NH_4NO_3 (5 ml), 1 % KH_2PO_4 (5 ml), 1 % MgSO_4 (5 ml), 0,5 % FeSO_4 + 0,5 % ZnSO_4 (2 krople), sacharoza (5 g), woda destylowana (dopełnić do 100 ml).
2. Przygotować pożywkę **bez azotu** według przepisu: 1 % KH_2PO_4 (5 ml), 1 % MgSO_4 (5 ml), 0,5 % FeSO_4 + 0,5 % ZnSO_4 (2 krople), sacharoza (5 g), woda destylowana (dopełnić do 100 ml).
3. Przygotować pożywkę **bez fosforu** według przepisu: 2 % NH_4NO_3 (5 ml), 1 % MgSO_4 (5 ml), 0,5 % FeSO_4 + 0,5 % ZnSO_4 (2 krople), sacharoza (5 g), woda destylowana (dopełnić do 100 ml).
4. Przygotować pożywkę **bez potasu** według przepisu: 2 % NH_4NO_3 (5 ml), 1 % MgSO_4 (5 ml), 1 % NaH_2PO_4 (5 ml), 0,5 % FeSO_4 + 0,5 % ZnSO_4 (2 krople), sacharoza (5 g), woda destylowana (dopełnić do 100 ml).
5. Podłoża te można przygotować w innych ilościach zależnie od potrzeb, zachowując proporcje składników.
6. Do odmierzania wszystkich roztworów należy używać osobnych pipet.
7. Przygotowane podłoża rozlać do sterylnych kolbek stożkowych po 25-30 ml, zatkać korkami z waty, opisać odpowiednio i wysterylizować gotując na palniku.
8. Po ostudzeniu zaszczyć pożywki za pomocą ezy zarodnikami *A. niger* i inkubować w temperaturze 28-30 °C przez tydzień.
9. Jedną pożywkę pełną zostawić niezaszczepioną jako kontrolę sterylności.
10. Po okresie inkubacji zaobserwować uzyskane wyniki, opisać wyrosłe kolonie i wyciągnąć wnioski.

5. Test na wykorzystywanie przez *Aspergillus niger* różnych źródeł węgla

MATERIAŁY: 4 sterylne kolby stożkowe o pojemności 50 ml z dopasowanymi korkami z waty, eza, pipeta automatyczna, lejki Büchnera, 4 okrągłe sączki bibułowe, pisak do szkła, długopis, NH_4NO_3 (2 %), KH_2PO_4 (1 %), MgSO_4 (1 %), FeSO_4 (0,5 %) + ZnSO_4 (0,5 %), glukoza (*in subst.*), skrobia (*in subst.*), kwas winowy (*in subst.*), glicerol, woda destylowana, zarodnikujący *Aspergillus niger*

1. Przygotować 4 pożywki o następującym składzie: 2 % NH_4NO_3 (5 ml), 1 % KH_2PO_4 (5 ml), 1 % MgSO_4 (5 ml), 0,5 % FeSO_4 + 0,5 % ZnSO_4 (2 krople), źródło węgla (x g), woda destylowana (dopełnić do 100 ml).
2. Do pierwszej pożywki dodać 5 g glukozy, do drugiej, trzeciej i czwartej odpowiednią ilość skrobi, kwasu winowego i glicerolu (ilość tych związków należy obliczyć tak, aby ilość węgla w pożywkach była taka sama).
3. Podłoża te można przygotować w innych ilościach zależnie od potrzeb, zachowując proporcje składników.
4. Pożywki rozlać do kolbek po 25-30 ml, odpowiednio opisać i wysterylizować przez zagotowanie na palniku gazowym a po ostygnięciu zaszczyć zarodnikami kropidlaka.
5. Po tygodniowej inkubacji w temperaturze 28-30 °C opisać morfologię wyrosłych kolonii.
6. Przygotować odpowiednią ilość sączków bibułowych o średnicy lejka Büchnera, zważyć je i odpowiednio opisać długopisem.
7. Wszystkie hodowle odsączyć na lejku Büchnera, następnie sączki przygotować do suszenia składając je na pół i suszyć w 105 °C, do stałej masy.
8. Po wysuszeniu zważyć i odejmując masę sączka obliczyć suchą masę hodowli na poszczególnych pożywkach. Wyniki umieścić w tabeli. Porównać i zinterpretować.

ROZDZIAŁ TRZECI:

MIKROFLORA CZŁOWIEKA

Każdy zdrowy żywy organizm (pomijając wyjątkowe przypadki) zasiedlony jest przez jakieś mikroorganizmy, stanowiące jego naturalną mikroflorę. Określenie „prawidłowa mikroflora” odnosi się do całości populacji drobnoustrojów zasiedlających wewnętrzne i zewnętrzne powierzchnie zdrowego, normalnego organizmu ludzkiego, zwierzęcego lub roślinnego. Skóra i błony śluzowe ciała są zawsze siedliskiem drobnoustrojów, które można podzielić na 2 grupy:

1. **flora stała** – jej skład jest stosunkowo niezmienny a charakterystyczne dla niej bakterie są regularnie znajdowane w określonej okolicy ciała organizmu w danym wieku; zachwianie równowagi w obrębie tej flory zwykle szybko prowadzi do jej odzyskania;
2. **flora przejściowa (nietrwala)** – składa się z niechorobotwórczych lub potencjalnie (oportunistycznie) chorobotwórczych drobnoustrojów bytujących na skórze i błonach śluzowych; mikroorganizmy te pochodzą z otoczenia, nie wywołują schorzeń i nie osiedlają się na stałe, ale w przypadku zakłócenia równowagi stałej mikroflory mogą się rozmnażać i wywoływać schorzenia.

1. Badanie mikroflory skóry metodą odciskową

MATERIAŁY: sterylna szalka Petriego, pisak do szkła, agar odżywczy, mydło, alkohol lub inne środki do dezynfekcji błon śluzowych i skóry

1. Przygotować szalkę Petriego z agarem odżywczym.
2. Podzielić szalkę na 4 sektory i odpowiednio opisać.
3. Na jednym odcisnąć brudny palec, na drugim palec umyty mydłem, na trzecim palec przetarty alkoholem lub innym środkiem dezynfekcyjnym a czwarty zostawić jako kontrolę sterylności.
4. Inkubować w 37 °C przez 24-48 godzin.
5. Opisać morfologię wyrosłych kolonii i porównać wzrost bakterii (liczbę kolonii) w poszczególnych sektorach.
6. Z wybranych koloni można wykonać preparaty barwione metodą Grama.

2. Badanie mikroflory jamy ustnej i jamy nosowo-gardłowej metodą wymazów

MATERIAŁY: sterylna szalka Petriego, jałowe patyczki do wymazów, pisak do szkła, agar z krwią, agar zwykły, agar Chapmana

1. Przygotować szalkę Petriego z agarem z krwią, agarem zwykłym oraz agarem Chapmana.
2. Jałowymi patyczkami zakończonymi wacikiem pobrać wymaz z jamy ustnej (wewnętrznej strony policzka, dziąsła, języka, podniebienia, płytki nazębnej) i/lub jamy nosowo-gardłowej oraz z powierzchni skóry a następnie wykonać rozmaz na odpowiednio opisanych szalkach z wybranymi podłożami (najlepiej równoległe wykonać wymazy na wszystkich trzech podłożach).
3. Inkubować w temperaturze 37 °C przez 24-48 godzin.
4. Opisać morfologię wyrosłych kolonii i porównać materiał pochodzący od różnych osób. Zinterpretować wyniki posiewów wykonanych na poszczególnych podłożach.
5. Z wybranych kolonii można wykonać preparaty barwione metodą Grama.

Na podłożu z krwią rosną między innymi paciorkowce oraz gronkowce hemolizujące, czyli zdolne do rozkładu czerwonych ciałek krwi (otoczone jasną obwódką) oraz paciorkowce zieleniejące (otoczone zielonkawą obwódką). Podłoże Chapmana zaś, to podłoże różnicująco-wybiórcze dla gronkowców. Pożywka ta zawiera duże stężenie chlorku sodu, co hamuje wzrost większość drobnoustrojów towarzyszących, jest więc zatem składnikiem wybiórczym pożywki. Składnikiem różnicującym jest mannitol, który jest rozkładany przez niektóre gatunki

gronkowców (*Staphylococcus aureus*, *S. saprophyticus*) a przez inne nie (*S. epidermidis*), zaś rolę wskaźnika pełni czerwień fenolowa. Chorobotwórcze gronkowce fermentujące mannitol zmieniają barwę podłoża na żółtą, natomiast kolonie niegroźnych gronkowców mannitol-ujemnych są nieco mniejsze i nie zmieniają barwy podłoża. Gronkowce charakteryzujące się zdolnością do hemolizy (na podłożu z krwią) oraz kwaśną fermentacją mannitolu (mannitolo-dodatnie) (na podłożu Chapmana) to gatunki potencjalnie chorobotwórcze, np. *Staphylococcus aureus*. Zarówno podłoże z krwią, jak i podłoże Chapmana, wykorzystywane jest także do mikrobiologicznej oceny czystości powietrza.

ROZDZIAŁ CZWARTY: BADANIA MIKROBIOLOGICZNE WÓD

1. Mikroflora autochtoniczna

Wody powierzchniowe są naturalnym środowiskiem bytowania wielu organizmów żywych, w tym również bakterii, które obok glonów stanowią znaczą część mikroflory tych wód. **Autochtoniczna** mikroflora, czyli mikroorganizmy naturalnie występujące w środowisku wodnym, może być zróżnicowana zarówno pod względem jakościowym, jak i ilościowym, co jest związane z lokalnymi uwarunkowaniami środowiskowymi (dostępnością składników odżywczych, temperaturą, pH, natlenieniem, jakością i głębokością wody, warunkami klimatycznymi i meteorologicznymi, porami roku itp.). Mikroflora autochtoniczna to przede wszystkim mikroorganizmy zimnolubne i zimnotolerancyjne, zarówno autotroficzne jak i heterotroficzne, zdolne do wzrostu nawet w bardzo ubogich, pod względem odżywczym, środowiskach, czyli tzw. prototrofy. Pod względem preferencji tlenowych są to przede wszystkim tlenowce i względnie beztlenowce. Ich aktywność polega przede wszystkim na mineralizacji substancji organicznej, przyczyniają się zatem do naturalnego procesu samooczyszczania się wód. Stanowią też istotne źródło pożywienia dla innych organizmów żywych.

2. Mikroflora allochtoniczna

W wodach pojawia się również mikroflora **allochtoniczna**, czyli obca i nie występująca naturalnie w danym środowisku. Większość przedstawicieli tej flory ginie dość szybko w obcym dla siebie środowisku, jednak niektóre mogą utrzymywać się w nim przez jakiś czas w formie wegetatywnej lub wytwarzać formy przetrwalne. Do mikroflory allochtonicznej zaliczamy np. bakterie glebowe, które są wypłukiwane z gleby wodami spływu powierzchniowego, czy bakterie ściekowe, do których zaliczamy mikroorganizmy rozwijające się na szczątkach roślinnych i zwierzęcych oraz mikroorganizmy pochodzenia jelitowego, dla których naturalnym siedliskiem jest układ pokarmowy ludzi i zwierząt. Wody mogą być także rezerwuarem mikroorganizmów chorobotwórczych, których źródłem są ścieki komunalne, nieczystości pochodzące z ferm i gospodarstw hodowlanych lub, w mniejszym stopniu, odchody dzikich zwierząt.

3. Mikroorganizmy wskaźnikowe w badaniu wód

W celu zminimalizowania ryzyka zakażenia woda przeznaczona do picia lub na potrzeby przemysłu spożywczego czy przetwórczego, przed wprowadzeniem do wodociągu jest oczyszczana i uzdatniana na różne sposoby, np. przez chlorowanie lub ozonowanie. Wody wykorzystywane przez człowieka podlegają także kontroli sanitarnej, jednakże bezpośrednie wykrywanie wszystkich organizmów chorobotwórczych byłoby bardzo trudne, czasochłonne i drogie, więc w praktyce niemożliwe. Dlatego też w rutynowych badaniach sanitarnych wód stosuje się metodę niebezpośrednią, polegającą na wykrywaniu niechorobotwórczych bakterii fekalnych uznanych za tzw. **wskaźniki sanitarne**. Ich obecność w wodach wskazuje na zanieczyszczenie tych wód odchodami, co z kolei stwarza ryzyko obecności bakterii (i/lub innych organizmów) chorobotwórczych. Innymi słowy, obecność w wodach wskaźnikowych bakterii fekalnych dowodzi zanieczyszczenia tej wody fekaliami, co z kolei wskazuje na ryzyko zanieczyszczenia jej groźnymi bakteriami chorobotwórczymi oraz innymi patogenami, obecnymi w odchodach. Bakterie wskaźnikowe wykorzystywane w analizie mikrobiologicznej wód to:

1. laseczki beztlenowe redukujące siarczany(IV)
2. paciorkowce kałowe
3. bakterie grupy *coli* oraz bakterie grupy *coli* typu kałowego.

4. Pobieranie próbek wody do badań mikrobiologicznych

Przy pobieraniu próbek wody do badań mikrobiologicznych należy zachować warunki sterylne. Wodę pobiera się do jałowych pojemników np. szklanych butelek z doszlifowanym korkiem. Próbkę należy dokładnie opisać (miejsce pobrania, data).

Próbki wód powierzchniowych płynących należy pobierać, o ile to możliwe, z nurtu, pod prąd, z głębokości 10-15 cm. Podobnie należy postępować w przypadku wód stojących, z tą różnicą, że zamiast z nurtu próbkę należy pobrać w miejscu, gdzie zbiornik jest najgłębszy.

Próbki ścieków należy pobrać bezpośrednio do butelek z kanału doprowadzającego ścieki do oczyszczalni oraz z kanału odprowadzającego ścieki oczyszczone.

Przed pobraniem próbki wody wodociągowej (ewentualnie wód głębinowych) należy odpowiednio przygotować wylot kurka. Najpierw należy go dokładnie umyć środkiem czyszczącym, a następnie opalić przy pomocy płonącego tamponu z waty nasączonej alkoholem. Po opaleniu otworzyć kran i spuszczać wodę dość silnym strumieniem przez kilka minut.

5. Transport próbek

Próbki należy dostarczyć do laboratorium możliwie najszybciej a ich analizy powinny się rozpocząć w ciągu 2 godzin od pobrania. Jeżeli nie jest to możliwe, w trakcie transportu próbki należy umieścić w termosach z lodem lub przetrzymać w lodówce, aż do momentu rozpoczęcia analiz. Czas ten nie powinien wynosić jednak więcej niż 12 h.

6. Oznaczanie ogólnej liczby bakterii psychrofilnych i mezofilnych

MATERIAŁY: kilka-kilkanaście sterylnych szalek Petriego, pipeta automatyczna, pisak do szkła, jałowa sól fizjologiczna, agar odżywczy, badana woda (powierzchniowa, wodociągowa, studniowa, pochodząca z pływalni)

1. W zależności od spodziewanej ilości mikroorganizmów w badanym materiale zastosować należy surową próbkę wody lub przygotować kolejne dziesięciokrotne rozcieńczenia badanej wody w soli fizjologicznej.
2. Próbkę wody posiać na agar odżywczy metodą posiewu powierzchniowego lub wgłębnego. Dla każdego rozcieńczenia zastosować przynajmniej 2 powtórzenia (lub ich wielokrotność) w celu oznaczenia osobno liczebności bakterii psychrofilnych i mezofilnych.
3. Próbkę przeznaczoną do oznaczenia liczebności bakterii psychrofilnych inkubować w temperaturze 22 °C przez 68 h, zaś próbki przeznaczone do oznaczenia liczebności bakterii mezofilnych inkubować w 36 °C przez 24 h.
4. Po okresie inkubacji policzyć wyrosłe kolonie i wyliczyć uśrednioną liczbę bakterii obydwu grup, uwzględniając zastosowane rozcieńczenia.

7. Oznaczanie miana *coli* i NPL metodą fermentacyjną próbówkową

7.1. Wybór metody posiewu

Przed przystąpieniem do badań należy wybrać system posiewu próbki na podłoża. Uzależnione jest to od pochodzenia próbki i spodziewanego stopnia zanieczyszczenia. Częściowo regulują to

odpowiednie rozporządzenia dotyczące norm, jakie powinny spełniać wody przeznaczone do picia. W innych przypadkach należy kierować się doświadczeniem i zdrowym rozsądkiem. W przypadku bardzo zanieczyszczonych próbek (np. ścieków) wymagających posiewania mikroskopijnych objętości, można, a czasem wręcz należy, próbki takie rozcieńczyć za pomocą sterylnej soli fizjologicznej. Można również zastosować system posiewów pomniejszony, ewentualnie powiększony (w przypadku bardzo czystych wód) 10-krotnie.

7.2. Zasada metody

Metoda fermentacyjna probówkowa opiera się na wykrywaniu bakterii grupy *coli* z wykorzystaniem ich zdolności do fermentacji laktozy z wytworzeniem kwasu i gazu widocznego w stosowanym podłożu płynnym. Metoda obejmuje 3 etapy: (1) **badania wstępne** z zastosowaniem pożywki Eijkmana, (2) **badania potwierdzające** z zastosowaniem pożywki Endo oraz (3) **badania uzupełniające** składające się z kilku analiz.

7.3. Przebieg badania

7.3.1. Badania wstępne

MATERIAŁY: kilka-kilkanaście probówek, kilka-kilkanaście probówek Durhama, pipeta automatyczna, pisak do szkła, podłoże Eijkmana, badana woda lub ścieki

1. Po wyborze systemu posiewu próbki, należy obliczyć potrzebną ilość podłoża Eijkmana (po około 10 ml na każdą probówkę) i przygotować według przepisu na opakowaniu.
2. Przygotować odpowiednią ilość probówek szklanych i umieścić w każdej z nich probówkę Durhama (jest to miniaturowa probówka służąca do zbierania gazu, który będzie się uwalniał w pożywce w wyniku fermentacji laktozy) dnem do góry.
3. Do probówek rozlać gotowe podłoże Eijkmana (po około 10 ml) i wysterylizować tak przygotowane probówki wraz z podłożem.
4. Po sterylizacji i ostygnięciu probówek posiać jałowo odpowiednie objętości badanej próbki wody (według wybranego systemu posiewu).
5. Zabezpieczone probówki wstawić do cieplarki ustawionej na 37 °C. Wyniki należy odczytać po 24 i 48 h.

Podłoże Eijkmana jest podłożem płynnym, różnicującym, zawierającym laktozę i barwny składnik identyfikujący wrażliwy na zmiany pH. Świeżo przygotowane podłoże ma kolor fioletowy. Jeżeli w podłożu tym znajdują się bakterie fermentujące laktozę, to w wyniku ich metabolizmu wytworzy się kwas i gaz. Kwas powoduje obniżenie pH podłoża i w efekcie zmianę jego barwy z fioletowej na żółtą. Z kolei gaz gromadzony jest w probówkach Durhama i widoczny w postaci pęcherzyków.

Za wynik **dodatni (+)** uznaje się te probówki, w których nastąpiła wyraźna zmiana barwy z fioletowej na żółtą, obecny jest gaz w probówce Durhama, a podłoże zmętniało w wyniku namnożenia mikroorganizmów. Nieznaczna zmiana barwy i/lub brak gazu należy uznać za wynik **wątpliwy (+/-)**. Brak zmiany barwy podłoża i brak gazu to wynik **ujemny (-)**. Należy pamiętać, że podłoże Eijkmana jest podłożem różnicującym, ale nie wybiórczym, zatem mogą się na nim rozwinąć mikroorganizmy nie należące do grupy *coli*. Podłoże będzie wtedy mętne, ale pozostanie fioletowe a w probówce Durhama nie stwierdzimy obecności gazu. Wynik ujemny jest wynikiem ostatecznym i probówki rozpoznane jako (-) nie wymagają dalszych badań. Dalszych badań natomiast wymagają probówki z wynikami wątpliwymi (z powodów oczywistych) oraz dodatnimi. W przypadku wyników dodatnich chodzi o wykluczenie fałszywych wyników dodatnich. Fermentacja laktozy z wytworzeniem kwasu i gazu może być bowiem wynikiem działalności bakterii nie należących do grupy *coli* a mianowicie Gram-dodatnich, przetrwalnikujących laseczek z rodzaju *Bacillus* lub Gram-ujemnych, nieprzetrwalnikujących pałeczek z rodzaju *Aeromonas* albo synergizmu bakteryjnego. Wyniki dodatnie i wątpliwe poddaje się badaniom potwierdzającym.

7.3.2. Badania potwierdzające

MATERIAŁY: kilka sterylnych szalek Petriego, eza, pisak do szkła, agar Endo, hodowle na podłożu Eijkmana uzyskane na etapie badań wstępnych

1. Przygotować odpowiednią ilość podłoża Endo według przepisu i rozlać jałowo do szalek Petriego (ich ilość zależy od ilości wyników dodatnich i wątpliwych uzyskanych na etapie badań wstępnych).
2. Z próbek zawierających hodowle na podłożu Eijkmana z dodatnimi i wątpliwymi wynikami, wykonać posiewy jałową ezą na podłoża Endo. Przed pobraniem materiału należy lekko wstrząsnąć probówką a ezy nie zanurzać zbyt głęboko (chodzi o to, aby nie pobrać zbyt dużo materiału bakteryjnego; posiew bowiem powinien być wykonany tak, aby uzyskać pojedyncze kolonie).
3. Posiewy inkubować w temperaturze 37 °C przez 24 h.

Agar Endo jest podłożem stałym, różnicująco-wybiórczym, zawierającym w składzie laktozę. Za wynik **dodatni (+)** przyjmuje się obecność gładkich, ciemnoczerwonych kolonii o metalicznym, zielonkawym połysku (wystarczy obecność choćby jednej takiej kolonii). Niektóre bakterie grupy *coli* mogą rosnąć na agarze Endo w sposób nietypowy, w postaci kolonii gładkich, jasno- lub ciemnoczerwonych z ciemniejszym środkiem, bez charakterystycznego metalicznego połysku. Obecność takich kolonii należy uznać za wynik **wątpliwym (+/-)** i wykonać dalsze badania uzupełniające. Kolonie o innym zabarwieniu lub brak wzrostu bakterii przyjmuje się za wynik **ujemny (-)**.

7.3.3. Badania uzupełniające

Badania uzupełniające obejmują 3 rodzaje analiz: (1) ponowne stwierdzenie zdolności wyizolowanego szczepu do fermentowania laktozy na pożywce płynnej ze wskaźnikiem Andrade, (2) wykonanie barwienia metodą Grama, (3) wykonanie testu na obecność oksydazy cytochromowej. W zasadzie wszystkie wymienione badania powinny być wykonane jednocześnie, jednakże w przypadku dość jasnych wyników, czasem pomija się jedno z nich. Aby na tym etapie uznać próbkę za dodatnią, wyniki WSZYSTKICH testów uzupełniających muszą być dodatnie. Jeżeli tak nie jest, wynik uznaje się za ujemny.

MATERIAŁY: kilka próbek, kilka próbek Durhama, kilka sterylnych szalek Petriego, szkiełko podstawowe, eza, agar odżywczy, podłoże laktozowe ze wskaźnikiem Andrade, odczynnik do wykrywania obecności oksydazy cytochromowej, fiolet krystaliczny, płyn Lugola, 96 % etanol, safranina, hodowle uzyskane na etapie badań potwierdzających

Badanie wtórnej fermentacji laktozy:

1. Przygotować odpowiednią ilość próbek (ilość ta zależy od ilości nietypowych kolonii uzyskanych na etapie badań potwierdzających) zawierających próbki Durhama oraz podłoże laktozowe ze wskaźnikiem Andrade (przygotować według przepisu na opakowaniu po około 10 ml na każdą probówkę).
2. Każdą pojedynczą, nietypową kolonię z podłoża Endo posiać jałową ezą na przygotowane podłoże i inkubować w temperaturze 37 °C.
3. Wyniki odczytać po 24 i 48 h. Zmętnienie pożywki, jej zakwaszenie (świeżo przygotowane podłoże jest różowe, po sterylizacji przyjmuje barwę łososiową a w wyniku zakwaszenia jego kolor zmienia się na fuksjowy (ciemno różowy)) i obecność gazu, przyjmuje się za wynik **dodatni (+)**. Brak tych zmian to wynik **ujemny (-)**.

Barwienie metodą Grama:

UWAGA! Przed wykonaniem barwienia Grama pojedyncze nietypowe kolonie z agaru Endo należy posiać jałową ezą na agar zwykły (np. na skosy agarowe lub na szalki) i poczekać aż bakterie wyrosną (24 h, 37 °C).

1. Wykonać barwienie metodą Grama i obserwować wyniki pod mikroskopem.
2. Bakterie grupy *coli* to Gram-ujemne pałeczki, w związku z czym zabarwią się na różowo – wynik **dodatni (+)**. Brak takich bakterii w preparacie należy uznać za wynik **ujemny (-)**.

Test na obecność oksydazy cytochromowej:

1. Test ten wykonuje się na tych samych koloniach, które namnożono na agarze zwykłym na potrzeby barwienia Grama.
2. Kroplę świeżo przygotowanego odczynnika do wykrywania obecności oksydazy cytochromowej (1 % wodny roztwór chlorowodoru p-aminodwumetyloaniliny + 0,1 % alkoholowy roztwór α -naftolu albo 1 % wodny roztwór di- lub tetrametylo-p-fenylenodiaminy) nanieść na testowane kolonie.
3. Pojawienie się intensywnie niebieskiego zabarwienia (wynik **dodatni (+)**) w ciągu 30-60 sekund potwierdza obecność oksydazy cytochromowej a tym samym wyklucza bakterie grupy *coli*. Słabe zabarwienie i/lub pojawiające się po dłuższym czasie to wynik **ujemny (-)** świadczący o braku oksydazy cytochromowej u badanych bakterii i potwierdzający ich przynależność do grupy *coli*.
4. Badając obecność oksydazy cytochromowej u testowanych bakterii dobrze jest jednocześnie analogiczny test przeprowadzić na hodowli bakterii o potwierdzonej przynależności do grupy *coli*, aby móc porównać uzyskany rezultat. Ułatwi to jednoznaczne zakwalifikowanie wyniku jako (+) lub (-).

Wyniki wszystkich etapów badań należy zebrać w tabeli i ustalić na ich podstawie ostateczny wynik (+ lub -) dla każdej z posianych objętości danej próbki wody. Następnie na podstawie ilości uzyskanych wyników dodatnich i ujemnych w poszczególnych objętościach próbki, odczytać NPL i miano *coli* z odpowiednich tabel.

ROZDZIAŁ PIĄTY: BADANIA MIKROBIOLOGICZNE POWIETRZA

1. Mikroflora powietrza

Powietrze stanowi mieszaninę różnych gazów, spośród których największy udział ma azot (78 %) oraz tlen (21 %). Oprócz tego w skład powietrza wchodzi argon (0,034 %), dwutlenek węgla (0,03 %), neon, hel, krypton, ksenon, wodór, metan, tlenek azotu oraz zmienne ilości pary wodnej (H₂O). Powierzchnia kuli ziemskiej jest też źródłem wielu innych gazów, par, pyłów organicznych i nieorganicznych, drobnych organizmów i innych ciał obcych, które tworzą razem zanieczyszczenie powietrza.

Mikroflora powietrza jest bardzo zróżnicowana a jej skład zależy od źródeł zanieczyszczenia, warunków meteorologicznych oraz terenowych. Mikroorganizmy znajdujące się w powietrzu nie namnażają się ze względu na brak odpowiednich warunków (brak substancji odżywczych, niedostatek wilgoci oraz nadmierne promieniowanie słoneczne) a jedynie mogą w nim być zawieszone i wraz z nim się przemieszczać. Między mikroorganizmami znajdującymi się w powietrzu nie wytwarzają się także żadne związki metaboliczne. Możemy zatem mówić jedynie o ich przeżywalności, o której decydują przede wszystkim warunki meteorologiczne (wilgotność, promieniowanie słoneczne, temperatura, ruch powietrza, wyładowania atmosferyczne), wielkość cząstek przenoszących mikroorganizmy, rodzaj mikroorganizmów oraz ich wrażliwość na warunki środowiska. Różne cząsteczki stałe, w tym bakterie, wirusy i zarodniki grzybów występujące w powietrzu odgrywają rolę w tworzeniu się tzw. jąder kondensacji pary wodnej i powstawania opadów deszczu, gradu i śniegu. Dzięki temu zjawisku powietrze atmosferyczne jest stosunkowo szybko oczyszczane z zanieczyszczeń, w tym także mikrobiologicznych.

2. Mikroorganizmy wskaźnikowe w badaniach powietrza

Wykrywanie bakterii chorobotwórczych w powietrzu jest trudne i żmudne, dlatego (podobnie jak np. w przypadku wód) wykorzystuje się tzw. mikroorganizmy wskaźnikowe, które mogą wskazywać na potencjalną obecność bakterii chorobotwórczych. Sanitarnymi wskaźnikami zanieczyszczenia powietrza są: (1) **gronkowce hemolizujące**, (2) **gronkowce manniotolujemne oraz manniotolo-dodatnie**, (3) **promieniowce**, (4) **pałeczki *Pseudomonas fluorescens***.

3. Badanie czystości powietrza metodą sedymentacyjną Kocha

MATERIAŁY: kilka-kilkanaście sterylnych szalek Petriego, pisak do szkła, agar odżywczy, agar z krwią, agar Chapmana, podłoże Pochona, podłoże Kinga B, agar brzezczkowy lub pożywka Sabourauda

1. Przygotować po kilka szalek z agarem odżywczym, agarem z krwią, agarem Chapmana, podłożem Pochona, podłożem Kinga oraz pożywką dla grzybów (agarem brzezczkowym lub pożywką Sabourauda).
2. Ustawić szalki w wybranych miejscach w badanym pomieszczeniu i otworzyć jednocześnie na 20 minut lub inny określony czas.
3. Po upływie zadanego czasu zamknąć szalki i wstawić do ciepłarki: agar zwykły i agar z krwią na 37 °C (24-48 h); podłoże Chapmana – połowa na 10 °C, połowa na 37 °C (24-

- 48 h); podłoże Pochona i Kinga na 26 °C (24-48 h); pożywki dla grzybów na 26 °C (6 dni).
4. Po okresie inkubacji policzyć kolonie wyrosłe na szalkach i obliczyć ilość odpowiednich mikroorganizmów w 1 m³ powietrza korzystając ze wzoru opisującego metodę Kocha. Na agarze zwykłym liczymy ogólną ilość mikroorganizmów w powietrzu a na podłożu dla grzybów – ilość ich zarodników. Podłoże z krwią służy do liczenia bakterii hemolizujących typu α i β a podłoże Chapmana do liczenia gronkowców mannitolo-dodatnich i mannitolo-ujemnych. Na podłożu Pochona liczymy ilość promieniowców, zaś na podłożu Kinga B – liczebność pałeczek *Pseudomonas fluorescens*.
 5. Otrzymane wyniki odnieść do wartości normatywnych i zinterpretować.

ROZDZIAŁ SZÓSTY: BADANIA MIKROBIOLOGICZNE GLEB

1. Gleba jako środowiska życia mikroorganizmów

Gleba to zewnętrzna warstwa skorupy ziemskiej tworząca się w procesach wietrzenia fizycznego i chemicznego skał macierzystych, w wyniku działania czynników naturalnych, takich jak zmiany temperatury, działanie wody, powietrza, roślinności oraz człowieka. Gleba uczestniczy w produkcji pierwotnej biomasy, umożliwia także zakotwiczenie roślinom dostarczając im jednocześnie wody oraz związków mineralnych. Dzięki procesom rozkładu materii organicznej oraz zasobności w próchnicę, gleba jest doskonałym, i w związku z tym bardzo bogatym, środowiskiem życia zarówno mikro- jak i makroorganizmów. Gleba pełni również w przyrodzie rolę filtrującą i buforującą, chroniąc częściowo inne komponenty środowiska przed nadmierną dostawą substancji naturalnych, czy też przed skażeniem substancjami toksycznymi. Gleba składa się z pięciu zasadniczych frakcji i są to: (1) związki mineralne w stanie stałym, (2) substancja organiczna, (3) powietrze glebowe, (4) roztwór glebowy oraz (5) organizmy żywe. Procentowy udział poszczególnych frakcji w składzie gleby waha się w szerokich granicach i zależy od typu gleby, pory roku, klimatu oraz innych czynników.

2. Ocena stanu sanitarnego gleby

Bakteriologiczna ocena stanu sanitarnego gleby może obejmować różne rodzaje badań w zależności od celów, jakim ma służyć. Dla określenia przebiegu procesów samooczyszczania gleby stosuje się takie oznaczenia jak:

1. ogólna liczba bakterii;
2. miano bakterii grupy *coli* typu kałowego (gdzie miano to **najmniejsza ilość gleby – w gramach – w której występują bakterie danej grupy**);
3. miano bakterii przetrwalnikujących redukujących siarczany(IV) (siarczyny) (*Clostridium perfringens*);
4. stosunek liczby przetrwalników do ogólnej liczby bakterii saprofitycznych.

3. Pobieranie próbek gleby do badań bakteriologicznych

Próbki gleby pobiera się po zdjęciu wierzchniej warstwy gleby, z głębokości 20-30 cm. Próbką powinna być pobrana z poletka o powierzchni 25-100 m² metodą kopertową (wyznacza się kwadrat o boku 5-10 m, pobiera próbki z 4 rogów oraz ze środka kwadratu, otrzymując w ten sposób 5 próbek, z których każda powinna mieć około 100 g). Próbki gleby pobiera łaską Egnera a w uproszczonych przypadkach, jałową metalową łopatką. Próbki gleby umieszcza się w sterylnych naczyniach (najczęściej słoikach) lub w jałowych woreczkach plastikowych. Badanie bakteriologiczne powinno być wykonane w dniu pobrania próbki. W przeciwnym razie próbkę gleby należy przechowywać w lodówce, jednak nie dłużej niż dwa dni.

4. Przygotowanie próbek gleby do badań

MATERIAŁY: sterylna kolba stożkowa o pojemności 500 ml lub większa z dopasowanym korkiem z waty, 4-6 sterylnych probówek, głaszczka, perełki szklane, sterylne sito o średnicy oczek 2-3 mm, jałowa metalowa łopatką, pipeta automatyczna, pisak do szkła, sól fizjologiczna lub 0,28 % roztwór pirofosforanu sodowego, sterylny bulion odżywczy, gleba

Próbki gleby pobrane z jednego punktu metodą kopertową należy wymieszać razem i uśrednić. Z uśrednionej próbki gleby należy usunąć kamyczki, żwir, szkło itp. a następnie rozdrobnić jałową metalową łopatką, przesiać przez jałowe sito o średnicy oczek 2-3 mm i dokładnie wymieszać. W sterylnej kolbie o pojemności 500 ml odważyć 30 g próbki, po czym wlać 270 ml jałowej wody z dodatkiem 0,28 % pirofosforanu sodowego (w celu ułatwienia desorpcji mikroorganizmów z cząstek gruntu) lub 270 ml soli fizjologicznej. Można dorzucić sterylne perełki szklane ułatwiające późniejsze wytrząsanie. Uzyskaną mieszaninę będącą rozcieńczeniem próbki w stosunku 1:10, wytrząsać przez 20 minut na wytrząsarce lub ręcznie, po czym pozostawić na kilka minut w celu sedymentacji. Następnie w jałowych probówkach przygotować kolejne rozcieńczenia. Rozcieńczać należy sterylną solą fizjologiczną. Oprócz tego należy posiać 0,5 ml roztworu glebowego na sterylny bulion odżywczy i wstawić na kilka dni do ciepłarki ustawionej na 30 °C, w celu namnożenia mikroorganizmów występujących w danej próbce gleby (do dalszych badań).

5. Oznaczanie liczby bakterii mezofilnych i termofilnych metodą płytkową

MATERIAŁY: kilka sterylnych szalek Petriego, pipeta automatyczna, pisak do szkła, agar odżywczy (+ materiały z punktu 4.)

1. Przygotować odpowiednie rozcieńczenia próbek gleby.
2. Przygotować po dwie sterylne szalki dla każdego wytypowanego rozcieńczenia (jedna dla bakterii termofilnych, jedna dla bakterii mezofilnych) i opisać a następnie do każdej wylać po 1 ml danego rozcieńczonego roztworu glebowego.
3. Upłynnionym i ostudzonym do około 50 °C agarem odżywczym zalać szalki do około połowy jej wysokości i zamieszać delikatnym okrężnym ruchem nie odrywając szalki od powierzchni stołu. Pozostawić do zastygnięcia w temperaturze pokojowej.
4. Płytki inkubować w temperaturze 30 °C przez 48 godzin (bakterie mezofilne) i w temperaturze 60 °C (bakterie termofilne).
5. Policzyć liczbę wyrosłych kolonii i na jej podstawie wyliczyć odpowiednio liczbę bakterii mezo- i termofilnych w 1 g gleby. Należy uwzględnić stopień rozcieńczenia próbki.

6. Oznaczanie bakterii z rodzaju *Salmonella*

Oznaczanie bakterii z rodzaju *Salmonella* odbywa się w 3 etapach. W pierwszym etapie stosuje się podłoża namnażające: pożywkę Kauffmanna (K) i pożywkę z wodoroselenianem sodu (SF). W drugim etapie badań wykorzystuje się pożywki wybiórczo-różnicujące: podłoże SS i podłoże Sołtysa. W trzecim etapie wykorzystuje się zestaw do szybkiej identyfikacji biochemicznej rodziny *Enterobacteriaceae* oraz zestaw lateksowy do szybkiej identyfikacji serologicznej bakterii z rodzaju *Salmonella*. Wynik badania podaje się jako stwierdzenie bądź niestwierdzenie obecności tych bakterii w badanej próbce gleby. W przypadku wykrycia bakterii *Salmonella sp.* zaleca się następnie wykonanie oznaczenia miana *coli*, miana *perfringens* oraz wykonanie badań w celu wykrycia jaj *Ascaris lumbricoides* (glisty ludzkiej) i *Trichuris trichura* (włosogłówki).

MATERIAŁY: 2 kolby stożkowe o pojemności 300 ml, kilka sterylnych szalek Petriego, eza, pisak do szkła, podłoże K, podłoże SE, podłoże SS, podłoże Sołtysa, podłoże McConkeya lub agar odżywczy, zestaw do szybkiej identyfikacji biochemicznej rodziny *Enterobacteriaceae*, zestaw lateksowy do szybkiej identyfikacji serologicznej bakterii z rodzaju *Salmonella* (+ materiały z punkt 4.)

1. Przygotować próbkę gleby poprzez jej uśrednienie i przesianie przez jałowe sito.
2. Do 2 jałowych kolb o pojemności 300 ml odważyć po 10 g gleby.
3. Do pierwszej z nich wprowadzić jałowo 90 ml podłoża K, do drugiej – 90 ml podłoża SF.
4. Hodowle inkubować w 43 °C przez 18 h (podłoże SF) i przez 24 h (podłoże K).
5. Hodowlę uzyskaną na podłożu K posiać za pomocą ezy na podłoże Sołtysa, zaś mikroorganizmy uzyskane na podłożu SF przeszczepić na agar SS.

6. Inkubować w 37 °C przez 24 h.
7. Wynik dodatni na podłożu Sołtysa to kolonie o barwie kremowej do jasnozielonej.
8. Na podłożu SS kolonie bakterii z rodzaju *Salmonella* mogą wyglądać dwójako. Szczepy nie wytwarzające siarkowodoru będą przezroczyste, zaś szczepy produkujące siarkowodór będą bezbarwne z czarnym środkiem.
9. Pojedyncze kolonie uzyskane na podłożu SS i podłożu Sołtysa należy poddać identyfikacji biochemicznej i serologicznej, według instrukcji producenta zestawów do jej przeprowadzania.

ROZDZIAŁ SIÓDMY: METABOLIZM MIKROORGANIZMÓW

Środowisko przyrodnicze to skomplikowany układ wzajemnych zależności pomiędzy elementami abiotycznymi (nieożywionymi) oraz biotycznymi (ożywionymi). Wzajemne interakcje wszystkich elementów biocenoz ziemskich umożliwiają zamknięty obieg pierwiastków. Z ekologicznego punktu widzenia organizmy żywe stanowiące biotyczną część środowiska dzielimy na: producentów, konsumentów i reducentów. **Producenci** to organizmy samożywne (autotroficzne), które wytwarzają materię organiczną ze związków mineralnych (niektóre bakterie, glony, rośliny). **Konsumenci** odżywiają się gotową materią organiczną (pierwotniaki, zwierzęta). **Reducenci**, zwani też saprofitami, odżywiają się martwą materią organiczną lub inaczej, rozkładają materiał pochodzenia organicznego (np. szczątki roślin, czy zwierząt) (niektóre bakterie i grzyby).

W środowiskach naturalnych występuje wiele gatunków mikroorganizmów uczestniczących bezpośrednio w przemianach różnych substratów i przyczyniających się tym samym do obiegu pierwiastków w przyrodzie. Często bywa tak, że podobne reakcje na danym substracie przeprowadzane są przez liczne gatunki niekoniecznie blisko ze sobą spokrewnione. Ich podobieństwo opiera się na typie prowadzonej reakcji biochemicznej. Takie mikroorganizmy łączy się w tzw. grupy fizjologiczne. Przykładem takiej grupy są np. bakterie proteolityczne, amonifikacyjne, mocznikowe, nityfikacyjne, denityfikacyjne, czy bakterie wiążące wolny azot.

Wiele bakterii wodnych i glebowych potrafi wykorzystywać nieorganiczne związki lub jony (amon, azotan(III), siarczan(IV), tiosiarczan, siarczek, żelazo, siarkę elementarną, wodór, tlenek węgla) jako donory elektronów lub wodoru, zyskując w wyniku ich utleniania energię i równoważniki redukujące do procesów syntezy. Energia uzyskiwana jest zazwyczaj w wyniku oddychania z tlenem, jako ostatecznym akceptorem elektronów. Jedynie kilka wyspecjalizowanych bakterii z tej grupy rośnie wykorzystując zamiast tlenu azotan(V), azotan(III) lub N_2O jako akceptor w oddychaniu beztlenowym. Ten typ życia, w którym związki nieorganiczne wykorzystywane są jako donory wodoru, nosi nazwę **chemolitoautotrofii** co szczegółowo opisano w rozdziale drugim. Większość bakterii należących do tej grupy metabolicznej wykorzystuje do syntez komórkowych dwutlenek węgla jako jedyne lub główne źródło węgla. Są zatem również autotrofami (chemolitoautotrofami). Niektóre mikroorganizmy tej grupy są obligatoryjnie chemolitoautotroficzne, inne mogą wykorzystywać także związki organiczne stając się chemoorganoautotrofami. Są zatem fakultatywnymi chemolitoautotrofami.

1. Zdolności metaboliczne mikroorganizmów w praktyce

Zdolności biochemiczne drobnoustrojów uzależnione są od obecności w ich komórkach specyficznych enzymów. Zdolność mikroorganizmów do metabolizmu, w szczególności do rozkładu pewnych substancji, wykorzystuje się często w celu identyfikacji danego gatunku (np. zdolność bakterii z grupy *coli* do kwaśnej fermentacji laktozy wykorzystuje się przy badaniu miana *coli* w wodach i glebach). Związki powstające w wyniku metabolizmu to metabolity. Ich obecność w środowisku lub pożywce hodowlanej wykrywa się za pomocą specyficznych indykatorów lub odczynników. Badania biochemiczne mają szczególne znaczenie w przypadku rozróżniania poszczególnych gatunków o bardzo podobnej morfologii. Ponownie można tu przywołać przykład bakterii z grupy *coli*, które należą do rodziny *Enterobacteriaceae*. Do rodziny tej należą np. takie rodzaje jak *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella* i inne. Wszystkie są Gram-ujemnymi pałeczkami i można je rozróżnić tylko na podstawie zdolności metabolicznych.

Jedną z lepiej znanych mikrobiologii rodzin mikroorganizmów jest rodzina *Enterobacteriaceae*, do której należy m.in. *Escherichia coli*. Na potrzeby badań i rozróżniania bakterii należących do tej właśnie rodziny powstało wiele testów biochemicznych i metabolicznych stosowanych w

mikrobiologii. Najczęściej stosowane próby biochemiczne służące identyfikacji poszczególnych gatunków z rodziny *Enterobacteriaceae* i nie tylko, badają właściwości:

1. fermentacyjne (wytwarzanie kwasu i/lub gazu),
2. proteolityczne,
3. produkowania enzymu katalazy,
4. wytwarzania indolu,
5. wytwarzania acetoiny,
6. wytwarzania siarkowodoru,
7. rozkładu mocznika (wytwarzania amoniaku),
8. redukcji azotanów,
9. redukcji błękitu metylenowego,
10. hemolityczne (rozpuszczania czerwonych krwinek).

Przy badaniu mikroflory wód i gleb stosuje się z kolei często następujące testy:

1. oznaczanie zdolności sacharolitycznych,
2. oznaczanie zdolności amylolitycznych,
3. oznaczanie zdolności celulozylitycznych,
4. oznaczanie zdolności pektynolitycznych,
5. oznaczanie zdolności lipolitycznych,
6. oznaczanie zdolności rozkładu węglowodorów i produktów ropopochodnych,
7. oznaczanie zdolności rozkładu fenolu i jego pochodnych.

Mikroorganizmy często są wykorzystywane do pozyskiwania enzymów, które znacznie ułatwiły bądź przyspieszyły pewne procesy wykorzystywane przez człowieka na skalę masową. Np. w procesie fermentacji alkoholowej do rozpadu skrobi używa się amylaz pochodzących od grzybów. Izomeraza glukozowa używana jest do przekształcenia glukozy we fruktozę, która jest słodsza i jest powszechnie stosowana w produktach dla diabetyków. Te i wiele innych enzymów uzyskuje się najczęściej ze szczepów *Bacillus sp.*, *Clostridium sp.*, promieniowców i bakterii mlekowych. Proteazy i lipazy uzyskiwane od mikroorganizmów dodaje się do proszków do prania. Celulazy produkowane przez drobnoustroje wykorzystywane są do przekształcania celulozy z drewna i słomy w cukry, które następnie wykorzystuje się do produkcji alkoholi. Enzymy te to głównie egzoenzymy, czyli takie, które wydzielane są przez drobnoustroje do środowiska zewnętrznego (pożywki), skąd można je wyizolować. Izoluje się także pewne enzymy z wnętrza komórek, np. endonukleazy, które wykorzystywane są w klonowaniu i technologiach genowych.

2. Próby metaboliczne

2.1. Próby fermentacyjne

Próby fermentacyjne pozwalają stwierdzić, czy badany drobnoustrój ma zdolność utleniania cukrów (węglowodanów), jakich cukrów i czy przy ich rozkładzie powstaje tylko kwas, czy kwas i gazy. Pod tym względem rozróżniamy mikroorganizmy kwasotwórcze i gazotwórcze oraz zarówno kwaso- jak i gazotwórcze. Substancjami służącymi do prób fermentacyjnych są cukry proste i złożone oraz ich pochodne. Próby takie najczęściej stosuje do identyfikacji bakterii należących do rodziny *Enterobacteriaceae*, czyli bakterii jelitowych. W przypadku identyfikacji pałeczek jelitowych stosuje się:

- arabinozę, ksylozę, ramnozę (pentozy: $C_5H_{10}O_5$);
- glukozę (heksosa: $C_6H_{12}O_6$);
- sacharozę, laktozę, maltozę (dwucukry: $C_{12}H_{22}O_{11}$);
- rafinozę (trójcukier: $C_{18}H_{32}O_{16}$);
- skrobię, inulinę, celulozę, glikogen (wielocukry: $(C_6H_{12}O_5)_n$);
- eskulinę, amygdalinę (glikozydy: pochodne cukrów);
- mannitol, dulcytol, sorbitol (alkohole wyższe: pochodne cukrów).

W celu stwierdzenia aktywności enzymatycznej badanego drobnoustroju w stosunku do substancji cukrowej posiewa się go z hodowli agarowej do hodowli płynnej zawierającej tą

substancję, zwykle w ilości nie większej niż 1 %. W próbkach z pożywkami płynnymi umieszcza się dodatkowo próbkę Durhama (jak np. w przypadku badania miana *coli* w wodach metodą fermentacyjną próbkową). Pożywki płynne zawierają dodatkowo indykator, najczęściej w postaci barwnika zmieniającego barwę w obecności produktu metabolizmu danego mikroorganizmu. Rozkład cukrów może odbywać się zarówno w warunkach tlenowych, jak i beztlenowych a zatem przy udziale tlenowców jak i beztlenowców. Wśród tlenowców wyróżnić możemy takie gatunki, które są zdolne do całkowitego utlenienia substratu cukrowego do CO₂ i H₂O, jak i takie, które są zdolne tylko do częściowego rozkładu danego substratu. W tym wypadku powstają metabolity w postaci prostszych związków organicznych, w których nadal zmagazynowana jest pewna część energii. Produktami ubocznymi są gazy.

Aktywność fermentacyjną drobnoustrojów wobec cukrów można badać np. przy pomocy wody peptonowej. Indykatorem może być np. **błękit bromotymolowy** lub inny barwnik wrażliwy na zmiany pH. Sterylną wodę peptonową zaszczepia się badanymi drobnoustrojami z hodowli agarowej i inkubuje w temperaturze 37 °C. Wynik, w zależności od badanego cukru, odczytuje się po 1-14 dniach a niekiedy nawet później. Wyjściowa barwa błękitu bromotymolowego jest zielona (w pH obojętnym) a po zakwaszeniu środowiska kolor zmienia się na żółty. Niekiedy może nastąpić alkalizacja środowiska objawiająca się zmianą koloru na niebieski. Fermentacja i związane z nią zakwaszenie pożywki, może mieć różną intensywność, co można odpowiednio zaznaczyć opisując wyniki (np. +, ++, +++).

2.1.1. Fermentacja w warunkach tlenowych

MATERIAŁY: kilka sterylnych probówek, kilka sterylnych probówek Durhama, eza, pipeta automatyczna, pisak do szkła, badane bakterie w hodowli płynnej lub agarowej, dowolne podłoże fermentacyjne ze wskaźnikiem

1. Zachowując warunki sterylne przygotować w probówkach (po jednej dla każdej badanej hodowli) zawierających próbki Durhama odwrócone dnem do góry, wybrane podłoże fermentacyjne według przepisu.
2. Zaszczepić podłoża badanymi bakteriami za pomocą ezy lub pipety automatycznej.
3. Opisać odpowiednio i inkubować przez kilka-kilkanaście dni w temperaturze 37 °C.
4. Po okresie inkubacji stwierdzić obecność i intensywność fermentacji.

2.1.2. Fermentacja masłowa w warunkach beztlenowych

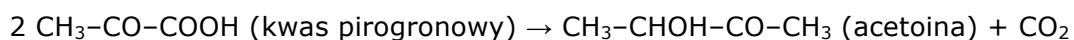
Fermentację masłową przeprowadzają głównie beztlenowe, przetrwalnikujące laseczki z rodzaju *Clostridium*, np. bakterie glebowe *Clostridium pasteurianum*. W wyniku fermentacji masłowej powstaje kwas masłowy (C₃H₇COOH), CO₂ i H₂.

MATERIAŁY: sterylna probówka, eza lub pęseta, pisak do szkła, gleba albo badane bakterie w hodowli płynnej lub agarowej, 2 % sterylny roztwór sacharozy

1. Probówkę z 2 % sterylnym roztworem sacharozy zaszczepić grudką ziemi (za pomocą sterylnej pęsety) lub badanymi bakteriami z hodowli (za pomocą ezy).
2. Zawartość probówki ogrzewać przez 10 minut w łaźni wodnej w temperaturze 75-80 °C (spowoduje to zabicie nieprzetrwalnikujących form bakterii oraz usunięcie tlenu z pożywki).
3. Probówkę szybko schłodzić (np. pod strumieniem zimnej wody), zatkać korkiem i uszczelnić folią lub parafilmem.
4. Inkubować przez 7 dni w temperaturze pokojowej.
5. Po inkubacji sprawdzić obecność kwasu mlekowego, który powoduje powstanie charakterystycznego zapachu zjełczałego masła.

2.2. Próba na wytwarzanie acetoiny

Acetoina (acetylometylokarbinol) jest obojętnym produktem utleniania glukozy. Najpierw glukoza zostaje utleniona do kwasu pirogronowego ($\text{CH}_3\text{-CO-COOH}$) a następnie kwas ten ulega przemianie do acetoiny według reakcji:



Próbie na wytwarzanie acetoiny stosuje się w celu odróżnienia Gram-ujemnych pałeczek jelitowych (*Escherichia coli*) nie wytwarzających acetoiny, od pokrewnych im pałeczek typu ziemnego (*Pseudomonas aerogenes*, zwanych też *Enterobacter aerogenes*), które acetoinę wytwarzają. Najczęściej stosowanym podłożem do próby na wytwarzanie acetoiny jest pożywka Clarka. Inkubację prowadzi się zwykle przez 48 h, po czym stwierdza się obecność acetoiny za pomocą odpowiednich odczynników. Najlepszą do tego metodą jest **metoda Barritta (Voges-Proskauera)**. Do 48-godzinnej hodowli dodaje się 1 ml 6 % alkoholowego roztworu α -naftolu i 0,4 ml 10-20 % roztworu KOH. Jeśli acetoina jest obecna w hodowli to reakcja następuje natychmiast lub po 2-5 minutach, w postaci czerwonego zabarwienia (może mieć różną intensywność w zależności od aktywności danego szczepu).

MATERIAŁY: 2 sterylne probówki, porcelanowa płytka z wgłębieniami lub białe parowniczkiz, eza, pipeta automatyczna, pisak do szkła, badane bakterie w hodowli płynnej lub agarowej, podłoże Clarka, 6 % alkoholowy roztwór α -naftolu, 10-20 % roztwór KOH

1. Przygotować probówki (po jednej dla każdej badanej hodowli) z podłożem Clarka (przygotować według przepisu).
2. Zaszczepić badanymi bakteriami za pomocą ezy lub pipety automatycznej.
3. Opisać odpowiednio i inkubować przez 48 h w temperaturze 37 °C.
4. Po okresie inkubacji przeprowadzić próbę na obecność acetoiny, używając porcelanowej płytki z wgłębieniami lub białych parowniczek. Do wgłębienia w płytce wprowadza się niewielką ilość badanej hodowli z podłoża Clarka (np. 0,5 ml) i dodaje po kilka kropli wymienionych wyżej odczynników obserwując wynik reakcji.

2.3. Próba z czerwienią metylową

Próba obejmuje rozróżnienie dwóch podgrup bakterii należących do rodziny *Enterobacteriaceae*. *Escherichia coli* reprezentuje podgrupę, która fermentuje glukozę do mleczanu, octanu, etanolu, dwutlenku węgla oraz wodoru i tym samym zakwasza środowisko pożywki. Druga podgrupa reprezentowana jest przez *Aerobacter aerogenes*, który wytwarza głównie glikol butylenowy (związek o charakterze obojętnym) oraz octan, mrówczan, etanol i dwutlenek węgla. Prekursorem glikolu jest acetoina. Próbę przeprowadza się na podłożu niezbuforowanym z nadmiarem glukozy (powyżej 1 %) oraz minimalną zawartością peptonu lub bulionu, aby ograniczyć ilość alkalicznych produktów. Zakwaszenie podłoża lub jego brak obserwuje się przy użyciu wskaźnika w postaci alkoholowego roztworu czerwieni metylowej (0,1 g czerwieni metylowej, 300 ml 95 % alkoholu etylowego).

MATERIAŁY: 2 sterylne probówki, eza, pipeta automatyczna, pisak do szkła, 3,4-dniowe hodowle badanych bakterii na pożywce płynnej lub agarowej, podłoże Clarka, alkoholowy roztwór czerwieni metylowej

1. Przygotować według przepisu podłoże Clarka w probówkach (po jednej dla każdej badanej hodowli).
2. Zaszczepić badanymi bakteriami za pomocą ezy lub pipety automatycznej.
3. Opisać odpowiednio i inkubować przez 3-4 dni w temperaturze 37 °C.
4. Po okresie inkubacji odmierzyć po 5 ml badanych hodowli i przenieść do świeżych sterylnych probówek.
5. Do 5 ml hodowli wprowadzić 5 kropli roztworu czerwieni metylowej i obserwować zmianę barwy. Wyraźne czerwone zabarwienie wskazuje na zakwaszenie podłoża i świadczy o

dotatnim wyniku próby. Żółte zabarwienie wskazuje na alkalizację i daje wynik ujemny. Barwa pomarańczowa lub jasnoczerwona to wynik niejasny.

2.4. Próba na wytwarzanie indolu

Za pomocą tej próby można np. odróżnić pałeczki okrężnicy (*Escherichia coli*) od pałeczek duru brzuszego (*Salmonella sp.*) i czerwonki (*Shigella sp.*). Substratem, z którego tworzy się indol w drodze enzymatycznej może być zawierający tryptofan pepton, hydrolizat kazeiny lub czysty aminokwas – tryptofan. Indol odpowiedzialny jest za charakterystyczny fekalny zapach i wytwarzają go bakterie posiadające enzym – **tryptofanazę**. Tryptofan powstaje jako produkt rozkładu substancji białkowych, zawartych w peptonie lub hydrolizacie kazeiny. Indol zostaje wytworzony z tryptofanu pod wpływem tryptofanazy.

Indol wytwarzany jest przez pałeczki okrężnicy, ale nie przez pałeczki duru brzuszego ani przez pałeczki czerwonki (z nielicznymi wyjątkami). Do prób na wytwarzanie indolu stosuje się następujące podłoża: (1) wodę peptonową o zawartości peptonu dwukrotnie większej niż do prób fermentacyjnych, (2) bulion trypsynowy, (3) pożywki syntetyczne z tryptofanem. Po inkubacji trwającej zwykle 24-48 godzin dodaje się do hodowli kilka kropli odczynnika **Kovacs** lub odczynnika **Ehrlicha**, który reaguje z indolem wywołując czerwone zabarwienie górnej warstwy pożywki na granicy styku odczynnika z jej powierzchnią. Odczynnik Kovacs to mieszanina 5 g aldehydu p-dwumetyloaminobenzoesowego, 75 ml alkoholu n-amyłowego lub butylowego oraz 25 ml stężonego (37 %) HCl. Odczynnik Ehrlicha powstaje w wyniku zmieszania 0,8 g aldehydu p-dwumetyloaminobenzoesowego, 76 ml 96 % alkoholu etylowego i 16 ml stężonego (37 %) HCl.

MATERIAŁY: sterylne probówki, eza, pipeta automatyczna, pisak do szkła, badane bakterie w hodowli płynnej lub agarowej, podłoże z tryptofanem, odczynnik Kovacs lub odczynnik Ehrlicha

1. Przygotować probówki (po jednej dla każdej badanej hodowli) z podłożem zawierającym tryptofan (według przepisu).
2. Zaszczepić badanymi bakteriami za pomocą ezy lub pipety automatycznej.
3. Opisać odpowiednio i inkubować przez 24-48 h w temperaturze 37 °C.
4. Po okresie inkubacji dodać do hodowli kilka kropli odczynnika Kovacs lub odczynnika Ehrlicha i obserwować pojawienie się czerwonego pierścienia na granicy styku odczynnika z powierzchnią pożywki.

2.5. Badanie na podłożu Hugh-Leifsona

Podłoże to zawiera specyficzny pepton – **trypton** oraz wskaźnik w postaci błękitu bromotymolowego. Trypton to mieszanina peptydów powstałych na skutek hydrolizy kazeiny (najważniejszego białka mleka) przez enzym proteolityczny – **trypsynę**. Substratem różnicującym bakterie jest glukoza. Mikroorganizmy rozwijające się na tym podłożu mogą metabolizować trypton i alkalizować środowisko, względnie wykorzystywać glukozę i zakwaszać środowisko. Bakterie zakwaszające pożywkę w warunkach beztlenowych zaliczane są do fermentujących a w obecności tlenu – do utleniających glukozę.

MATERIAŁY: 2 sterylne probówki, igła preparacyjna lub eza zakończona igłą, pipeta automatyczna, pisak do szkła, badany szczep bakterii w hodowli płynnej lub agarowej, podłoże Hugh-Leifsona, glukoza, sterylna parafina

1. Do 2 probówek wprowadzić po 9 ml podłoża Hugh-Leifsona (bez glukozy), umieścić we wrzącej łaźni wodnej i po upłynięciu ogrzewać przez 10 minut w celu usunięcia tlenu z podłoża.
2. Schłodzić do 45 °C, do każdej probówki wprowadzić 1 ml jałowego 10 % roztworu glukozy (końcowe stężenie glukozy będzie 1 %) i zostawić do zestalenia.
3. Ezą zakończoną igłą zaszczepić podłoże w obu probówkach badaną hodowlą.

4. Jedną z probówek zalać 1 ml parafiny uzyskując warunki beztlenowe, drugą pozostawić niezalaną.
5. Odpowiednio opisać i inkubować w temperaturze 25 °C przez 24 h.
6. W przypadku badania więcej niż jednego szczepu ilość przygotowanych probówek z podłożem należy odpowiednio zwielokrotnić.

Bakterie wytwarzające kwas z glukozy zakwaszają środowisko i powodują zmianę barwy pożywki z zielonej na żółtą. Mikroorganizmy wykorzystujące trypton alkalizują podłoże i zabarwia się ono na niebiesko. Drobnoustroje tlenowe w probówce bez parafiny utlenią glukozę do kwasu i zmieniają barwę podłoża na żółtą. W podłożu z parafiną barwa podłoża pozostanie niezmienną (zieloną). Mikroorganizmy rozwijające się w warunkach beztlenowych (probówka z parafiną) zmieniają barwę podłoża na żółtą.

2.6. Badanie zdolności wzrostu na cytrynianie

Zdolność wzrostu na cytrynianie jako jedynym źródle węgla w pożywce, to kolejna cecha diagnostyczna wykorzystywana przy rozróżnianiu poszczególnych szczepów z rodziny *Enterobacteriaceae*. W badaniu tym wykorzystuje się stałe podłoże Simonsa z cytrynianem.

MATERIAŁY: kilka sterylnych szalek Petriego lub probówek, eza, pipeta automatyczna, pisak do szkła, badane bakterie w hodowli płynnej lub agarowej, podłoże Simonsa

1. Upłynnione podłoże Simonsa rozlać do probówek i ułożyć w skosy lub do szalek Petriego (ilość zależna od ilości badanych szczepów).
2. Po zestaleniu wykonać posiewy badanych szczepów za pomocą ezy lub pipety automatycznej.
3. Opisać odpowiednio i inkubować w temperaturze 37 °C przez 72 h.
4. Zaobserwować zmianę podłoża.

Bakterie utylizujące cytryniany rosnąc na podłożu alkalizują środowisko i zmieniają barwę podłoża z zielonej na niebieską. Jest to wynik dodatni. Brak wzrostu bakterii i niezmienną barwa podłoża to wynik ujemny. *Escherichia coli* nie rośnie na tym podłożu w odróżnieniu od pozostałych bakterii należących do grupy *coli*.

ROZDZIAŁ ÓSMY: MIKROSKOPIA I BARWIENIE DROBNOUSTROJÓW

1. Mikroskopia

Mikroskopia to szczegółowe obserwowanie materiału biologicznego (w tym drobnoustrojów) za pomocą mikroskopów, czyli urządzeń powiększających obraz. Jest to szczególnie ważne w przypadku obserwacji tak małych obiektów jak mikroorganizmy, które w przeważającej większości nie są widoczne gołym okiem. Postęp technik mikroskopowych umożliwia zagłębienie coraz głębiej w strukturę i funkcjonowanie komórek.

Najprostszym przyrządem powiększającym jest lupa, nazywana także mikroskopem prostym. Pozostałe przyrządy optyczne nazywamy mikroskopami złożonymi, ze względu na znaczną komplikację budowy w porównaniu z lupą. Te z kolei możemy podzielić na 2 grupy, w zależności od mechanizmu uzyskiwania obrazu: mikroskopy świetlne i mikroskopy elektronowe. W różnych typach mikroskopu świetlnego używa się różnych rodzajów promieni świetlnych. W zależności od konstrukcji oraz rodzaju wykorzystywanego promieniowania świetlnego wyróżniamy m.in. mikroskop świetlny zwykły, mikroskop ultrafioletowy, mikroskop ciemnego pola (ultramikroskop), mikroskop fluorescencyjny (luminescencyjny), mikroskop kontrastowo-fazowy i mikroskop interferencyjny.

1.1. Mikroskop świetlny zwykły

Jest to najczęściej wykorzystywany przyrząd optyczny w laboratorium mikrobiologicznym. Maksymalne powiększenie możliwe do uzyskania za pomocą mikroskopu świetlnego nie przekracza 2000 razy a ograniczenie to wynika ze zdolności rozdzielczej mikroskopu. Mikroskop świetlny zwykły umożliwia obserwację obiektów wielkości około 1 μm .

Mikroskop ten wykorzystuje światło z zakresu widzialnego. Zakres ten może się różnić u poszczególnych osób, ale przyjmuje się, że promieniowanie widzialne to promieniowanie z zakresu długości fali od 380 do 780 nm. Często granice te są nieco węższe (400-700 nm). Przyjmuje się zatem, że: promieniowanie o fali krótszej od 350 nm to ultrafiolet (UV), 350-400 nm to bliski fiolet, 400-700 nm to promieniowanie widzialne, 700-1000 nm to bliska podczerwień, powyżej 1000 nm to podczerwień (IR).

Mikroskop świetlny zwykły składa się z części mechanicznych (statyw, tubus, rewolwer, stolik przedmiotowy, śruba makrometryczna i śruba mikrometryczna, śruby nastawne do przesuwania preparatu – suwaki krzyżowe) oraz części optycznych (obiektyw, okular, kondensator, źródło światła, lustro). Statyw mocuje wszystkie niezbędne części mikroskopu i zapewnia stabilność całemu urządzeniu. Tubus to rodzaj rury, gdzie od góry umocowany jest okular a u dołu urządzenie rewolwerowe (rewolwer obiektywowy, zwrotnica, tarcza obrotowa). Na rewolwerze mocuje się zwykle 3 lub 4 obiektywy o różnych powiększeniach. Położenie tubusa w pionie można regulować za pomocą śruby makro- i mikrometrycznej. Ustawienie tubusa w odpowiedniej pozycji góra-dół względem oglądanego preparatu, czyli innymi słowy ustawienie odległości pomiędzy obiektywem a preparatem, jest warunkiem uzyskania odpowiedniej ostrości obrazu oglądanego preparatu. Śrubą makrometryczną wykonuje się „duże” ruchy i służy ona do nastawiania ostrości obrazu „z grubsza”, śrubą mikrometryczną zaś o niewielkim zakresie ruchów, nastawiamy dokładną ostrość, zwłaszcza w przypadku dużych powiększeń. Na stoliku przedmiotowym umieszczamy preparat na szkiełku. Na środku stolika znajduje się otwór, przez który przechodzi skierowane od dołu światło, które następnie przechodzi przez preparat i wpada do obiektywu. Na stoliku znajduje się metalowy uchwyt, który służy do przytrzymywania preparatu w jednej pozycji. Stolik, a razem z nim preparat,

można przesuwając w płaszczyźnie poziomej (prawo-lewo, przód-tył) za pomocą śrub nastawnych. Umożliwia to oglądanie różnych części preparatu.

W dolnej części mikroskopu znajduje się element „świetlny”. W starszych mikroskopach jest to odpowiednio ustawione lustro, które zbiera światło słoneczne lub sztuczne i kieruje je przez preparat do obiektywu. Współcześnie w mikroskopach stosuje się własne źródło światła w postaci małej żarówki, która umieszczona jest zwykle wewnątrz podstawy statywu a jej promieniowanie jest kierowane w odpowiednią stronę za pomocą wewnętrznego lustra. Promienie świetlne skupiane są przez kondensator umieszczony tuż pod stolikiem i składający się z soczewek wypukłych. Oświetlenie można regulować za pomocą przesłony kondensatora oraz przesuwając kondensator w górę lub w dół. Obiektywy składają się z soczewek a ich obudowy oznaczone są symbolami handlowymi oraz liczbami oznaczającymi powiększenie (np. 4×, 10×, 100×). Im silniej obiektyw powiększa obraz, tym jego soczewka frontalna mniejsza i tym krótsza ogniskowa. Stąd silnie powiększające obiektywy muszą znajdować się blisko preparatu. Zwykle obiektyw o największym powiększeniu przeznaczony jest do immersji, pozostałe zaś potocznie nazywa się „obiektywami suchymi”. Okular składa się z 2 płasko-wypukłych soczewek, z których górna ustawiona jest powierzchnią płaską do oka. Okular jest oznaczony na obudowie liczbą oznaczającą powiększenie (np. 10×) i w przeciwieństwie do obiektywu, powiększa obraz linearnie nie mając wpływu na rozdzielczość. Obserwacje powiększonych obrazów wiążą się ze zjawiskiem **aberracji sferycznej** (większe załamывanie promieni świetlnych w części obwodowej niż środkowej soczewki) oraz **aberracji chromatycznej** (rozszerzanie promieni światła białego na poszczególne widma w soczewce), co w efekcie może zniekształcać obraz. Dlatego też zarówno okulary i obiektywy jak i kondensatory konstruuje się z kilku soczewek o różnych krzywiznach i wykonanych z różnego rodzaju szkła (achromaty i apochromaty), co niweluje niepożądane zjawiska.

O przydatności mikroskopu decydują dwa parametry: całkowite powiększenie i zdolność rozdzielcza.

2. Barwienie drobnoustrojów

Barwienie drobnoustrojów ma na celu ich uwidocznienie i odróżnienie od innych elementów preparatu, np. tła. Barwienie to proces fizyko-chemiczny, podczas którego zachodzi adsorpcja barwnika na powierzchni komórki a także częściowa dyfuzja do jej wnętrza. Do barwienia bakterii wykorzystuje się najczęściej barwniki o charakterze zasadowym (część barwna ma ładunek dodatni), ponieważ składniki komórek mają odczyn lekko kwaśny (ładunek ujemny), co sprzyja powinowactwu barwnika i elementów komórkowych. Niektóre drobnoustroje z trudem chłoną barwnik i wymagają specjalnych metod barwienia lub oglądania w mikroskopie nie wymagającym barwienia. Najczęściej stosowane barwniki w mikrobiologii to: błękit metylenowy, fuksyna, safranina, zieleń malachitowa, fiolet goryczki (gencjanowy), fiolet krystaliczny, fiolet metylenowy.

Wyróżniamy kilka rodzajów barwienia. W zależności od ilości zastosowanych barwników mówimy o barwieniu prostym lub złożonym. Pod względem wybarwianych elementów preparatu barwienie nazywamy pozytywnym, negatywnym lub negatywno-pozytywnym. Osobną kategorię stanowi barwienie przyżyciowe.

Jedną z podstawowych cech morfologicznych oglądanych bakterii jest kształt ich komórek oraz rodzaj skupisk (jeżeli tworzą takowe). Ogólnie kształty bakterii podzielić można na 3 typy: (1) kuliste (*cocci*), (2) cylindryczne (wydłużone) i (3) spiralne. Do bakterii kulistych zaliczamy następujące kształty i skupiska:

- ziarniak (*Micrococcus*),
- dwójka (*Diplococcus*),
- gronkowiec (*Staphylococcus*),
- paciorkowiec (*Streptococcus*),
- pakietowiec albo sześcianka (*Sarcina*),
- tetrada (*Tetrad* lub *Tetracoccus*).

Ziarniaki nie zawsze są idealnie kuliste – często mają kształt lekko wydłużony, elipsoidalny lub jajowaty i możemy je wtedy nazywać *Coccobacilli*. Wśród form wydłużonych bakterii wyróżniamy następujące kształty oraz ich skupiska:

- pałeczka (*Bacterium*),
- laseczka (*Bacillus*) oraz jej skupiska: *Diplobacillus*, *Streptobacillus* i *Palisada*,
- maczugowiec (*Corynebacterium*),
- wrzecionowiec (*Fusobacterium*),
- prątek (*Mycobacterium*).

Trzecią grupę bakterii – formy spiralne – reprezentują:

- przecinkowiec (*Vibrio*),
- krętek (*Spirochaetae*),
- śrubowiec (*Spirillum*).

2.1. Preparaty żywe i martwe

Wszystkie preparaty mikrobiologiczne ze względu na sposób przygotowania dzielimy na martwe i żywe. Preparat martwy najczęściej uzyskuje się przez kilkukrotne przesunięcie preparatu nad płomieniem palnika w celu jego wysuszenia. Jednocześnie giną wtedy wszystkie komórki. Preparaty żywe wykonuje się często metodą wiszącej kropli z zastosowaniem specjalnego szkiełka podstawowego z zagłębieniem, które pozwala na obserwację mikroorganizmów znajdujących się w kropli wiszącej na szkiełku nakrywkowym i umieszczonym tak, aby kropla z obserwowanym materiałem znajdowała się dokładnie nad zagłębieniem w szkiełku podstawowym. Barwniki stosowane w preparatach żywych nie mogą powodować szybkiej śmierci mikroorganizmów.

2.2. Barwienie przyżyciowe

Barwienie to stosowane jest do preparatów nieutrwalonych, mokrych, zawierających żywe komórki. W tym przypadku stosuje się barwniki w dużym rozcieńczeniu, nie niszczące komórek. Przykładem takiego barwienia jest barwienie promieniowców, drożdży i grzybów nitkowatych błękitem metylenowym w rozcieńczeniu 1:10 000. Wybarwiają się wtedy komórki, których błona została uszkodzona i straciła barierę półprzepuszczalności, w wyniku czego barwnik może się swobodnie dostać do wnętrza komórki. Błękit metylenowy w stężeniu nietoksycznym dla drożdży, przechodząc do komórki przez błonę komórkową ulega redukcji w wyniku działania dehydrogenaz. Efektem tego jest przekształcenie błękitu w związek bezbarwny – leukobłękit metylenowy.

2.3. Barwienie proste i złożone

W barwieniu prostym (monochromatycznym) stosujemy tylko jeden barwnik i przeważnie jest to błękit metylenowy lub fuksyna. W barwieniu złożonym stosujemy co najmniej dwa barwniki, które możemy stosować w określonej kolejności lub w mieszaninie. Przy barwieniu złożonym stosuje się często tzw. zaprawy (bejce, utrwalacze) w celu zwiększenia chłonności barwnika lub utrwalenia jego związania w komórce.

2.4. Barwienie pozytywne, negatywne i negatywno-pozytywne

Barwienie pozytywne jest w mikrobiologii najczęściej stosowane i polega na wybarwieniu komórek drobnoustrojów, podczas gdy tło pozostaje niezabarwione. Do barwienia pozytywnego stosuje się barwniki o małych cząsteczkach łatwo wnikających do komórek. W barwieniu negatywnym, gdzie komórki pozostają niezabarwione, stosuje się barwniki o charakterze tuszu, które wybarwiają tło preparatu. Barwniki te nie wnikają do wnętrza komórek ze względu na swoje właściwości (w szczególności ze względu na znaczną wielkość cząsteczek). W barwieniu negatywnym stosuje się np. tusz chiński, nigrozynę, cyjanochinę, kolargol czy

czerwień Kongo. Takie barwienie można stosować do bakterii, które nie wchłaniają klasycznych barwników, jak np. krętek blady (*Treponema pallidum*). Metoda negatywno-pozytywna to kombinacja dwóch poprzednich rodzajów barwienia. Polega ona na przygotowaniu zawiesiny bakterii w jednym z barwników negatywnych i rozprowadzeniu jej w sposób równomierny na szkiełku podstawowym za pomocą drugiego szkiełka podstawowego. Następnie preparat zabarwia się barwnikiem pozytywnym, najczęściej fuksyną lub błękitem metylenowym.

3. Przygotowanie preparatu

Przed przystąpieniem do wykonania preparatu trzeba odpowiednio przygotować szkiełko podstawowe. Należy je dokładnie umyć wodą z detergentem i odtłuścić (w razie potrzeby można posłużyć się roztworem alkoholowym) a następnie wytrzeć do sucha bawełnianą szmatką lub papierem, nie pozostawiając kłaczków.

Kolejnym etapem jest zrobienie rozmazu drobnoustrojów na szkiełku. Drobnoustroje można pobierać zarówno z hodowli płynnej, jak i z hodowli na podłożu stałym. Jeżeli materiał pobieramy z hodowli płynnej to наносimy go pipetką (1-2 krople) lub eżą, zachowując warunki sterylne, aby nie zanieczyścić badanej hodowli. Jeśli badany materiał pochodzi z hodowli na podłożu stałym, to najpierw na szkiełko podstawowe наносimy 1-2 krople soli fizjologicznej, następnie sterylną eżą pobieramy nieco materiału i rozprowadzamy w soli fizjologicznej. W obydwu przypadkach po naniesieniu materiału rozprowadzamy go równomiernie na fragmencie powierzchni szkiełka wykonując tzw. **rozmaz**. Rozmaz musi być cienki, inaczej wybarwiony preparat będzie nieczytelny, ponieważ zamiast pojedynczych mikroorganizmów otrzymamy zbitą masę wielu komórek niemożliwą do jednoznacznej identyfikacji. Po wykonaniu rozmazu preparat należy podsuszyć na wolnym powietrzu. Po wyschnięciu preparatu należy go utrwalić przeciągając kilkakrotnie nad płomieniem palnika, rozmazem do góry uważając, aby nie spalić preparatu. Szkiełko należy umieścić w łapie, czyli specjalnym drewnianym uchwycie przypominającym spinacz do bielizny. Utrwalenie ma na celu zabicie mikroorganizmów oraz ich przytwierdzenie do szkiełka, dzięki czemu nie zostaną z niego zmyte podczas barwienia i płukania. Po wybarwieniu wodę ze szkiełka należy delikatnie odsączyć szmatką lub papierem i zostawić do całkowitego wysuszenia na wolnym powietrzu. Przy sporządzaniu preparatów przyżyciowych omijamy etap utrwalania preparatu w płomieniu i nie odsączamy preparatu.

4. Oglądanie preparatów pod immersją

1. Oglądanie należy rozpocząć od obiektywu o najmniejszym powiększeniu, gdzie należy znaleźć odpowiedni fragment preparatu i wstępnie wyregulować ostrość śrubą makrometryczną.
2. Następnie należy zmienić obiektyw na kolejny pod względem wielkości powiększenia i czynności powtórzyć. Postępując w ten sposób należy dojść do obiektywu o największym powiększeniu.

UWAGA! Przy nastawianiu ostrości przy największych powiększeniach nie należy używać śruby makrometrycznej, a jedynie mikrometryczną o niewielkim zakresie ruchów. Wynika to z tego, że ustawienie ostrości wymaga wtedy już tylko niewielkich korekt, a operowanie śrubą makrometryczną może spowodować zmiążdżenie preparatu i/lub zniszczenie obiektywu.

3. Przy każdym powiększeniu, po uzyskaniu ostrości, można oglądać różne części preparatu przesuwając go za pomocą śrub nastawnych. Do immersji służy zazwyczaj obiektyw o największym powiększeniu i jest on wtedy odpowiednio oznaczony (np. „oil” oznacza obiektyw przeznaczony do immersji olejowej).
4. Prawidłowe wykonanie immersji wygląda następująco:
 - Ustawić interesujące nas miejsce na preparacie pod obiektywem immersyjnym.
 - Przesunąć obiektyw w taki sposób, aby umożliwić wprowadzenie kropli olejku immersyjnego na preparat (odsunąć obiektyw na bok lub obniżyć całkowicie stolik).

- Zamknąć przesłonę kondensora tak, aby światło tworzyło mały punkt świetlny (ułatwi to wprowadzenie kropli olejku immersyjnego na odpowiednie miejsce preparatu).
- Nanieść kroplę olejku immersyjnego na punkt świetlny.
- Otworzyć przesłonę kondensora.
- Nasunąć obiektyw immersyjny na kroplę i skorygować ostrość śrubą mikrometryczną.
- Można przesuwając preparat w płaszczyźnie poziomej uważając jednakże, aby nie „wyjechać” obiektywem z kropli olejku.

UWAGA! Po zakończeniu obserwacji należy **ZAWSZE** dokładnie umyć obiektyw z pozostałości olejku, za pomocą szmatki lub chusteczki nasączonej alkoholem. Podobne przeczyszczenie obiektywów zaleca się także przed przystąpieniem do oglądania preparatu, gdyż mogą być one niedomyte po poprzednim użyciu lub zakurzone.

5. Proste barwienie bakterii (pozytywne i negatywne)

MATERIAŁY: 2 szkiełka podstawowe, eza, błękit metylenowy, czerwień Kongo, hodowla bakteryjna

1. Na szkiełkach podstawowych wykonać 2 rozmazy bakterii wydanych do badania a następnie utrwalić w płomieniu palnika.
2. Jeden z preparatów zalać błękitem metylenowym na 5 minut, następnie spłukać wodą i osuszyć.
3. Drugi preparat zalać na około 30 sekund czerwienią Kongo, zlać nadmiar barwnika (nie spłukiwać!) i delikatnie osuszyć ligniną.
4. Oglądać preparaty pod immersją i spróbować zidentyfikować kształty badanych bakterii.

6. Barwienie bakterii metodą Grama

MATERIAŁY: szkiełko podstawowe, eza, fiolet krystaliczny, płyn Lugola, 96 % etanol, safranina, hodowla bakteryjna

1. Przygotować na szkiełku podstawowym rozmaz nieznaną bakterii udostępnioną przez prowadzącego i utrwalić preparat.
2. Na osuszonym preparacie wykonać barwienie stosując kolejno odczynniki: fiolet krystaliczny (2-3 minuty), spłukać obficie wodą bieżącą, płyn Lugola (1,5-2 minuty), spłukać wodą, etanol (30 sekund), spłukać wodą, safranina (20 sekund), spłukać wodą i zostawić do obeschnięcia. Można preparat delikatnie osuszyć papierem lub szmatką.
3. Suchy preparat oglądać pod mikroskopem świetlnym z zastosowaniem immersji i ustalić przynależność do bakterii Gram-dodatnich lub Gram-ujemnych oraz spróbować zidentyfikować kształt (skupiska) komórek.

LITERATURA:

1. Kocwowa E. 1984: *Ćwiczenia z mikrobiologii ogólnej dla wyższych szkół technicznych*. Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa
2. Kołwzan B., Adamiak W., Grabas K., Pawełczyk A. 2005: *Podstawy mikrobiologii w ochronie środowiska*. Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław
3. Kunicki-Goldfinger W. 2005: *Życie bakterii*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa
4. Kur J. (red.) 1993: *Ćwiczenia z mikrobiologii ogólnej*. Politechnika Gdańska, Gdańsk
5. Litwin A. 1999: *Podstawy technik mikroskopowych*. Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków, wydanie IV
6. Olańczuk-Neyman K. 1992, 1998: *Laboratorium biologii środowiska*. Politechnika Gdańska, Gdańsk
7. Pawlaczyk-Szpilowa M. 1980: *Ćwiczenia z mikrobiologii wody i ścieków*. Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa
8. Petrycka H. 1993: *Ćwiczenia z mikrobiologii środowiskowej*. Politechnika Śląska, wydanie II, Gliwice
9. PN-C-04615-05:1975 – Woda i ścieki. Badania mikrobiologiczne. Oznaczanie bakterii grupy coli metodą fermentacyjną probówkową
10. PN-C-04615-07:1977 – Woda i ścieki. Badania mikrobiologiczne. Oznaczanie bakterii grupy coli typu kałowego (fekalnego) metodą fermentacyjną probówkową
11. PN-Z-04111-02:1989 – Ochrona czystości powietrza. Badania mikrobiologiczne. Oznaczanie liczby bakterii w powietrzu atmosferycznym (imisja) przy pobieraniu próbek metodą aspiracyjną i sedymentacyjną
12. PN-Z-19000-1:2001 – Jakość gleby. Ocena stanu sanitarnego gleby. Wykrywanie bakterii z rodzaju *Salmonella*
13. Różalski A. 2003: *Ćwiczenia z mikrobiologii ogólnej – skrypt dla studentów biologii, cz. 1*. Wydawnictwo Uniwersytetu Łódzkiego, Łódź, wydanie III
14. Schlegel H. G. 2005: *Mikrobiologia ogólna*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa
15. Żakowska Z., Stobińska H. (red.) 2000: *Mikrobiologia i higiena w przemyśle spożywczym*. Politechnika Łódzka, Łódź



KAPITAŁ LUDZKI
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI
FUNDUSZ SPOŁECZNY



Publikacja bezpłatna, współfinansowana ze środków Unii Europejskiej
w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego