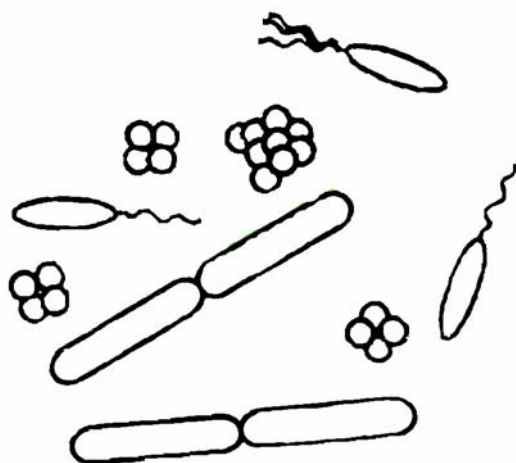


MIKROBIOLOGIA OGÓLNA

**ĆWICZENIA DLA STUDENTÓW
II ROKU**

WERSJA DUŻA



INSTYTUT MIKROBIOLOGII

WYDZIAŁ BIOLOGII

UNIwersytet Warszawski

2006

SPIS TREŚCI

I. REGULAMIN PRACOWNI	2
II. ĆWICZENIA	3
Ćwiczenie 1.	
Przygotowanie i jałowanie szkła i podłoży	
Podstawowe techniki mikrobiologiczne	3
Ćwiczenie 2.	
Izolowanie drobnoustrojów z różnych środowisk naturalnych	
Izolowanie czystych kultur	7
Ćwiczenie 3.	
Wzrost hodowli bakteryjnej	11
Ćwiczenie 4.	
Formy morfologiczne bakterii	13
Ćwiczenie 5.	
Budowa komórki bakteryjnej	15
Ćwiczenie 6.	
Metabolizm bakterii – źródła węgla, azotu i energii	17
Ćwiczenie 7.	
Metabolizm bakterii – procesy oddechowe	21
Ćwiczenie 8.	
Koniugacja u bakterii	24
Ćwiczenie 9.	
Podstawowe techniki pracy z bakteriofagami	27
Ćwiczenie 10.	
Analiza mikrobiologiczna wody	30
III. KRÓTKA CHARAKTERYSTYKA BAKTERII STOSOWANYCH NA ĆWICZENIACH	32
IV. ADDENDUM	
Opis kolonii bakteryjnych	36
V. ZALECANA LITERATURA	36

I. Regulamin pracowni

1. W pracowni obowiązuje noszenie fartucha ochronnego (najlepiej białego).
2. Na stołach laboratoryjnych mogą znajdować się wyłącznie materiały potrzebne do wykonywania ćwiczenia.
3. W pracowni zabronione jest spożywanie posiłków oraz palenie tytoniu.
4. Należy zachować daleko idącą ostrożność przy pracy z materiałem mikrobiologicznym:
 - a) stosować się do zasad pracy jałowej (zachować szczególną ostrożność przy pracy w bezpośrednim sąsiedztwie płomienia palnika);
 - b) hodowle bakteryjne w probówkach wstawiać do statywów (nie wolno ich kłaść na stole);
 - c) każdą posianą próbę dokładnie opisywać (rodzaj posiewu, inicjały osoby wykonującej posiew, data itp.);
 - d) po skończeniu posiewów wyżarzać ezy, opalać głaszczki, a pipety wkładać do specjalnych pojemników.
5. Po zakończeniu pracy należy posprzątać stół laboratoryjny, niepotrzebny już sprzęt odłożyć na miejsce, pozostawić w porządku mikroskop.
6. Niepotrzebne hodowle drobnoustrojów oraz szkło używane w trakcie pracy należy odłożyć do specjalnie przygotowanych pojemników, po uprzednim usunięciu wszelkich napisów, i zanieść do zmywalni.
7. Nie wolno wnosić z pracowni żadnych hodowli bakteryjnych i preparatów bez pozwolenia.
8. Po zakończeniu pracy należy sprawdzić, czy został wyłączony gaz oraz używana aparatura nie przeznaczona do pracy ciągłej.
9. Przed wyjściem z sali należy umyć ręce.
10. W razie jakichkolwiek problemów należy niezwłocznie zgłosić się do osoby prowadzącej zajęcia.

Ćwiczenie 1

Temat: Przygotowanie i jałowanie szkła i podłoży Podstawowe techniki mikrobiologiczne

I. 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 do badań mikrobiologicznych.

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 i rH oraz odpowiednią wartość osmotyczną.

Ważne jest również określenie do jakiego celu ma służyć dane podłoże - czy chodzi nam tylko o uzyskanie hodowli, czy o wyselekcjonowanie jakiegoś określonego gatunku, czy też o zróżnicowanie gatunków występujących w mieszaninie. Zależnie od potrzeby możemy zastosować podłoże minimalne lub pełne, podłoże selekcyjne lub też różnicujące.

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

Proces sterylizacji można przeprowadzić dwiema drogami:

- przez zabicie drobnoustrojów i ich form przetrwalnych w danym środowisku w wyniku działania: (a) wysokiej temperatury - suszarka, autoklaw, aparat Kocha; (b) promieniowania UV, β , γ , X; (c) związków chemicznych - tlenek etylenu lub propylenu;
- przez usunięcie drobnoustrojów i ich form przetrwalnych 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 szybką i taną.

Pamiętać należy, że w pracowni mikrobiologicznej sterylizujemy wszystko, czym moglibyśmy zakazić badaną hodowlę drobnoustrojów.

1. 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 jałowaniu w autoklawie pH może się obniżyć;
- e) do jałowania rozlewać podłoże do kolb do objętości nie większej niż 3/4 naczynia, aby nie wykypiało w czasie jałowania;
- f) kolby zatykać korkami z waty, zabezpieczać korki przed zamoczeniem folią aluminiową i odpowiednio podpisywać;
- g) stosować możliwie najniższą temperaturę do jałowania.

2. Sposoby sterylizacji

2.1. Jałowienie szkła w suszarce

- a) Odpowiednio zapakowane szkło ułożyć luźno w suszarce, aby umożliwić swobodne krążenie powietrza.
- b) Włączyć ogrzewanie. Czas sterylizacji liczyć od momentu osiągnięcia odpowiedniej temperatury: przy 160°C - 2 godz., przy 180°C - 1 godz. (nie wolno przekraczać temp. 180°C, gdyż grozi to zwęglaniem papieru i waty).

2.2. Jałowienie w autoklawie

Temperatura 100°C nie zabija form przetrwalnych 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 zostają zabite w ciągu około 30 min. Czas trwania sterylizacji w autoklawie zależeć będzie 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.

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 podłoża w temp. 100°C przez 30 min, co 24 godz. W czasie pierwszego ogrzewania zabite zostają formy wegetatywne, a przetrwalniki zostają zaktywowane 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 wegetatywne powstałe po opóźnionym kiełkowaniu.

Ponieważ tyndalizacja opiera się na zjawisku kiełkowania przetrwalników, stosować ją możemy tylko do substancji umożliwiających ten proces, a więc zawierających określone związki organiczne. W ten sposób jałowi się stężone roztwory cukrów, witamin, aminokwasów, 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 filtr o określonej wielkości porów przy zastosowaniu nad- lub podciśnienia. Filtr zatrzymuje bakterie na zasadzie mechanicznej i/lub fizyko-chemicznej. Filtry i oprawki do filtrów należy przed użyciem wyjałowić (na ogół w autoklawie); sterylne musi też być naczynie, do którego filtrujemy jałowy płyn. Do jałowienia niewielkich ilości płynu bardzo wygodne są wysterylizowane filtry jednorazowe.

3. Przygotowanie bulionu odżywczego, agaru odżywczego i 20% roztworu glukozy oraz ich jałowienie

3.1. Bulion odżywczy

Skład:	bulion w proszku	15 g
	woda destylowana	1000 ml

- Bulion w proszku wsypać do kolby, wlać wodę, rozpuścić mieszając. Sprawdzić pH podłoża przy pomocy papierka wskaźnikowego - powinno wynosić 7,2 - 7,4.
- Część bulionu rozlać po około 200 ml do 3 kolb o pojemności 300 ml. Kolby zatkać korkami z waty i zabezpieczyć przed zamknięciem folią aluminiową.
- Jedną kolbę jałować w autoklawie przy nadciśnieniu 1 atm przez 30 min, drugą w aparacie Kocha (3 razy po 30 min. co 24 godz. - tyndalizacja), trzecią pozostawić bez jałowienia.
- Pozostały bulion zużyć do przygotowania agaru odżywczego.

3.2 Agar odżywczy

Skład:	bulion odżywczy	200 ml
	agar-agar w proszku	4 g

- Do kolby o pojemności 300 ml odważyć 4 g sproszkowanego agaru i wlać 200 ml przygotowanego bulionu odżywczego.
 - Kolbę zatkać korkiem z waty, zabezpieczyć folią aluminiową.
 - Jałować w autoklawie przy nadciśnieniu 1 atm przez 30 min.
- Każdy student przygotowuje sobie 200 ml agaru odżywczego na następne ćwiczenia.

3.3. 20% roztwór glukozy

- Przygotowany 20 % roztwór glukozy w wodzie destylowanej rozlać do 3 probówek po około 5 ml.
- Jedną probówkę wyjałować w aparacie Kocha (tyndalizacja), drugą w autoklawie przy nadciśnieniu 1 atm przez 30 min, trzecią pozostawić bez jałowienia. Zaobserwować zmianę barwy roztworu po wyjałowieniu w autoklawie.

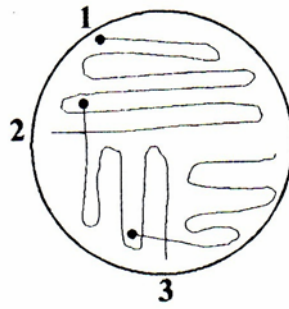
4. Zapoznanie się z techniką pracy sterylnej i sposobami posiewu bakterii

4.1 Technika pracy sterylnej

- Dezynfekcja stołów laboratoryjnych za pomocą sterinolu lub alkoholu etylowego.
- Praca w bezpośrednim sąsiedztwie płomienia palnika.
- Wyżarzanie ez i opalanie głaszczek.

4.2. Praktyczne zastosowanie poznanych technik i metod posiewu bakterii

- Przestrzegając zasad pracy sterylnej rozlać do 3 probówek po 2 ml jałowego bulionu. Po tygodniu sprawdzić jałowość bulionu we wszystkich 4 probówkach (również w tej, z której pobierany był bulion).
- Otrzymaną hodowlę bakteryjną wysiać ezą według wskazówek asystenta:
 - na skos z agarem odżywczym;
 - na płytkę z agarem odżywczym - posiewem redukcyjnym (p. rysunek 1).



Rys. 1. Posiew redukcyjny.

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

III. Zagadnienia do opracowania

1. Jakie parametry należy uwzględnić przy sporządzaniu podłoża mikrobiologicznego?
2. Kryteria podziału podłoży mikrobiologicznych.
3. Sterylizacja i sposoby jej przeprowadzania.
4. Pasteryzacja, dezynfekcja i zastosowanie tych procesów w praktyce.

Ćwiczenie 2

**Temat: Izolowanie drobnoustrojów z różnych środowisk naturalnych.
Izolowanie czystych kultur.**

I. 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: 1) małe rozmiary; 2) krótki czas generacji; 3) różnorodność metaboliczna (zdolność do wykorzystania wielu źródeł węgla, azotu, energii, różnych końcowych akceptorów elektronów); 4) zdolność adaptacji do zmieniających się warunków środowiska; 5) zdolność do życia w warunkach ekstremalnych (dotyczy to temperatury, pH, potencjału oksydo-redukcyjnego, ciśnienia osmotycznego, ciśnienia hydrostatycznego i bardzo niskich stężeń substancji pokarmowych); 6) wytwarzanie form przetrwalnych.

Na ogół w danym środowisku występują różne mikroorganizmy. Jeśli chcemy więc wyizolować określony gatunek, musimy zastosować odpowiednie podłoża i warunki hodowli, hamujące wzrost innych mikroorganizmów i prowadzące do selekcyjnego namnażania mikroorganizmu poszukiwanego. Z wyrosłych kolonii możemy następnie założyć czyste kultury, a po ich identyfikacji, uzyskać czystą kulturę poszukiwanego przez nas gatunku.

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

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.

Klon to czysta kultura i pochodzące od niej populacje bakteryjne.

Szczepy to różne klony należące do tego samego gatunku, a wprowadzone z poszczególnych czystych kultur, izolowanych niezależnie od siebie.

II. Część praktyczna

1. Przygotowanie podłoży

- Rozlać agar odżywczy (przygotowany na poprzednich ćwiczeniach) na płytki Petriego.
- Po zastygnięciu podłoża, płytki wysuszyć.
- Przed dokonaniem posiewów płytki należy odpowiednio podpisać flamastrem na denku, uwzględniając rodzaj posiewanej próbki, rozcieńczenie, inicjały osoby wykonującej posiew.

2. Izolowanie drobnoustrojów z powietrza metodą sedymentacyjną Kocha.

- Płytki z agarem odżywczym postawić w miejscu, gdzie wykonany będzie posiew.
- Zdjąć wieczko i wystawić pożywkę na działanie powietrza przez 5, 10 lub 15 minut zależnie od przewidywanego skażenia powietrza. Po ekspozycji płytki zakryć.
- Po kilkudniowej inkubacji w temperaturze pokojowej policzyć kolonie bakterii, a następnie obliczyć liczbę drobnoustrojów (X) w 10 dm^3 ($0,01 \text{ m}^3$) 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.

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:

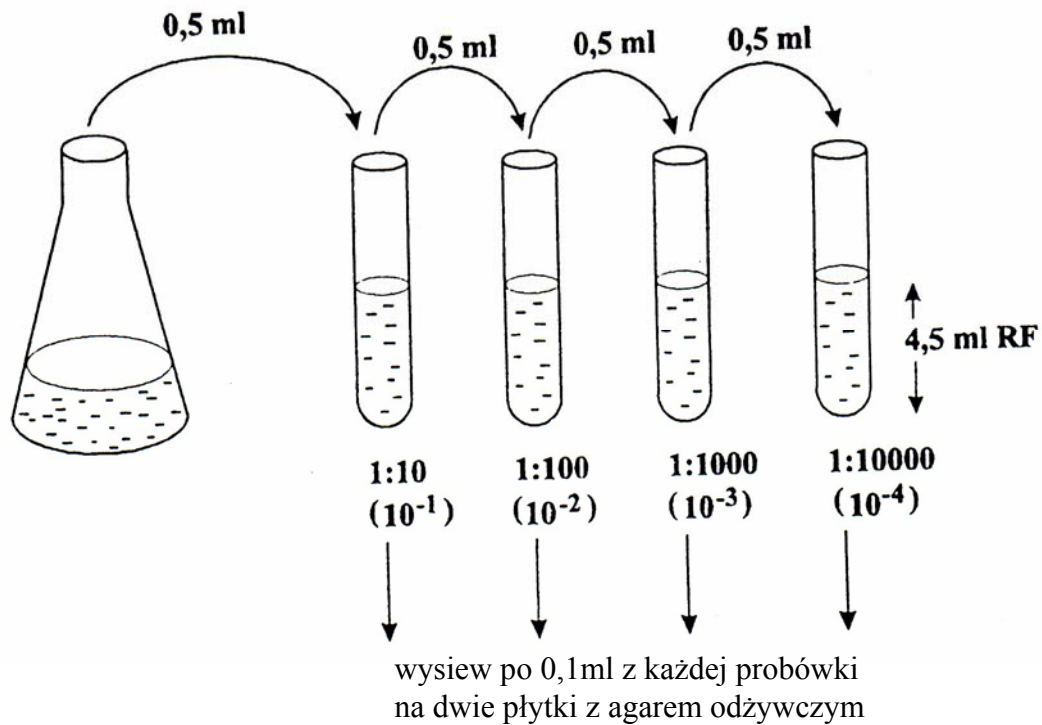
- pomieszczenia służby zdrowia
 - sala operacyjna - 100
 - sala opatrunkowa - 150
 - sala z chorymi - 1000
- pomieszczenia domów mieszkalnych
 - kuchnia i jadalnia - 2000
 - pokój do przyjęć - 1500
 - sypialnia - 1000
- pomieszczenia szkolne
 - sale wykładowe - 1500
 - sale do ćwiczeń - 2000
 - sale gimnastyczne - 3000

3. Izolowanie mikroorganizmów z naturalnego zbiornika wodnego i szacowanie ich liczby

- a) Rozcieńczyć wodę ze zbiornika (10⁻¹ - 10⁻⁴) wg schematu przedstawionego na stronie 9.
 - Wlać do 4 probówek po 4,5 ml soli fizjologicznej.
 - Do pierwszej probówki odmierzyć pipetą (à 1 ml) 0,5 ml badanej wody. Pipetę odłożyć, a zawartość probówki dobrze wymieszać. W ten sposób rozcieńczyliśmy badaną wodę dziesięciokrotnie (10⁻¹).
 - Przenieść 0,5 ml rozcieńczenia 10⁻¹ do następnej probówki z solą fizjologiczną i wymieszać. Uzyskujemy stukrotne rozcieńczenia badanej wody (10⁻²).
 - Postępując analogicznie otrzymujemy rozcieńczenia 10⁻³ i 10⁻⁴.
- b) Na płytki z agarem odżywczym wysiać po 0,1 ml każdego rozcieńczenia w 2 powtórzeniach.
- c) Po kilkudniowej inkubacji w temperaturze pokojowej zaobserwować zróżnicowaną morfologię kolonii mikroorganizmów.
- d) Następnie policzyć kolonie na płytkach. Do liczenia należy wziąć te płytki, na których wyrosło od 30 do 300 kolonii. Obliczyć liczbę bakterii 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.



Rys. 2. Schemat rozcieńczania hodowli bakteryjnej.

4. Izolowanie mikroorganizmów z gleby i określanie ich liczby

- 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. Począć, aż cząstki stałe opadną na dno.
- Przygotować kolejne rozcieńczenia gleby (10^{-1} - 10^{-6}) tak jak w punkcie 3a, traktując roztwór glebowy jako rozcieńczenie 10^{-1} . Wysiać na dwie płytki z agarem odżywczym po 0,1 ml każdego z rozcieńczeń od 10^{-2} do 10^{-6} .
- Po kilkudniowej inkubacji w temperaturze pokojowej zaobserwować zróżnicowaną morfologię kolonii mikroorganizmów.
- Policzyć kolonie, a następnie obliczyć liczbę bakterii w 1 g gleby, stosując wzór z punktu 3d).
- Wybrać jedną z wyrosłych kolonii 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; p. str. 37);
 - brzeg kolonii (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.

- f) Wybraną kolonię posiać metodą posiewu redukcyjnego na agar odżywczy (tak jak pokazano na str. 6). Płytkę inkubować w temperaturze pokojowej. 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.

5. Izolowanie mikroorganizmów z innych środowisk

- a) Na jednej płytce z agarem odżywczym wykonać posiew dowolny, np. kaszlnąć, dotknąć palcem brudnym i przetartym etanolem, dotknąć jakimś przedmiotem itp.
b) Po inkubacji w temperaturze pokojowej obserwować wzrost bakterii.

III. Zagadnienia do opracowania

1. Przyczyny szerokiego rozpowszechnienia mikroorganizmów w przyrodzie.
2. Metody izolowania mikroorganizmów z różnych środowisk naturalnych.
3. Metody izolowania czystych kultur - bezpośrednie i pośrednie.
4. Podstawowe pojęcia mikrobiologiczne - hodowla, czysta kultura, kolonia, szczep, klon.

Ćwiczenie 3

Temat: Wzrost hodowli bakteryjnej.

I. Wprowadzenie

Po wsianiu bakterii na odpowiednie podłoże płynne i inkubacji w optymalnych dla danego gatunku warunkach następuje, po pewnym okresie adaptacji, intensywny przyrost liczby bakterii w hodowli. Jednakże skład podłoża takiej hodowli podlega ciągłym zmianom; ubożeje ono w składniki pokarmowe, natomiast nagromadzają się w nim stopniowo metabolity, wykazujące często działanie toksyczne. Bakterie po okresie intensywnego wzrostu, zaczynają się dzielić coraz rzadziej, w wyniku czego hodowla wchodzi w fazę równowagi a następnie w fazę zamierania, w której podziały prawie zupełnie ustają, a liczba żywych komórek maleje. Tego typu hodowle noszą nazwę hodowli okresowych.

Jeżeli chcemy utrzymać hodowlę w fazie intensywnego wzrostu, musimy ciągle uzupełniać zużywane z podłoża składniki pokarmowe i odprowadzać z hodowli nagromadzające się metabolity i nadmiar komórek. W takiej hodowli ciągłej faza logarytmicznego wzrostu może trwać przez czas nieograniczony, jeśli nie dopuści się do wytworzenia warunków obniżających szybkość wzrostu.

Jeszcze inny rodzaj hodowli uzyskamy, jeśli stworzymy warunki do równoczesnego podziału wszystkich bakterii w hodowli. Taka synchroniczna hodowla jest odbiciem zachowania się pojedynczej komórki i przez to może być przydatna w wielu badaniach dotyczących fizjologii bakterii.

II. Część praktyczna

Szczepy:

Escherichia coli (dziki szczep)

Podłoża i roztwory:

- bulion odżywczy
- podłoże Davisa (płynne)
- agar odżywczy
- roztwór fizjologiczny (0,85% NaCl)

1. Badanie wzrostu bakterii w hodowli okresowej

- a) Przygotować nocne hodowle szczepu w bulionie odżywczym oraz w minimalnym podłożu Davisa.
- b) Każdą z otrzymanych hodowli rozcieńczyć odpowiednim świeżym podłożem w stosunku 1 : 20.
- c) Zmierzyć absorbancję poszczególnych hodowli - nie powinna być wyższa niż 0,1.
- d) Rozcieńczone hodowle nocne podzielić na 3 części:
 - jedną inkubować w warunkach statycznych w 37°C;
 - drugą - z napowietrzaniem również w 37°C;
 - trzecią pozostawić w temp. pokojowej bez napowietrzania.
- e) Inkubację prowadzić przez 3 godziny. Co godzinę pobierać próbki hodowli i oznaczać ich absorbancję.

- f) Na podstawie uzyskanych wyników przygotować wykres zależności absorbancji każdej hodowli od czasu.
Porównać uzyskane wyniki.

2. Określanie liczby bakterii w hodowli

- a) Upłynnić agar odżywczy, rozlać na szalki Petriego; po zakrzepnięciu agaru płytki wysuszyć.
- b) Otrzymaną hodowlę bulionową *E. coli* rozcieńczyć w roztworze soli fizjologicznej do wartości 10^{-6} (milion razy).
- c) Z rozcieńczeń 10^{-5} i 10^{-6} wysiać po 0,1 ml na szalki z agarem odżywczym - każde rozcieńczenie na dwie szalki.
- d) Inkubować w temp. 37°C przez 24 godz. Policzyć kolonie otrzymane na szalkach.
Obliczyć liczbę bakterii w 1 ml wyjściowej hodowli wg wzoru:

$$\text{liczba bakterii w 1 ml} = a \times b \times 10$$

gdzie: **a** - średnia liczba kolonii na płytce
b - odwrotność wysianego rozcieńczenia

III. Zagadnienia do opracowania

1. Hodowle bakteryjne - kryteria podziału, warunki hodowli.
2. Fazy wzrostu w hodowli okresowej.
3. Typy wzrostu bakterii na różnych podłożach.
4. Czynniki, jakie należy brać pod uwagę przy zakładaniu hodowli bakteryjnych.
5. Określanie liczebności mikroorganizmów.

Ćwiczenie 4

Temat: Formy morfologiczne bakterii.

I. 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 i odbarwiacze. Przykładem barwienia złożonego jest metoda Grama, która jest podstawą 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), cylinder (pałeczki i laseczki) i skręcony cylinder (przecinkowce, kretki 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).

II. Część praktyczna

1. Barwienie proste preparatów bakteryjnych

Szczepy bakteryjne

- pałeczki: *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas fluorescens*
- laseczki: *Bacillus subtilis*, *B. megaterium*
- ziarniaki: *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*

Barwniki

- fiolet krystaliczny (barwić 1 minutę)
- błękit metylenowy (barwić 5 minut)

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 wybranym barwnikiem.
- Po określonym czasie 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.
- Po całkowitym wyschnięciu preparatu oglądać go pod mikroskopem, najpierw pod małym powiększeniem, a następnie stosując obiektyw imersyjny.
- Narysować wszystkie oglądane formy morfologiczne bakterii i tworzone przez te bakterie układy komórek.

2. Barwienie złożone metodą Grama

Szczepy bakteryjne

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

Roztwory stosowane do barwienia

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

a) Przygotowanie preparatu

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

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.
- Splukać preparat wodą, osuszyć bibułą i zalać na 30 sekund 95% etanolem.
- Splukać wodą, osuszyć bibułą i dobarwiać safraniną przez 5 minut.
- Splukać wodą, osuszyć i oglądać.
- Narysować obraz widziany w mikroskopie, uwzględniając kolor, na jaki wybarwiły się komórki poszczególnych bakterii.

III. Zagadnienia do opracowania

1. Podstawowe kształty komórek bakteryjnych i tworzone przez nie układy.
2. Technika sporządzania preparatów mikroskopowych (cel i sposoby utrwalania preparatów).
3. Podział metod barwienia: barwienia proste i złożone; pozytywne i negatywne.
4. Zasada barwienia metodą Grama.
5. Bakterie gramujemne i gramodatnie.
6. Technika mikroskopowania.

Ćwiczenie 5

Temat: Budowa komórki bakteryjnej.

I. Wprowadzenie

Strukturami występującymi powszechnie w komórce bakteryjnej są: nukleoid, błona cytoplazmatyczna i rybosomy. Poza tym, prawie wszystkie bakterie posiadają ścianę komórkową, a niektóre - otoczki i rzęski. Ściana komórkowa zawiera warstwę mureiny, która u bakterii gramdodatnich jest gruba, zaś u gramujemnych – cienka i pokryta błoną zewnętrzną. Stosując bejce (zaprawy), można pogrubić ścianę komórkową i rzęski, a następnie je wybarwić, dzięki czemu stają się widoczne w zwykłym mikroskopie optycznym. Obecność otoczek można wykazać, stosując złożone barwienie negatywno-pozytywne. Pewne gatunki bakterii (np. laseczki) wytwarzają endospory, które umożliwiają im przetrwanie w niekorzystnych warunkach środowiska. Można je uwidocznąć, stosując złożone barwienie, w którym stosuje się zieleń malachitową (na gorąco) i safraninę.

II. Część praktyczna

Szczepy:

Bacillus megaterium

Bacillus subtilis

Micrococcus luteus

Proteus vulgaris

Barwniki, utrwalacze, zaprawy i inne:

- wodne roztwory safraniny (0,01%; 0,2%; 0,5%)

- wodny roztwór zieleni malachitowej (5%)

- roztwór taniny (10%)

- tusz chiński

- alkohol metylowy

1. Barwienie ściany komórkowej

- Przygotować rozmaz z nocnej hodowli *Bacillus megaterium*.
- Po wysuszeniu preparat utrwaląc przez 1 min alkoholem metylowym.
- Zlać alkohol, przepłukać preparat roztworem taniny (bejca) i zalać roztworem taniny na 30 min.
- Splukać preparat wodą.
- Barwić 30-60 sek. 0,01% roztworem safraniny.
- Obejrzeć pod mikroskopem najpierw pod małym powiększeniem, potem pod imersją. Narysować obraz mikroskopowy i opisać.

2. Barwienie przetrwalników metodą Schaeffer-Fultona

- Wykonać rozmazy z 24- i 48-godzinnej hodowli *B. megaterium* lub *B. subtilis*.
- Preparat wysuszyć i utrwalić w płomieniu.
- Barwić zielenią malachitową przez około 8 min, podgrzewając preparat, co pewien czas, płomieniem palnika, aż do ukazania się pary.
- Splukać wodą.
- Barwić 0, 5 % safraniną przez 4 min.
- Splukać wodą i osuszyć.
- Preparat obejrzeć pod imersją. Przetrwalniki powinny być wybarwione na zielono a wewnątrz komórki na różowo.

3. Barwienie otoczek metodą Burriego-Ginsa

- a) Na odtłuszczone szkiełko podstawowe nanieść kroplę płynnej hodowli *Micrococcus luteus* (lub *B. megaterium*) lub zrobić zawiesinę bakterii z hodowli stałej i nanieść kroplę na szkiełko.
- b) Dodać kroplę tuszu i zmieszać z hodowlą.
- c) Drugim szkiełkiem podstawowym rozprowadzić zawiesinę po powierzchni szkiełka tak, aby powstała jednorodna, ciemna (lecz nie czarna) warstwa.
- d) Rozmaz wysuszyć na powietrzu, ostrożnie utrwalić w płomieniu palnika.
- e) Barwić 0,2% safraniną przez około 15 sek.
- f) Spłukać barwnik, preparat osuszyć.
- g) Obejrzeć pod mikroskopem. Tło powinno być ciemne, bakterie zabarwione na różowo, zaś otoczki pozostają niewybarwione.

4. Wykazanie zdolności bakterii do ruchu

- a) Z płynnej hodowli *Proteus vulgaris* przygotować preparat w postaci tzw. kropli wiszącej:
 - na szkiełko nakrywkowe nanieść maleńką kroplę płynnej hodowli szczepu;
 - za pomocą wazeliny nałożonej na rogach szkiełka przykleić je nad łezką szkiełka podstawowego.
- b) Nastawić pod mikroskopem obraz brzegu kropli na małym powiększeniu, a następnie zmienić obiektyw na imersyjny. Obserwować ruch własny bakterii.

III. Zagadnienia do opracowania

1. Budowa i funkcja bakteryjnych struktur komórkowych; porównanie komórki prokariotycznej z eukariotyczną.
2. Zastosowanie złożonych metod barwienia do uwidocznienia niektórych struktur komórkowych (otoczka, ściana komórkowa, przetrwalniki).
3. Metody określania zdolności bakterii do ruchu.

Ćwiczenie 6

Temat: Metabolizm bakterii - odżywianie

I. Wprowadzenie

Składniki pożywienia, to związki, które po przyswojeniu przez komórkę bakteryjną, włączają się do jej metabolizmu jako budulec lub źródło energii. 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 a chemotrofy - chemiczną), 2) donory protonów i elektronów przy redukcji NAD lub NADP (litotrofy wykorzystują związki nieorganiczne, a organotrofy - organiczne) i wreszcie 3) na główne źródło węgla (autotrofy wykorzystują dwutlenek węgla, a heterotrofy - związki organiczne). Chemolitoautotrof jest więc bakterią samożywłą, która jako główne źródło energii wykorzystuje energię chemiczną, uzyskaną z utleniania związków nieorganicznych. Chemoorganoheterotrof to mikroorganizm, dla którego związek organiczny jest źródłem węgla, energii i elektronów.

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 więc znajdować się w ich podłożu. Związki te, zwane czynnikiem wzrostowym, to aminokwasy, witamy, 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, a także u archeonów.

II. Część praktyczna

1. Przygotowanie podłoży

a) Podłoże AB

Zmieszać ze sobą: 50 ml soli **A** (Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , pH 8,4)
 50 ml soli **B** (NH_4Cl , MgSO_4 , $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, pH 7,0)
 2 ml roztworu czerwieni fenolowej
 2 ml soli Tuovinen (wersenian sodu, ZnSO_4 , CaCl_2 , MnCl_2 , FeSO_4 , $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, CuSO_4 , CoCl_2 , pH 6,0)
 100 ml 4% agaroidu

b) Agar odżywczy

Skład: wyciąg mięsny, ekstrakt drożdżowy, pepton, NaCl, woda, agar-agar.

c) Podłoże dla nitryfikatorów

Do 2 kolb à 300 ml wlać po 50 ml wody wodociągowej i dodać do każdej z nich po 2 ml następujących roztworów: 6% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,6% MgSO_4 ; 0,1% FeSO_4 ; 0,3% K_2HPO_4 ; 0,6% NaCl; 20% CaCO_3 .

d) Agar odżywczy ze skrobią (1%)

e) Agar odżywczy z mlekiem (4%)

Do upłynnionego agaru odżywczego dodać 8 ml jałowego, odtłuszczonego mleka.

f) Agar odżywczy z tłuszczem (3%)

Do upłynnionego agaru odżywczego dodać 6 g wrzącej margaryny.

g) Podłoże EMB z laktozą

Zmieszać: 190 ml upłynnionego podłoża (o składzie: ekstrakt drożdżowy, hydrolizat kazeiny, K_2HPO_4 , NaCl, woda, agar-agar)

2 ml wodnego roztworu 4% eozyny

2 ml wodnego roztworu 0,65% błękitu metylenowego

10 ml 20% roztworu laktozy.

h) Żelatyna odżywcza: woda, żelatyna, pepton

i) Podłoże Davisa dla prototrofa

Zmieszać ze sobą: 40 ml soli Davisa (K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , $MgSO_4$, $(NH_4)_2SO_4$, cytrynian sodu, woda)

4 ml 20 % glukozy

150 ml agaroidu

j) Podłoże Davisa dla auksotrofa

Do podłoża Davisa sporządzonego jak wyżej dodać 2 ml hydrolizatu kazeiny i 2 ml roztworu tiaminy.

k) Podłoże dla bakterii wiążących azot

Skład: woda, mannitol, K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , $MgSO_4$, NaCl, $CaCO_3$, ślady $MnSO_4$, $FeCl_2$, Na_2MoO_4 .

l) Podłoże Davisa z różnymi źródłami azotu

Zmieszać ze sobą: 40 ml bezazotowych soli Davisa

4 ml 20% glukozy

2 ml roztworu zawierającego źródło azotu

150 ml agaroidu

Źródła azotu to: 10 % roztwór NH_4Cl

10 % roztwór KNO_3

20 % roztwór hydrolizatu kazeiny

2. Źródła węgla i energii

a) Określenie typu pokarmowego badanych szczepów

Szczepy

Bacillus subtilis

Halothiobacillus neapolitanus

Paracoccus versutus

Micrococcus luteus

Podłoża

podłoże mineralne AB

agar odżywczy

- Płytkę z podłożem AB i z agarem odżywczym podzielić na 4 sektory i odpowiednio podpisać.

- Każdy ze szczepów wysiać rysą na oddzielnych sektorach obu podłoży.

- Po inkubacji w temperaturze pokojowej określić typ pokarmowy badanych bakterii.

Zmiana barwy podłoża AB z czerwonej na żółtą świadczy o jego zakwaszeniu.

b) Wykazanie obecności bakterii nitryfikacyjnych w glebie

Materiał badany

gleba

Podłoże

podłoże mineralne z punktu 1c)

- Podłoże przygotowane w punkcie 1c) rozlać do 2 kolbek à 100 ml.
- Do jednej z nich wprowadzić grudkę gleby. Drugą zostawić niezaszczepioną jako kontrolę. Po 1 i 2 tygodniach inkubacji w temperaturze pokojowej zbadać, czy w hodowli pojawiły się azotyny. Do jednej probówki pobrać około 2 ml pożywki z kolby zaszczonej glebą, a do drugiej z kolby kontrolnej. Do obu probówek dodać po kilka kropli mieszaniny α -naftyloaminy z kwasem sulfanilowym lub wsypać odrobinę odpowiedniego odczynnika firmy Merck. Pojawienie się różowego zabarwienia świadczy o obecności azotynów w próbie.

c) Badanie zdolności bakterii heterotroficznych do wykorzystywania różnych organicznych źródeł węgla

Szczepy

Escherichia coli dzika (Lac^+)
Escherichia coli mutant (Lac^-)
Bacillus subtilis
Pseudomonas fluorescens

Podłoża

agar odżywczy ze skrobią
 agar odżywczy z mlekiem
 agar odżywczy z tłuszczem
 EMB z laktozą
 żelatyna odżywcza

- Płytki z pożywkami podzielić na pół, odpowiednio podpisać i zrobić posiewy:
 - na agar odżywczy z mlekiem i ze skrobią posiać rysą *B. subtilis* i dziką *E. coli*;
 - na agar odżywczy z tłuszczem posiać rysą *E. coli* i *P. fluorescens*;
 - na podłoże EMB z laktozą posiać posiewem redukcyjnym dziką *E. coli* (Lac^+) i mutantą *E. coli* (Lac^-);
- Na jeden słupek z żelatyną odżywczą wsiać igłą *B. subtilis*, a na drugi *E. coli*.
- Płytki z podłożem EMB inkubować w 37°C przez noc, (a następnie wstawić do lodówki, jeśli nie mogą być zaraz obejrzone).
- Pozostałe posiewy inkubować w temperaturze pokojowej przez kilka dni.

Odczyt posiewów po inkubacji:

- Płytki z agarem odżywczym i skrobią należy zalać płynem Lugola. Brak fioletowego zabarwienia wokół strefy wzrostu bakterii świadczy o rozkładzie skrobi.
- Na agarze odżywczym z mlekiem obserwuje się przejrzyste strefy wokół linii wzrostu szczepów hydrolizujących kazeinę.
- Płytki z agarem odżywczym i tłuszczem należy zalać 20% roztworem $CuSO_4$. Pojawienie się szmaragdowego zabarwienia wokół linii wzrostu świadczy o rozkładzie tłuszczu.
- Na podłożu EMB kolonie bakterii zużywających cukier są fioletowe z metalicznym połyskiem, a kolonie bakterii niezdolnych do zużycia danego cukru są różowe.

d) Prototrofy i auksotrofy

Szczepy

E. coli dzika
E. coli AB1157 thr leu pro his arg thi
E. coli 108 pro met thy

Podłoża:

podłoże Davisa
 podłoże Davisa z hydrolizatem kazeiny i tiaminą
 agar odżywczy

- Płytkę z agarem odżywczym, podłożem Davisa oraz podłożem Davisa uzupełnionym hydrolizatem kazeiny i tiaminą podzielić na trzy sektory i odpowiednio podpisać.
- Na jednym sektorze wszystkich trzech pożywek posiać wężymkiem dziką *E. coli*, a na dwóch pozostałych oba mutanty auksotroficzne.
- Po inkubacji zinterpretować otrzymane wyniki.

3. Źródła azotu

a) Izolowanie z gleby bakterii wiążących azot cząsteczkowy

- Z kolbki zawierającej podłoże bezazotowe (punkt 1k) odlać do probówki około 10 ml.
- Do probówki dodać „szczyptę” sacharozy.
- Probówkę i kolbę zaszczyć grudką gleby. Inkubować w temperaturze pokojowej.
- Po tygodniu zaobserwować wzrost *Azotobacter* sp. w postaci błonki na powierzchni pożywki.
- Pobrać próbkę z błonki na dwa szkiełka podstawowe.
- Jedno przykryć szkiełkiem nakrywkowym i obserwować przyżyciowo komórki *Azotobacter* sp. oraz jego cysty, widoczne jako okrągłe twory, dość silnie załamujące światło.
- Na drugim wykonać preparat tuszowy dobarwiony błękitem metylenowym. Obserwować komórki z otoczkami.
- Jeśli w probówce z pożywką bezazotową namnożył się *Clostridium pasteurianum*, z dna probówki powinny odrywać się pęcherzyki gazu, a po zdjęciu korka czuć jest zapach kwasu masłowego.
- Z dennej części probówki pobrać pipetą nieco hodowli i zmieszać na szkiełku podstawowym z równą objętością płynu Lugola. Przykryć szkiełkiem nakrywkowym.
- Obserwować w mikroskopie laseczki z zabarwionym na fioletowo materiałem zapasowym granulacją.

b) Wykorzystywanie różnych innych źródeł azotu

- Trzy płytki z podłożem Davisa z trzema różnymi źródłami azotu - NH_4Cl , KNO_3 i hydrolizatem kazeiny - podzielić na dwie części.
- Na jednej połowie posiać rysą *E. coli*, a na drugiej - *B. subtilis*.
- Po inkubacji zaobserwować, jakie źródła azotu może wykorzystywać każda z badanych bakterii.

III. Zagadnienia do opracowania

1. Źródła węgla i energii.
2. Typy pokarmowe bakterii.
3. Prototrofy i auktotrofy; czynniki wzrostowe.
4. Różnorodność źródeł azotu wykorzystywanych przez bakterie.

Ćwiczenie 7

Temat: Metabolizm bakterii - procesy oddechowe.

I. Wprowadzenie

Chemotrofy uzyskują energię z utleniania jakichś 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 przenośników, dlatego też najbardziej wydajne energetycznie jest oddychanie tlenowe, w którym końcowym akceptorem jest tlen.

Istnieje duża grupa bakterii względnie tlenowych, które - przy braku tlenu - mogą oddychać beztlenowo, wykorzystując utlenione związki nieorganiczne, znajdujące się w podłożu, jako końcowe akceptory elektronów. W oddychaniu azotanowym (którego przykładem jest denitryfikacja), akceptorem są azotany. Beztlenowce nie potrafią wykorzystać tlenu jako akceptora elektronów. Niektóre z nich wykorzystują siarczany (bakterie redukujące siarczany), inne dwutlenek węgla (bakterie homoacetogenne).

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.

II. Część praktyczna

Szczepy:

Escherichia coli
Bacillus subtilis
Pseudomonas fluorescens
Serratia marcescens
Enterococcus faecalis
Clostridium sporogenes
Pseudomonas stutzeri

Podłoża i roztwory:

- bulion odżywczy
 - bulion odżywczy z KNO₃ (0,1%)
 - mleko z lakmusem
 - 20% roztwór glukozy
 - 0,3% roztwór błękitu metylenowego
 - woda utleniona
 - jałowa parafina

1. Określenie stosunku bakterii do tlenu

a) Przygotowane w probówkach podłoża zaszczyć kroplą nocnej hodowli bulionowej wybranego szczepu wg wskazówek asystenta:

- bulion odżywczy z dodatkiem 0,5% glukozy - wysoki słup podłoża;
- bulion odżywczy - niski słup podłoża.

Przed posiewem probówki z wysokimi słupami podłoża należy zagrzać we wrzącej łaźni wodnej, a następnie szybko schłodzić.

b) Po posiewie - wysoki słup podłoża należy zalać jałową parafiną, aby uniemożliwić dostęp powietrza. Zaszczone podłoża inkubować w 37°C przez 24 godz.

c) Obserwować wzrost lub jego brak w poszczególnych probówkach. Określić stosunek badanych bakterii do tlenu.

2. Wykazanie obecności katalazy u wybranych szczepów bakterii

24-godzinne hodowle szczepów bakterii na płytkach z agarem odżywczym 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 i denitryfikacja

- Dwie probówki zawierające bulion odżywczy z KNO_3 (wysoki słup pożywki i rurka Durhama) zaszczyć – jedną *P. stutzeri*, drugą *E. coli*; trzecią pozostawić jako kontrolę.
- Po 24-godzinnej inkubacji w 30°C obserwować obecność gazu w rurkach Durhama, określić zmianę pH podłoża (za pomocą papierka wskaźnikowego), sprawdzić obecność jonów NO_2^- w hodowli (za pomocą specjalnego odczynnika).
- Na podstawie uzyskanych wyników określić, który ze szczepów jest zdolny do denitryfikacji.

2.2. Fermentacja i peptonizacja mleka

- Do probówek zawierających odtłuszczone, jałowe mleko z lakmusem wsiać kolejno: *Enterococcus faecalis*, *E. coli*, *B. subtilis*, czwartą probówkę pozostawić nie zaszczyć.
- Inkubować 24 godz w 37°C , zaobserwować zmiany w podłożu: zakwaszenie lub alkalizację, powstanie skrzepu kazeiny, hydrolizę kazeiny, redukcję lakmusu.
- Na podstawie zaobserwowanych zmian określić zdolność badanych szczepów do fermentacji i peptonizacji mleka.

Mleko odtłuszczone zawiera laktozę, kazeinę, sole mineralne i witaminy - jest więc znakomitą pożywką, na której może rozwijać się ogromna liczba gatunków bakterii.

Jeśli bakterie fermentują laktozę, wówczas powstaje kwas mlekowy w takiej ilości, że wytrąca się kazeina jako tzw. skrzep kwaśny. Następuje zmiana barwy lakmusu na różową. Wskutek wytworzenia się warunków prawie beztlenowych w dolnej części słupa pożywki następuje redukcja lakmusu, który pełni rolę ostatecznego akceptora elektronów.

Bakterie, które nie fermentują laktozy mogą wykazywać zdolność do peptonizacji kazeiny po jej uprzednim wytrąceniu przez podpuszczkę (tzw. skrzep słodki). W tym przypadku obserwuje się alkalizację mleka (zmiana barwy lakmusu na niebieską).

3. Test redukcji błękitu metylenowego jako demonstracja intensywności procesu oddechowego

- Ponumerować pięć probówek.
- Przygotować rozcieńczenia młodej hodowli bulionowej *E. coli* wg schematu:

nr probówki	bulion (ml)	hodowla (ml)
1	9	1
2	7	3
3	5	5
4	-	10
5 (kontrola)	10	-

- c) Do każdej probówki dodać 0,1 ml wodnego roztworu błękitu metylenowego. Zawartość probówek dokładnie wymieszać i wstawić je do termostatu o temp. 37°C.
- d) W odstępach 10-minutowych obserwować zabarwienie zawartości probówek. Zanotować czas odbarwienia błękitu w poszczególnych probówkach.
- e) Po zakończeniu obserwacji zawartość probówek ponownie wymieszać. Wyjaśnić obserwowane zmiany zabarwienia.

III. Zagadnienia do opracowania

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

Cwiczenie 8

Temat: Koniugacja u bakterii.

I. Wprowadzenie

Koniugacja jest jednym ze sposobów przekazywania materiału genetycznego u bakterii. Proces ten wymaga bezpośredniego kontaktu dwu komórek, z których jedna pełni rolę dawcy a druga biorcy materiału genetycznego. Zdolność do przekazywania materiału genetycznego (bycia dawcą) jest uwarunkowana obecnością w komórce plazmidu koniugacyjnego. Jednym z badanych na ćwiczeniach plazmidów jest plazmid F. Jest to kółko zamknięte, dwuniciowa cząsteczka DNA występująca albo w stanie autonomicznym (szczepy F⁺), w którym replikuje się niezależnie od chromosomu gospodarza, albo w stanie zintegrowanym z chromosomem (szczepy Hfr), w którym replikuje się jako jego część.

Plazmid F niesie informację genetyczną nadającą komórce gospodarza cechy dawcy, a także informację dotyczącą inicjacji i regulacji własnej replikacji oraz transferu do komórki pozbawionej tego plazmidu. W wyniku koniugacji biorcy F⁻ z dawcą F⁺ powstają transkoniuganty, które uzyskują plazmid F.

Koniugacja biorcy F⁻ z dawcą typu Hfr prowadzi do ukierunkowanego przekazywania chromosomu dawcy, w wyniku czego powstają z dużą częstością rekombinanty chromosomowe, nie zawierające jednak plazmidu F. Częstość pojawiania się różnego typu rekombinantów jest zależna od odległości danego markera od punktu początkowego transferu (ang. origin) i jest tym większa, im bliżej tego punktu leży dany gen.

W zależności od miejsca integracji plazmidu F z chromosomem bakteryjnym, powstają różnego typu szczepy Hfr; dany typ ma jednak zawsze ten sam punkt początkowy i ten sam kierunek przekazywania DNA.

Zastosowanie różnych typów Hfr pozwoliło na określenie położenia różnych genów na chromosomie bakteryjnym i skonstruowanie tzw. map chromosomowych, podających odległości między poszczególnymi genami w jednostkach rekombinacyjnych (częstość rekombinacji) lub czasowych (czas wejścia danego genu do komórki biorcy).

Podobnie jak plazmid F mogą być przekazywane inne plazmidy koniugacyjne. Niosą one często, poza genami warunkującymi replikację i transfer koniugacyjny, także geny nadające komórce gospodarza określone cechy fenotypowe, np. oporność na antybiotyki, metale ciężkie, czy też zdolność do metabolizowania określonych źródeł węgla (np. toluenu). Cechy te w pewnych warunkach środowiska mogą stać się selektywnie korzystne dla bakterii, która uzyskała plazmid.

Koniugacja (wraz z transformacją i transdukcją) jest sposobem horyzontalnego transferu genów między bakteriami.

II. Część praktyczna

Szczepy:

Escherichia coli

a) F ⁻ 108	<i>pro met thy</i> Str ^r	- biorca
Hfr C	prototrof Str ^s -	- dawca
b) MC1061R	Rif ^r	- biorca
DH1 (R6K/drd1)	Ap ^r	- dawca
MC1061(R6K/drd1Cm)	Cm ^r	- dawca

Podłoża i roztwory:

- agar odżywczy
- podłoże Davisa płynne (150 ml wody dest., 40 ml soli Davisa, 4 ml 20% glukozy)
- podłoże Davisa stałe (150 ml agaroidu, 40 ml soli Davisa, 4 ml 20% glukozy)
- roztwór fizjologiczny
- roztwór hydrolizatu kazeiny (20%)
- roztwory aminokwasów: metioniny i proliny (1 mg/ml)
- roztwór tyminy (3 mg/ml)
- roztwór streptomycyny (5 mg/ml)
- roztwór ampicyliny (5 mg/ml)
- roztwór chloramfenikolu (2 mg/ml)
- roztwór ryfampicyny (5 mg/ml).

Uwaga: Studenci otrzymują gotowe, jałowe roztwory metioniny, proliny, tyminy i antybiotyków. Należy dodawać je w ilości 1 ml na 100 ml podłoża.

Każdy student wykonuje jedną z koniugacji:

- 1) F⁻108 x HfrC
- 2) MC1061R x DH1(R6K/drd1)
- 3) MC1061R x MC1061(R6K/drd1Cm)

Koniugacja 1

1. Szczepy rodzicielskie hodować przez 18 godz. w minimalnym podłożu Davisa uzupełnionym wymaganymi przez szczep czynnikami oraz hydrolizatem kazeiny.
2. Nocną hodowlę każdego szczepu rozcieńczyć 1 : 20 świeżym podłożem i inkubować w 37°C do osiągnięcia fazy wzrostu logarytmicznego (2,5 - 3 godz.).
3. Hodowlę dawcy i biorcy mieszać w stosunku 1:10 (4,5 ml hodowli biorcy i 0,5 ml hodowli dawcy Hfr).
4. Mieszaninę koniugacyjną wstawić do termostatu o temp. 37°C na 60 min.
5. Rozcieńczyć hodowlę szczepu dawcy i wysiać na płytce z agarem odżywczym w celu określenia liczby komórek użytych do koniugacji. Płytki inkubować przez 24 godz. w 37°C.
6. Po zakończeniu koniugacji mieszaninę koniugacyjną rozcieńczyć i wysiać na odpowiednie podłoża selekcyjne wg schematu:
 - a) selekcja rekombinantów Pro⁺Str^r - na podłożu Davisa z dodatkiem metioniny, tyminy i streptomycyny - wysiać rozcieńczenie 10⁻² i 10⁻³ (po dwa powtórzenia);
 - b) selekcja rekombinantów Met⁺Str^r - na podłożu Davisa z dodatkiem proliny, tyminy i streptomycyny - wysiać rozcieńczenie 10⁻¹ i 10⁻² (po dwa powtórzenia).
 Inkubować w 37°C przez 48 godzin.
7. Policzyc kolonie rekombinantów i szczepu dawcy; obliczyć częstość rekombinacji wg wzoru:

liczba rekombinantów w 1 ml x 100

liczba dawcy w 1 ml mieszaniny koniug.

8. Zinterpretować otrzymane wyniki.

Koniugacja 2 i 3

1. Przygotować nocne hodowle szczepu MC1061R na bulionie odżywczym, DH1(R6K/drd1) na bulionie z ampicyliną (stęż. 50 µg/ml), a MC1061(R6K/drd1Cm) na bulionie z chloramfenikolem (20 µg/ml).
2. Nocne hodowle rozcieńczyć 10-krotnie świeżą pożywką bez antybiotyku i inkubować w 37°C do uzyskania fazy wzrostu logarytmicznego (2-3 godziny).
3. Zmieszać logarytmiczne hodowle biorecy i dawcy w stosunku 1:1 i inkubować 60 min w 37°C.
4. Rozcieńczyć mieszaniny koniugacyjne i wysiać rozcieńczenia 10^{-2} – 10^{-3} na podłoża selekcyjne:
 - a) agar odżywczy z ryfampicyną i ampicyliną (po 50 µg/ml) - dla transkoniugantów Rif^rAp^r;
 - b) agar odżywczy z ryfampicyną (50 µg/ml) i chloramfenikolem (20 µg/ml) - dla transkoniugantów Rif^rCm^r.
 Płytki inkubować w 37°C przez 24 godziny.
5. Rozcieńczyć hodowlę szczepu dawcy i wysiać na płytki z agarem odżywczym w celu określenia liczby komórek użytych do koniugacji. Płytki inkubować przez 24 godz. w 37°C.
6. Policzyc kolonie transkoniugantów i szczepów dawców; obliczyć częstość przekazywania plazmidu wg wzoru:

liczba transkoniugantów w 1 ml x 100

liczba dawcy w 1 ml mieszaniny koniug.

7. Zinterpretować otrzymane wyniki.

III. Zagadnienia do opracowania

1. Sposoby przekazywania materiału genetycznego u bakterii.
2. Różne typy dawców w koniugacji.
3. Przekazywanie cech chromosomowych i plazmidowych.
4. Selekcjonowanie różnych typów rekombinantów i transkoniugantów.

Ćwiczenie 9

Temat: Podstawowe techniki pracy z bakteriofagami

I. Wprowadzenie

Bakteriofagi, zwane w skrócie fagami, są bezwzględnymi, wewnątrzkomórkowymi pasożytami bakterii. Są one zdolne do reprodukcji, ale nie mają własnego metabolizmu. Do namnażania się wykorzystują aparat metaboliczny gospodarza. Zwykle dany fag infekuje tylko określony gatunek, bądź szczep czy grupę szczepów bakterii. Kolejne etapy infekcji fagowej to 1) adsorpcja do wrażliwej komórki, posiadającej określony receptor; 2) penetracja kwasu nukleinowego do komórki; 3) replikacja kwasu nukleinowego wirusa; 4) synteza podjednostek białkowych płaszcza; 5) łączenie się podjednostek białkowych i pakowanie kwasów nukleinowych (czyli tworzenie cząstek wirusa); 6) uwolnienie namnożonych cząstek wirusa z komórki, najczęściej w wyniku jej lizy. Niektóre fagi nitkowate po namnożeniu opuszczają komórki gospodarza nie doprowadzając do ich lizy.

Fagi łagodne (umiarkowane) mają zdolność wejścia w stan stabilnej równowagi (zwanej lizogenią) z komórkami gospodarza. W czasie infekcji populacji bakterii fagiem łagodnym większość komórek ulega lizie, a tylko część lizogenizacji.

Fagi hoduje się i bada na podłożu stałym porośniętym gęsto bakteriami (tzw. murawa bakteryjna), gdzie w wyniku ich działalności można obserwować tzw. łysinki, lub w płynnej hodowli bakterii wrażliwych, gdzie aktywność fagów przejawia się stopniowym spadkiem mętności hodowli, w miarę lizy komórek gospodarza. Łysinka jest to widoczna gołym okiem strefa przejaśnienia w gęstym wzroście bakterii na podłożu stałym, powstająca najczęściej wskutek lizy części lub wszystkich komórek przez fagi. Zwykle łysinka powstaje w wyniku pierwotnej infekcji jednej bakterii przez jeden wirion. Morfologia łysinki tzn. wielkość, kształt brzegów, stopień przejrzystości, może być pomocna w identyfikacji faga, np. fagi zjadliwe tworzą łysinki przejrzyste, zaś fagi łagodne - mętne, gdyż nie lizują wszystkich komórek.

II. Część praktyczna

Szczepy i bakteriofagi

E. coli JM109 F' lub TG1
E. coli DH1 lub DH5α
E. coli(λ)
 λ_{vir}
 M13

Podłoża

agar odżywczy
 agar odżywczy półpłynny (0,7%)
 bulion odżywczy

1. Oznaczenie miana faga techniką agaru dwuwarstwowego

- Rozcieńczyć odpowiednio zawiesinę faga bulionem odżywczym (wg wskazówek asystenta).
- Do 4 probówek wlać po 0,1 ml hodowli *E. coli* DH1, a następnie dodać po 0,1 ml sąsiednich rozcieńczeń zawiesiny faga w dwóch powtórzeniach (np. do dwóch 10⁻⁴ i do dwóch 10⁻⁵). Inkubować 20 min w 37°C.
- Do każdej probówki dodać po 3 ml upłynnionego i schłodzonego do około 46°C agaru półpłynnego. Wymieszać, obracając probówkę między dłońmi.
- Natychmiast wylewać zawartość probówki na szalkę z agarem odżywczym i rozprowadzić równomiernie po całej jej powierzchni.

- e) Po zastygnięciu agaru, inkubować płytki w 37°C przez 24 godziny.
 f) Obliczyć liczbę łysinek fagowych. Uśrednić wyniki z dwóch płytek i uwzględniając rozcieńczenie obliczyć miano faga (X) wg wzoru:

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

gdzie X - miano faga PFU/ml

a - średnia liczba łysinek

b - odwrotność rozcieńczenia

10 - przeliczenie na 1 ml wyjściowej zawiesiny

2. Rodzaje łysinek fagowych

- a) Do probówki dodać 0,1 ml hodowli *E. coli* TG1 i 3 ml upłynnionego, schłodzonego agaru półpłynnego. Wymieszać i wylać na szalkę z agarem odżywczym, rozprowadzając równomiernie po całej powierzchni.
 b) Po zastygnięciu podzielić płytkę na 3 sektory i na każdy z nich nakropić nie więcej niż 10 μ l zawiesiny:

faga λ_{vir}

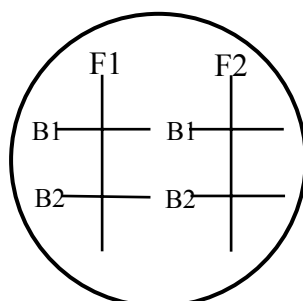
faga M13

hodowli *E. coli*(λ)

- c) Po wsiąknięciu zawiesin, odwrócić płytki do góry dnem i inkubować w 37°C.
 d) Opisać rodzaje stref lizy na murawie bakteryjnej.

3. Test wrażliwości na infekcję fagiem (cross-streaking)

- a) Na szalkę z agarem odżywczym nanieść w postaci rysy, za pomocą ezy, zawiesinę faga λ_{vir} i równomiernie ją rozprowadzić wzdłuż linii posiewu.
 b) Równolegle w podobny sposób nanieść faga M13.
 c) Po wsiąknięciu zawiesin fagowych nabrać na eżę hodowlę *E. coli* TG1 i jednym ruchem posiać ją rysą w poprzek posiewu faga λ_{vir} .
 d) Eżę opalić, ponownie nabrać hodowli tego samego szczepu i posiać ją rysą w poprzek faga M13.
 d) W taki sam sposób posiać *E. coli* DH5 α .
 e) Po wsiąknięciu hodowli w pożywkę inkubować płytki w 37°C.
 f) Ocenić wrażliwość obu szczepów na badane fagi.



Rys. 3. Określanie wrażliwości bakterii na fagi (test cross streaking).

III. Zagadnienia do opracowania

1. Etapy infekcji fagowej, cykl lityczny i lizogeny.
2. Od czego zależy wrażliwość szczepu bakteryjnego na infekcję bakteriofagiem?
3. Podstawowe techniki pracy z bakteriofagami i ich zastosowanie.
4. Łysinka fagowa.

Ćwiczenie 10

Temat: Analiza mikrobiologiczna wody do celów sanitarnych Oznaczanie bakterii grupy coli - miano coli

I. Wprowadzenie

W wodach powierzchniowych, oprócz typowej mikroflory wodnej, mogą się też znajdować mikroorganizmy, które zostały wypłukane z gleby lub przedostały się do niej wraz ze ściekami. 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 patogennych, może stanowić źródło zakażenia. Zmusza nas to do prowadzenia stałej kontroli sanitarnej wody pitnej, wód zbiorników powierzchniowych i wody w basenach. O możliwości występowania w badanej wodzie mikroorganizmów patogennych wnioskujemy 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, nieprzetrwalnikujące, względnie beztlenowe, fermentujące laktozę po 48 godz. z wytworzeniem kwasu oraz gazu i tworzące na podłożu Endo charakterystyczne bordowe kolonie z metalicznym połyskiem. Bakterie z grupy coli dzielą się na dwa typy: typ fekalny, w skład którego wchodzi bakterie fermentujące laktozę z wytworzeniem kwasu i gazu w 37° i 44°C (*E. coli*) i typ ziemny, w skład którego wchodzi bakterie ziemne, niezdolne do fermentacji laktozy w 44°C (*Citrobacter* sp. i *Enterobacter* sp.). Obecność w wodzie bakterii z grupy coli świadczy o skażeniu badanej wody ściekami bytowymi lub glebą.

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

II. Część praktyczna

Materiał

woda wodociągowa
woda ze zbiornika naturalnego
ścieki komunalne

Podłoża

agar odżywczy
podłoże Eijkmana o składzie:
pepton, laktoza, NaCl, purpura bromo-
krezolowa

1. Badanie wody wodociągowej.

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 Petriego 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.).
 - Po inkubacji policzyć liczbę kolonii na płytkach i uśrednić. Porównać liczbę psychrofilii i mezofilii.
- c) Oznaczyć bakterie z 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.

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

- a) Pobrać próbkę wody ze zbiornika.
- b) Oznaczyć liczbę bakterii psychrofilnych i mezofilnych.
- Rozcieńczyć badaną wodę 10^{-1} do 10^{-4} .
 - Po 0,1 ml każdego z rozcieńczeń wysiać na 4 płytki z agarem odżywczym.
 - Dwie z nich inkubować w 37°C, a dwie w temperaturze pokojowej.
 - Policzyć wyrosłe kolonie. Na podstawie wzoru z punktu 2c ze str. 4 obliczyć liczbę bakterii psychrofilnych i mezofilnych w 1 ml badanej wody. Porównać krytycznie wyniki.
- c) 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.

Zakwaszenie podłoża (zmiana barwy podłoża z fioletowej na żółtą) i obecność gazu w rurce Durhama świadczą o występowaniu bakterii z grupy coli, przy czym jeśli takie zmiany podłoża obserwuje się w probówkach inkubowanych w 44°C - bakterii z grupy coli typu fekalnego. Ostatnia probówka w szeregu z wynikiem pozytywnym stanowi podstawę do oznaczenia miana coli i miana coli typu fekalnego. Brak gazu i zakwaszenia po 48 godz. przyjmuje się jako wynik ujemny.

3. Oznaczyć bakterie z grupy coli w ściekach komunalnych metodą fermentacyjno-probówkową

- a) Przygotować rozcieńczenia badanych ścieków 10^{-1} do 10^{-5} .
- b) Oznaczyć miano coli metodą fermentacyjno-probówkową tak jak w punkcie 2c).

III. 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.
- 5. Wykrywanie bakterii grupy coli metodą fermentacyjno-probówkową i metodą filtrów membranowych.
- 6. Miano coli i wskaźnik coli.

III. KRÓTKA CHARAKTERYSTYKA BAKTERII STOSOWANYCH NA ĆWICZENIACH

(na podstawie Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, red. J.G. Holt. Williams & Wilkins, Baltimore, 1984-1989, tomy I-IV oraz wydanie II, tom 2, 2005.

TYP FIRMICUTES

1. Rodzaj *Bacillus*

(łac. *bacillum* – laseczka/pałeczka)

Laseczki gramdodatnie, poruszające się za pomocą rzęsek. Występują pojedynczo lub tworzą łańcuszki. Tlenowce lub warunkowe tlenowce. Chemoorganoheterotrofy - są wśród nich prototrofy i auksotrofy. Tworzą endospory. Ich pierwotnym siedliskiem jest gleba, ale dzięki endosporom można je izolować z najróżniejszych środowisk. Niektóre gatunki są patogenami, np. *B. anthracis* (laseczka węglik).

- a) *B. megaterium* (laseczka olbrzymia)
(gr. *mega* – wielki; gr. *teras* – potwór, bestia)

Tworzy łańcuszki. Centralnie położone endospory nie powodują rozdęcia komórki macierzystej. Prototrof. Temp. optymalna 30°C.

- b) *B. subtilis* (laseczka sienna)
(łac. *subtilis* – wysmukły, cienki, nikły)

Tworzy łańcuszki. Centralnie położone endospory nie powodują rozdęcia komórki macierzystej. Prototrof. Temp. optymalna 37°C. Łatwo można wyizolować tę bakterię z siana.

2) Rodzaj *Clostridium*

(gr. *kloster* – wrzeciono; *clostridium* – małe wrzeciono)

Laseczki gramdodatnie. Beztlenowce. Chemoorganoheterotrofy. Tworzą endospory owalne bądź okrągłe, często o średnicy większej od średnicy komórki macierzystej. Niektóre gatunki są chorobotwórcze, np. *C. tetani* (laseczka tężca), *C. botulinum* (laseczka jadu kielbasianego).

- a) *C. pasteurianum*
(łac. *pasteurianum* – należący do Pasteura)

Prototrof zdolny do wiązania azotu cząsteczkowego. Gromadzi granulozę. Owalne endospory położone są subterminalnie i powodują rozdęcie komórki macierzystej. Temp. optymalna 30-37°C. Występuje w glebie na całym świecie.

3) Rodzaj *Enterococcus*

(gr. *enteron* – jelito; gr. *kokkos* – pestka, ziarno, jagoda; *Enterococcus* – ziarniak jelitowy)

- a) *Enterococcus faecalis* (paciorkowiec kałowy)
(łac. *faex* – odchody; *faecalis* – kałowy)

Gramdodatni ziarniak występujący w parach i krótkich łańcuszkach. Nieruchliwy. Lepiej rośnie przy obniżonym ciśnieniu tlenu (beztlenowiec aerotolerancyjny lub mikroaerofil). Fermentuje węglowodany z wytworzeniem głównie kwasu mlekowego (bez gazu). Chemoorganotrof, auktotrof. Występuje w przewodzie pokarmowym ludzi i zwierząt, na owadach i roślinach. Znajdowany również w żywności. Zdolny do wzrostu w temp. 10° i 45°C, w obecności 6,5% NaCl i pH 9,6. Patogen oportunistyczny odpowiedzialny za wiele zakażeń szpitalnych, np. powoduje infekcje dróg moczowych, zakażenia ran pooperacyjnych.

4) Rodzaj Staphylococcus (gronkowce)

(gr. *staphyle* – winne grono; gr. *kokkos* – pestka, ziarno, jagoda)

- a) **S. epidermidis** (gronkowiec skórny, dawniej gronkowiec biały)
(łac. *epidermidis* – skórny)

Gramdodatni ziarniak występujący głównie w postaci dwoinek i tetrad (tworzy też grona). Nieruchliwy. Wytwarza biały barwnik. Warunkowy tlenowiec. Chemoorganoheterotrof, auktotrof. Wzrost w temp. 15°-45°C (temp. optymalna 30-37°C). Rośnie w podłożach zawierających do 7,5 % NaCl. Powszechnie występuje na skórze i błonach śluzowych zwierząt i ludzi. Może stać się patogenem oportunistycznym.

TYP ACTINOBACTERIA

1) Rodzaj Micrococcus

(gr. *micros* – mały; gr. *kokkos* – pestka, ziarno, jagoda)

- a) **M. luteus** (pakietowiec żółty)
(łac. *luteus* – złoto-żółty)

Gramdodatni ziarniak tworzący układy złożone z 4 komórek (pakiety). Nieruchliwy. Tlenowiec. Chemoorganoheterotrof, auktotrof. Temp. optymalna 25-37°C. Występuje w glebie, wodzie, kurzu, mleku i jego przetworach, na skórze ludzi i zwierząt.

TYP PROTEOBACTERIA

Klasa Alphaproteobacteria

1) Rodzaj Paracoccus

(gr. *para* – obok, przy, podobny do; gr. *kokkos* – pestka, ziarno, jagoda)

- a) **P. versutus**

(łac. *versutus* – zmienny)

Gramujemna pałeczka. Warunkowy chemolitoautotrof zdolny do wzrostu autotroficznego na podłożu mineralnym z tiosiarczanem. Prototrof. Rośnie chemoorganotroficznie na pożywkach zawierających różne związki organiczne jako jedyne źródło węgla i energii. Tlenowiec. Zdolny do denitryfikacji. Temp. optymalna 30°C. Występuje w glebie.

Klasa Gammaproteobacteria

Rodzina Enterobacteriaceae (pałeczki jelitowe)

Gramujemne pałeczki. Chemoorganoheterotrofy. Warunkowe tlenowce.

1) **Rodzaj *Escherichia***

(Teodor Escherich – mikrobiolog niemiecki, który wyizolował tę bakterię)

a) ***E. coli*** (pałeczka okrężnicy)

(gr. *colon* – jelito grube/okrężnica; miejsce występowania tej bakterii)

Pałeczka jelitowa. Warunkowy tlenowiec. Chemoorganoheterotrof. Prototrof. Temp. optymalna 37°C. Występuje w jelicie grubym człowieka i licznych zwierząt. Szeroko rozpowszechniona w środowisku życia człowieka. Najlepiej poznana bakteria pod względem fizjologicznym i genetycznym.

2) **Rodzaj *Proteus*** (pałeczka odmieńca)

(gr. *Proteus* – grecki bóg morski zdolny do przybierania różnorodnych kształtów)

a) ***P. vulgaris***

(łac. *vulgaris* – pospolity)

Bardzo ruchliwa pałeczka. W czasie wzrostu na wilgotnych podłożach stałych komórki wielu szczepów podlegają cyklicznym przemianom. Formy osiadłe są krótkie (1-3 µm długości) i mają nieliczne rzęski. Po osiągnięciu pewnego zagęszczenia przekształcają się one w formy długie (20 - 80 µm długości), posiadające liczne rzęski. Formy długie migrują (ang. *swarming*), a następnie osiadają i tworzą formy krótkie. Takie powtarzające się cykle dają w rezultacie wzrost w postaci koncentrycznych pierścieni wokół pierwotnego punktu posiewu. Bakteria odgrywa ważną rolę w rozkładzie materii organicznej. W organizmie człowieka jest na ogół komensalem, ale niekiedy staje się patogenem. Może powodować wtórne infekcje u ludzi dorosłych, zakażenia układu moczowego oraz biegunki i zatrucia u niemowląt.

3) **Rodzaj *Serratia***

(Serafino Serrati - włoski fizyk)

a) ***S. marcescens*** (pałeczka cudowna, pałeczka krwawa)

(łac. *marcescens* – zwiędły, przekwitły)

Prototrof. W temp. poniżej 30°C wiele szczepów wytwarza czerwony barwnik prodigiozynę. Występuje na roślinach, w glebie i wodzie, niekiedy jest komensalem człowieka. Może być patogenem oportunistycznym u ludzi hospitalizowanych.

Inne rodziny1) **Rodzaj *Pseudomonas***

(gr. *pseudes* – fałszywy, rzekomy; gr. *monas* – jednostka, monada)

Gramujemne pałeczki poruszające się dzięki rzęskom. Tlenowce, niektóre wykorzystują azotany jako końcowe akceptory elektronów. Większość to chemoorganoheterotrofy, prototrofy. Niektóre gatunki są warunkowymi chemolitoautotrofami, zdolnymi do wykorzystania H₂ lub CO jako źródła energii.

a) ***P. fluorescens*** (pałeczka fluoryzująca)

(łac. *fluorescens* – fluoryzująca)

Chemoorganoheterotrof, prototrof. Nie rośnie autotroficznie. Zdolny do denitryfikacji. Temp. optymalna 25-30°C. Występuje w wodach i glebie. Może spowodować zanieczyszczenie żywności.

b) ***P. stutzeri***

(łac. *stutzeri* – należący do Stutzerza)

Chemoorganoheterotrof, prototrof. Nie rośnie autotroficznie. Zdolny do denitryfikacji. Temp. optymalna 30-35°C. Występuje w wodach i glebie.

2) **Rodzaj *Halothiobacillus***

(gr. *hals* – morze, sól; gr. *thios* – siarka; *bacillum* – pałeczka/laseczka)

Gramujemne pałeczki. Tlenowce. Bezwzględne chemolitoautotrofy. Uzyskują energię z utleniania siarki i jej związków nieorganicznych. Niektóre szczepy są umiarkowanymi halofilami, wymagającymi NaCl (opt. stęż. 0,4-1,0 M).

a) ***H. neapolitanus***

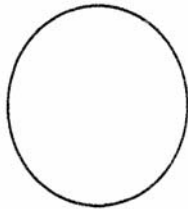
(łac. *neapolitanus* – neapolitański)

Wyizolowany w 1902 r. z Zatoki Neapolitańskiej. Występuje w wodzie morskiej i na korodującym betonie.

IV. ADDENDUM

Opis kolonii bakteryjnych

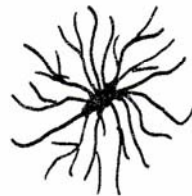
WYGLĄD OGÓLNY KOLONII



okrągła



nieregularna

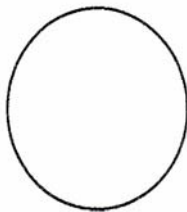


nitkowata



strzępiasta

BRZEG KOLONII



gładki



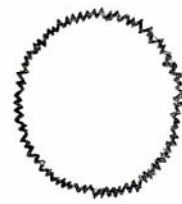
falisty



płatkowaty



nitkowaty



ząbkowany

WZNIESIENIE KOLONII

płaska

wypukła

pępkowata

kraterowata

z wałem brzeżnym



V. ZALECANA LITERATURA

- 1) **Kunicki-Goldfinger W.J.H. „Życie bakterii”. PWN, 2001.**
- 2) **Madigan M.T., Martinko J.J., Parker J. „Brock biology of microorganisms”. Prentice Hall International Inc., London, 1997.**
(oraz wszystkie następne wydania tej książki)
- 3) **Schlegel H.G. „Mikrobiologia ogólna”. PWN, 1996.**
- 4) Salyers A.A, Whitt D.D. „Mikrobiologia – różnorodność, chorobotwórczość i środowisko”. PWN, 2003.
- 5) Baj J., Markiewicz Z. (red.) „Biologia molekularna bakterii”. PWN, 2006.
- 6) Różalski A. „Ćwiczenia z mikrobiologii ogólnej – skrypt dla studentów biologii”. Wyd. Uniwersytetu Łódzkiego, Łódź, 1996.
- 7) Duszkiewicz-Reinhard W., Grzybowski R., Sobczak E. „Teoria i ćwiczenia z mikrobiologii ogólnej i technicznej”. Wyd. SGGW, Warszawa, 1996.
- 8) Grabińska-Łoniewska (red). „Ćwiczenia laboratoryjne z mikrobiologii ogólnej”. Oficyna Wyd. Politechniki Warszawskiej, Warszawa, 1996.