

## Raport wykonanego ćwiczenia

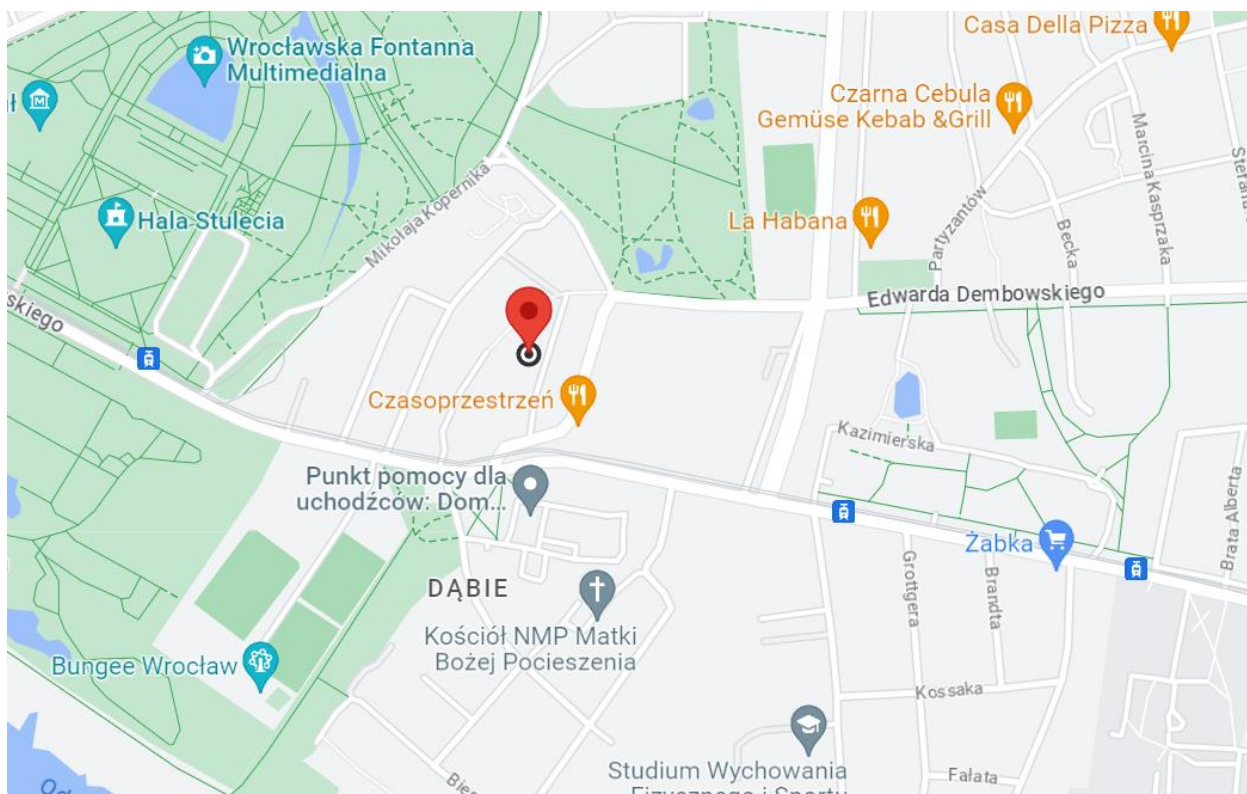
### „Izolacja bakterii glebowych”

**Cel:** Chcemy wyizolować bakterii glebowe z próby badanej, pobranej przez nas. Przeprowadzimy Barwienie Grama. Dodatkowo chcemy sprawdzić pewne własności tych bakterii, a same określić zdolność do amonifikacji, zdolność do produkcji antybiotyków.

**Przebieg ćwiczenia:**

#### *I etap. Pobranie próby*

Gleba była pobrana na terytorium Biskupina, Wrocław. Czerwoną pinezką odznaczono miejsce na mapie podanej poniżej (Rys.1)



Rys. 1: Miejsce pobrania gleby do badania

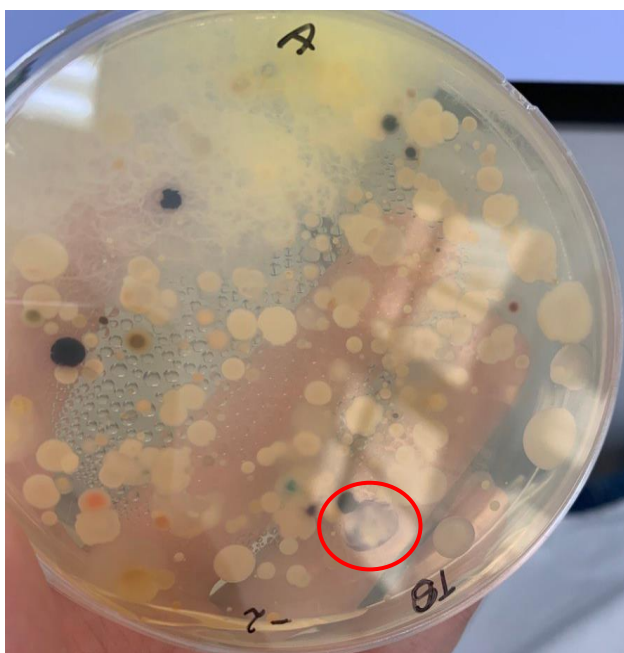
#### *II etap. Izolacja bakterii glebowych*

**Materiały:** płyn fizjologiczny, próbki gleby, płytki z AO, sterylne probówki, płytki z podłożem selekcyjnym dla promieniowców

1. Zawiesiliśmy grudkę gleby naszej próby badanej w 5 ml płynu fizjologicznego.
2. Zamieszaaliśmy i pozostawiliśmy do opadnięcia osadu.
3. Z płynu znad osadu w sterylnych eppendorfkach wykonaliśmy rozcieńczenia  $10^{-2}$  i  $10^{-3}$
4. Wykonaliśmy posiewy dywanowe tych rozcieńczeń na płytki z AO oraz na płytki z podłożem selekcyjnym dla promieniowców.

##### 5. Siedmiodniowa inkubacja (28°C)

6. Wykonaliśmy posiew redukcyjny szczepu na nową płytkę, aby pozyskać czyste kultury. W tym etapie wybrano było podłoże selekcyjne dla promieniowców (A), dla tego, że na tym podłożu najlepiej urosły mikroorganizmy. Na płytce z rozcieńczeniem gleby  $10^{-2}$  wyrosły kolonie białego, fioletowego, pomarańczowego i czarnego kolorów. Niektóre z tych kolonii są w małym stopniu przezroczyste. Wszystkie kolonie charakteryzują się kolistym kształtem, rozmiary są bardzo jednorodne. Zdjęcie płytki umieszczono poniżej (Rys.2) Czerwonym kółkiem zaznaczono kolonię, którą wybrano do posiewu redukcyjnego.



Rys.1: Posiew dywanowy, płytka A, rozcieńczenie  $10^{-2}$ , po inkubacji

7. Po siedmiodniowej inkubacji, zdecydowano wykonać powtórny posiew redukcyjny, dla tego, że na naszej płytce wyrosło dwie różne kolonie, jedna czarnego koloru, która była mniej aktywna (widać z posiewy), druga żółtego koloru. Zdjęcie umieszczono poniżej (Rys.2) Kółkiem zaznaczono miejsce, z którego pobraliśmy mikroorganizm, w naszym przypadku to była żółta kolonia.



Rys. 2: Posiew redukcyjny 1, płytka A, rozcieńczenie  $10^{-2}$ , po inkubacji

8. Po ponownej inkubacji otrzymaliśmy czystą kulturę, którą przenieśliśmy na skos, i wykorzystaliśmy w kolejnych etapach ćwiczenia. Nie zrobiono zdjęcia końcowej płytki z kulturą czystą. Wyglądała ona tak samo jak 2 kolonia na zeszłej płytce- żółte zabarwienie.

### *III etap. Barwienie Grama*

W tym etapie skorzystaliśmy z przepisu laboratoryjnego:

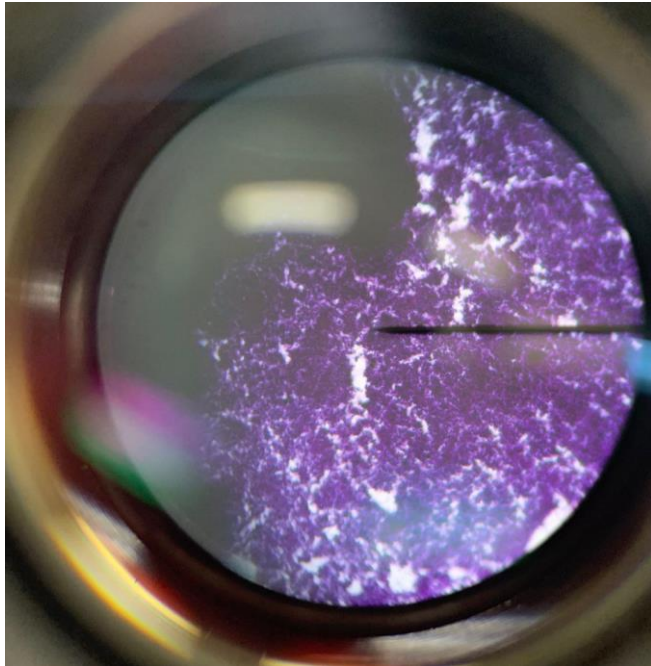
Materiały: hodowle płynne szczepów bakteryjnych, 0,5% roztwór fioletu krystalicznego, płyn Lugola, fuksyna, alkohol etylowy, woda destylowana, szkiełka: przedmiotowe i nakrywkowe.

1. przygotować rozmazy hodowli izolantów bakteryjnych
2. barwić roztworem fioletu krystalicznego przez około 3 minuty
3. spłukać preparat wodą destylowaną
4. zalać preparat płynem Lugola na około 3 minuty
5. spłukać wodą destylowaną
6. zalać preparat alkoholem etylowym na około 30 s, w celu odbarwienia
7. spłukać wodą destylowaną
8. barwić fuksyną przez 15 s
9. spłukać wodą destylowaną

10. wysuszyć

11. oglądać pod mikroskopem, przy powiększeniu max 40 razy

Podczas oglądania pod mikroskopem zauważono fioletowe zabarwienie komórek, w niektórych miejscach ono zmieniało się na fioletowo-niebieskie. Co znaczy to zabarwienie opiszemy już we wnioskach. Zdjęcie umieszczono poniżej (Rys. 3)



Rys. 3: Obserwacja komórek bakterii pod mikroskopem

#### *IV etap. Określenie zdolności izolatów do amonifikacji*

Materiały: kolby z podłożem z mocznikiem (mocznik (20g),  $K_2HPO_4$  (1g),  $CaCl_2 \times 6 H_2O$  (0.1 g),  $MgSO_4 \times 7H_2O$  (0.3g), NaCl (0.1g),  $FeCl_3 \times 6H_2O$  (0.01g), wyciąg z mięsa wołowego (5g),  $H_2O$  dest. (1000ml)), odczynnika Nesslera

1. Dwie probówki zawierające po 5 ml podłoża z mocznikiem zaszczipiliśmy izolatami glebowymi i inkubowaliśmy ( $37^\circ C$ ) 7 dni.

2. Po inkubacji za pomocą odczynnika Nesslera sprawdziliśmy ilość amoniaku wydzielającego. Zdjęcie umieszczono poniżej (Rys. 4) Czerwonym kółkiem zaznaczono naszego izolanta już z dodanym odczynnikiem Nesslera.



Rys. 4: Izolanty + odczynnik Nesslera

#### *V etap. Badanie zdolność do produkcji antybiotyków przez izolanty*

W tym etapie ćwiczenia mieliśmy przepis laboratoryjny:

Materiały: hodowle bulionowe szczepów testowych (*Serratia marcescens*, *Bacillus subtilis*), hodowle płynne izolantów (przygotowane na wcześniejszych zajęciach), płytki z podłożem Miller-Hintona

1. Na płytki z podłożem MH posiać mikroorganizmy testowe wykorzystując metodę posiewu dywanowego. Odstawić na 10 min.
2. Na każdej tak zaszczepionej płytce należy ustawić 2 cylindry metalowe w odpowiedniej odległości od siebie i od ścianek płytki. Przed ustawieniem cylindrów rozgrzać ich brzegi w ogniu, aby móc wtopić je delikatnie w agar. Wszystkie czynności wykonywać z zachowaniem zasad sterylnej pracy.
3. Cylindry wypełnić płynnymi hodowlami izolantów (menisk wklęsły).
4. Inkubować w 28°C przez 7 dni.
5. Obserwować strefy zahamowania wzrostu.

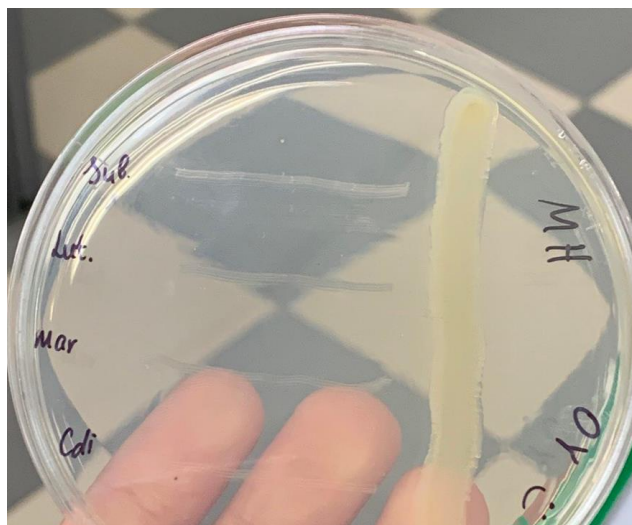
Ale w praktyce zamieniliśmy to ćwiczenie innym. Skorzystaliśmy z płytek z podłożem MH, ale na początku zrobiliśmy posiew linią prostą naszej hodowli izolantu. Inkubujemy 7 dni (28 °C).

Po inkubacji zrobiliśmy dodatkowe posiewy eżą hodowli bulionowych naszych szczepów



testowych (*Serratia marcescens*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Micrococcus Luteus* ).

Zdjęcie umieszczam poniżej (Rys. 5)



Rys. 5: Naniesiony izolant po inkubacji oraz hodowle szczepów testowych przed inkubacją.

Znowy odkładamy do inkubacji. Zdjęcie po inkubacji nie było zrobione. Porównując otrzymane wyniki z innymi osobami w grupie można było zauważyć, że na płytce prawie nic nie wyrosło.

### Obserwacje i wnioski:

Po pierwsze można powiedzieć, że cel osiągnięty- wyizolowaliśmy bakterię i przeprowadziliśmy wszystkie zaplanowane ćwiczenia z izolatem.

Było wybrano bardzo ciekawe miejsce dla pobrania próby gleby, dla tego, że na płytkach w II etapie wyrosła duża różnorodność kolonii mikroorganizmów. Wszystkie charakteryzowali się różnymi rozmiarami i zabarwieniem. Po II etapie otrzymaliśmy skos z czystą kulturą. Też można zauważyć, że kolonia była pobrana z płytki z podłożem A, co świadczy o zawartości dużej ilości promieniowców w naszej glebie, jednym z których jest nasz izolat.

Też o zawartości promieniowców można stwierdzić z wyników barwienia Grama. Fioletowe i niebiesko-fioletowe zabarwienie świadczy o bakteriach Gram-dodatnich. Do tych bakterii należą promieniowce, laseczki, większość ziarniaków, maczugowce. Można też stwierdzić już o poprawności wykonania ćwiczenia, bo potwierdziliśmy już dwoma metodami obecność promieniowców.

Żółte zabarwienie roztworu i wytrącenie niewielkiej ilości brunatnego osadu (Co można zauważyć przyrównując nasz izolat do innych) jest dowodem obecności jonów amonowych. Za pomocą odczynnika Nesslera w IV etapie sprawdziliśmy, że izolat jest zdolny do amonifikacji.

Przez to, że nic nie wyrosło po inkubacji w etapie V można stwierdzić, że nasz izolant nie jest zdolny do produkcji antybiotyków.

**Podsumowanie:** Odizolowaliśmy z gleby izolanta, który jest promieniowcem (G<sup>+</sup>).

Dodatkowo on jest zdolny do amonifikacji.