

MIKROBIOLOGIA

W

OCHRONIE ŚRODOWISKA

CZĘŚĆ I

przygotowana przez zespół pracowników
Zakładu Genetyki Bakterii
pod kierunkiem dr Anny Łasicy



INSTYTUT MIKROBIOLOGII

WYDZIAŁ BIOLOGII

UNIwersytet Warszawski

2013

SPIS TREŚCI

I. REGULAMIN PRACOWNI	4
II. ĆWICZENIA	
Ćwiczenie 1	5
<ul style="list-style-type: none">• Podłoża mikrobiologiczne, jałowienie i podstawowe techniki mikrobiologiczne• Izolacja mikroorganizmów ze środowisk naturalnych	
Ćwiczenie 2	14
<ul style="list-style-type: none">• Izolacja czystych kultur mikroorganizmów z różnych środowisk naturalnych• Obserwacje mikroskopowe różnych form morfologicznych i wybranych struktur bakterii wyizolowanych ze środowisk naturalnych	
Ćwiczenie 3	19
<ul style="list-style-type: none">• Badanie rozkładu związków organicznych oraz przemian związków azotu przez mikroorganizmy występujące w wodzie i glebie	
Ćwiczenie 4	25
<ul style="list-style-type: none">• Aktywność oddechowa i fermentacyjna mikroorganizmów	
Ćwiczenie 5 i 6	29
<ul style="list-style-type: none">• Analiza mikrobiologicznego skażenia wody (bakterie grupy coli)• Analiza mikrobiologicznego skażenia żywności (izolacja pałeczek <i>Campylobacter</i>)	
Ćwiczenie 7	35
<ul style="list-style-type: none">• Wpływ czynników środowiskowych na rozwój mikroorganizmów	
Ćwiczenie 8	40
<ul style="list-style-type: none">• Odczyt wyników ćwiczenia 7. Konsultacje	
III. SKŁAD PODŁOŻY STOSOWANYCH NA ĆWICZENIACH	41

IV. ADDENDUM	43
1. Podstawowe formy morfologiczne bakterii	43
2. Kształt nitek grzybni promieniowców	43
3. Różnorodność budowy sinic (cyjanobakterii)	44
4. Budowa konidioforów u różnych gatunków pleśni	44
5. Typowe ugrupowania u drożdży	45
6. Metody opisu kolonii bakteryjnych	45
V. ZALECANA LITERATURA	46

I. REGULAMIN PRACOWNI

1. W pracowni obowiązuje noszenie fartucha ochronnego (najlepiej białego).
2. Wszystkie odczynniki i ich roztwory, a także podłoża i hodowle mikroorganizmów muszą być czytelnie oznakowane.
3. Na stołach laboratoryjnych mogą znajdować się wyłącznie materiały potrzebne do wykonywania ćwiczenia.
4. Należy zachować daleko idącą ostrożność przy pracy z materiałem mikrobiologicznym, a w szczególności:
 - a) stosować się do zasad pracy jałowej (zachować szczególną ostrożność przy pracy w bezpośrednim sąsiedztwie płomienia palnika);
 - b) wstawiać hodowle bakteryjne w probówkach do statywów (nie wolno ich kłaść na stole);
 - c) opisywać każdą posianą próbę (rodzaj posiewu, inicjały osoby wykonującej posiew, itp.);
 - d) po skończeniu posiewów wyżarzać ezy, opalać głaszczki i zawsze wstawiać je do statywów, a zużyte pipety wkładać do specjalnych pojemników.
5. W pracowni obowiązuje szczególna ostrożność przy pracy z odczynnikami chemicznymi (do pipetowania ich roztworów należy używać WYŁĄCZNIE pompek lub gruszek);
6. W pracowni zabronione jest spożywanie posiłków, a także picie napojów.
7. Po zakończeniu pracy należy:
 - a) posprzątać stół laboratoryjny;
 - b) niepotrzebny już sprzęt odłożyć na miejsce, pozostawić w porządku mikroskopy.
8. Niepotrzebne hodowle drobnoustrojów oraz szkło zużyte w trakcie pracy należy odłożyć do specjalnie przygotowanych pojemników, po uprzednim usunięciu wszelkich napisów i zanieść do zmywalni.
9. Nie wolno wnosić z pracowni żadnych hodowli bakteryjnych, preparatów i odczynników bez pozwolenia prowadzącego zajęcia.
10. Po zakończeniu pracy należy sprawdzić, czy został wyłączony gaz oraz aparatura nie przeznaczona do pracy ciągłej, a przed wyjściem z sali – umyć ręce.
11. W razie pojawienia się jakichkolwiek problemów należy niezwłocznie zgłosić się do osoby prowadzącej zajęcia lub do opiekuna.

II. ĆWICZENIA

Ćwiczenie 1

- **Podłoża mikrobiologiczne, jałowienie i podstawowe techniki mikrobiologiczne**

Wprowadzenie

Obiektem badań w mikrobiologii są mikroskopijnej wielkości organizmy występujące powszechnie we wszystkich środowiskach naturalnych. Badanie tych organizmów w naturalnych warunkach bytowania jest jednak z wielu względów bardzo trudne, a często niemożliwe. Poznanie morfologii, fizjologii, wymagań pokarmowych i środowiskowych drobnoustrojów stało się realne dzięki stworzeniu sztucznych środowisk do ich hodowli - tzw. podłoży (pożywek) mikrobiologicznych. Umożliwiły one hodowanie drobnoustrojów w warunkach laboratoryjnych i uzyskanie czystych kultur - tzn. hodowli stanowiących potomstwo jednego osobnika i będących materiałem w wielu badaniach mikrobiologicznych.

1. Podłoża

Podłoża mikrobiologiczne są to mieszaniny odpowiednio dobranych składników odżywczych, dostarczających hodowanym na nich organizmom niezbędnych pierwiastków chemicznych oraz źródła energii. Każde podłoże musi mieć odpowiednią dla danego gatunku wartość odżywczą, odpowiednie pH oraz odpowiednie ciśnienie osmotyczne.

Ważne jest również określenie, do jakiego celu ma służyć dane podłoże - czy chodzi nam tylko o uzyskanie hodowli, o wyselekcjonowanie jakichś określonych bakterii, czy też o zbadanie właściwości metabolicznych tych mikroorganizmów. Zależnie od potrzeby możemy zastosować podłoże **minimalne** lub **pełne, mineralne, selekcyjne** czy **różnicujące**.

Ze względu na konsystencję dzielimy podłoża na: **płynne, półpłynne** i **stałe**. Podłoża zestala się najczęściej agarem, który jest uzyskiwany z krasnorostów morskich. Podłoża zestalone można wykorzystywać w postaci słupków, skosów i na płytkach Petriego.

Jednym z koniecznych warunków, jaki muszą spełniać wszystkie podłoża, jest ich sterylność, co oznacza, że muszą być pozbawione wszelkich żywych organizmów - zarówno ich form wegetatywnych jak i przetrwalnikowych.

Zasady przygotowywania podłoży

Przygotowując podłoża należy:

- a) używać szkła odpowiednio wymytego i wypłukanego;
- b) przestrzegać ściśle przepisów przygotowania pożywek (odważać dokładnie składniki, zwracać uwagę na kolejność ich dodawania i na uwodnienie soli);
- c) używać tylko wody destylowanej;
- d) ustawiać odpowiednie pH podłoża, pamiętając o tym, że po jałowieniu w autoklawie pH może się obniżyć;
- e) do jałowienia rozlewać podłoże do kolb do objętości nie większej niż 3/4 naczynia, aby nie wykipiło w czasie jałowienia w autoklawie;

- f) kolby zatykać korkami z waty, zabezpieczać korki przed zamoczeniem folią aluminiową i odpowiednio podpisywać;
- g) stosować możliwie najniższą temperaturę do jałowienia.

2. Jałowienie (sterylizacja)

Proces sterylizacji można przeprowadzić na dwa sposoby:

- **przez zabicie drobnoustrojów i ich form przetrwalnikowych** w danym środowisku w wyniku działania: (a) wysokiej temperatury - suszarka, autoklaw, a także metoda tyndalizacji; (b) promieniowania UV lub jonizującego; (c) związków chemicznych - tlenek etylenu lub propylenu;
- **przez usunięcie drobnoustrojów i ich form przetrwalnikowych z danego środowiska** (filtracja).

Wybór metody sterylizacji zależy od rodzaju sterylizowanego podłoża (środowiska), a także od wyposażenia laboratorium; należy wybrać metodę nie niszczącą podłoża a skuteczną, możliwie szybko i tanio.

Należy pamiętać, aby w pracowni mikrobiologicznej sterylizować wszystko, czym można by zakazić badaną hodowlę drobnoustrojów.

2.1. Jałowienie szkła w suszarce

Odpowiednio zapakowane szkło układa się luźno w suszarce, aby umożliwić swobodne krążenie powietrza. Czas sterylizacji (2 godz.) liczy się od momentu osiągnięcia temperatury 160°C lub rzadziej w 180°C przez 1 godzinę (nie wolno przekraczać temp. 180°C, gdyż grozi to zwęglaniem papieru i waty). Zabite zostają wszystkie mikroorganizmy, w tym ich formy przetrwalnikowe, i wirusy.

2.2. Jałowienie w autoklawie

Temperatura 100°C nie zabija form przetrwalnikowych i niektórych wirusów. Wyższą temperaturę wrzenia wody można osiągnąć po zastosowaniu nadciśnienia. W autoklawie - hermetycznie zamkniętym kotle - stosując nadciśnienie 1 atm, uzyskuje się atmosferę nasyconej pary wodnej o temp. 121°C. W tej temperaturze wszystkie mikroorganizmy i ich przetrwalniki, a także wirusy, zostają zabite w ciągu około 30 min. Czas trwania sterylizacji w autoklawie zależy od rodzaju jałowionego materiału i jego objętości.

W autoklawie jałowi się podłoża (oprócz tych, które rozkładają się w tej temperaturze), sól fizjologiczną, bufor, wodę destylowaną, narzędzia chirurgiczne, opatrunki. Nie sterylizuje się tu stężonych roztworów cukrów oraz substancji łatwo hydrolizujących, np. witamin, aminokwasów, puryn, pirymidyn, mocznika.

2.3. Jałowienie w aparacie Kocha (tyndalizacja)

W aparacie Kocha sterylizuje się substancje, które ulegają rozkładowi w temp. powyżej 100°C. Tyndalizacja polega na trzykrotnym ogrzewaniu jałowionego roztworu w temp. 100°C przez 30 min, co 24 godz. W czasie pierwszego ogrzewania zabite zostają formy wegetatywne, a przetrwalniki są aktywowane do kiełkowania, w wyniku działania wysokiej temperatury i obecności pewnych związków organicznych. Proces ten jest możliwy, dzięki pozostawieniu jałowionego materiału w temp. pokojowej przez około 24 godz. Następne ogrzewanie zabija kiełkujące przetrwalniki (które utraciły ciepłooporność). Trzecie ogrzewanie zabija ewentualne formy endospory, których kiełkowanie było opóźnione.

Ponieważ metoda tyndalizacji wykorzystuje zjawisko kiełkowania przetrwalników, możemy ją stosować tylko do jałowienia wodnych roztworów substancji umożliwiających ten proces, a więc zawierających określone związki organiczne. W ten sposób jałowi się stężone roztwory cukrów,

witamin, aminokwasów, puryn, pirymidyn, itp.

2.4. Jałowienie przez filtrację

Filtracja pozwala na jałowienie płynów, które ulegają rozkładowi pod wpływem ciepła (np. roztwór mocznika, surowica). Polega ona na przepuszczaniu jałowionego płynu przez jałowy filtr o określonej wielkości porów przy zastosowaniu nad- lub podciśnienia. Filtr zatrzymuje bakterie na zasadzie mechanicznej i/lub fizyko-chemicznej. Naczynie, do którego filtrujemy sterylizowany płyn, też musi być sterylne.

Część praktyczna

1. Przygotowanie podłoża

- a) Oznaczyć płytki/szalki Petriego na denku symbolem podłoża
- b) Rozlać następujące podłoża na płytki:
 - agar odżywczy (AO)
 - agar odżywczy dla bakterii hemolizujących z dodatkiem krwi końskiej (5%)
 - podłoże dla promieniowców (wg Pochona) z dodatkiem nystatyny (POCH)
 - podłoże dla grzybów (wg Sabourauda) z dodatkiem penicyliny, streptomycyny i glukozy (SAB)
 - podłoże dla fototrofów (BG-11; przygotowane przez prowadzącego zajęcia)
- c) Po zastygnięciu podłoża, płytki wysuszyć.
- d) Przed dokonaniem posiewów płytki należy odpowiednio podpisać flamastrem na denku, uwzględniając rodzaj posiewanej próbki, rozcieńczenie, inicjały osoby wykonującej posiew.

• Izolacja mikroorganizmów ze środowisk naturalnych

Wprowadzenie

Woda, gleba i organizmy żywe są środowiskami dogodnymi dla wzrostu różnych mikroorganizmów. Mikroorganizmy znajdują się również w powietrzu, które nie jest jednak środowiskiem sprzyjającym ich rozwojowi. To właśnie mikroorganizmy wytyczają granice biosfery, a tak szerokie rozprzestrzenienie w przyrodzie zawdzięczają następującym cechom: i) małe rozmiary; ii) krótki czas generacji; iii) różnorodność metaboliczna (zdolność do wykorzystania wielu źródeł węgla, azotu, energii, różnych końcowych akceptorów elektronów); iv) zdolność adaptacji do zmieniających się warunków środowiska; v) zdolność do życia w warunkach ekstremalnych (dotyczy to temperatury, pH, potencjału oksydo-redukcyjnego, ciśnienia osmotycznego, ciśnienia hydrostatycznego i bardzo niskich stężeń substancji pokarmowych); vi) wytwarzanie form przetrwalnikowych.

Na ogół w danym środowisku występują różne gatunki zaliczane do mikroorganizmów (bakterie, archeony, grzyby, glony). W skład mikroflory środowiska wchodzi mikroorganizmy typowe (**autochtoniczne**) i nabyte (**allochtoniczne**) w różnych proporcjach ilościowych. Jeśli chcemy wyizolować określony gatunek, musimy zastosować odpowiednie, sprzyjające dla tego gatunku podłoże i warunki hodowli (np. temperatura, dostęp tlenu), ale jednocześnie hamujące wzrost innych mikroorganizmów, prowadząc w ten sposób do selekcyjnego namnażania mikroorganizmu poszukiwanego. Na ćwiczeniach stosowane będą różne podłoża i warunki hodowli w celu uzyskania

wzrostu: sinic, promieniowców, innych bakterii oraz grzybów mikroskopowych izolowanych z różnych środowisk naturalnych. Wysiewając ilościowo pobrane próbki na podłoża stałe, można określić liczebność mikroorganizmów.

Z wyrosłych kolonii (tylko na podłożu stałym) możemy następnie założyć czyste kultury, a po ich identyfikacji, uzyskać czystą kulturę poszukiwanego przez nas gatunku.

Podstawowe pojęcia w mikrobiologii to hodowla, kolonia i czysta kultura.

Hodowla to podłoże z namnożonymi mikroorganizmami. Hodowle można prowadzić na podłożu płynnym bądź stałym. Hodowle mogą być jednogatunkowe (gdy na podłożu rośnie jeden gatunek bakterii) lub mieszane (gdy rosną w nich przynajmniej dwa gatunki).

Kolonia to widoczne gołym okiem skupisko drobnoustrojów na podłożu stałym. Na ogół kolonia powstaje w wyniku podziałów pojedynczej komórki.

Czysta kultura nazywamy hodowlę, w której bakterie stanowią potomstwo jednej, pierwotnie wyosobnionej komórki bakteryjnej.

1. Określanie liczebności mikroorganizmów

Liczebność mikroorganizmów można badać, stosując metody bezpośrednie i pośrednie. W **metodach bezpośrednich** najczęściej liczymy mikroorganizmy pod mikroskopem. Mikroorganizmy liczone są w specjalnych komorach pod niedużym powiększeniem (obiektyw 40x), a więc można w ten sposób określić tylko liczbę drobnoustrojów odpowiednio dużych (powyżej 4 μm średnicy). Ponadto ich liczba powinna przekraczać 10^6 komórek/ml.

Jeśli mikroorganizmów jest bardzo mało, należy przefiltrować odpowiednią objętość badanej wody przez specjalny czarny **filtr membranowy**, a następnie wybarwić osadzone na nim komórki, stosując 4,6-diamidyno-2-fenylindol (ang. *4,6-diamidino-2-phenylindole*, **DAPI**), który wiąże się z cząsteczkami dwuniciowego DNA. Filtr ogląda się w mikroskopie epifluorescencyjnym (z bocznym światłem UV). Komórki oświetlone światłem o długości np. 365 nm (ultrafiolet) emitują światło o długości fali 420 nm (jasnoniebieskie). Drobnoustroje liczy się w polach siatki narysowanej na okularze. Znając wielkość pól, powierzchnię filtra i objętość przesączonej próby określa się liczbę drobnoustrojów. Metoda ta jest szybka i bardzo dokładna.

Metody pośrednie polegają na odpowiednim, ilościowym wysiewie badanego materiału na podłoże stałe i uzyskaniu tylu kolonii, aby (i) można je było policzyć, (ii) błąd statystyczny był jak najmniejszy (zwykle liczy się kolonie na tych płytkach, gdzie jest ich ~ 30-300). Zakłada się, że każda kolonia wyrasta z podziałów pojedynczej komórki mikroorganizmu. Znając liczbę wyrosłych kolonii, objętość wysianej próbki i ewentualne rozcieńczenie materiału, można oszacować liczbę żywych mikroorganizmów, zdolnych do wytworzenia kolonii (ang. *viable count*) przypadających na 1 mililitr czy 1 g badanego środowiska. W metodzie tej oznaczamy w rzeczywistości nie liczbę żywych komórek, lecz liczbę **jednostek tworzących kolonie (jtk/ml)** (ang. *colony forming unit*, **cfu**). Dokładność metody płytkowej jest zadawalająca w przypadku określania gęstości bakterii w hodowli określonego gatunku o znanych wymaganiach pokarmowych. Metodę tę stosuje się np. w mikrobiologii żywności, w mikrobiologii medycznej, w analizie sanitarnej wody, gdzie ważne jest dla nas poznanie liczby żywych bakterii.

W metodach pośrednich stosuje się różne techniki wysiewu, pamiętając o tym, by wysiew robić co najmniej w dwóch powtórzeniach.

Wyróżniamy 3 typy posiewu: **posiew powierzchniowy** (kolejnych rozcieńczeń na płytce), **posiew wgłębny** (metoda płytek lanych) z wykorzystaniem **filtrów membranowych** (kolonie wyrastają na filtrze).

1. Izolowanie drobnoustrojów z powietrza metodą sedymentacyjną Kocha

Podłoże: płytki z samym agarem odżywczym oraz z dodatkiem krwi

Wykonanie:

- a) Płytki postawić w miejscu, gdzie wykonany będzie posiew.
- b) Zdjąć wieczko i wystawić pożywkę na działanie powietrza przez 10 lub 15 minut zależnie od przewidywanego skażenia powietrza. Po ekspozycji płytki zakryć.
- c) Płytki inkubować w temperaturze pokojowej 7 dni.

Odczyt:

- a) Na płytkach z agarem odżywczym i krwią zaobserwować przejaśnienia wokół kolonii, które świadczą o zdolności mikroorganizmu do hemolizy.
- b) Policzyc kolonie bakterii na szalkach (AO), a następnie obliczyć liczbę drobnoustrojów (X) w 10 dm³ (0,01 m³) powietrza według zamieszczonego niżej wzoru (według założenia Omeliańskiego na 100 cm² podłoża osiada w ciągu 5 minut tyle mikroorganizmów, ile znajduje się właśnie w 10 dm³ powietrza):

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

gdzie:

- a** – uśredniona liczba kolonii na płytce;
- b** – powierzchnia płytki w cm²;
- c** – współczynnik czasu:
(dla 5 minut wynosi 1, dla 10 – 2, dla 15 – 3);
- 100** – przeliczenie powierzchni płytki na 100 cm².
- X** – liczba drobnoustrojów w 10 dm³ (0,01 m³)

Powietrze atmosferyczne uważamy za:

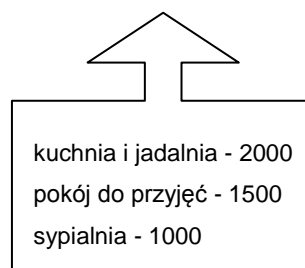
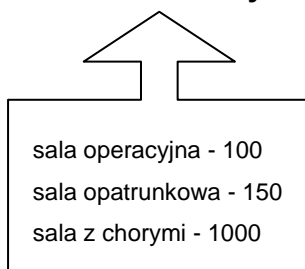
- nie zanieczyszczone, jeśli ogólna liczba bakterii w 1 m³ wynosi mniej niż 1000;
- średnio zanieczyszczone, jeśli ogólna liczba bakterii w 1 m³ wynosi od 1000 do 3000;
- silnie zanieczyszczone, jeśli ogólna liczba bakterii w 1 m³ wynosi więcej niż 3000.

Dopuszczalny stopień mikrobiologicznego zanieczyszczenia powietrza atmosferycznego wynosi 3000 mikroorganizmów w 1 m³.

Dopuszczalna liczba mikroorganizmów w 1 m³ powietrza pomieszczeń użytkowych wynosi:

pomieszczenia domów mieszkalnych

pomieszczenia służby zdrowia



pomieszczenia szkolne



Jakościowa mikrobiologiczna ocena stanu sanitarnego powietrza polega na wykrywaniu bakterii wskaźnikowych. Są to gatunki lub rodzaje wytypowane jako przedstawiciele mikroflory pochodzącej z określonych zanieczyszczeń – gleby, wód powierzchniowych, od ludzi i zwierząt.

Wskaźniki bakteriologicznego zanieczyszczenia powietrza:

- z przewodów oddechowych człowieka – gronkowce i paciorkowce hemolizujące
np. *Staphylococcus albus* czy *Streptococcus salivarius*
- cząstkami gleby – promieniowce,
- cząstkami wód powierzchniowych – *Pseudomonas fluorescens*.

2. Izolowanie mikroorganizmów z naturalnego zbiornika wodnego i szacowanie ich liczebności

Podłoże: agar odżywczy (AO), podłoże dla promieniowców (POCH), podłoże dla grzybów (SAB), płynne podłoże dla sinic (fototrofy) (BG-11)

Wykonanie:

a) Rozcieńczyć wodę ze zbiornika (10^{-2} i 10^{-3}) wg schematu przedstawionego na str. 11 (Rys. 1).

Uwaga! Pierwsze rozcieńczenie: dziesięciokrotne - 10^{-1} wykonane jest przez prowadzącego zajęcia.

- Wlać do 2 probówek po 4,5 ml soli fizjologicznej (RF; 0,9 % NaCl).
 - Do pierwszej probówki odmierzyć pipetą (à 1 ml) 0,5 ml rozcieńczenia 10^{-1} badanej wody. Pipetę odłożyć, a zawartość probówki dobrze wymieszać. W ten sposób badana woda została rozcieńczona stukrotnie (10^{-2}).
 - Przenieść 0,5 ml rozcieńczenia 10^{-2} do następnej probówki z solą fizjologiczną i wymieszać. Uzyskano kolejne (tysięckrotne) rozcieńczenie badanej wody (10^{-3}).
- b) Odebrać po 1 ml z dwóch rozcieńczeń (10^{-1} i 10^{-2}) do probówek typu Eppendorf i inkubować w termobloku 15 min w 80°C (próby do oceny liczby bakterii sporujących)
- c) Wykonać posiew powierzchniowy. Na płytki wysiać po 0,1 ml rozcieńczeń 10^{-2} i 10^{-3} w 2 powtórzeniach.
- d) Płytki inkubować w następujących warunkach:
- mikroorganizmy saprofityczne – AO, temp. 28°C, 48 godz.
 - mikroorganizmy sporujące – AO, temp. 28°C, 48 godz.
 - mikroorganizmy termofilne – AO, temp. 55°C, 24 godz.
 - mikroorganizmy psychrofilne - AO, temp. 20°C, 48 godz.
 - promieniowce – POCH, temp. 26°C, 7 dni
 - grzyby - SAB, temp. 26°C, 7 dni
- e) Hodowle fototrofów (sinice) zostały założone 6 tyg. wcześniej (inkubacja w świetle, temp. 18°C)

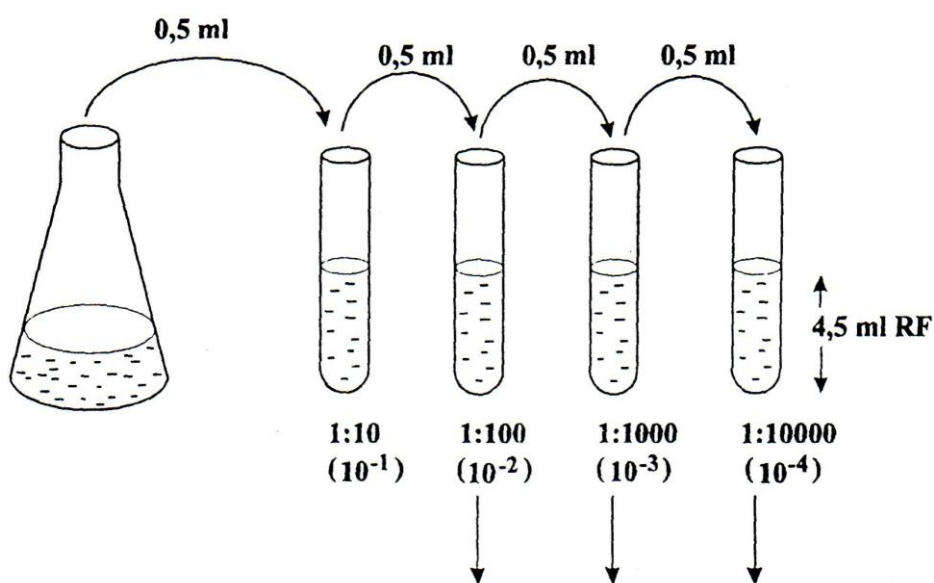
Odczyt:

- Po inkubacji w odpowiednich warunkach (jw.) zaobserwować zróżnicowaną morfologię kolonii mikroorganizmów.
- Policzyć kolonie na płytkach. Do liczenia należy wziąć te płytki, na których wyrosło od 30 do 300 kolonii. Obliczyć liczbę jtk w 1 ml badanej wody (X) wg wzoru:

$$X = a \times b \times 10$$

gdzie **a** - średnia liczba bakterii na płytkach;
b - odwrotność wysianego rozcieńczenia;
10 - przeliczenie na 1 ml.
X – liczba jednostek tworzących kolonie (jtk)

- Wyniki należy wpisać do tabeli (Tab. 1, str. 12).
- Obserwować zielone i czerwone sinice (cyjanobacterie).



wysiew po 0,1 ml z probówek 10^{-2} i 10^{-3} (woda)
oraz 10^{-3} i 10^{-4} (gleba) na dwie płytki z odpowiednim podłożem

Rys. 1. Schemat rozcieńczeń dziesięciokrotnych.

3. Izolowanie mikroorganizmów z gleby i określanie ich liczebności

Podłoże: agar odżywczy (AO), podłoże dla promieniowców (POCH), podłoże dla grzybów (SAB)

Wykonanie:

- Przygotować roztwór glebowy. W tym celu odważyć 10 g gleby i wsypać do kolby zawierającej 90 ml soli fizjologicznej i całość wytrząsać kilka minut w celu wymycia mikroorganizmów z cząstek gleby. Poczekać, aż cząstki stałe opadną na dno. Taki roztwór glebowy traktujemy jako rozcieńczenie 10^{-1} (przygotowane przez prowadzącego zajęcia).

- b) Przygotować dwa rozcieńczenia gleby (10^{-3} i 10^{-4}) tak jak w punkcie 3, otrzymując od prowadzącego zajęcia roztwór glebowy rozcieńczony 10^{-2} .
- c) Odebrać po 1 ml z dwóch rozcieńczeń (10^{-1} i 10^{-2}) do probówek typu Eppendorf i inkubować w termobloku 15 min w 80°C (próby do oceny liczby bakterii sporujących)
- d) Wykonać posiew powierzchniowy. Na płytki wysiać po 0,1 ml rozcieńczeń 10^{-3} i 10^{-4} w 2 powtórzeniach.
- e) Płytki inkubować w poniższych warunkach:
- mikroorganizmy saprofityczne – AO, temp. 28°C, 48 godz.
 - mikroorganizmy sporujące – AO, temp. 28°C, 48 godz.
 - mikroorganizmy termofilne – AO, temp. 55°C, 24 godz.
 - mikroorganizmy psychrofilne – AO, temp. 20°C, 48 godz.
 - promieniowce – POCH, temp. 26°C, 7 dni
 - grzyby – SAB, temp. 26°C, 7 dni

Odczyt:

- a) Po inkubacji w odpowiednich warunkach (jw.) zaobserwować zróżnicowaną morfologię kolonii mikroorganizmów.
- b) Policzyć kolonie na płytkach, a następnie obliczyć liczbę bakterii w 1 g gleby, stosując wzór z punktu 2 (str. 10).
- c) Wyniki należy wpisać do tabeli (Tab. 1)
- d) Porównać skład ilościowy (jtk/ml lub 1 g gleby) i jakościowy danego typu bakterii/grzybów w badanej wodzie i glebie.

Tabela 1. Określenie liczby bakterii i grzybów w wodzie i glebie.

Rodzaj/cecha mikroorganizmu	Średnia liczba kolonii bakterii/grzybów na podłożu na rozcieńczeniu:				Liczba jtk* w 1 ml wody lub w 1 g gleby
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	
WODA					
Saprofity	x			x	
Sporujące			x	x	
Termofilne	x			x	
Psychrofilne	x			x	
Promieniowce	x			x	
Grzyby	x			x	
GLEBA					
Saprofity	x	x			
Sporujące			x	x	
Termofilne	x	x			
Psychrofilne	x	x			
Promieniowce	x	x			
Grzyby	x	x			

* jtk = jednostka tworząca kolonię (cfu, ang. colony forming unit)

4. Izolowanie mikroorganizmów z innych środowisk

Podłoże: agar odżywczy (AO)

Wykonanie:

- a) Na jednej płytce wykonać posiew dowolny np. kaszlnąć, dotknąć palcem brudnym i przetartym etanolem, dotknąć jakimś przedmiotem, itp.
- b) Płytkę inkubować w temperaturze pokojowej 7 dni.

Odczyt:

Obserwować wzrost bakterii.

Zagadnienia do opracowania

1. Podłoża mikrobiologiczne.
2. Sterylizacja i sposoby jej przeprowadzania.
3. Metody izolowania mikroorganizmów z różnych środowisk naturalnych.
4. Podstawowe pojęcia mikrobiologiczne - hodowla, czysta kultura, kolonia
5. Określanie liczebności mikroorganizmów – metody bezpośrednie i pośrednie.

Ćwiczenie 2

• Izolacja czystych kultur mikroorganizmów z różnych środowisk naturalnych

Wprowadzenie

Część badań środowiskowych opiera się na globalnej charakterystyce procesów zachodzących w danym środowisku bez identyfikacji konkretnych mikroorganizmów. Jednakże w pewnych typach analiz (np. oznaczanie czystości wód i żywności) oraz w biotechnologii i mikrobiologii medycznej wymagana jest identyfikacja konkretnych gatunków. Trzeba więc wybrać odpowiednią metodę izolacji czystej kultury tego mikroorganizmu, którego szukamy. Do tego celu stosuje się:

- a) podłoża selekcyjne
- b) selekcyjne warunki inkubacji
- c) odpowiednie rozcieńczenie materiału,

aby umożliwić wzrost wybranym mikroorganizmom, a zahamować wzrost innych. Jeśli w danym środowisku poszukiwanych bakterii jest mało w stosunku do pozostałych mikroorganizmów można zastosować technikę **wzbogacania hodowli** w mikroorganizmy, których szukamy. Ostatecznie niezbędne jest otrzymanie czystej kultury, aby jednoznacznie potwierdzić obecność poszukiwanych bakterii (np. bakterii wskaźnikowych).

Czystą kulturę możemy uzyskać stosując różne metody:

- **metody bezpośrednie** - pobranie pojedynczej komórki i umieszczenie jej w jałowym podłożu. Można to zrobić za pomocą **mikromanipulatora** lub, w przypadku większych mikroorganizmów, np. drożdży, za pomocą mikropipety pasterowskiej i mikroskopu.
- **metody pośrednie** – oparte na odpowiednich posiewach na płytce z podłożem stałym. Stosowane są różne techniki, aby po wykonaniu posiewu otrzymać pojedyncze kolonie:
 - a) **metoda suchych rozcieńczeń (posiew redukcyjny)**
 - b) **wysiew powierzchniowy**
 - c) **metoda płytek lanych**

Część praktyczna

1. Morfologia kolonii mikroorganizmów

Wykonanie:

Wybrać jedną z kolonii wyrosłych na agarze odżywczym (ćw. 1) i opisać w zeszycie jej morfologię, uwzględniając:

- wielkość (średnicę) w mm;
- typ wzrostu (na powierzchni lub częściowo wrośnięta w podłoże);
- barwę kolonii i jej otoczenia (barwnik może dyfundować do podłoża);
- przejrzystość (przejrzysta, nieprzejrzysta, opalizująca);

- kształt (kolonia może być okrągła z brzegiem o zróżnicowanym wyglądzie; może być rozgałęziona, amebowata, pofałdowana, strzępiasta, nieregularna; punkt 6, str. 45);
- brzeg (gładki, falisty, płatkowaty, ząbkowany, nitkowaty);
- wzniesienie (płaska, wypukła, pępkowata, kraterowata, z wałem brzeżnym);
- powierzchnię (gładka, lśniąca, matowa, pomarszczona, pofałdowana, krzaczkowata, koncentrycznie pierścieniowata);
- strukturę (ziarnista, włóknista, skórzasta, krucha, ciągnąca się - strukturę bada się za pomocą ezy).

Należy przy tym pamiętać, że morfologia kolonii zależy nie tylko od rodzaju mikroorganizmu, ale również od składu podłoża i warunków hodowli. Hodowla danego mikroorganizmu może charakteryzować się też swoistym zapachem.

2. Izolacja czystych kultur mikroorganizmów

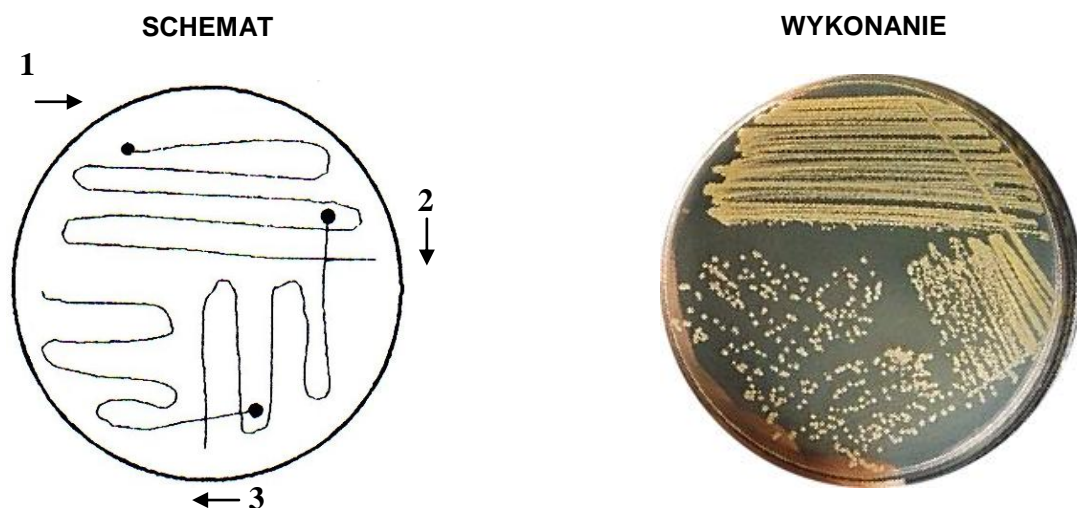
Podłoże: agar odżywczy

Wykonanie:

- Wybraną i opisaną kolonię z punktu 1 posiać metodą posiewu redukcyjnego na płytkę (Rys. 2).
- Płytkę inkubować w temperaturze pokojowej 7 dni.

Odczyt:

Sprawdzić, czy uzyskana hodowla jest jednorodna i czy pojedyncze kolonie mają taką samą morfologię jak pobrana kolonia wyjściowa, a więc czy rzeczywiście udało się uzyskać czystą kulturę.



Rys. 2. Posiew redukcyjny.

- 1 - początek linii posiewu; 2 i 3 - miejsca, w których przerywa się posiew i opala eżę w celu usunięcia nadmiaru materiału.

• Obserwacje mikroskopowe różnych form morfologicznych i wybranych struktur bakterii wyizolowanych ze środowisk naturalnych

Wprowadzenie

Komórki bakteryjne są zwykle bardzo małe i charakteryzują się małą gęstością - słabo załamują i pochłaniają światło, dlatego też trudno jest odróżnić je od podłoża. Przed oglądaniem w mikroskopie, najczęściej się je więc wybarwia, stosując różne metody w zależności od rodzaju bakterii oraz celu, jaki chcemy osiągnąć. W barwieniu prostym stosujemy tylko jeden barwnik, natomiast w złożonym co najmniej dwa barwniki, a często również różne zaprawy (bejce) i odbarwiacze. Przykładem barwienia złożonego jest **metoda Grama**, która spełnia ważną rolę w klasyfikacji i identyfikacji bakterii. Oprócz barwienia pozytywnego, w którym oglądamy wybarwione bakterie na bezbarwnym tle, istnieją też barwienia negatywne, w których wybarwia się tło (czyli szkiełko podstawowe) za pomocą tuszu bądź nigrozyny. W ten sposób uwidacznia się otoczki bakteryjne, które trudno wybarwiają się metodami pozytywnymi.

Podstawowe kształty bakterii to kula (ziarniaki), walec (paleczki i laseczki) i skręcony walec (przecinkowce, krętki i śrubowce). Istnieją też bakterie o kształtach nieregularnych, np. maczugowce. Bakterie mogą tworzyć charakterystyczne układy komórek, takie jak: dwoinki, pakiety, grona (takie układy tworzą ziarniaki), a także łańcuszki (ziarniaki i laseczki) a promieniowce splecione nici, tzw. pseudogrzybnie. Morfologia bakterii, pleśni czy drożdży – grzybów mikroskopowych izolowanych na podłożu stałym w postaci kolonii przedstawiona jest w Addendum (str. 43).

Dzięki barwieniu metodą Grama można podzielić bakterie na dwie grupy (bakterie gramdodatnie i gramujemne) na podstawie odmiennego typu budowy ściany komórkowej, otaczającej błonę cytoplazmatyczną. Ściana komórkowa zawiera warstwę mureiny, która u bakterii gramdodatnich jest gruba, zaś u gramujemnych – cienka i pokryta błoną zewnętrzną.

Barwienia pozwalają również uwidocznnić pewne elementy strukturalne komórki (np. otoczki, stosując barwienie negatywno-pozytywne). Niektóre gatunki bakterii (np. laseczki) wytwarzają endospory, które umożliwiają im przetrwanie w niekorzystnych warunkach środowiska. Można je uwidocznnić, stosując barwienie złożone, w którym stosuje się zieleń malachitową (na gorąco) i safraninę.

Część praktyczna

1. Barwienie proste

Materiał: Dowolnie wybrana kolonia bakterii z posiewów środowiskowych: woda lub gleba

Wykonanie:

a) Przygotowanie preparatu

- Zrobić rozmaz na szkiełku podstawowym.
- Wysuszyć go w temperaturze pokojowej.
- Utrwalić, przeprowadzając ostrożnie szkiełko trzykrotnie przez płomień palnika. Przed barwieniem poczekać, aż szkiełko ostygnie.

b) Barwienie preparatu

- Zalać cały preparat fioletem krystalicznym.
- Po 1 minucie zlać barwnik i przemywać szkiełko wodą wodociągową aż do momentu, gdy woda spływająca z preparatu będzie bezbarwna.
- Delikatnie usunąć wodę ze szkiełka za pomocą bibuły.

Odczyt:

- Po całkowitym wyschnięciu preparatu oglądać go pod mikroskopem, najpierw pod małym powiększeniem, a następnie stosując obiektyw imersyjny.
- Narysować wszystkie oglądane formy morfologiczne bakterii (pałeczki, laseczki, ziarniaki) i tworzone przez te bakterie układy komórek, np. łańcuszki lub grona.

2. Barwienie złożone metodą Grama

Materiał: Szczepy bakteryjne

- *Escherichia coli* i *Bacillus megaterium*
- *Proteus vulgaris* i *Micrococcus luteus*

Roztwory stosowane do barwienia

- fiolet krystaliczny
- safranina
- płyn Lugola
- 95% etanol

Wykonanie:

a) Przygotowanie preparatu

- Na szkiełku podstawowym zmieszać hodowle bakterii gramujemnej (np. *E. coli*) i gramodatniej (np. *Bacillus megaterium*).
- Zrobić rozmaz, wysuszyć i utrwalić jak w punkcie 1 a).

b) Barwienie metodą Grama

- Preparat barwić fioletem krystalicznym przez 2 minuty.
- Zlać fiolet, wypłukać szkiełko płynem Lugola i zalać je płynem Lugola na 2 minuty.
- Spłukać preparat wodą, osuszyć bibułą i zalać na 30 sekund 95% etanolem.
- Spłukać wodą, osuszyć bibułą i dobarwiać safraniną przez 5 minut.
- Spłukać wodą, osuszyć

Odczyt:

- Po całkowitym wyschnięciu preparatu oglądać go pod mikroskopem, najpierw pod małym powiększeniem, a następnie stosując obiektyw imersyjny.

b) Narysować wszystkie oglądane formy morfologiczne bakterii i tworzone przez te bakterie układy komórek, uwzględniając kolor, na jaki wybarwiły się komórki poszczególnych bakterii.

3. Oglądanie gotowych preparatów:

a) otoczki *B. megaterium*

barwienie negatywno-pozytywne (na tle ciemnego tuszu widać niewybarwione otoczki, a wewnątrz komórki wybarwione safraniną na różowo);

b) endospory *B. megaterium*

barwienie złożone (zieleń malachitowa na gorąco wybarwia endospory na zielono, zaś safranina komórki wegetatywne na różowo)

c) promieniowce

barwienie proste fioletem krystalicznym

d) grzyby

barwienie proste fioletem krystalicznym

e) cyjanobakterie

preparat przyżyciowy lub barwienie proste

Schematy obrazów mikroskopowych wybranych bakterii i grzybów zamieszczono w Addendum (str. 43).

Zagadnienia do opracowania

1. Metody izolowania czystych kultur - bezpośrednie i pośrednie.
2. Podstawowe kształty komórek bakteryjnych i tworzone przez nie układy.
3. Technika sporządzania preparatów mikroskopowych (cel i sposoby utrwalania preparatów).
4. Podział metod barwienia: barwienia proste i złożone; pozytywne i negatywne.
5. Zasada barwienia metodą Grama.
6. Bakterie gramujemne i gramododatnie.
7. Podstawy morfologii grzybów mikroskopowych.

Ćwiczenie 3

- **Badanie rozkładu związków organicznych oraz przemian związków azotu przez mikroorganizmy występujące w wodzie i glebie**

Wprowadzenie

Składniki pożywienia, to związki, które po przyswojeniu przez komórkę bakteryjną, włączają się do jej metabolizmu jako budulec, źródło energii lub donor elektronów. Każda bakteria musi mieć zapewnione do wzrostu podstawowe źródło węgla, azotu, siarki i fosforu oraz źródło energii.

Typ pokarmowy bakterii wskazuje zwykle na:

- 1) główny proces, za pomocą którego bakteria zdobywa energię
fototrofy wykorzystują energię świetlną
chemotrofy wykorzystują energię chemiczną,
- 2) donory elektronów przy redukcji NAD lub NADP
litotrofy wykorzystują związki nieorganiczne
organotrofy wykorzystują związki organiczne
- 3) na główne źródło węgla
autotrofy wykorzystują dwutlenek węgla
heterotrofy wykorzystują związki organiczne

Chemolitoautotrof jest więc bakterią samożywną, która jako główne źródło energii wykorzystuje energię chemiczną, uzyskaną z utleniania pierwiastków lub związków nieorganicznych, np. **bakterie nitryfikacyjne** wykorzystujące sole amonowe NH_4^+ (**nitrozobakterie**) czy azotyny NO_2^- [azotany (III)] (**nitrobakterie**). Głównym źródłem węgla dla chemolitoautotrofów jest dwutlenek węgla, więc potrafią one rosnać na podłożach mineralnych.

Chemoorganoheterotrof to mikroorganizm, dla którego związek organiczny jest źródłem węgla, energii i elektronów. Ten związek organiczny może być prostym związkiem drobnocząsteczkowym jak glukoza czy cytrynian, lub też złożonym związkiem wielkocząsteczkowym jak celuloza, białko, skrobia czy tłuszcz - odpowiednio dla bakterii o właściwościach celulozowych, proteolitycznych, amylolitycznych czy lipolitycznych. Pierwsze etapy rozkładu związków wielkocząsteczkowych zachodzą na zewnątrz komórek dzięki wydzielanym przez drobnoustroje ektoenzymom.

Niektóre bakterie potrafią syntetyzować wszystkie niezbędne im związki z jednego, prostego związku węgla i soli mineralnych. Nazywamy je **prototrofami**. Inne, zwane **auksotrofami**, nie potrafią syntetyzować pewnych związków, które muszą zatem znajdować się w ich podłożu. Związki te, zwane czynnikami wzrostowymi, to aminokwasy, witaminy, zasady purynowe i pirymidynowe i inne.

Bakterie potrafią wykorzystać jako źródło azotu nie tylko związki nieorganiczne (jony NH_4^+ , NO_3^-) i organiczne (np. aminokwasy), ale również azot cząsteczkowy. Zdolność do wiązania azotu cząsteczkowego jest cechą występującą u wielu różnych bakterii zarówno wolnożyjących jak i symbiotycznych, autotroficznych jak i heterotroficznych, tlenowych i beztlenowych. Za zredukowanie cząsteczki N_2 do NH_4^+ , gdy brakuje w środowisku innych, dostępnych form azotu, odpowiedzialny jest **kompleks enzymatyczny nitrogenazy**.

- Wszystkie podłoża wykonane zostały przez prowadzącego zajęcia.
- Do każdego z eksperymentów należy zostawić podłoże bez posiewu (kontrola negatywna) oraz dołączyć posiew znanego gatunku bakterii przeprowadzającego dany proces (kontrola pozytywna).
- Wyniki podawać jako **miano bakterii** lub jako **liczbę bakterii tworzących kolonie (jtk)** w przeliczeniu na 1 ml wody/1 g gleby. Wyniki wpisać do tabeli (Tab. 2, str. 24).

Miano bakterii to najmniejsza objętość wody/masa gleby, w której wykrywa się bakterie.

1. Oznaczanie miana bakterii celulolitycznych

Podłoże: półpłynne z karboksymetylocelulozą (2,5%); rozlane do probówek (CEL)

Wykonanie:

a) Przygotowane podłoża zaszczepić:

- próbką wody (rozc. 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2}) o objętości 1 ml
- próbką gleby (rozc. 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) o objętości 1 ml
- kroplą nocnej hodowli bulionowej szczepu kontrolnego

b) Hodowle inkubować w temperaturze pokojowej 7 dni.

Odczyt:

Obserwować zmiany konsystencji podłoża. O obecności bakterii celulolitycznych świadczy jego upłynnienie. Wynik podać jako miano bakterii.

2. Oznaczenie liczby bakterii (jtk) rozkładających skrobię

Podłoże: agar odżywczy ze skrobią (1%) (AS)

Wykonanie:

a) Wykonać posiew powierzchniowy oraz rysą. Na płytce wysiać po 0,1 ml rozcieńczeń wody 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} i gleby 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} w 2 powtórzeniach. Do posiewu rysą wykorzystać pełen zakres rozcieńczeń od 10^0 do 10^{-5} .

Szczep kontrolny posiać rysą z płynnej hodowli bulionowej.

b) Hodowle inkubować w temperaturze pokojowej 7 dni.

Odczyt:

Powierzchnię płytek zalać płynem Lugola, a następnie policzyć kolonie, wokół których wystąpiła strefa przejaśnienia świadcząca o zajściu procesu hydrolizy skrobi. W posiewach rysą odnaleźć rozcieńczenie, w którym znajdują się bakterie rozkładające skrobię. Wynik podać jako jtk/ml bakterii.

3. Oznaczenie liczby bakterii (jtk) rozkładających tłuszcze

Podłoże: agar odżywczy z tłuszczem (3%) (TŁ)

Wykonanie:

Posiewy wykonać analogicznie do punktu 2 (rozkład skrobi).

Odczyt:

Powierzchnię płytek zalać 20 % roztworem CuSO_4 . Pojawienie się szmaragdowego zabarwienia wokół linii wzrostu świadczy o hydrolizie tłuszczu. W posiewach rysą odnaleźć rozcieńczenie, w którym znajdują się bakterie rozkładające tłuszcz. Wynik podać jako jtk/ml bakterii.

4. Oznaczenie liczby bakterii (jtk) rozkładających białka

Podłoże: agar odżywczy z mlekiem (M)

Wykonanie:

Posiewy wykonać analogicznie do punktu 2 (rozkład skrobi).

Odczyt:

Policzyć kolonie, wokół których wystąpiła strefa przejaśnienia świadcząca o zajściu procesu hydrolizy kazeiny (białko mleka). W posiewach rysą odnaleźć rozcieńczenie, w którym znajdują się bakterie rozkładające kazeinę. Wynik podać jako jtk/ml bakterii.

5. Oznaczanie miana bakterii amonifikacyjnych

Podłoże: płynne, 1% woda peptonowa (PEP)

Wykonanie:

a) Przygotowane podłoża zaszczerpić:

- próbką wody (rozc. od 10^{-1} do 10^{-7}) o objętości 1ml
- próbką gleby (rozc. od 10^{-1} do 10^{-7}) o objętości 1ml
- kroplą nocnej hodowli bulionowej szczepu kontrolnego

b) Hodowle inkubować w temperaturze pokojowej 7 dni.

Odczyt:

Obserwować wzrost bakterii (zmętnienie, obecność kożucha, osadu). Wykonać oznaczenie odczynu pH podłoża testem paskowym. Oznaczyć obecność amoniaku z pomocą odczynnika Nesslera (chlorek rtęci, jodek potasu, zasada potasowa; porcelanowe płytki z wgłębieniem; wykonuje prowadzący zajęcia). Stwierdzenie wzrostu bakterii, obecności amoniaku (pomarańczowe

zabarwienie z odczynnikiem Nesslera) oraz alkalizacji podłoża do pH ok. 8,0-9,0 świadczy o procesie amonifikacji. Wynik podać jako miano bakterii.

6. Oznaczanie miana bakterii nityfikacyjnych I i II fazy

Podłoże: mineralne płynne wg Winogradskiego, kolbki (WIN)

Wykonanie:

- a) Przygotowane podłoża zaszczyć:
- próbką wody (rozc. 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2}) o objętości 1ml
 - próbką gleby (rozc. 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) o objętości 1ml
- b) Hodowle inkubować w temperaturze pokojowej 14 dni.

Odczyt:

Po 7 i 14 dniach inkubacji obecność bakterii nityfikacyjnych I fazy (nitrozobakterii) potwierdzić na podstawie wykrycia azotynów $N-NO_2$ [azotanów (III)] za pomocą odczynnika Griessa (α -naftyloamina, kwas octowy, kwas sulfanilowy; na płytce porcelanowej; wykonuje prowadzący zajęcia). Intensywny czerwony kolor świadczy o obecności azotynów.

Obecność bakterii nityfikacyjnych II fazy (nitrobakterii) potwierdzić na podstawie wykrycia azotanów $N-NO_3$ [azotanów (V)] testem paskowym lub odczynnikiem z brucyną (na płytce porcelanowej; wykonuje prowadzący zajęcia). Test paskowy interpretować wg skali kolorymetrycznej załączonej do testu. Pozytywna reakcja z brucyną – kolor czerwono-rudy świadczy o obecności azotanów. Wynik podać jako miano bakterii.

7. Oznaczanie miana bakterii denityfikacyjnych

Podłoże: próbki z płynnym podłożem wg Giltaya (wysoki słup), z rurką Durhama (GIL)

Wykonanie:

- a) Przygotowane podłoża zaszczyć:
- próbką wody (rozc. od 10^{-1} do 10^{-7}) o objętości 1 ml
 - próbką gleby (rozc. od 10^{-1} do 10^{-7}) o objętości 1 ml
 - kroplą nocnej hodowli bulionowej szczepu kontrolnego
- b) Hodowle inkubować w temperaturze pokojowej 7 dni.

Odczyt:

Obserwować wzrost bakterii. O obecności bakterii denityfikacyjnych świadczy zmętnienie podłoża oraz gaz w rurce Durhama. Wynik podać jako miano bakterii.

8. Oznaczanie miana bakterii wiążących azot

Podłoże: płynne bezazotowe z mannitolem (1%) i sacharozą; kolbki i probówki typu Corning (MAN)

Wykonanie:

a) Przygotowane podłoża w kolbkach zaszczepić:

- próbką wody (rozc. 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2}) o objętości 1 ml
- próbką gleby (1 g gleby oraz rozc. 10^{-1} , 10^{-2}) o objętości 1 ml
- kroplą nocnej hodowli bulionowej szczepu kontrolnego

Do probówek dodać tylko materiał nierozcieńczony.

b) Probówki zamknąć zakrętką w celu odcięcia dostępu tlenu. Hodowle inkubować w temperaturze pokojowej 7 dni.

Odczyt:

Zaobserwować wzrost *Azotobacter spp.* w postaci błonki na powierzchni pożywki oraz obecność komórek z otoczką (po dwie komórki) w tuszowym preparacie mikroskopowym (**barwienie proste negatywne**).

W tym celu należy:

- pobrać próbkę z błonki na szkiełko podstawowe
- dodać kroplę tuszu chińskiego i wykonać rozmaz
- można preparat dobarwić błękitem metylenowym
- obserwować komórki z otoczkami

Jeśli w kolbce z pożywką bezazotową namnożył się *Clostridium pasteurianum*, z dna powinny odrywać się pęcherzyki gazu. W probówkach, po odkręceniu nakrętki, czuć jest zapach kwasu masłowego (efekt fermentacji sacharozy w warunkach beztlenowych).

Wykonać preparat mikroskopowy:

- z dennej części probówki pobrać pipetą pasterowską nieco hodowli, nanieść kroplę na szkiełko podstawowe i zmieszać z równą objętością płynu Lugola. Przykryć szkiełkiem nakrywkowym.
- obserwować w mikroskopie laseczki z zabarwionym na fioletowo materiałem zapasowym (granulozą) wypełniającym komórki.

Tabela 2. Określenie miana lub liczby bakterii (jtk) o różnych właściwościach metabolicznych

Grupa bakterii	Średnia liczba kolonii/miano bakterii na podłożu na rozcieńczeniu:								Liczba jtk* w 1 ml wody /1 g gleby lub miano bakterii
	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	
WODA									
Celulolityczne				x	x	x	x	x	
Lipolityczne	x				x	x	x	x	
Amylolityczne	x				x	x	x	x	
Proteolityczne	x				x	x	x	x	
Amonifikacyjne	x								
Nitryfikacyjne I f.				x	x	x	x	x	
Nitryfikacyjne II f.				x	x	x	x	x	
Denitryfikacyjne	x								
Wiążące azot N ₂				x	x	x	x	x	
GLEBA									
Celulolityczne	x				x	x	x	x	
Lipolityczne	x	x	x				x	x	
Amylolityczne	x	x	x				x	x	
Proteolityczne	x	x	x				x	x	
Amonifikacyjne	x								
Nitryfikacyjne I f.	x				x	x	x	x	
Nitryfikacyjne II f.	x				x	x	x	x	
Denitryfikacyjne	x								
Wiążące azot N ₂	x			x	x	x	x	x	

* jtk = jednostka tworząca kolonię (cfu, ang. *colony forming unit*)

Zagadnienia do opracowania

1. Źródła pierwiastków biogennych i energii.
2. Typy pokarmowe bakterii.
3. Różnorodność źródeł węgla i azotu wykorzystywanych przez bakterie.

Ćwiczenie 4

• Aktywność oddechowa i fermentacyjna mikroorganizmów

Wprowadzenie

Chemotrofy uzyskują energię z utleniania pierwiastków bądź związków chemicznych. Proces utleniania zachodzący z udziałem łańcucha transportu elektronów i egzogenego końcowego akceptora elektronów nazywamy **oddychaniem**. W tym procesie ATP powstaje w wyniku **fosforylacji oksydacyjnej**. Ilość uwalnianej energii jest tym większa, im dłuższy jest łańcuch przonośników elektronów, dlatego też najbardziej wydajne energetycznie jest oddychanie tlenowe, w którym końcowym egzogenym akceptorem jest tlen.

Istnieje duża grupa bakterii względnie (warunkowo) tlenowych, które - przy braku tlenu - mogą oddychać beztlenowo, wykorzystując utlenione związki nieorganiczne, znajdujące się w podłożu (egzogenne), jako końcowe akceptory elektronów. W oddychaniu azotanowym (którego przykładem jest denitryfikacja) akceptorem są azotany, w oddychaniu siarczanowym – siarczany. Beztlenowce nie potrafią wykorzystać tlenu jako akceptora elektronów. Niektóre z nich wykorzystują inne nieorganiczne akceptory, np. dwutlenek węgla (bakterie homoacetogenne czy archeony metanogenne), Fe^{+3} , arseniany i inne.

W warunkach braku tlenu i innych egzogennych akceptorów bakterie mogą też uzyskiwać energię z utleniania związków organicznych, bez udziału łańcucha transportu elektronów, z wykorzystaniem endogennych akceptorów elektronów. Taki sposób uzyskiwania energii nazywamy **fermentacją**. W metabolizmie fermentacyjnym ATP powstaje w wyniku **fosforylacji substratowej**. Nazwy fermentacji wywodzą się od najbardziej charakterystycznego produktu końcowego, którym jest związek (lub związki) organiczny np. kwas mlekowy w fermentacji mlekowej, w której endogennym akceptorem elektronów jest pirogronian.

Część praktyczna

1. Określenie stosunku bakterii do tlenu - wzrost w warunkach mniejszego dostępu tlenu

Podłoże: bulion odżywczy – niski słup podłoża w próbkach

Wykonanie:

a) Przygotowane podłoża zaszczepić:

- próbką wody (rozc. 10^{-1} , 10^{-2}) o objętości 1 ml
- próbką gleby (10^{-2} , 10^{-3}) o objętości 1 ml
- kroplą nocnej hodowli bulionowej szczepów kontrolnych : *Escherichia coli* (warunkowy tlenowiec)
: *Micrococcus luteus* (tlenowiec)

Przygotować 2 powtórzenia każdej próby.

b) Po posiewie – jeden komplet probówek inkubować w warunkach tlenowych w temperaturze pokojowej przez 7 dni. Drugi komplet zamknąć w anaerostacie, ustalić atmosferę na 6% zawartości O_2 i inkubować w temperaturze pokojowej przez 7 dni.

Odczyt:

Obserwować wzrost lub jego brak w poszczególnych probówkach. Określić stosunek do tlenu mikroorganizmów z badanych środowisk, zaobserwować różnice.

2. Oznaczanie wytwarzania katalazy przez szczepy środowiskowe

Podłoże: agar odżywczy

Wykonanie:

- a) Posiać 5 czystych kultur „wężykiem” na płytkę z podłożem.
- b) Inkubować w 37°C 24 godz.
- c) Przesiać na świeże podłoże na dobę przed odczytem (inkubacja j.w.)

Odczyt:

Świeże hodowle szczepów bakterii wyizolowanych ze środowiska wodnego oraz gleby zalać wodą utlenioną. Wydzielanie się pęcherzyków gazu świadczy o obecności katalazy - enzymu rozkładającego nadtlenek wodoru na wodę i tlen.

3. Oddychanie bakterii w warunkach beztlenowych

3.1 Oddychanie azotanowe, w tym denitryfikacja – podłoże wg Giltaya (wykonane w ćw.1)

3.2 Oddychanie siarczanowe

Podłoże: podłoże wg Starkey'a w probówkach

Wykonanie:

- a) Przygotowane podłoża zaszczepić:
 - próbką wody (rozc. od 10^{-1} do 10^{-5}) o objętości 1 ml
 - próbką gleby (rozc. od 10^{-1} do 10^{-5}) o objętości 1 ml
 - kroplą nocnej hodowli bulionowej szczepu kontrolnego
- b) Hodowle inkubować w temperaturze pokojowej 7 dni.

Odczyt:

Obserwować wzrost bakterii, o którym świadczy zmętnienie podłoża, występowanie czarnego osadu i charakterystyczny zapach siarkowodoru.

Określić miano bakterii zdolnych do oddychania siarczanowego [redukcją siarczany (VI)].

4. Oznaczanie intensywności oddychania mikroorganizmów środowiskowych na podstawie redukcji błękitu metylenowego.

Podłoże: bulion odżywczy w probówkach

Wykonanie:

a) Przygotować wodę oraz rozcieńczenie gleby 10^{-1} , następnie zmieszać z bulionem wg schematu:

nr próbówki	bulion (ml)	woda/gleba	
1	5	5	woda nierozcieńczona
2	5	5	gleba rozc. 10^{-1}
3 (kontrola +)	5	5	hodowla <i>E. coli</i>
4 (kontrola -)	10	-	

b) Do każdej próbówki dodać 0,1 ml wodnego roztworu błękitu metylenowego. Zawartość próbek dokładnie wymieszać i wstawić je do termostatu o temp. 37°C.

Odczyt:

Obserwować zabarwienie zawartości próbek po 10 min, po 1 godz. i po 2 godz. Zanotować czas odbarwienia błękitu w poszczególnych probówkach.

Po zakończeniu obserwacji zawartość próbek ponownie wymieszać. Wyjaśnić obserwowane zmiany zabarwienia.

5. Zdolność bakterii do fermentacji cukru

5.1 Fermentacja sacharozy – (beztlenowa hodowla *C. pasteurianum*; wykonane w ćw. 3)

5.2 Fermentacja laktozy

Podłoże: płynne podłoże Eijkmana z 0,3 % laktozą, w probówkach

Wykonanie:

a) Przygotowane podłoża zaszczepić:

- próbką wody (rozc. od 10^{-1} do 10^{-5}) o objętości 1 ml
- próbką gleby (rozc. od 10^{-1} do 10^{-5}) o objętości 1 ml
- kroplą nocnej hodowli bulionowej szczepu kontrolnego

b) Hodowle inkubować w temperaturze pokojowej 7 dni.

Odczyt:

Obserwować zmianę zabarwienia podłoża. Zakwaszenie podłoża (zmiana barwy podłoża z fioletowej na żółtą) świadczy o przeprowadzeniu fermentacji.

Zagadnienia do opracowania

1. Stosunek bakterii do tlenu: tlenowce bezwzględne i względne, beztlenowce bezwzględne i aerotolerancyjne.
2. Metody hodowli beztlenowców, mikroaerofilów i beztlenowców.
3. Końcowe akceptory elektronów i produkty oddychania w procesach oddechowych i fermentacji.
4. Zysk energetyczny w różnych typach oddychania i fermentacji.

Ćwiczenie 5 i 6

• Analiza mikrobiologicznego skażenia wody (bakterie grupy coli)

Wprowadzenie

Ochrona środowiska to szereg działań mających na celu utrzymanie prawidłowości w procesach zachodzących w przyrodzie naturalnie. Szybki rozwój cywilizacyjny pociąga za sobą liczne i nieuniknione zmiany w środowisku. Zmiany te prowadzą początkowo do zaburzenia równowagi w ekosystemach, a w drastycznych przypadkach do ich zniszczenia. Dlatego, należy aktywnie przeciwdziałać procesowi degradacji przyrody poprzez wprowadzenie odpowiednich działań takich jak: rozsądne gospodarowanie zasobami środowiska, recyding, wprowadzanie standardów pracy w zakładach przemysłowych a także przeciwdziałanie zanieczyszczeniom chemicznym i biologicznym. Dodatkowo niezbędny jest monitoring efektów tych działań, którego ważnym elementem jest stała kontrola mikrobiologicznego skażenia wody.

W wodach powierzchniowych, oprócz typowej mikroflory wodnej, mogą się też znajdować mikroorganizmy, które przedostały się do niej wraz ze ściekami lub zostały wypłukane z gleby. W skład mikroorganizmów ściekowych mogą wchodzić bakterie stanowiące normalną mikroflorę przewodu pokarmowego ludzi i zwierząt oraz mikroorganizmy chorobotwórcze. Woda jest konsumowana w znacznych ilościach, więc jeśli nawet zawiera niewielką liczbę mikroorganizmów chorobotwórczych takich jak: *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Vibrio cholerae* czy wirusów, np. enterowirusy, może stanowić źródło zakażenia. Z tego powodu prowadzona jest stała kontrola sanitarna wody pitnej, wód zbiorników powierzchniowych i wody w basenach. O możliwości występowania w badanej wodzie mikroorganizmów patogennych wnioskuje się pośrednio, badając obecność tzw. bakterii wskaźnikowych, które stale żyją jako saprofity w przewodzie pokarmowym człowieka i zwierząt wyższych.

Najważniejszą bakterią wskaźnikową jest *Escherichia coli*, która wchodzi w skład tzw. grupy coli. Bakterie z grupy coli to gramujemne pałeczki, oksydazo-ujemne nieprzetrawialnikujące, względnie tlenowe, fermentujące laktozę w temp. 37°C po 24- 48 godz. z wytworzeniem kwasu oraz gazu i tworzące na podłożu różnicującym Endo (lub EMB) z laktozą charakterystyczne bordowe kolonie z metalicznym połyskiem i zdolne do wzrostu w obecności soli żółci (lub innych związków powierzchniowo czynnych). Wśród bakterii z grupy coli wyróżnia się bakterie: typu kałowego (fekalnego), które fermentują laktozę z wytworzeniem kwasu i gazu także w temperaturze 44°C (*E. coli*, *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp). *E. coli*, oprócz wymienionych wyżej cech, charakteryzuje się także zdolnością do rozkładu tryptofanu (dzięki tryptofanazie) oraz glukuronidów (dzięki β-D-glukuronidazie). Wymienione właściwości bakterii grupy coli jak i *E. coli* są wykorzystywane w analizie wody do celów sanitarnych ze względu na to, że można je łatwo i szybko wykryć. Obecność w wodzie bakterii z grupy coli świadczy o skażeniu badanej wody ściekami bytowymi lub glebą. W zależności od badanej wody analiza sanitarna może też obejmować wykrywanie i oznaczanie innych bakterii wskaźnikowych takich jak: enterokoki kałowe, *Clostridium perfringens*, *Pseudomonas aeruginosa* oraz bakterie z rodzaju *Legionella*.

Obecność w wodzie bakterii z grupy coli bada się stosując metodę fermentacyjno-probówkową lub metodę filtrów membranowych, w zależności od spodziewanego stopnia skażenia badanej wody. Oprócz tego oznacza się też liczbę bakterii psychrofilnych i mezofilnych w badanej wodzie, wysiewając ją na agar odżywczy i inkubując płytki odpowiednio w temperaturze 20 i 37°C. W celu potwierdzenia wykrytego zanieczyszczenia mikrobiologicznego, przeprowadza się dodatkowe

testy na obecność bakterii wskaźnikowych (np. dla *E. coli* test indolowy na wykrycie aktywności tryptofanazy lub oznaczenie obecności oksydazy cytochromowej).

Miano coli jest to najmniejsza objętość badanej wody (wyrażona w cm³), w której znajdują się jeszcze bakterie z grupy coli.

Część praktyczna

Materiał: woda wodociągowa, woda ze zbiornika naturalnego, wstępnie oczyszczone ścieki komunalne

Podłoże: agar odżywczy, probówki z podłożem Eijkmana, bulion tryptofanowy, podłoże Endo

1. Badanie wody wodociągowej

Wykonanie:

a) Pobrać próbkę wody wodociągowej.

- W tym celu wylot kranu należy wymyć, wytrzeć do sucha i opalić palnikiem.
- Następnie spuszczać wodę z kranu przez 10 minut.
- Po tym czasie, nie zakręcając dopływu, pobrać około 200 ml wody do jałowej kolby à 300 ml. Kolbę zamknąć jałowym korkiem.

b) Oznaczyć liczbę bakterii psychrofilnych i mezofilnych.

- W tym celu na 4 płytki wlać po 1 ml pobranej wody.
- Następnie na każdą z nich wlać 20 ml upłynnionego agaru odżywczego ostudzonego do temperatury 46°C.
- Całość rozprowadzić równomiernie po powierzchni płytki.
- Po zakrzepnięciu dwie płytki inkubować w 20°C (przez 72 godz.) i dwie w 37°C (przez 24 godz).

c) Oznaczyć liczbę bakterii grupy coli.

- Do 10 probówek zawierających po 10 ml podłoża Eijkmana wlać po 1 ml wody wodociągowej
- 5 probówek inkubować w 37°C, a 5 w 44°C.
- Po 24 i 48 godzinach inkubacji obserwować zmiany pożywki.

Odczyt:

Płytki: Po inkubacji policzyć liczbę kolonii na płytkach i uśrednić. Porównać liczbę psychrofilii i mezofili.

Probówki: Zakwaszenie podłoża (zmiana barwy podłoża z fioletowej na żółtą) i obecność gazu w rurce Durhama świadczą o występowaniu bakterii z grupy coli. Takie zmiany podłoża obserwowane

w probówkach inkubowanych w obu temperaturach wskazują na obecność bakterii z grupy coli typu fekalnego. Brak gazu i zakwaszenia po 48 godzinach uznaje się za wynik ujemny.

2. Badanie wody ze zbiornika

Wykonanie:

- a) Pobrać próbkę wody ze zbiornika.
- b) Oznaczyć liczbę bakterii psychrofilnych i mezofilnych.
 - Rozcieńczyć badaną wodę 10^{-1} do 10^{-4} (wykonuje prowadzący zajęcia).
 - Po 0,1 ml każdego z rozcieńczeń wysiać na 4 płytki z agarem odżywczym.
 - Dwie płytki z AO inkubować w 37°C , a pozostałe dwie w temperaturze pokojowej.
- c) Oznaczyć liczbę bakterii grupy coli
 - Po 0,1 ml każdego z rozcieńczeń wysiać na 2 płytki z podłożem Endo
 - Płytki z podłożem Endo inkubować w 37°C .
- d) Oznaczyć miano coli metodą fermentacyjno-probówkową.
 - Do probówek zawierających po 10 ml podłoża Eijkmana i rurki Durhama, ponumerowanych od 1 do 10 dodajemy kolejno wg schematu:

1 ml wody nierozcieńczonej	probówka nr 1 i 2
1 ml wody rozcieńczonej 10^{-1}	probówka nr 3 i 4
1 ml wody rozcieńczonej 10^{-2}	probówka nr 5 i 6
1 ml wody rozcieńczonej 10^{-3}	probówka nr 7 i 8
1 ml wody rozcieńczonej 10^{-4}	probówka nr 9 i 10
 - Szereg probówek o numerach parzystych inkubować w temperaturze 37°C , a o numerach nieparzystych w 44°C . Obserwacje należy przeprowadzić po 24 i 48 godz. inkubacji.

Odczyt:

Analizę materiału z szalek z AO oraz z testu probówkowego wykonać analogicznie do badania wody wodociągowej.

Na płytkach z podłożem Endo zaobserwować kolor kolonii bakterii. Bakterie grupy coli mają kolonie gładkie, ciemnoczerwone z metalicznym połyskiem. Wybrać kilka kolonii do testu na obecność oksydazy cytochromowej oraz do testu indolowego.

3. Badanie ścieków po wstępnym oczyszczeniu

Wykonanie:

- a) Przygotować rozcieńczenia badanych ścieków 10^{-1} do 10^{-5} .
- b) Oznaczyć liczbę bakterii grupy coli na podłożu Endo jak dla wody ze zbiornika.
- c) Oznaczyć miano coli metodą fermentacyjno-probówkową tak jak dla wody ze zbiornika, ale bez materiału nierozcieńczonego.

Odczyt:

Taki sam jak dla badania wody ze zbiornika.

4. Test na obecność oksydazy cytochromowej

Materiał: kolonie z podłoża Endo, paski lub krążki diagnostyczne

Wykonanie:

Plastikową jałową eżą nanieść materiał z pojedynczej kolonii na pasek lub krążek diagnostyczny nasączony α -naftolem i chlorowodorkiem dimetylo-p-fenylendiaminy. Inkubować 1 min w temperaturze pokojowej.

Odczyt:

Kolor niebieski oznacza obecność oksydazy cytochromowej, czyli badana bakteria nie należy do grupy coli.

5. Test indolowy

Materiał: hodowle bakterii przesianych z podłoża Endo w bulionie tryptofanowym

Wykonanie:

Na powierzchnię hodowli wlać ostrożnie (nawarstwić) odczynnik Kovacs'a (p-dimetyloaminobenzaldehyd w HCl).

Odczyt:

Zabarwienie wiśniowo-czerwone na powierzchni bulionu świadczy o obecności indolu wytworzonego z tryptofanu, a więc o obecności *E. coli*, która wytwarza tryptofanazę.

- **Analiza mikrobiologicznego skażenia żywności (izolacja pałeczek *Campylobacter*)**

Wprowadzenie

Żywność podobnie jak woda konsumowana jest w znacznych ilościach, i tak samo jak ona może zawierać groźne mikroorganizmy patogenne, stając się źródłem zakażenia. Dlatego żywność również podlega ścisłej kontroli jakości. Ponadto, w licznych procesach produkcyjnych zużywana jest znaczna ilość wody (np. do mycia powierzchni), więc zakażona mikrobiologicznie żywność może być dodatkowym źródłem skażenia wody. Jednoczesne zanieczyszczenie wody i żywności można prześledzić na przykładzie produkcji mięsa drobiowego.

Ptaki (m.in. drób domowy) są nosicielami w układzie pokarmowym pałeczek rodzaju *Campylobacter*. ***C. jejuni*** to aktualnie najczęściej izolowany ludzki enteropatogen, zarówno w krajach uprzemysłowionych, jak i rozwijających się. Kliniczne spektrum objawów towarzyszących infekcjom *Campylobacter* waha się od słabych biegunek do silnych stanów zapalnych jelit. Na silniejsze symptomy oraz powikłania narażone są głównie małe dzieci, osoby starsze oraz osoby z obniżoną aktywnością układu immunologicznego. Do infekcji ludzi dochodzi najczęściej przez spożycie nieodpowiednio przygotowanego drobiu, nie pasteryzowanego mleka lub zanieczyszczonej pałeczkami patogenu wody (skażenia poprodukcyjne). Chociaż poziom kolonizacji jelit kurcząt jest bardzo wysoki (maksymalnie 10^{10} cfu/g zawartości jelit) nie wywołuje to u ptaków objawów chorobowych, co uniemożliwia identyfikację i eliminację zakażonych ptaków ze stada.

Obecnie w Polsce przeprowadzany jest jedynie monitoring zakażeń żywności, polegający na wrywkowej analizie tusz drobiowych na rynku (zgodnie z zaleceniami Unii Europejskiej). Jednakże przeciwdziałanie infekcjom ludzi przez *Campylobacter* spp. powinno polegać również na wprowadzaniu określonych standardów w produkcji mięsa drobiowego oraz na prowadzeniu kampanii informacyjnej (m.in. informacje o konieczności obróbki termicznej mięsa przed spożyciem).

Cześć praktyczna

1. Izolacja pałeczek *Campylobacter* z mięsa drobiowego.

Materiał: mięso drobiowe

Podłoże: bulion Boltona, podłoże agarowe *mCCD* (z węglem drzewnym, cefoperazonem i deoksycholanem), podłoże Blood Agar No2 (BA)

Wykonanie:

- a) Odważyć mięso wraz ze skórą (2 g) i pociąć na małe kawałki
- b) Dodać do 18 ml bulionu Boltona (płynna pożywka namnażająca)
- c) **NAMNAŻANIE:** inkubacja w atmosferze mikroaerobowej w temperaturze 37°C przez 4 do 6 h, a następnie w temperaturze 41,5°C przez 44 h ±4 h.
- d) **IZOLOWANIE:** wysiać odpowiednie rozcieńczenia na dwie pożywki: pożywkę agarową z węglem drzewnym, cefoperazonem i deoksycholanem (podłoże *mCCD*) oraz BA No. 2.

e) Płytki inkubować w atmosferze mikroaerobowej w temperaturze 41,5°C przez 44 h ±4 h.

Odczyt:

Obserwacja i ocena morfologii kolonii.

2. Test hippuranowy

Materiał: kolonie bakterii z podłoża mCCD/BA, 1% hippuran sodu, 3,5% ninhydryna

Wykonanie:

- a) Odmierzyć 0,4 ml 1% roztworu hippuranu sodu do probówki typu Eppendorf i zmieszać z niewielką ilością bakterii (zdrapanych ezą z szalki)
- b) Inkubować probówki w 37°C 2 godz.

Odczyt:

Na zawiesinę bakterii nawarstwić 0,2 ml 3,5% roztworu ninhydryny rozpuszczonej w mieszaninie acetonu i butanolu 1:1. Obserwować aktywność hippuranidazy *C. jejuni* w postaci fioletowego pierścienia na granicy dwóch roztworów.

Test hippuranowy wykrywa aktywność enzymatyczną hippuranazy (aminohydrolaza N-benzoilglicyny), katalizującej hydrolizę wiązania peptydowego znajdującego się w kwasie hippuranowym z uwolnieniem kwasu benzoesowego i glicyny. Obecność hippuranazy jest charakterystyczna dla komórek gatunku *C. jejuni*.

Można wykonać dodatkowe testy identyfikacyjne, takie jak specyficzny PCR lub testy API.

Zagadnienia do opracowania

1. Właściwe bakterie wodne.
2. Mikroorganizmy chorobotwórcze, które mogą się dostać do wody wraz ze ściekami.
3. Bakterie wskaźnikowe świadczące o skażeniu wody.
4. Sanitarna analiza bakteriologiczna wody. Miano coli.
5. Wykrywanie bakterii grupy coli metodą fermentacyjno-probówkową i metodą filtrów membranowych.
6. Sanitarna analiza bakteriologiczna żywności.

Ćwiczenie 7

• Wpływ czynników środowiskowych na rozwój mikroorganizmów

Wprowadzenie

Mikroorganizmy bytujące we wszystkich środowiskach stale podlegają wpływom warunków zewnętrznych. Źródłem bodźców są zarówno zjawiska naturalnie występujące w przyrodzie (promieniowanie UV, wilgotność, temperatura, etc.), jak i inne mikroorganizmy (wydzielanie szkodliwych produktów metabolizmu, antybiotyków, wykorzystanie źródeł pokarmowych). Oczywiście źródłem największych zmian w środowisku jest działalność człowieka. Dotyczy ona analogicznych zjawisk, ale o znacznie większej intensywności i zasięgu (np. zmiany temperatury wody w wyniku odprowadzania ogrzanych wód przemysłowych, „zrzuty” szkodliwych związków chemicznych z fabryk czy silna eutrofizacja wód w wyniku intensywnego nawożenia gleb rolnych). W celu przeciwdziałania szkodliwym efektom czynników zewnętrznych mikroorganizmy wykształciły liczne mechanizmy obronne, np. różne sposoby uzyskiwania oporności na antybiotyki, systemy przekształcania w komórce lub usuwania z niej związków szkodliwych czy ochronne formy wzrostu (biofilm).

1. Mechanizmy oporności bakterii na antybiotyki

Bakterie są naturalnymi producentami antybiotyków. Ich rolą jest eliminacja konkurencyjnych mikroorganizmów w celu zdobycia danej niszy ekologicznej. Każdy producent musi jednocześnie wykształcić odpowiedni mechanizm chroniący go przed autodestrukcją. Dlatego też, każdy mechanizm działania antybiotyku ma swoje specyficzne antidotum.

Wyróżnia się 6 zjawisk odpowiedzialnych za oporność bakterii na daną grupę antybiotyków:

- i) naturalny brak celu działania antybiotyku, np. brak ściany komórkowej u mykoplazm powoduje ich naturalną oporność na penicyliny
- ii) nieprzepuszczalność osłon komórkowych, np. większość bakterii gramujemnych jest oporna na penicylinę G
- iii) inaktywacja antybiotyku poprzez cięcie cząsteczki (β -laktamaza i penicylina) lub jej modyfikację (metylacja, acetylacja, fosforylacja)
- iv) modyfikacja celu działania antybiotyku (głównie mutacje w genach kodujących cele, np. rybosom i streptomycyna)
- v) alternatywny szlak biochemiczny (szlak pobierania kwasu foliowego ze środowiska zamiast szlaku jego syntezy wewnątrz komórki blokowanego przez sulfonamidy)
- vi) aktywny transport poza komórkę poprzez specyficzne pompy (ang. **efflux pumps**; np. tetracykliny)

Antybiotyki mogą być eliminowane na kilka sposobów jednocześnie (np. penicylina).

Bakterie nabywają oporności w wyniku spontanicznych zmian w genomie (mutacje) lub poprzez horyzontalny transfer genów odpowiedzialnych za oporność (np. na plazmidach R). Procesy te stale zachodzą w komórkach bakteryjnych, jednak do ich utrwalenia dochodzi

w odpowiedzi na czynnik selekcyjny. Horyzontalny transfer genów jest bardzo efektywny i w znacznej mierze przyczynia się do szybkiego nabywania oporności. Plazmidy często kodują geny oporności na wiele grup antybiotyków, co sprzyja powstawaniu szczepów wielolekoopornych.

2. Mechanizmy oporności na inne związki szkodliwe na przykładzie arsenu

Mikroorganizmy są stale narażone na działanie jonów metali występujących w środowisku. Niektóre z tych jonów (magnez, potas, miedź czy cynk) są pobierane jako istotne składniki odżywcze, podczas gdy inne są związkami toksycznymi (tj. rtęć, ołów, kadm, arsen czy srebro).

Jednym z najbardziej toksycznych pierwiastków, występujących naturalnie w środowisku, jest **arsen**. Najbardziej groźne i toksyczne są nieorganiczne związki arsenu, przy czym związki As(III) są bardziej toksyczne niż związki As(V). **Arseniany** (HAsO_4^{2-} i H_2AsO_4^-), są molekularnymi analogami fosforanów i hamują fosforylację oksydacyjną, tym samym blokując łańcuch oddechowy. **Arseniny** [$\text{As}(\text{OH})_3$ i H_2AsO_3] są bardziej toksyczne, ponieważ wiążą się z grupami tiolowymi, upośledzając funkcje wielu białek.

Mikroorganizmy wykształciły różne mechanizmy usuwania arsenu z komórki:

- i) zmniejszenie pobierania arsenianów przez systemy transportu fosforanów
- ii) transformacje chemiczne toksycznych związków arsenu (metylacja, demetylacja, redukcja/utlenianie w procesach oddechowych)
- iii) specjalne systemy detoksykacji arsenu, tzw. systemy ArsC

Mikroorganizmy pełnią istotną rolę w wielu reakcjach geochemicznych, które mają pośredni lub bezpośredni wpływ na specjację arsenu w środowisku. Mikroorganizmy redukujące As(V) uwalniają do środowiska bardziej toksyczne formy As(III), tym samym zwiększając stopień jego zanieczyszczenia. Z kolei bakterie utleniające arseniny mogą być wykorzystane w procesach bioremediacji wód pitnych skażonych arsenem. Mikrobiologiczne utlenianie arseninów [As(III)], a następnie adsorpcja powstałych arsenianów [As(V)] na silnych adsorbentach [np. Fe(III)] może w przyszłości stać się wydajnym sposobem usuwania arsenu.

3. Biofilm

Biofilm (inaczej błona biologiczna) to skupisko bakterii przytwierdzonych do podłoża za pomocą śluzowej substancji wydzielanej przez komórki (ang. **matrix**). Substancja ta zbudowana jest głównie z polisacharydów, ale może zawierać również białka lub kwasy nukleinowe. Biofilmy mogą być jednogatunkowe, ale częściej stanowią konsorcja wielu gatunków bakterii o różnych typach pokarmowych i różnym zapotrzebowaniu na tlen np. płytka nazębna. Pierwszym etapem tworzenia biofilmu jest spontaniczne zetknięcie się z podłożem pojedynczych komórek bakteryjnych. W celu przyłgnięcia do podłoża wykorzystywane są specyficzne struktury komórkowe (pilusy), białka powierzchniowe (adhezyny) oraz polisacharydy. W konsekwencji następuje specyficzna sygnalizacja wewnątrzkomórkowa, uruchamiająca m.in. produkcję śluzu oraz sygnalizacja zewnątrzkomórkowa powodująca napływ innych bakterii i intensywny rozrost błony biologicznej.

Bakterie odnoszą liczne korzyści pozostając w obrębie biofilmu:

- i) ochrona przed szkodliwym działaniem środowiska (np. antybiotyki i inne szkodliwe związki, bakteriofagi, układ immunologiczny)
- ii) trwałe zajęcie korzystnej niszy ekologicznej

- iii) łatwiejsze interakcje z sąsiadującymi bakteriami (horyzontalny transfer genów)

Zdolność bakterii do tworzenia biofilmów stanowi poważny problem w medycynie oraz przemyśle.

Część praktyczna

Materiał: Poniższe doświadczenia przeprowadzane są na czystych kulturach bakteryjnych wyizolowanych w toku ćwiczeń z różnych środowisk lub na szczepach laboratoryjnych.

1. Wpływ promieniowania UV na wzrost bakterii wyizolowanych ze środowisk naturalnych

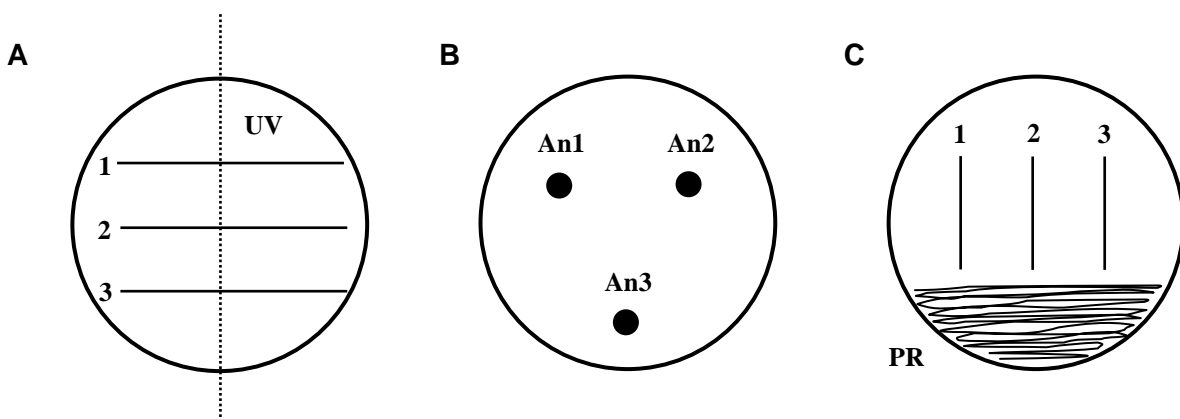
Podłoże: agar odżywczy

Wykonanie: UWAGA! Wymagane maski ochronne przed promieniowaniem UV

- Na 2 płytki posiać równoległymi rysami 3 kultury bakteryjne z hodowli płynnej (wg Rys. 3A).
- Następnie zdjąć wieczko, zakryć połowę płytki czarnym papierem a drugą naświetlać promieniami UV 5 s (1 szalka) i 15 s (1 szalka). Zakryć płytki.
- Płytki inkubować w temperaturze pokojowej w ciemności 7 dni.

Odczyt:

Obserwować różnice we wzroście szczepów w zależności od ekspozycji na promieniowanie ultrafioletowe.



Rys. 3 Schematy posiewów.

A – badanie wpływu UV na wzrost bakterii; **B** – badanie wrażliwości bakterii na antybiotyki; **C** – badanie wytwarzania antybiotyków przez promieniowce (Test1). Oznaczenia: **1, 2, 3** – szczepy bakteryjne; **An** – antybiotyk; **PR** – szczep promieniowca

2. Wrażliwość na antybiotyki bakterii wyizolowanych ze środowisk naturalnych

Podłoże: agar odżywczy

Wykonanie:

- a) Wysiać powierzchniowo (0,1 ml) 3 kultury bakteryjne na płytki.
- b) Pęsetą nałożyć na posianą płytkę 3 jałowe krążki bibuły nasączone różnymi antybiotykami (oddalone od siebie wg Rys. 3B).
- c) Płytki inkubować w temperaturze pokojowej 7 dni.

Odczyt:

Obserwować koliste strefy zahamowania wzrostu bakterii wokół krążków z antybiotykami.

3. Wytwarzanie antybiotyku przez wyizolowane szczepy promieniowców

Podłoże: agar odżywczy

Wykonanie:

Test 1

- a) Na 1/3 płytki posiać esą szczep promieniowca (wg Rys. 3C) (wykonane wcześniej przez prowadzącego zajęcia).
- b) Następnie posiać rysą prostopadle wobec posiewu promieniowca 3 bakterie z hodowli płynnych
- c) Płytki inkubować w temperaturze pokojowej 7 dni.

Test 2

- a) Na płytkę posiać rysą 4 kultury promieniowców z hodowli płynnej (wykonane wcześniej przez prowadzącego zajęcia)
- b) Płytkę z urosniętymi promieniowcami zalać półpłynnym podłożem odżywczym zmieszany z bakteryjnym szczepem wskaźnikowym.
- c) Płytkę inkubować w temperaturze pokojowej 7 dni.

Odczyt:

Test 1. Obserwować strefy zahamowania wzrostu badanych bakterii w zależności od odległości od posianego promieniowca (zanik kreski wzrostu bakteryjnego).

Test 2. Obserwować strefy zahamowania wzrostu bakterii wokół rys na szalkach z podłożem półpłynnym.

4. Toksyczność metali ciężkich na przykładzie nieorganicznych związków arsenu oraz mikrobiologiczny mechanizm transformacji arsenu - utlenianie arseninów

Materiał: szczep *Sinorhizobium* (Ars+), szczep *Agrobacterium* (wt), szczep *Agrobacterium* (pArs)

Podłoże: mineralne MSM z 5 mM arseninami [As (III)]

Wykonanie: UWAGA! Praca w rękawiczkach

- a) nocne hodowle bakteryjne odmłodzić 1:100 w podłożu MSM i hodować w 30°C przez 24 godz. (wykonane przez prowadzącego zajęcia)
- b) do probówek typu Eppendorf pobrać 0,5 ml hodowli i dodać 0,5 ml 0,1 M roztworu azotanu srebrowego (AgNO₃) (toksyczny!).
- c) probówki zamknąć i wymieszać.

Odczyt:

Obserwować zabarwienie probówek oraz obecność osadu. Brązowy osad świadczy o obecności ortoarsenianu srebrowego (Ag₃AsO₄), czyli o utlenieniu arseninu As (III) do arsenianu As (V).

5. Wytwarzanie biofilmu jako przykład formy wzrostu bakteryjnego w środowisku chroniącej przed szkodliwymi czynnikami zewnętrznymi.

Materiał: szczep *E. coli* (biofilm +), szczep *E. coli* (biofilm -), 20% roztwór glukozy, r-r antybiotyku (Ap - ampicylina), r-r NaOH, r-r HCl

Podłoże: podłoże Luria Bertani (LB)

Wykonanie: (wcześniej przez prowadzącego zajęcia)

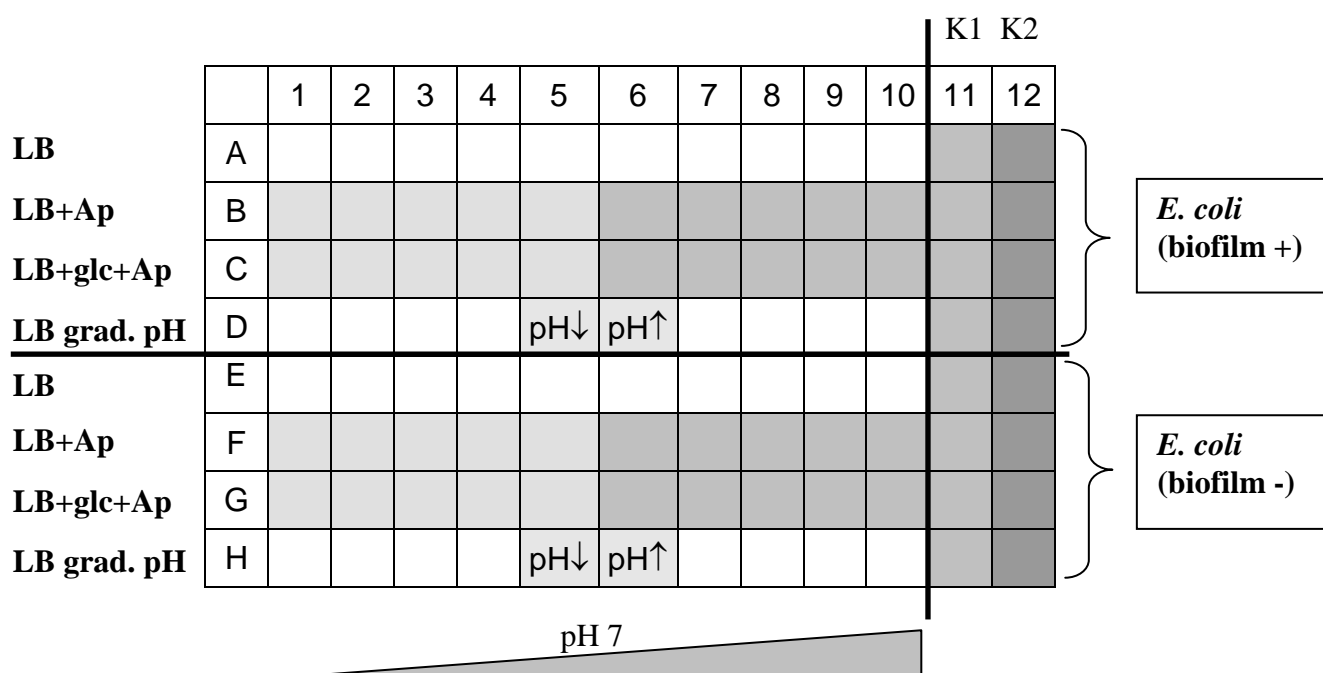
- a) Założyć nocne hodowle bakterii w LB, 37 °C po 5 ml w probówkach.
- b) Rano hodowle odmłodzić (rozcieńczyć 1:100).
- c) Nanieść po 100 µl hodowli w dołki na płytce titracyjnej.
- d) Dodać po 100 µl z r-r badanych szkodliwych czynników zewnętrznych
 - wpływ antybiotyku badać na szczepach hodowanych bez i z dodatkiem glukozy
 - do rzędów poziomych A i E oraz pionowych 11 i 12 dodać tylko jałowej wody
- e) Inkubować płytkę 24 godz. w 37 °C.

Odczyt: Barwienie biomasy biofilmu za pomocą fioletu krystalicznego

- a) Po zakończeniu inkubacji podłoże hodowlane usunąć wraz z komórkami, które nie uległy adhezji, przepłukać wodą destylowaną 2x.

- b) Przemyć całe płytki 2x - płytki zanurzyć w wodzie i lekko mieszać, po usunięciu wody wysuszyć.
- c) Ddplukane dołki barwić 0,1% fioletem krystalicznym przez 10 min w temperaturze pokojowej – dodać po 220 μ l barwnika do każdego dołka.
- d) Płytki przemyć 2x wodą przez zanurzenie, wodę usunąć pipetą, a płytki pozostawić do wyschnięcia, ok. 15 min w 50 °C.
- e) Barwnik rozpuszczać dodając do każdego dołka 250 μ l 95 % etanolu i inkubować pod przykryciem w temperaturze pokojowej przez 15 min.
- f) Mieszaninę przenieść do czystych dołków i mierzyć absorbancję przy długości fali A_{570}
- g) Ocenić wpływ zastosowanych czynników na dany szczep bakteryjny na podstawie odczytu spektrofotometrycznego (wydruk); porównać wyniki obu szczepów korzystając ze schematu płytki (Rys. 4).

Fiolet krystaliczny barwi niespecyficznie, żywe i martwe komórki oraz matrix biofilmu.



Rys. 4 Schemat płytki titracyjnej do analizy biofilmu.

K1 – kontrola, szczep bez czynnika szkodliwego; **K2** - kontrola, czyste podłoże

Zagadnienia do opracowania

1. Przystosowanie bakterii do zmian w środowisku.
2. Mechanizmy oporności bakterii na szkodliwe związki chemiczne.

Ćwiczenie 8

- Odczyt wyników z ostatniego ćwiczenia i podsumowanie ćwiczeń
- Konsultacje

III. SKŁAD PODŁOŻY STOSOWANYCH NA ĆWICZENIACH

1. Bulion odżywczy/agar odżywczy

wyciąg mięsny, pepton, NaCl / agar-agar

2. Podłoże wg Pochona (dla promieniowców)

asparagina, skrobia rozpuszczalna, sole Winogradskiego (K_2HPO_4 , $MgSO_4 \times 7H_2O$, NaCl, $Fe_2(SO_4)_3 \times 9H_2O$, $MnSO_4 \times 5H_2O$), nystatyna, agar-agar

3. Podłoże wg Sabourauda (dla grzybów)

glukoza, pepton, penicylina, streptomycyna, agar-agar

4. Podłoże BG-11 (dla sinic)

$NaNO_3$, K_2HPO_4 , $MgSO_4 \times 7H_2O$, $CaCl_2 \times 2H_2O$, cytrynian, cytrynian żelazowo amonowy, EDTA (wersenian), Na_2CO_3 , ślady metali

5. Podłoże dla bakterii celulolitycznych

sól sodowa karboksymetylocelulozy, $NaNO_3$, K_2HPO_4 , KCl, $CaCl_2$, $Fe SO_4$, $MgSO_4$, ekstrakt drożdżowy

6. Podłoże wg Winogradskiego (dla bakterii nitryfikacyjnych)

$(NH_4)_2SO_4$, K_2HPO_4 , $MgSO_4 \times 7H_2O$, NaCl, $FeSO_4 \times 7H_2O$

7. Podłoże wg Giltaya (dla heterotroficznych bakterii denitryfikacyjnych)

asparagina, glukoza, KNO_3 , cytrynian sodowy, KH_2PO_4 , $MgSO_4 \times 7H_2O$, $CaCl_2 \times 6H_2O$, $FeCl_3 \times 4H_2O$

8. Podłoże dla bakterii wiążących azot (*Azotobacter* spp.)

mannitol, K_2HPO_4 , $MgSO_4 \times 7H_2O$, NaCl, $CaCO_3$, Na_2MoO_4 , $FeCl_3$, $MnSO_4 \times 4H_2O$

9. Podłoże wg Starkey'a (dla bakterii redukujących siarczany)

mleczan sodu, K_2HPO_4 , $MgSO_4 \times 7H_2O$, Na_2SO_4 , $CaCl_2 \times 2H_2O$, $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \times 6H_2O$, NH_4Cl

10. Podłoże Eijkmana

pepton, laktoza, NaCl, purpura bromokrezolowa

11. Bulion tryptofanowy

pepton-trypton,

NaCl

12. Podłoże Endo

wyciąg mięsny, pepton, NaCl, laktoza, fuksyna zasadowa, Na₂SO₃

13. Bulion Boltona

pepton, ekstrakt drożdżowy, NaCl, kwas alfa-ketoglutary, hemina, Na₂CO₃, pirogronian sodu, hydrolizat laktoalbuminy, Na₂S₂O₅

14. Podłoże mCCD (selekcyjne dla *Campylobacter* spp.)

ekstrakt mięsny, hydrolizat kazeiny, peptony, węgiel drzewny, NaCl, pirogronian sodu, FeSO₄, cefoperazon, deoksykolan sodu, agar-agar

15. Podłoże Blood Agar Base No2

hydrolizat kazeiny, peptony, wyciąg z wątroby, ekstrakt drożdżowy, NaCl, agar-agar

16. Podłoże MSM (dla bakterii utleniających arseniny)

NaCl, KCl, NH₄Cl, MgCl₂ x 6H₂O, CaCl₂, KH₂PO₄, Na₂SO₄, NaHCO₃, ekstrakt drożdżowy, arsenin sodu, witaminy, sole Tuovinenena, mlecza sodu

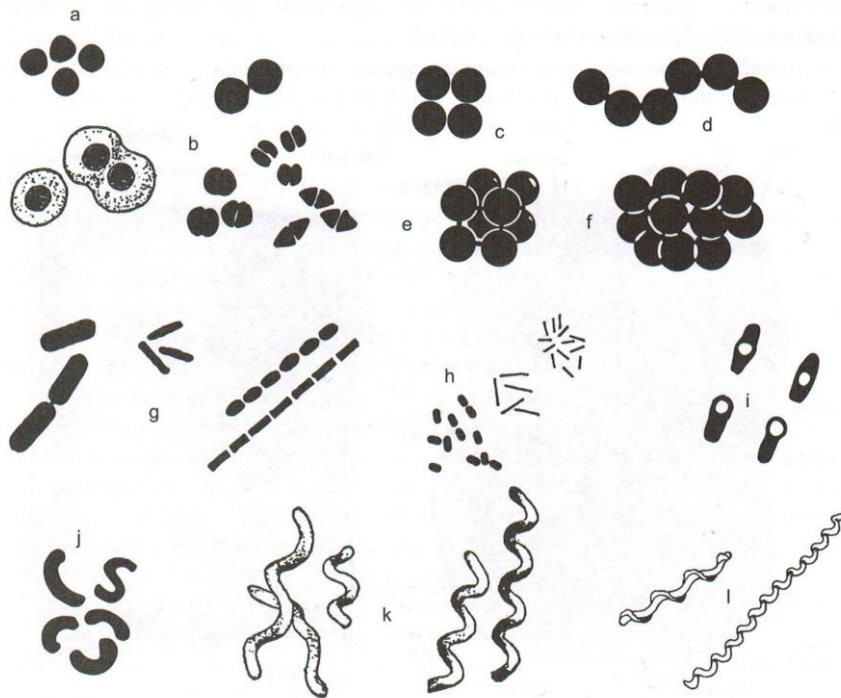
17. Podłoże Luria-Bertani

trypton, ekstrakt drożdżowy, NaCl

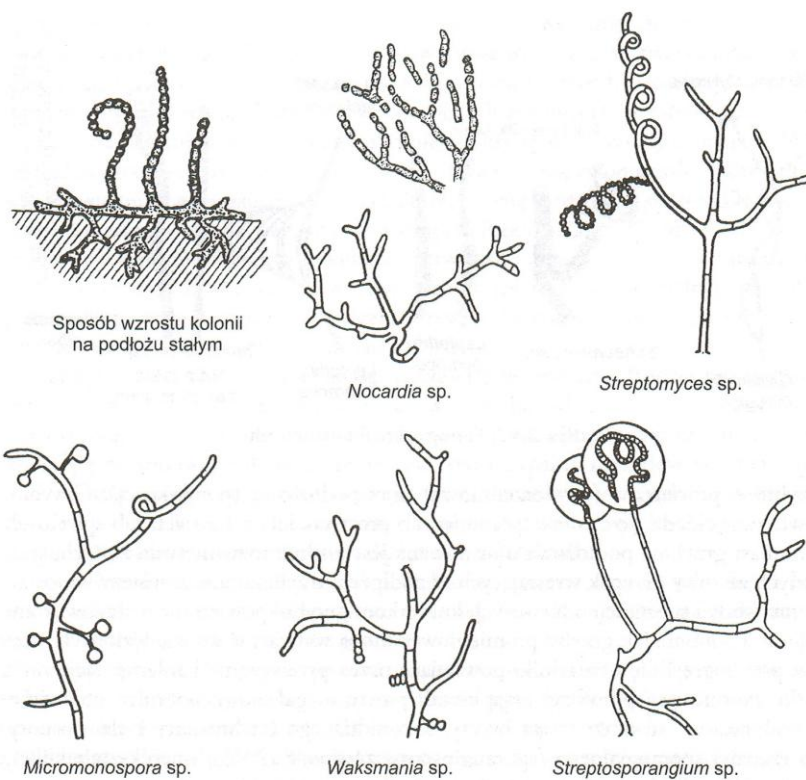
IV. ADDENDUM

1. Podstawowe formy morfologiczne bakterii

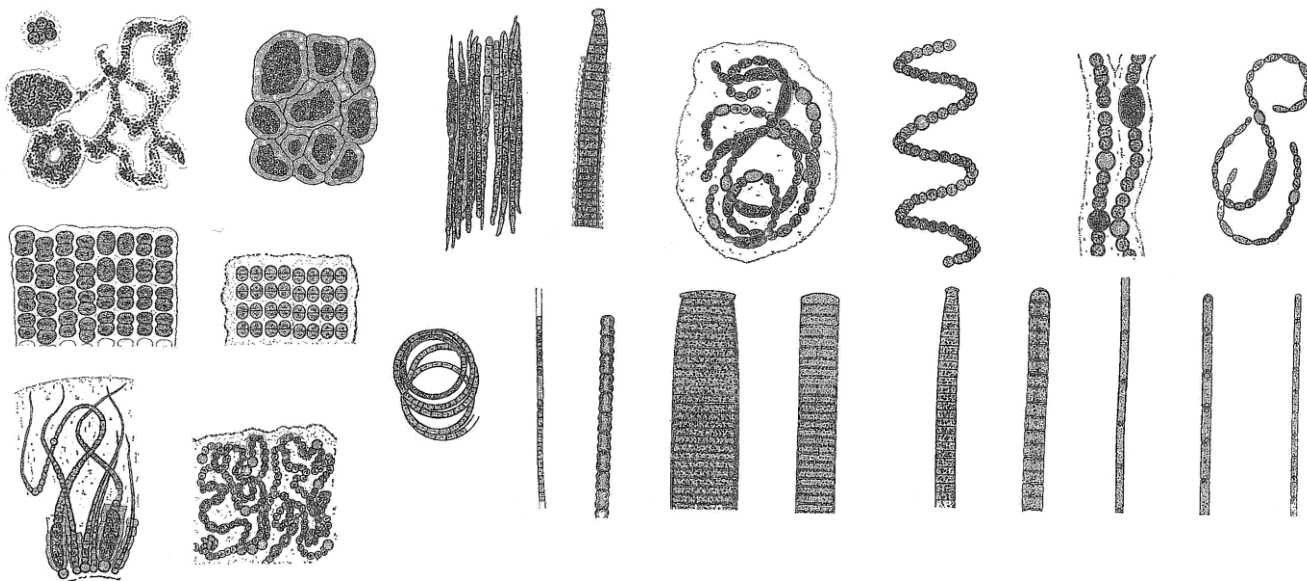
a – ziarniak (*coccus*), b - dwoinka (*diplococcus*), c - czwórniak (*tetracoccus*), d – paciorkowiec (*streptococcus*), e – pakietowiec (*sarcina*), f – gronkowiec (*staphylococcus*), g – laseczka (*bacillus*), h – pałeczka (*bacterium*), i – laseczki zawierające endospory (ułożone centralnie lub terminalnie, szersze lub węższe od przekroju komórki), j – przecinkowiec (*vibrio*), k – śrubowiec (*spirillum*), l – krętek



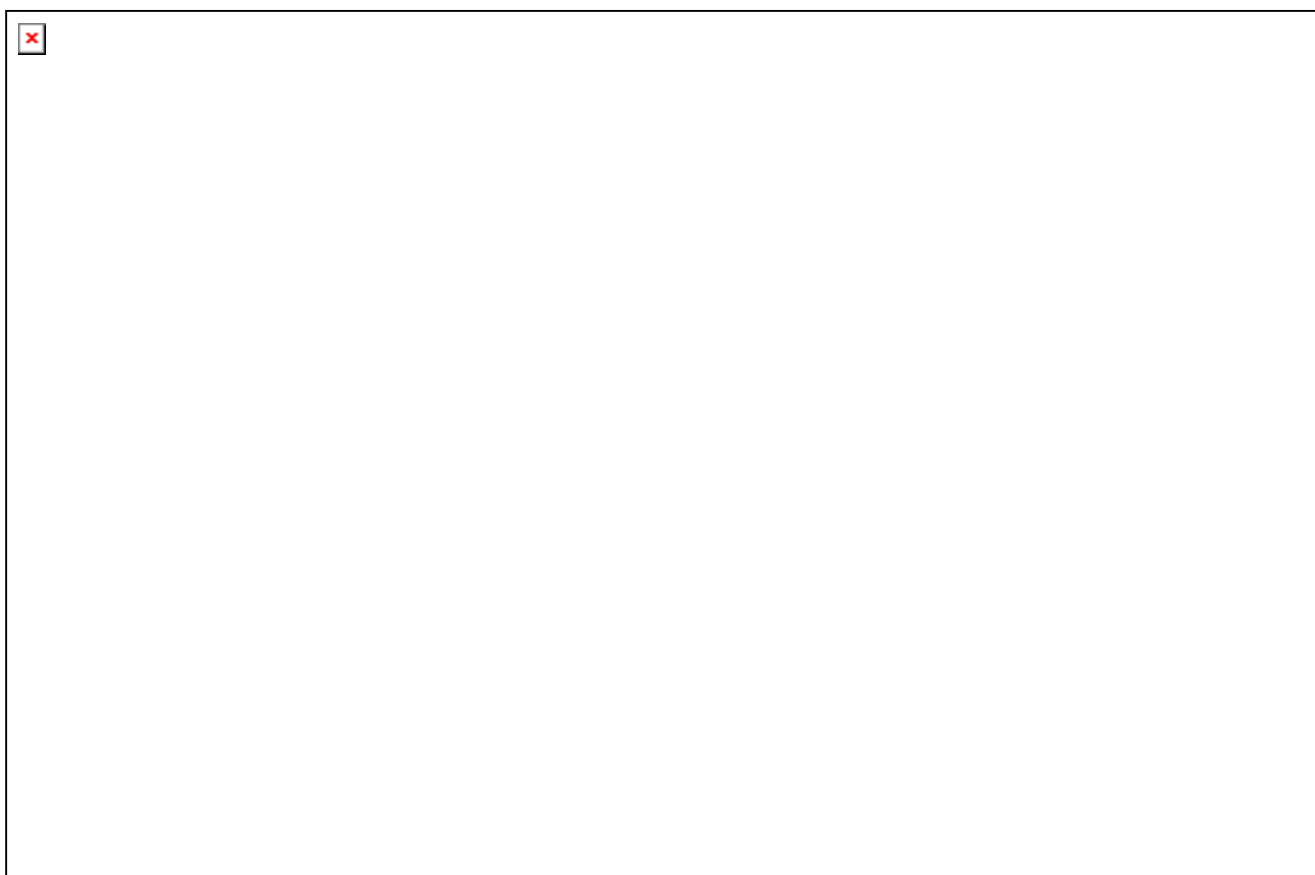
2. Kształt nitek grzybn promieniowców



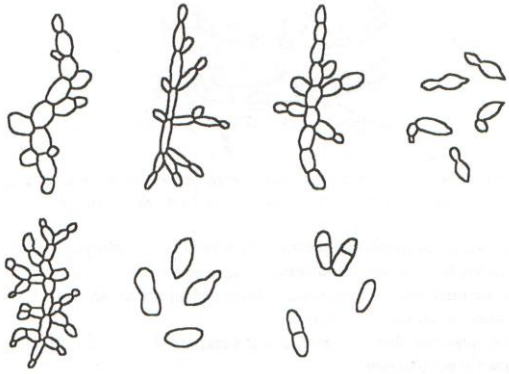
3. Różnorodność budowy sinic (cyjanobakterii)



4. Budowa konidioforów u różnych gatunków pleśni

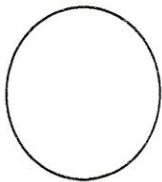


5. Typowe ugrupowania u drożdży



6. Metody opisu kolonii bakteryjnych

WYGLĄD OGÓLNY KOLONII



okrągła



nieregularna

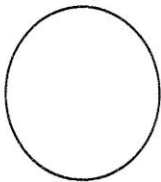


nitkowata

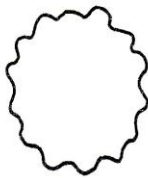


strzępiasta

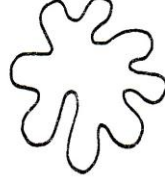
BRZEG KOLONII



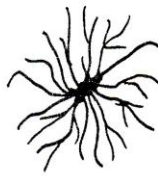
gładki



falisty



płatkowaty



nitkowaty



ząbkowany

WZNIESIENIE KOLONII



płaska



wypukła



pępkowata



kraterowata



z wałem brzeżnym

V. ZALECANA LITERATURA

1. Kunicki-Goldfinger W. J. H. „Życie bakterii”. Wyd. Naukowe PWN, 2001.
2. Madigan M.T., Brock T.D. (et al) „Brock biology of microorganisms”. San Francisco, CA: Pearson/Benjamin Cummings, 2009 (oraz wszystkie następne wydania tej książki).
3. Schlegel H.G. „Mikrobiologia ogólna”. Wyd. Naukowe PWN, 2003.
4. Salyers A.A, Whitt D. D. „Mikrobiologia – różnorodność, chorobotwórczość i środowisko”. PWN, 2003.
5. Różalski A. „Ćwiczenia z mikrobiologii ogólnej – skrypt dla studentów biologii”. Wyd. Uniwersytetu Łódzkiego, Łódź, 1996.
6. Grabińska-Łoniewska A. (red.). „Ćwiczenia laboratoryjne z mikrobiologii ogólnej”. Oficyna Wyd. Politechniki Warszawskiej, 1999
7. Duszkiewicz-Reinhard W., Grzybowski R., Sobczak E. „Teoria i ćwiczenia z mikrobiologii ogólnej i technicznej”. Wyd. SGGW, Warszawa, 1996
8. Błaszczak M. K. „Mikroorganizmy w ochronie środowiska” Wyd. Naukowe PWN, 2007
9. Błaszczak M. K. „Mikrobiologia środowisk” Wyd. Naukowe PWN, 2010
10. Lampert W., Sommer U. Ekologia wód śródlądowych. PWN, Warszawa. 2001.
11. Grabińska-Łoniewska A., Słomczyńska B., Rutkowska-Narożniak A., Łebkowska M., Słomczyński T., Zborowska E. „Biologia Środowiska”, Wyd. Seidel-Przywecki, 2011
12. Wetzel R. Limnology. Lake and river ecosystems. Academic Press, 2001.