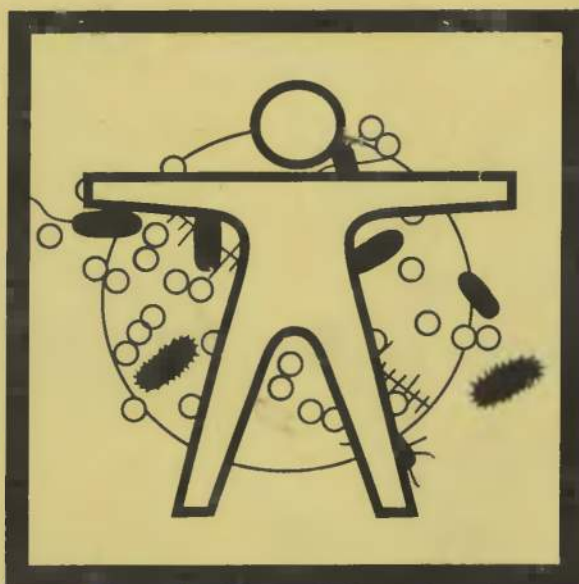


Wydział Nauk o Żywności i Rybactwa
Akademia Rolnicza w Szczecinie

Elżbieta Daczkowska - Kozon
Waldemar Dąbrowski



Mikrobiologia Żywności cz. 1

Skrypt do ćwiczeń z mikrobiologii żywności

SZCZECIN 2002



Cyfralab

Wydział Nauk o Żywności i Rybactwa
Akademia Rolnicza w Szczecinie

Elżbieta Daczkowska – Kozon
Waldemar Dąbrowski


Biblioteka Główna
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny
Księgozbiór Przyrodniczy

C-46858



520-000038366

Mikrobiologia Żywności cz. 1

Skrypt do ćwiczeń z mikrobiologii żywności

SZCZECIN 2002

Opracowanie graficzne
Szymon Gebel, Wojciech Sawicki

Redakcja
Waldemar Dąbrowski

C- 46858



MFN 46858

2021/0132/1

Spis treści

Rozdział 1. Zasady obowiązujące w laboratorium mikrobiologicznym	► 5
Rozdział 2. Niszczenie drobnoustrojów	► 7
Rozdział 3. Sterylizacja termiczna	► 8
Ćwiczenie 1. Ćwiczenie demonstracyjne	11
Ćwiczenie 2. Sterylizacja w autoklawie i aparacie kocha	12
Rozdział 4. Sterylizacja przy pomocy promieniowania elektromagnetycznego	► 16
4.1. Wyjaławianie przy pomocy promieni UV	16
Ćwiczenie 3. Wpływ promienlowania uv na mikroorganizmy	18
Rozdział 5. Wyjaławianie mechaniczne - sterylizacja na zimno	► 21
5.1. Chemiczne metody sterylizacji	21
Rozdział 6. Podłoża (pożywki) bakteriologiczne	► 23
6.1. Rodzaje pożywek	23
Ćwiczenie 4. Przygotowanie podłoży bakteriologicznych	27
Ćwiczenie 5. Wpływ pH podłoża na właściwości zestalające agar	28
Rozdział 7. Wzrost mikroorganizmów w warunkach laboratoryjnych	► 29
Ćwiczenie 6. Charakterystyka wzrostu bakterii na podłożach płynnych (typy wzrostu)	34
Ćwiczenie 7. Charakterystyka wzrostu bakterii tlenowych i względnie beztlenowych na podłożu stałym (agar odżywczy)	36
Ćwiczenie 8. Charakterystyka wzrostu bakterii – posiew kłuty na wysoki słupek agarowy	37
Rozdział 8. Wzrost drobnoustrojów beztlenowych	► 39
Ćwiczenie 9. Metody fizyczne hodowli drobnoustrojów Beztlenowych	40
Ćwiczenie 10. Metody chemiczne hodowli drobnoustrojów Beztlenowych	41
Ćwiczenie 11. Metody biologiczne hodowli drobnoustrojów Beztlenowych	43
Rozdział 9. Morfologia bakterii	► 45
Ćwiczenie 12. Kalibracja mikrometru okularowego	46
Ćwiczenie 13. Morfologia komórki bakteryjnej	50
Ćwiczenie 14. Barwienie bakterii metodą Grama	53
Ćwiczenie 15. Barwienie endospor metodą Schaeffera-Fultona w modyfikacji Wirtza	56
Ćwiczenie 16. Otoczki bakteryjne	58
Ćwiczenie 17. Określanie procentowego udziału komórek żywych w kulturze starterowej	61
Ćwiczenie 18. Ruch drobnoustrojów	63

Rozdział 10. Wpływ środowiska na mikroorganizmy	► 67
10.1. Temperatura	68
10.2. Potencjał oksydo-redukcyjny - O/R (Eh)	69
10.3. Napięcie powierzchniowe	70
10.4. Aktywność wodna	70
10.5. Wpływ pH środowiska na drobnoustroje	71
10.6. Działanie soli (kationów, anionów) na drobnoustroje	72
10.7. Barwniki	73
10.8. Związki powierzchniowo czynne	73
Ćwiczenie 19. Demonstracja wpływu temperatury inkubacji na wzrost wybranych szczepów wzorcowych bakterii	74
Ćwiczenie 20. Wpływ napięcia powierzchniowego na wzrost bakterii	76
Ćwiczenie 21. Demonstracja wpływu promieniowania UV na wybrane szczepy bakterii	78
Ćwiczenie 22. Wpływ aktywności wodnej środowiska na wzrost drobnoustrojów	79
Ćwiczenie 23. Wpływ pH środowiska na wzrost bakterii	82
Ćwiczenie 24. Demonstracja wpływu różnych stężeń soli na wzrost wybranych szczepów bakterii	83
Ćwiczenie 25. Demonstracja różnych stężeń, różnych barwników na wzrost wybranych szczepów bakterii	85
Rozdział 11. Antybiotyki	► 87
Ćwiczenie 26. Określenie wrażliwości bakterii na antybiotyki - metoda krążków bibulowych	88
Rozdział 12. Metoda oznaczania liczby mikroorganizmów w środowisku	► 90
Ćwiczenie 27. Bezpośrednie liczenia bakterii w preparacie barwionym	93
Ćwiczenie 28. Liczenia komórek przy pomocy komory Thoma	95
Ćwiczenie 29. Bezpośrednia metoda oznaczania liczby bakterii przy pomocy filtrów membranowych	98
Ćwiczenie 30. Oznaczenie ogólnej liczby drobnoustrojów w wodzie metodą płytkową	100
Ćwiczenie 31. Oznaczenie ogólnej liczby drobnoustrojów w powietrzu metodą sedymentacyjną	101
Ćwiczenie 32. Określanie czasu 1 generacji wybranych szczepów wzorcowych	103
Ćwiczenie 33. Oznaczenia miana coli w mleku	106
Ćwiczenie 34. Oznaczenia miana beztlenowych laseczek przetrwalnikujących redukujących siarczany w przyprawach	109
Ćwiczenie 35. Oznaczenie NPL bakterii z grupy coli w wodzie	111

Rozdział 1

ZASADY OBOWIĄZUJĄCE W LABORATORIUM MIKROBIOLOGICZNYM

Studenci przystępujący do zajęć praktycznych z przedmiotu „Mikrobiologia” powinni zdawać sobie sprawę z zagrożeń wynikających z pracy na żywym materiale mikrobiologicznym. Praca na żywym materiale, w tym także kontakt ze szczepami potencjalnie lub jednoznacznie chorobotwórczymi zmusza do przyjęcia określonych zasad postępowania.



U
W
A
G

OSTRZEŻENIA

Pamiętaj, że, każde zakażenie laboratoryjne jest znacznie niebezpieczniejsze niżeli zakażenie naturalne. Przy zakażeniu laboratoryjnym do organizmu wnika znacznie większa ilość drobnoustrojów niżeli w naturalnym. Przez to przebieg zakażenia jest intensywniejszy i groźniejszy dla zdrowia i życia.

Student udający się na zajęcia praktyczne z mikrobiologii **zobowiązany jest do:**

1. pozostawienia wierzchniej odzieży w szatni
2. posiadania czystego fartucha ochronnego
3. zajmowania przypisanego mu stanowiska na wszystkich kolejnych ćwiczeniach lub seminaryjnych zajęciach z przedmiotu

Praca w laboratorium mikrobiologicznym wymaga ostrożności, skupienia, zachowania czystości i ograniczenia ruchu powietrza. Zatem w trakcie zajęć praktycznych nie należy:

1. przemieszczać się po sali
2. rozmawiać
3. przenosić elementów wyposażenia z jednego stanowiska na inne
4. jeść i pić
5. palić

Każde stanowisko zaopatrzone jest w odpowiedni sprzęt oraz środki dezynfekcyjne, pozwalające na szybką interwencję w razie wylania materiału mikrobiologicznego na rękę, stół, podłogę, itp. O takich, i temu podobnych przypadkach losowych należy informować natychmiast osobę prowadzącą zajęcia.



U
W
A
G

OSTRZEŻENIA

Podczas pracy każdemu może się zdarzyć że dotknie palcem powierzchni płytki, wyleje płyn z bakteriami, stłucze coś z materiałem zakaźnym. Może się to zdarzyć każdemu. Nie należy się tego wstydzić czy bać, natomiast należy powiadomić prowadzącego ćwiczenia, który podejmie czynności zaradcze.

W czasie przebywania w laboratorium mikrobiologicznym **należy wystrzegać się:**

1. dotykania palcami oczu, nosa, uszu, włosów, itp.
2. brania długopisu do ust,
3. ślinienia kartek przy odwracaniu, itp.

Użyte na zajęciach szkło laboratoryjne, takie jak: pipety, bagietki, preparaty bakterioskopowe, po wykorzystaniu, umieścić w płynie odkażającym.

Sprzęt laboratoryjny, po wykorzystaniu, przed odstawieniem do statywu, opalić w płomieniu palnika.

Z laboratorium mikrobiologicznego nle wolno niczego wynosić.

Przed opuszczeniem sali, po odbytych zajęciach, uporządkować stanowisko pracy; powierzchnie robocze przetrzeć spirytusem denaturowanym. Przed opuszczeniem sali umyć ręce.

Rozdział 2

NISZCZENIE DROBNOUSTROJÓW

Aby stwierdzić, czy drobnoustroje uległy zniszczeniu, wykonujemy przesiew badanego materiału na optymalne podłoże wzrostowe. Brak wzrostu po inkubacji oznacza utratę zdolności do rozmnażania. W kategoriach praktycznych oznacza to śmierć komórki.

Drobnoustroje mogą być niszczone przy pomocy procesów sterylizacji i dezynfekcji. W przemyśle spożywczym stosuje się także proces sanityzacji.



DEFINICJA

Steryлизacją lub wyjaławianiem nazywamy proces w wyniku którego, ze środowiska poddanego procesowi, wyeliminowane zostają wszystkie formy żywe, tj. zarówno formy wegetatywne jak i przetrwalne.



DEFINICJA

Dezynfekcją nazywamy proces, w którym usunięte zostają wyłącznie drobnoustroje chorobotwórcze.



DEFINICJA

Sanityzacją nazywamy postępowanie przy pomocy którego, w danym środowisku obniżamy liczbę drobnoustrojów do poziomu akceptowanego przez odnośne przepisy.

METODY STERYLIZACJI

Steryлизację przeprowadzać można przy pomocy czynników fizycznych, chemicznych oraz w sposób mechaniczny. Wybór metody sterylizacji zależy od rodzaju wyjaławianego środowiska.

Do grupy czynników fizycznych sterylizacji zalicza się:

- podwyższoną temperaturę (sterylizacja termiczna)
- promienie UV
- promieniowanie jonizujące
- ultradźwięki

Do grupy chemicznych czynników sterylizujących zalicza się:

- niektóre gazy (tlenek etylenu, ozon)
- pary niektórych związków (formaldehyd, aldehyd glutarowy, β -propionolakton)

Wyjaławianie mechaniczne (sterylizacja na zimno)

- filtry

Rozdział 3

STERYLIZACJA TERMICZNA

Steryлизację przy pomocy podwyższonej temperatury wykorzystujemy zarówno w warunkach laboratorium mikrobiologicznego jak i w przemyśle spożywczym. Mechanizm bakteriobójczego działania temperatury polega głównie na denaturacji białek w niszczonych organizmach. Przy stosowaniu temperatur wyższych niż 200°C dochodzi do zwęglania związków organicznych.

Wyróżniamy następujące metody sterylizacji termicznej:

1. **Wyżarzanie** w płomieniu palnika - stosowane głównie do sterylizacji ez bakteriologicznych
2. **Opalanie** - stosujemy niekiedy do sterylizacji narzędzi, takich jak nożyczki, skalpele, do wyjaławiania naczyń, wylotów probówek oraz pipet, itp.
3. **Wyjaławianie w suchym gorącym powietrzu 160–180°C**, ten proces sterylizacji prowadzony jest w suszarkach, w których jałowimy szkło i niektóre narzędzia laboratoryjne
4. **Wyjaławianie w nasyconej parze wodnej o temperaturze wyższej niż 100°C**, proces prowadzony jest w hermetycznie zamykanych kotłach zwanych autoklawami. Temperaturę nasyconej pary wodnej, wyższej niż 100°C uzyskujemy dzięki sprężeniu nasyconej pary, stosownie do potrzeb, pod ciśnieniem 0,1 - 0,3 MPa (1-3 atm)
6. **Wyjaławianie w parze wodnej o temperaturze 100°C w tzw. aparatach Kocha**, ze względu na termooporność przetrwalników bakteryjnych niezbędne jest trzykrotne powtórzenie ogrzewania w odstępach 24-godzinnych. Inaczej proces ten nazywany jest sterylizacją frakcjonowaną lub tyndalizacją

Szczegóły dotyczące metod sterylizacji na gorąco, czynnika sterylizującego, parametrów procesów, urządzeń służących do sterylizacji oraz środowisk będących przedmiotem



- ✓ Wyjaławianie w aparatach Kocha jest stosowane w laboratoriach mikrobiologicznych oraz w warunkach domowych przy produkcji weków. Nie jest to całkowita sterylizacja, ponieważ temp. 100°C nie niszczy wirusów wszczepiennego zapalenia wątroby. Z tego względu aparaty Kocha nie mogą być stosowane w medycynie.
- ✓ Suszarki bakteriologiczne są aparatami działającymi na podobnej zasadzie jak domowe piekarniki elektryczne, z tą różnicą że istnieje w nich możliwość dokładniejszej regulacji temperatury.
- ✓ Urządzeniami podobnymi do autoklawów są domowe szybkowary, w których przyspieszenie procesu gotowania uzyskujemy poprzez podniesienie temperatury gotowania dzięki podwyższonemu ciśnieniu.

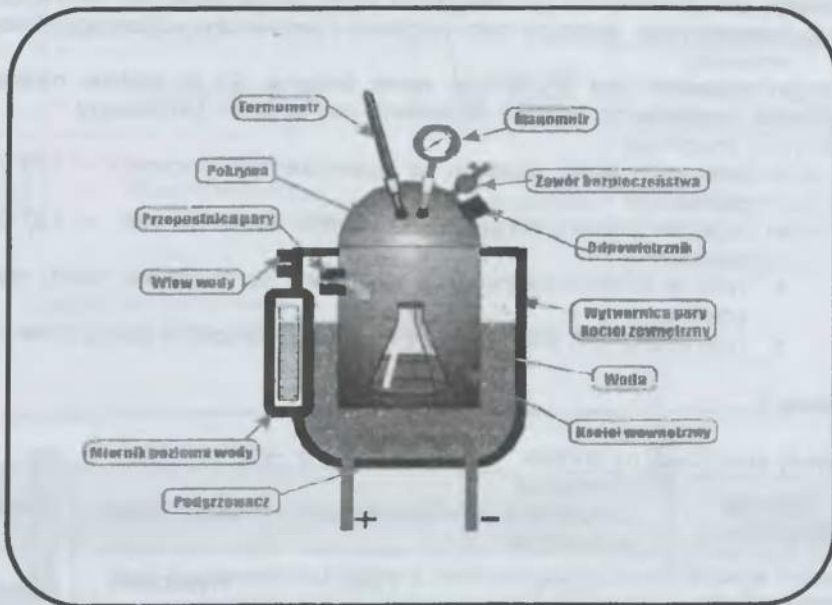
zastosowania konkretnych metod sterylizacji przedstawiono w Tabeli 1.



Pamiętaj - w autoklawach sterylizująco działa para wodna o podwyższonej temperaturze. Stosowane ciśnienia do 0,3 MPa w ogóle nie działają uszkadzająco na bakterie. Dzięki nim podwyższa się temperatura pary wodnej. Do zabicia bakterii potrzebne są ciśnienia co najmniej 60 MPa - 600 atm.

Rys. 1

Schemat budowy autoklawu



Kontrola skuteczności procesu sterylizacji

Wskaźniki skuteczności procesu:

- • **fizyczne** - określają stan techniczny urządzenia (termometry, manometry, karty kontrolne, kontrolki świetlne, itp.)
- • **biologiczne** - informują o fakcie zabicia spor szczepów bakterii wysoce opornych na dany czynnik sterylizujący
- • **chemiczne** - informują o prawidłowości przebiegu procesu sterylizacji, zawierają substancje, które po osiągnięciu wymaganych parametrów procesu zmieniają barwę

Metodyka biologicznego badania skuteczności działania urządzeń sterylizacyjnych polega na użyciu tzw. sporali. Są to opakowania papierowe zawierające krążki z bibuły lub wodorotlenku glinu, na których zaabsorbowane są przetrwalniki bakteryjne. Opakowania te rozkłada się w różnych miejscach w autoklawach lub suszarkach i przeprowadza proces sterylizacji. Po procesie sterylizacji krążki umieszcza się w podłożu (np. bulionie odżywcym)

i inkubuje w cieplarni. Wzrost drobnoustrojów świadczy o nieskuteczności procesu sterylizacji.



WSKAZÓWKA

Użycie sporali jest najpewniejszą metodą kontroli urządzeń!

Obecnie, z metod chemicznych badania procesu sterylizacji najpopularniejsze jest stosowanie taśm, które są przyklejane w różnych miejscach sterylizowanych opakowań. Zmieniają one zabarwienie po osiągnięciu przez aparat właściwej temperatury. Jest to metoda nieprecyzyjna, jednakże mało kosztowna i możliwa do codziennego stosowania.

Innym sposobem jest użycie tzw. **rurek Browna**. Są to szklane rurki zawierające odczynniki chemiczne zmieniające zabarwienie pod wpływem temperatury.

- rurki ze znakiem **czarnym** są stosowane dla temperatur $< 126^{\circ}\text{C}$ (para pod ciśnieniem)
- rurki ze znakiem **żółtym** są stosowane dla temperatur $> 130^{\circ}\text{C}$ (para pod ciśnieniem)
- rurki ze znakiem **zielonym** są stosowane dla temperatur 160°C (suche gorące powietrze)
- rurki ze znakiem **niebieskim** są stosowane dla kontroli sterylizacji w podczerwieni

Tabela 1

Metody sterylizacji na gorąco

Czynnik sterylizujący	Parametry stosowane w praktyce	Urządzenie	Nazwa metody	Zastosowanie
Bardzo wysoka temperatura	$\sim 600^{\circ}\text{C}$	Palnik	Wyzarzanie	ezy bakteriologiczne
Bardzo wysoka temperatura	$\sim 600^{\circ}\text{C}$	Palnik	Opalanie	włoty kolbek, probówek, pipety, bagietki, itp.
„suche gorąco” wysoka temperatura	$160^{\circ}\text{C}/2\text{h}$ $180^{\circ}\text{C}/1\text{h}$	Suszarka	Sterylicacja „na sucho”	szkło laboratoryjne, jednorodny sprzęt (skalpele, waciki do wymazów, itp.)
„wilgotne gorąco” para nasycona pod ciśnieniem: $0,08 - 0,1 \text{ MPa}$	$117^{\circ}\text{C}/15'$ $121^{\circ}\text{C}/15'$	Autoklaw	Sterylicacja „na mokro”	podłoża bakteriologiczne, płyny do rozcieńczeń, zestawy złożone z materiałów o różnej rozszerzalności cieplnej
„wilgotne gorąco” para bieżąca	$100^{\circ}\text{C}/30'$	Aparat Kocha	Sterylicacja frakcjonowana	niektóre podłoża lub składniki

			(tyndalizacja)	podłóż bakteriologicznych
--	--	--	----------------	------------------------------

Tabela 2

Metody sterylizacji na zimno

Proces	Urządzenie	Parametry	Zastosowanie
Sączenie przez filtry	Membranowe z octanu celulozy lub innych polimerów Seitza - azbestowo-celulozowy * Berkefelda - z ziemi okrzemkowej * Chamberlanda - z nieglazurowanej porcelany * Schotta - ze sproszkowanego szkła *	Wielkość por 0,2 - 0,45µm	sterylizacja roztworów cukrów, enzymów, witamin, płynów ustrojowych (składowe podłoża, wrażliwe na czynnik termiczny)
Promieniowanie UV	Lampy kwarcowe	Długość fali 250 - 260nm	jałowienie powierzchni roboczych, powietrza
Promieniowanie jonizujące	Bomby kobaltowe Akceleratory liniowe	Dawka promieniowania 0,1 - 50 kGy **	sterylizacja przypraw, konserwowanie owoców, hamowanie kiełkowania cebuli i ziemniaków

*praktycznie nie używane

**kGy - (kilo) Gray- jednostka promieniowania pochłoniętego



ĆWICZENIE 1

TEMAT: ĆWICZENIE DEMONSTRACYJNE

Cel: Zapoznanie studentów z zasadami postępowania, wyposażeniem i metodami pracy w pracowni mikrobiologicznej

Zasady BHP na zajęciach z mikrobiologii

1. Zwiedzanie pracowni bakteriologicznej
2. Demonstracja szkła laboratoryjnego, sprzętu i aparatury charakterystycznej dla pracowni mikrobiologicznej
3. Demonstracja przygotowania szkła i sprzętu laboratoryjnego do sterylizacji (przygotowywanie korków do kolb, probówek; zatykanie i pakowanie pipet, pakowanie płytek, pipet, bagietek, itp.)
4. Demonstracja działania suszarki
5. Demonstracja zestawów do filtracji; sposób przygotowania jałowego sprzętu
6. Demonstracja działania autoklawu i aparatu Kocha



**ĆWICZENIA****ĆWICZENIE 2****TEMAT: STERYLIZACJA W AUTOKLAWIE I APARACIE KOCHA**

Cel: Porównanie skuteczności jednorazowej obróbki termicznej w parze bieżącej i w parze nasyconej pod ciśnieniem

**URZĄDZENIA**

Autoklaw (sterylizator parowy) jest urządzeniem ciśnieniowym, w którym wytwarzana para wodna sprężana jest do wartości 0,08 – 0,3 MPa (0,8 - 3 atm.) przez co uzyskuje ona temperatury 117 – 138°C.

Istnieją różnego typu autoklawy. Na przykład autoklawy stosowane w medycynie wyposażone są w urządzenia suszące pozwalające na suszenie wysterylizowanej bielizny czy materiałów opatrunkowych. Autoklawy stosowane w przemyśle spożywczym zaopatrzone są w obrotowe pojemniki na puszkę. Rys.1 przedstawia schemat autoklawu stosowanego w laboratorium mikrobiologicznym.

W autoklawach wyjaławiamy:

- pożywki bakteriologiczne, zestawy zawierające elementy o różnej rozszerzalności cieplnej - tzw. sterylizacja czysta
- wykorzystane pożywki bakteriologiczne, próbki do badania bakteriologicznego (w medycynie i weterynarii) - tzw. sterylizacja brudna

Najczęściej stosowane parametry sterylizacji w autoklawach:

- 117°C/0,08 MPa - 30 min.; 121°C/0,1 MPa - 15 min. (sterylizacja czysta)
- 132°C/0,25 MPa - 30 min. (sterylizacja brudna)

Uwarunkowania bezpiecznej i prawidłowej pracy autoklawu parowego:

- do użycia może być dopuszczone urządzenie mające ważny atest Rejonowego Dozoru Technicznego
- autoklaw musi być sprawny
- autoklaw może obsługiwać wyłącznie osoba przeszkolona
- autoklaw należy obsługiwać zgodnie z instrukcją obsługi

Zasady sterylizacji w autoklawie:

- uzupełnić wodę w płaszczu wodnym
- włożyć do komory autoklawu sterylizowany materiał
- zamknąć pokrywę
- włączyć grzanie
- po osiągnięciu temperatury 100°C odpowietrzyć autoklaw

Mieszanina powietrza i pary wodnej nie działa tak skutecznie jak sama para wodna.

- prowadzić sterylizację przez określony czas
- po sterylizacji umożliwić spadek ciśnienia w autoklawie do zera i otworzyć autoklaw



WSKAZÓWKA

WAŻNIE

W żadnym razie nie próbować otwierać autoklawu przed spadkiem ciśnienia do 0. Wystygnięcie zamkniętego autoklawu może utrudnić otwarcie pokrywy wskutek jej zassania - wytworzonego podciśnienia!

Materiały:

1. Probówka z 5 ml 7-dniowej hodowli bulionowej szczepu wytwarzającego formy przetrwalne - oznakowana literą A
2. Probówka z 5 ml 7-dniowej hodowli bulionowej szczepu nie wytwarzającego form przetrwalnych - oznakowana literą B
3. Statyw z sześcioma probówkami zawierającymi po 5 ml, jałowego bulionu odżywczego każda
4. Dwie jałowe pipety – 1 ml
5. Dermatograf

Wykonanie:

1. Probówki zawierające jałowy bulion odżywczy oznaczyć numerami od 1 do 6 oraz numerem stanowiska i grupy
2. Do probówek oznaczonych numerami od 1 do 3 przenieść po 0.5 ml materiału z probówki oznaczonej literą A
3. Do probówek oznaczonych numerami od 4 do 6 przenieść po 0.5 ml materiału z probówki oznaczonej literą B
4. Probówki oznakowane 1A i 4B oraz 2A i 5B poddać działaniu odpowiedniego czynnika termicznego (patrz: Tabela 3)
5. Probówki oznakowane numerami 3A i 6B pozostawić w statywie
6. Poddane obróbce termicznej probówki oznakowane 1A, 4B, 2A, 5B ustawić w statywie obok probówek z oznakowaniem 3A i 6B; całość inkubować w 37°C/24h
7. Dokonać odczytu wyników i zapisać je w Tabeli A 3 przyjmując następującą zasadę
 - ❖ brak wzrostu (klarowne podłoże) = (-)
 - ❖ wzrost (widoczne zmętnienie całego podłoża lub wzrost w formie kożuszka na powierzchni podłoża) = (+)
8. Dokonać oceny skuteczności porównywanych metod obróbki termicznej.
9. Wyniki oceny zapisać w Tabeli 4, wg schematu:
 - ❖ wzrost na podłożu po inkubacji = brak skuteczności procesu = (-)
 - ❖ brak wzrostu na podłożu po inkubacji = proces skuteczny = (+)

Rys. 2
Schemat wykonania ćwiczenia 2

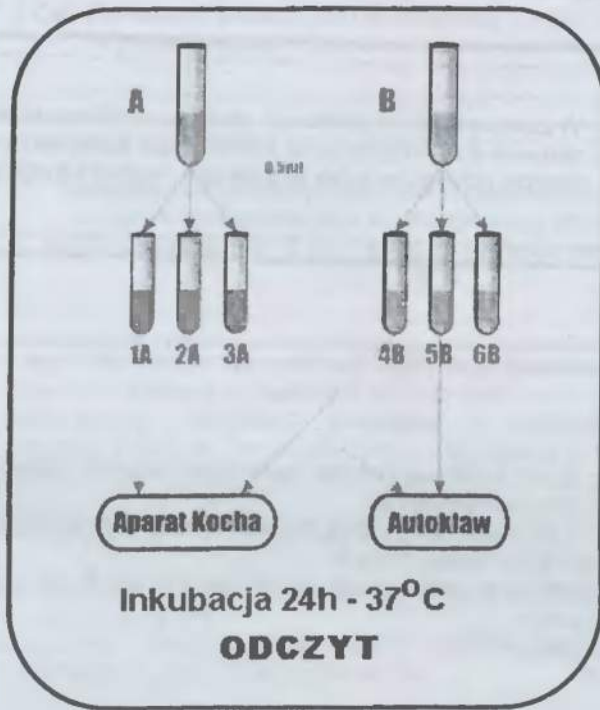


Tabela 3

Wyniki inkubacji posiewów materiału poddanego lub nie poddanego działaniu określonej obróbki termicznej

Oznakowanie próby	Działający czynnik	Urządzenie	Wynik inkubacji posiewów
1A	100°C / 15 min.	aparat Kocha	
2A	121°C / 15 min.	autoklaw	
3A	-	-	
4B	100°C / 15 min.	aparat Kocha	
5B	121°C / 15 min	autoklaw	
6B	-	-	

Tabela 4**Skuteczność bakteriobójcza zastosowanego czynnika termicznego**

Działający czynnik (URZĄDZENIE)	1A	2A	3A		4B	5B	6B
Para bieżąca (100°C/15min) (Aparat Kocha)							
Para nasycona pod ciśnieniem (121°C/15min) (autoklaw)							
Próba kontrolna							

Wnioski:

Data

zaliczenie

Rozdział 4

STERYLIZACJA PRZY POMOCY PROMIENIOWANIA ELEKTROMAGNETYCZNEGO

W procesie sterylizacji wykorzystywane są następujące rodzaje promieniowania elektromagnetycznego:

- promieniowanie gamma
- promieniowanie ultrafioletowe

Źródłem promieniowania gamma, stosowanego w utrwalaniu żywności, są urządzenia nazywane bombami kobaltowymi, zawierające izotopy promieniotwórcze Co^{60} lub rzadziej Cs^{137} oraz akceleratory liniowe. Aparaty te emitują promieniowanie gamma o dużej przenikliwości. Siła ich bakteriobójczego działania zależy od ilości energii zaabsorbowanej przez napromieniowany materiał. Wielkość zaabsorbowanej dawki wyrażana jest w grejach (Gy). $1 \text{ Gy} = 1 \text{ dżul/kg masy}$ ($1 \text{ Gy} = 100 \text{ radów}$).

Przykłady zastosowania promieniowania gamma :

- utrwalanie żywności pochodzenia zwierzęcego
- wyjaławianie ziaren, orzechów i przypraw
- konserwacja świeżych owoców i warzyw
- narzędzia medyczne jednorazowego użytku

Mechanizm bakteriobójczego działania promieni gamma polega na uszkodzaniu DNA. Najwrażliwszą na to promieniowane grupę stanowią formy wegetatywne bakterii. Bardziej odporne są, w kolejności wzrastającej oporności, drożdże i pleśnie, formy przetrwalne oraz wirusy.

Skuteczność wyjaławiania promieniami gamma zależy od:

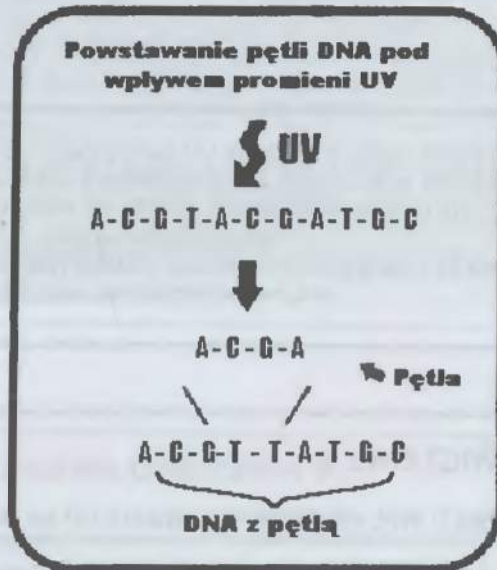
- dawki promieniowania
- warunków środowiska (temperatury, pH, składu chemicznego napromieniowywanej żywności)

4.1. WYJAŁAWIANIE PRZY POMOCY PROMIENI UV

Źródłem promieni UV są lampy kwarcowe. Najbardziej skuteczne bakteriobójczo jest promieniowanie UV o długości fali = 250 - 260 nm. Promienie UV, z uwagi na małą przenikliwość, działają tylko na wystawione na ich bezpośrednie działanie powierzchnie, itp. Mechanizm działania promieni UV polega na uszkodzaniu DNA poprzez tworzenie mostków pomiędzy tyminami. Powstają przez to pętle które nie są powielane przy procesach replikacji DNA. W ten sposób nowopowstałe nici DNA zawierają wiele braków, co uniemożliwia rozwój nowopowstałej komórki. Do wyjaławiania promieniami UV form przetrwalnych bakterii zarodników grzybów oraz wirusów konieczne jest przedłużanie czasu naświetlania od 2 do 5 x. Schemat działania promieni UV przedstawiono na rys. 3.

Rys. 3

SCHEMAT DZIAŁANIA PROMIENI UV NA DNA



Przykłady zastosowania promieniowania UV:

- wyjaławianie pomieszczeń szpitalnych, itp.
- wyjaławianie pomieszczeń, powierzchni roboczych i przedmiotów w pracowniach mikrobiologicznych, laboratoriach przykładowych, itp.
- wyjaławianie niektórych pomieszczeń składowych, np. chłodni
- wyjaławianie powierzchni jaj

Skuteczność wyjaławiania promieniami UV zależy od:

- formy w jakiej występują oraz liczebności mikroorganizmów w poddawanym działaniu UV środowisku
- emitowanej długości fali
- czasu działania UV
- stopnia zanieczyszczenia powietrza cząstkami mechanicznymi
- wilgotności powietrza
- odległości wyjaławianego obiektu od źródła promieniowania (skuteczność maleje z kwadratem odległości)



Efekt działania lamp UV zależy głównie od ich mocy oraz odległości od naświetlanej powierzchni.

Składa się nań także wiele innych czynników. Trudno jest zatem podać proste reguły, które należy stosować aby uzyskać prawidłową sterylizację. Spowodowane jest to tym, że lampy ulegają stopniowemu zużyciu i nie jest możliwe precyzyjne określanie wypromieniowywanej dawki opierając się jedynie na podanej przez producenta mocy lampy. Najważniejszym jest przestrzeganie wytycznych producenta lamp, który podaje czasy naświetlania w zależności od odległości do powierzchni naświetlanej.



UWAG

OSTRZEŻENIA

Podczas pracy z lampami UV należy zwracać baczność uwagę na osłonę oczu. Nawet kilkusekundowe naświetlenie powoduje bardzo bolesne zapalenie spojówek. Może też prowadzić do uszkodzenia wzroku.

Jest to rodzaj promieniowania, KTÓRE NIE OPALA a powoduje jedynie uszkodzenie naskórka.



ĆWICZENIA

ĆWICZENIE 3

TEMAT: WPŁYW PROMIENIOWANIA UV NA MIKROORGANIZMY

Cel: Zapoznanie studentów ze skutecznością działania promieniowania ultrafioletowego na różne drobnoustroje

Materiały:

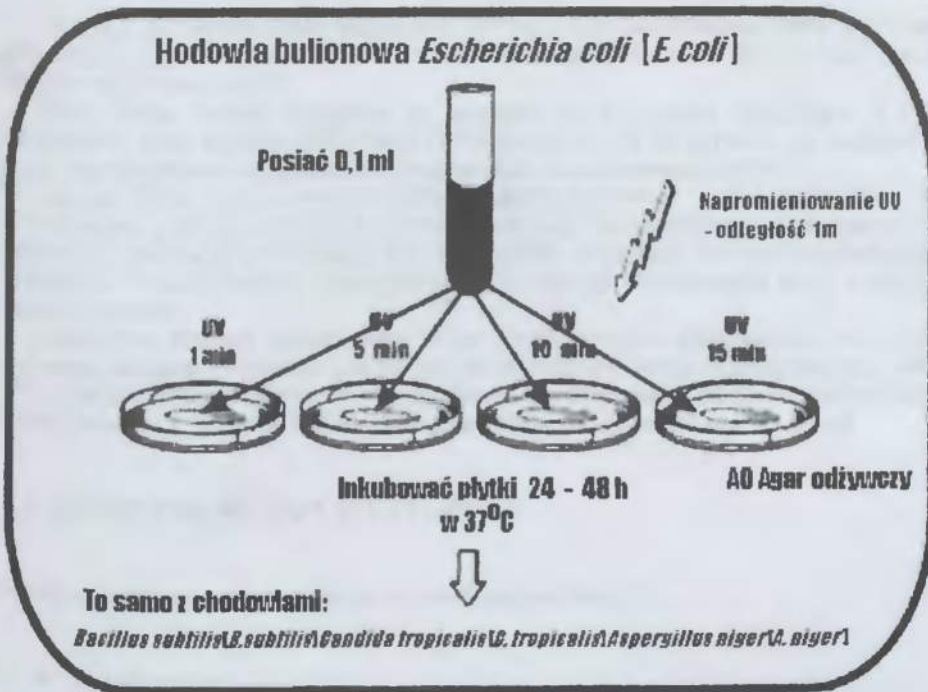
1. Probówka z 24h hodowlą *Escherichia coli* na bulionie odżywczym
2. Probówka z 24h hodowlą *Bacillus subtilis* na bulionie odżywczym
3. Probówka z 24 godziną hodowlą *Candida tropicalis*
4. Hodowla *Aspergillus fumigatus*
5. Płytki z agarem odżywczym (AO)
6. Jałowe pipety 1ml
7. Jałowe bagietki (głaszczki)
8. Dermatograf

Wykonanie:

1. Przenieść po 0,1 ml hodowli bulionowej *Escherichia coli* na 4 płytki z AO
2. Rozprowadzić materiał po powierzchni podłoża jałową bagietką
3. Przenieść po 0,1 ml hodowli bulionowej *Bacillus subtilis* na 4 płytki z AO
4. Przenieść po 0,1 ml hodowli płynnej *Candida tropicalis* na 4 płytki z podłożem Sabouraud
5. Rozprowadzić materiał po powierzchni podłoża jałową bagietką
6. Oznakować płytki w sposób pozwalający na identyfikację posianego szczepu
7. Pobrać eż zarodniki z hodowli *Aspergillus niger* i rozprowadzić je po powierzchni 4 płytek z podłożem stałym Sabouraud
8. Płytki ustawić na stole w odległości ~ 1m od źródła promieni UV.

9. Zsunąć wieczka płytek w sposób pozwalający na ekspozycję, na bezpośrednie działanie promieni UV, części materiału na płytce
10. Płytki z posianymi szczepami doświadczalnymi eksponować na działanie promieni UV przez 1, 5, 10 i 15 min
11. Po każdym interwale czasowym ekspozycji płytki oznaczyć dodatkowo, odpowiednio 1, 5, 10, 15, co odpowiada czasowi ekspozycji każdej z płytek
12. Płytki inkubować w 37°C/24h, hodowle z *A. niger* inkubować przez 3-5 dni
13. Określić skuteczność bakteriobójczą różnych czasów ekspozycji na działanie promieni UV
 - brak wzrostu na eksponowanej części płytki = proces skuteczny = (+)
 - wzrost na eksponowanej części płytki = proces nieskuteczny = (-)
 - wzrost mniej intensywny na eksponowanej części płytki w porównaniu z częścią osłoniętą = redukcja liczby skuteczność częściowa = (+/-)

Rys. 4
SCHEMAT WYKONANIA ĆWICZENIA 3



Wyniki odczytów umieścić w tabeli 5

Tabela 5

Skuteczność bakteriobójcza określonego czasu ekspozycji na działanie promieni UV (260 nm)

Szczep	<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Aspergillus niger</i>
Czas ekspozycji w min.				
1				
5				
10				
15				

Wnioski:

Data

zaliczenie



Rozdział 5

WYJAŁAWIANIE MECHANICZNE - STERYLIZACJA NA ZIMNO

Sterylizacja na zimno prowadzona jest przy pomocy różnego typu filtrów (patrz: Tabela 2). Działają one na zasadzie sita zatrzymując wszystkie, mniejsze od średnicy por filtra, cząsteczki znajdujące się w poddawanej filtracji środowisku. (Zatrzymywanie mniejszych od średnicy por filtra komórek jest wynikiem ich adsorpcji na filtrze.)

Wyjaławiony zestaw do sterylizacji na zimno, w skład którego wchodzi określony filtr bakteriologiczny podłączany jest do pompy próżniowej. Wytworzone podciśnienie pozwala na swobodny przepływ jałowionego materiału przez filtr oraz na uzyskanie jałowego przesączu.

Tą metodą jałowione są:

- związki termowrażliwe (termolabilne) przygotowane w formie roztworów (niektóre cukry, białka, aminokwasy, witaminy, enzymy, płyny ustrojowe)
- powietrze (np. boksy do posiewów, sale operacyjne)

Obecnie do wyjaławiania stosowane są wyłącznie jednorazowe filtry membranowe, sporządzone z poliwęglanu, octanu celulozy lub innych polimerów. Są one mało kosztowne i bardzo wygodne w użyciu.

Filtry Seitza zostały wycofane ze względu na zagrożenie wynikające z kontaktu z azbestem. Filtry Schotta, Berkefelda i Chamberlanda nie są używane ze względu na ich koszt oraz kłopotliwe przygotowanie (regeneracja) do ponownego użycia.

Oprócz filtrów membranowych bakteriologicznych spotkać można także tzw. ultrafiltry membranowe o różnej zdolności sączenia. Pozwalają one na zateżnianie bądź frakcjonowanie roztworów białkowych, eliminację soli i związków organicznych niskocząsteczkowych z roztworów. W laboratoriach i przemyśle są stosowane do otrzymywania wody o najwyższym stopniu czystości.

Najbardziej znanym producentem filtrów membranowych stosowanych w laboratoriach jest firma Millipore. Produkuje ona bardzo wiele rodzajów filtrów i różnej średnicy, wielkości por, właściwościach powierzchni (hydrofobowe, hydrofilowe), materiale (nitrocelulozowe, poliwęglowe itp.). Schemat zestawu filtrującego przedstawiono na rys. 20 str. 42.

5.1. CHEMICZNE METODY STERYLIZACJI

Do sterylizacji gazami stosowane są następujące związki:

- tlenek etylenu
- tlenek propylenu
- formaldehyd
- β - propionolaktan



TECHNIKA

Tlenek etylenu jest bezbarwnym gazem, który reaguje z wieloma związkami chemicznymi jak alkohole, aminy, kwasy organiczne i amidy. Jest zapalny i wybuchowy. Jego zapalność jest ograniczana poprzez mieszanie z CO_2 . Ma własności mutagenne i rakotwórcze. Jego działanie bakterio- i sporobójcze jest spowodowane reakcją z kwasami nukleinowymi, a konkretnie z alkilacją guanozyny.

1. Zastosowanie:

- wyłławianie sprzętu wielokrotnego użytku z materiałów termolabilnych
- sterylizacja sprzętu i narzędzi medycznych jednorazowego użytku (skała przemysłowa)

2. Trudności związane z bezpiecznym stosowaniem tlenu etylenu:

- **7 dniowy** okres degazacji w **temperaturze pokojowej** (oddzielne, dobrze wentrowane pomieszczenie)
- **12 h w 60°C** w specjalnych urządzeniach (**aeratory**) - proces kontrolowany biologicznie - zalecenie WHO

3. Skuteczność tlenu etylenu zależy od:

- stężenia gazu
- wilgotności
- temperatury
- czasu działania



WAŻN

Ze względu na toksyczność dla człowieka tlenek etylenu może być stosowany wyłącznie przez wyspecjalizowane zakłady produkcyjne.



TECHNIKA

Tlenek propylenu w obecności pary wodnej hydrolizuje do nietoksycznego glikolu propylenowego. Podobnie jak tlenek etylenu powoduje uszkodzenie DNA poprzez metylację guaniny. Był proponowany ale rzadko stosowany do sterylizacji żywności płatkowanej i sproszkowanej.

Rozdział 6

PODŁOŻA (POŻYWKI) BAKTERIOLOGICZNE



Podłoże lub pożywka to środowisko, w którym sztucznie stworzono warunki dla rozwoju mikroorganizmów.

Warunki, jakie spełniać powinno podłoże:

- powinno zawierać składniki zapewniające odpowiednią wartość odżywczą
- powinno zapewniać odpowiednie oddziaływanie na drobnoustroje, tzn. mieć odpowiednie pH, potencjał oksydo-redukcyjny (Eh), aktywność wodną (a_w), ciśnienie osmotyczne, itp.
- powinno być jałowe
- powinno być możliwie przejrzyste (łatwość obserwacji)

Kiedy spełniony zostaje warunek odpowiedniej wartości odżywczej podłoża?

Gdy podłoże zawiera:

- źródło energii (węglowodany, aminokwasy, tłuszcze)
- źródło węgla (węglowodany; białka, tłuszcze, CO_2)
- źródło azotu (aminokwasy, peptydy; sole amonowe, azotany; N_2)
- makro i mikroelementy (S, P, Mg, K, Co, Cu, Zn, itp.)
- złożone związki organiczne (drobnoustroje występujące w żywności to najczęściej heterotrofy /chemoorganotrofy/, wykorzystujące jako źródło C i N związki organiczne. Nierzadko wymagają one obecności w pożywce dodatkowych czynników wzrostowych jak witaminy czy nukleotydy itp.)

6.1. RODZAJE POŻYWEK

Podział podłoży na podstawie różnic w składzie chemicznym:

- **naturalne** - podłoża bazujące na składnikach pochodzenia naturalnego, np.: wyciągi z tkanek zwierzęcych lub roślinnych, mleko, żółtko jaja, brzeczka, krew zwierzęca
- **syntetyczne** - podłoża o ściśle określonym składzie chemicznym (jakościowo-ilościowym) - najczęściej sporządzone z zestawu określonych aminokwasów, cukrów, witamin, soli itp. Przeznaczone są do badania zapotrzebowań odżywczych bakterii oraz uzyskiwania czystych wielkocząsteczkowych produktów metabolizmu bakterii
- **półsyntetyczne** - podłoża syntetyczne które wymagają dodatków naturalnych jak surowica zwierzęca

Podział podłoży na podstawie różnic w konsystencji:

- **stałe** (1,5 - 2,0% agaru; 10-15% żelatyny)
- **płynne**
- **półpłynne** (0,1 - 0,7 % agaru). Służą do badania ruchu bakterii, przechowywania szczepów, oceny wymagań tlenowych badanych drobnoustrojów

Tabela 6
Czynniki zestalające podłoża

Żelatyna	Agar
proste białko, kwaśny hydrolizat kolagenu zwierzęcego	polisacharyd zawierający reszty siarczanowe, obecny w glonach morskich, krasnorostach
rozpuszczalna w ciepłej wodzie (w 25°C), postać galaretowatego żelu	koloid pęczniejący w wodzie, silnie chłonący wodę, temp. rozpuszczania 59 – 95°C, temp. krzepnięcia 45 – 48°C
rozkładana przez bakterie i grzyby proteolityczne	rozkładany przez nieliczne drobnoustroje
utrata właściwości zestalających przy kilkakrotnym przeprowadzeniu z zolu w żel zmienia pH podłoża	nie traci właściwości zestalających przy wielokrotnym przeprowadzaniu z zolu w żel bez wpływu na odczyn środowiska
ilość niezbędna do zestalenia podłoża 10 – 15%	dodatek agaru niezbędny do uzyskania podłoża stałego 1,5 – 2,5%
substrat pokarmowy (źródło N) dla drobnoustrojów proteolitycznych – efekt - upłynnienie podłoża	wyłącznie czynnik zestalający podłoże
	w środowisku o pH < 5,0, podczas sterylizacji ulega częściowej hydrolizie (traci właściwości zestalające)

Formy zestalania podłoży stałych:

1. Podłoża zestalone na płytkach Petriego
2. Podłoża w probówkach zestalone w formie:
 - słupka
 - skosu
 - półskosu

Zastosowanie podłoży stałych:**ad 1.**

- izolowanie pojedynczych kolonii bakteryjnych
- określanie morfologii kolonii jako cechy różnicującej
- określanie liczby drobnoustrojów

ad 2.

- przechowywanie czystych szczepów bakterii
- określanie niektórych cech fizjologicznych bakterii (sposób oddychania, zdolność ruchu)
- określanie cech biochemicznych bakterii

Podział podłoży na podstawie różnic w zapotrzebowaniu pokarmowym drobnoustrojów:

- **proste** - podłoże umożliwiające wzrost większości drobnoustrojów z danego środowiska
- **wzbogacone** - podłoże proste zawierające dodatkowe czynniki wzbogacające jak ekstrakty z drożdży, czy tkanek zwierzęcych - mózg, serce, umożliwiające wzrost bardziej wybrednych pod względem odżywczym bakterii z danego środowiska

Podział podłoży na podstawie celu jakiemu służą:

- **podstawowe** - zamiennie używana nazwa podłoża prostego
- **specjalne:**
 - **namnażające** - służą do namnażania bakterii
 - **namnażająco-wybiórcze** - służą do namnażania określonych rodzaj bakterii. Dodany inhibitor hamuje rozwój większości gatunków a umożliwia rozwój poszukiwanego gatunku
 - **wybiórczo-różnicujące** - następuje na nich wzrost wybranych gatunków i jednocześnie ich wstępne zróżnicowanie
 - **różnicujące** - służą do określenia wybranej cechy biochemicznej wybranego szczepu co pozwoli na zróżnicowanie tego szczepu na bakterie posiadające i nie posiadające badanej cechy
 - **szczególnego przeznaczenia** - wykorzystywane do transportu szczepów, przechowywania bakterii, maksymalnej produkcji niektórych metabolitów, badań genetycznych

Co decyduje o wyborze podłoża ?

- wymagania izolowanego drobnoustroju
- założony cel eksperymentu

Podłoża podstawowe pełne



DEFINICJA

Izotoniczność środowiska = ciśnienie osmotyczne środowiska,
optymalne dla zawieszonych w nim komórek ludzkich,
zwierzęcych i bakteryjnych

Bulion odżywczy - skład:

- **wodny wyciąg mięsny** - wyekstrahowane z mięsa wołowego poprzez gotowanie białka i inne drobnocząsteczkowe składniki
- **pepton** - rozpuszczalne produkty częściowej proteolizy białek bulionu (wynik działania enzymów proteolitycznych)
- **roztwór 0,85% NaCl** - zapewnia izotoniczność środowiska. Często używa się terminu - roztwór fizjologiczny soli.

**UWAGI****CIENIAWOSTKI**

- ✓ *Bardzo często dla celów laboratoryjnych używa się roztworów PBS - buforowanych fosforanami roztworów soli fizjologicznej.*
- ✓ *Rozwory hipotoniczne - roztwory o ciśnieniu osmotycznym niższym niżeli izotoniczne. Komórki w nim zawieszone pęcznieją i pękają*
- ✓ *Rozwory hipertoniczne - roztwory o ciśnieniu osmotycznym wyższym niżeli izotoniczne. Komórki w nim zawieszone obkurczają się.*

Agar odżywczy - skład:

- bulion odżywczy
- agar (1,5 - 2%)

**URZĄDZENIA****TECHNIKA**

Agar - czynnik zestalający podłoża bakteriologiczne jest polisacharydem zbudowanym z galaktozy, reszty siarczanowej, jonów magnezu i wapnia. Co 10. cząsteczka cukru jest zestryfikowana z resztą kwasu siarkowego. Jak każdy polisacharyd w środowisku kwaśnym w podwyższonej temperaturze ulega hydrolizie, co powoduje utratę jego zdolności żelifikacyjnych. Obniżenie pH przygotowywanej pożywki do wartości <5 a następnie jej sterylizacja powoduje, że pomimo dodania odpowiedniej ilości agaru (1,5 - 2%) pożywka pozostaje półpłynna. Najczęściej zjawisko takie występuje podczas przygotowywania pożywek do hodowli drożdży, w których czynnikiem ograniczającym rozwój bakterii jest niskie pH.



ĆWICZENIE 4

TEMAT: PRZYGOTOWANIE PODŁOŻY BAKTERIOLOGICZNYCH

Cel: Zapoznanie się z metodami przygotowywania podłoży bakteriologicznych

Materiały:

1. Dwie 250 ml kolbki płaskodenne z korkiem z waty lub ligniny osłonięte gazą
2. Suche podłoża gotowe: bulion odżywczy i agar odżywczy
3. Woda destylowana w kolbie, cylinder miarowy 100ml
4. Waga laboratoryjna
5. 3 niejałowe próbówki 20 ml z korkami jw., statyw, metalowy koszyk
6. 3 jałowe próbówki
7. 1 niejałowa pipeta
8. 1 jałowa pipeta
9. 2 jałowe szalki (płytki) Petriego
10. Dermatografy
11. Autoklaw

Wykonanie:

1. Odważyć, zgodnie z instrukcją na opakowaniu wymagane ilości suchego podłoża gotowego by otrzymać odpowiednio; 100 ml agaru odżywczego oraz 50 ml bulionu odżywczego. Dodać odpowiednie ilości wody destylowanej (100 i 50 ml)
2. Kolbki zawierające określone podłoże odpowiednio oznakować, odpowiednio, agar odżywczy = AO; bulion odżywczy = B
3. Ustawić w statywie próbówki, rozlać do nich, miarowo, bulion odżywczy (po 10 ml), próbówki zakorkować i umieścić w koszyku zbiorczym. Umieszczone w koszyku zbiorczym próbówki z bulionem przykryć kapturkiem. W koszyku umieścić kartkę z napisem -Bulion odżywczy
4. Kolbkę z agarem odżywczym, po zalaniu suchego podłoża wodą destylowaną, pozostawić na ~ 1 h w temp. pokojowej, do napęcznienia agaru
5. Koszyk z próbówkami zawierającymi bulion odżywczy oraz kolbki z agarem odżywczym umieścić w autoklawie
6. Sterylizować podłoża w 121°C/ 15 min. (Praktyczna demonstracja pracy autoklawu)
7. Agar odżywczy w kolbce przestudzić a następnie rozlać, z zachowaniem warunków jałowości, na jałowe płytki Petriego oraz przy pomocy jałowej pipety, do 3 jałowych próbówek. Jedną z nich pozostawić w statywie pozostałe "skosić", tzn. oprzeć o statyw pod kątem ~ 45 i 20 stopni i pozostawić tak do zestalenia się podłoża
8. Po zestaleniu się podłoża na płytkach odwrócić płytki denkami do góry i na denku, dermatografem, oznaczyć -AO. Probówki z podłożem zestalonym w formie słupków, skosów i półskosów oznakować jw. I zebrać do koszyka
9. Podłoża przechowywać w warunkach chłodniczych - **będą wykorzystywane na następnych zajęciach**



ĆWICZENIE 5

TEMAT: WPŁYW PH PODŁOŻA NA WŁAŚCIWOŚCI ZESTALAJĄCE AGARU

Cel : Demonstracja wpływu pH na cechy zestalające agar

Materiały:

1. Dwie 250 ml kolbki płaskodenne z korkiem z waty lub ligniny osłonięte gazą
2. Suche podłoże gotowe: agar odżywczy
3. Woda destylowana w kolbie, cylinder miarowy 100ml
4. Waga laboratoryjna
5. Jałowe szalki (płytki) Petriego
6. Dermatograf
7. Autoklaw

Wykonanie:

1. Do 2 kolbek odważyć, zgodnie z instrukcją na opakowaniu, wymaganą ilość suchego podłoża gotowego tak, by otrzymać po 50 ml agaru odżywczego
2. Dodać po 50 ml wody destylowanej
3. W jednej z kolbek obniżyć pH podłoża przy pomocy 10% roztworu HCl do ~ 4,5. Oznaczyć ją odpowiednio AOz
4. Kolbki z agarem odżywczym umieścić w autoklawie i sterylizować w 121° C/ 15 min
5. Wyjałowione podłoża przestudzić i wylać na płytki oznaczone stosownie literami AO i AOz. Pozostawić do zestalenia
6. Porównać skuteczność agaru jako czynnika zestalającego w podłożach o różnym pH wyjściowym przed sterylizacją
7. Wnioski zapisać w poniższej tabeli

Tabela 7

Wpływ wyjściowego pH na właściwości zestalające agaru

Oznakowanie próby	Konsystencja podłoża po zestaleniu
AO	
AOz	

Wnioski:

data

zaliczono

Rozdział 7

WZROST MIKROORGANIZMÓW W WARUNKACH LABORATORYJNYCH

Wzrost mikroorganizmów rozumieć można jako:

1. Wzrost masy i rozmiarów pojedynczego osobnika, tj. komórki
2. Wzrost biomasy i liczebności komórek w środowisku, tj. wzrost liczebności populacji



Hodowla nazywamy masę drobnoustrojów wyrosłych na podłożu o dowolnej konsystencji.

Hodowla czysta - wyrosłe w środowisku wzrostowym drobnoustroje są identycznymi osobnikami tj. należą do jednego szczepu konkretnego gatunku.

Hodowla mieszana - wyrosłe w środowisku wzrostowym drobnoustroje należą do różnych szczepów tego samego gatunku lub różnych gatunków jednego rodzaju bądź różnych rodzajów.

Hodowla statyczna - namnażanie drobnoustrojów prowadzone jest w naczyniu do którego w trakcie doświadczenia nie dodajemy nowej ani nie ujmujemy zużytej pożywki.

Hodowla zsynchronizowana - osobniki stanowiące wyjściowe inokulum, znajdują się w jednakowej fazie wzrostu.

Hodowla zsynchronizowana - ma zastosowanie głównie dla celów badawczych.

Hodowla ciągła - namnażanie drobnoustrojów prowadzone jest w środowisku w którym ciągle usuwana jest część pożywki i dodawana nowa.

Inokulum - masa drobnoustrojów wysiewanych na pożywkę

W zależności od tego, czy wyrosłe drobnoustroje są identycznymi osobnikami, tzn. czy należą do jednego szczepu, czy też są przedstawicielami różnych szczepów tego samego gatunku, różnych gatunków, jednego rodzaju, bądź różnych rodzajów, itp. jest to odpowiednio, **hodowla czysta** lub **mieszana**. Podobną terminologię możemy stosować do hodowli, w której występują bakterie należące do jednego typu serologicznego, fagowego lub identycznej antybiotykowrażliwości.

W zależności od tego, czy namnażanie drobnoustrojów prowadzone jest w środowisku o ograniczonej, zawartości składników pokarmowych czy też w warunkach stałego dopływu substratów pokarmowych i eliminacji ze środowiska wzrostowego produktów przemiany materii rozwijających się w nim drobnoustrojów, wyróżniamy **hodowlę statyczną i ciągłą**. Hodowla ciągła znajduje zastosowanie w warunkach przemysłowych.

Jeśli osobniki stanowiące wyjściowe inokulum, znajdują się w jednakowej fazie wzrostu to taką **hodowlę** nazywamy **zsynchronizowaną**. Tego typu hodowle mają zastosowanie głównie dla celów badawczych.



Hodowla ciągła znajduje zastosowanie w przemyśle!

Tabela 8

Metody prowadzące do uzyskania hodowli.

Materiał wyjściowy	Sposób posiewu	Narzędzia	Podłoże docelowe
podłoże płynne	przelewanie	-	podłoże płynne
podłoże płynne	przenoszenie	pipeta miarowa	podłoże płynne podłoże stałe
podłoże płynne	przenoszenie	pipeta niemiarowa	podłoże płynne podłoże stałe
podłoże płynne	przenoszenie	eza bakteriologiczna (eza prosta, eza z oczkiem)	podłoże płynne podłoże stałe
podłoże stałe	przenoszenie	eza bakteriologiczna (eza prosta, eza z oczkiem)	podłoże płynne podłoże stałe

Charakter wzrostu na podłożach płynnych zależy od:

- wymogów tlenowych mikroorganizmu
- właściwości fizyko-chemicznych podłoża
- natlenienia środowiska
- metody hodowli

Przy założeniu, że mamy do czynienia z hodowlą czystą może to być wzrost:

- **dyfuzyjny** (zmętnienie) - równomierny w całej objętości podłoża w postaci zmętnienia, charakterystyczny dla drobnoustrojów względnie beztlenowych.

Dodatkowo przy wzroście dyfuzyjnym na powierzchni podłoża może wystąpić membrana, pierścień lub osad na dnie probówki

- **w postaci kożuszka na powierzchni** - typowy dla drobnoustrojów ściśle (bezwzględnie) tlenowych
- **w postaci pierścienia tuż pod powierzchnią podłoża** - typowy dla mikroaerofilnych mikroorganizmów, tj. rosnących przy obniżonej zawartości tlenu (5%)
- **w postaci osadu na dnie** - typowy dla drobnoustrojów preferujących warunki beztlenowe. Osad może mieć formę kłaczków lub grudek

Formy wzrostu na podłożach płynnych przedstawia rys. 5

Rys.5



DEFINICJA

Kolonia nazywamy skupisko drobnoustrojów, widoczne gołym okiem, wyrosłe na powierzchni lub w głębi **PODŁOŻA STAŁEGO**, powstałe z jednostki tworzącej kolonie (jtk).

Jednostką tworzącą kolonie - jtk (ang. colony forming unit - CFU) może być pojedyncza komórka lub ich naturalne skupisko np.: dwójka, grono (gronkowce), łańcuszek (paciorkowce), itp.

Określanie cech morfologicznych kolonii ma znaczenie przy oznaczaniu przynależności systematycznej drobnoustrojów. Morfologia niektórych kolonii, szczególnie na podłożach różniących - wybiórczych bywa niekiedy tak charakterystyczna, że w znacznym stopniu ułatwia dalsze różnicowanie drobnoustrojów. Morfologia kolonii bakteryjnych zależy od:

- czasu hodowli. - drobnoustroje występujące w żywności wyrastają w postaci kolonii zwykle po 24 –48 godz., w starych hodowlach morfologia kolonii ulega znacznym zmianom
- rodzaju pożywki - na pożywkach ubogich w składniki odżywcze - kolonie wyrastają wolniej i są znacznie mniejsze
- cech fizjologicznych szczepu – szczepy stare tzn. przechowywane na pożywce przez dłuższy okres czasu, uszkodzone antybiotykami lub środkami dezynfekcyjnymi mogą wytwarzać odmienne morfologicznie kolonie

Tabela 9
Sposoby posiewów do pojedynczych kolonii

Material wyjściowy	Sposób posiewu	Narzędzia	Podłoże docelowe	Rodzaj posiewu
podłoże płynne	przenoszenie	pipeta miarowa	podłoże stałe	posiew powierzchniowy posiew podpowierzchniowy przez: • zalewanie, • zatapianie
podłoże płynne	przenoszenie	pipeta niemiaraowa	podłoże stałe	posiew powierzchniowy posiew podpowierzchniowy przez: • zalewanie, • zatapianie
podłoże płynne	przenoszenie	eza bakteriologiczna	podłoże stałe	posiew powierzchniowy posiew podpowierzchniowy przez: • wklucie
podłoże stałe	przenoszenie	eza bakteriologiczna	podłoże stałe	posiew powierzchniowy posiew podpowierzchniowy przez: • wklucie

Charakterystyka wzrostu drobnoustrojów na podłożach stałych.

Kolonie, w zależności od metody posiewu mogą wyrastać na powierzchni (**kolonie powierzchniowe**) lub w głębi podłoża stałego (**kolonie wgłębne**).

Cechy uwzględniane przy charakterystyce kolonii powierzchniowych:

1. Kształt kolonii - okrągły, elipsoidalny, nieregularny, meduzowaty
2. Brzeg kolonii - równy, ząbkowany, falisty, postrzępiony
3. Kształt przekroju poprzecznego - rodzaj wyniesienia kolonii nad podłoże - płaskie wypukłe, wypukło - wklęsłe, pępkowate, tarasowate
4. Struktura wewnętrzna kolonii - masłowata, śluzowata, grudkowata
5. Powierzchnia kolonii - lśniąca, matowa, łuskowata, puchowata
6. Przezroczystość kolonii - przejrzyste, nieprzejrzyste
7. Barwa kolonii
8. Wielkość kolonii (w milimetrach)
9. Zmiany dotyczące podłoża w bezpośrednim sąsiedztwie kolonii - zabarwienie podłoża, hemoliza na podłożu z krwią, strefa zmnienienia, itp.


UWAGI

Niekiedy kolonie mają charakterystyczny zapach także ułatwiający identyfikację.

Rys 6
Morfologia kolonii bakterii



Zapotrzebowanie tlenowe drobnoustrojów

Sposób wzrostu bakterii na podłożach płynnych i półpłynnych uzależniony jest między innymi od wymagań tlenowych drobnoustrojów. W związku z powyższym dzielimy je na:

1. **Bezwzględne tlenowce (obligatoryjne tlenowce)** wykorzystujące tlen do procesów metabolicznych, których celem jest uzyskanie energii (tlen jest akceptorem wodoru). Jest to ich jedyna forma uzyskiwania energii i bez obecności tlenu drobnoustroje nie rosną
2. **Bakterie względnie beztlenowe (fakultatywnie beztlenowe)**, drobnoustroje tlenowe posiadające zdolność wzrostu także w warunkach beztlenowych. Zdolność wzrostu, zarówno w warunkach tlenowych jak i beztlenowych jest możliwa dzięki dwóm mechanizmom biochemicznym uzyskiwania energii przez drobnoustroje (np. drożdże)
3. **Bakterie bezwzględnie beztlenowe (obligatoryjne beztlenowce)** rosną wyłącznie w warunkach beztlenowych. Są szczepy beztlenowców, dla których tlen atmosferyczny jest toksyczny
4. **Bakterie mikroaerofilnie** - rosną w warunkach zmniejszonej koncentracji tlenu



ĆWICZENIE 6

TEMAT: CHARAKTERYSTYKA WZROSTU BAKTERII NA PODŁOŻACH PŁYNNYCH (TYPY WZROSTU)

Cel: Zapoznanie studentów z różnego typu wzrostem bakterii na podłożach płynnych

Materiały:

1. 24-godzinne czyste hodowle: *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus* sp., *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia marcescens*, *Sarcina lutea*, *Streptococcus faecalis*, *Salmonella enteritidis*, *Streptococcus lactis*, *Bacillus cereus*
2. Probówki z jałowym bulionem odżywczym – 2 probówki po 5ml
3. Jałowy olej parafinowy lub jałowy 2% agar wodny
4. Jałowy bulion odżywczy w kolbce
5. Jałowe pipety 1 ml
6. Jałowa płytka z agarem odżywczym
7. Jałowe waciki do wymazów

Wykonanie:

1. Posługując się eżą bakteriologiczną przenieść z zachowaniem warunków jałowości po jednym oczku eży każdego ze szczepów, równolegle do 2 probówek z bulionem odżywczym
2. Jedną z ustawionych w statywie probówek z posiewem zalać 0,5 ml oleju parafinowego lub schłodzonym 2% agarem wodnym, drugą pozostawić jako kontrolę. Probówki oznaczyć odpowiednio B i O
3. Posiewy inkubować w 37°C przez 24h
4. Po inkubacji odczytać typ wzrostu w oparciu o schemat rysunkowy
5. Wyniki odczytów zapisać w Tabeli 10
6. Wykonać posiew materiału z dowolnie wybranego źródła na podłoże agarowe na płytce, np.:
 - ekspozycja otwartej płytki na stole laboratoryjnym przez 10 min.
 - odcisk palców na podłożu
 - pobrany jałowym wacikiem materiał z parapetu, podłogi
 - pobrany jałowym wacikiem materiał z kącików zlewu, toalety, itp.
 - pobrany jałowym wacikiem materiał z powierzchni ciała, np. ręki, włosów, czoła, języka, itp.)

Tabela 10

Charakterystyka wzrostu wybranych szczepów bakterii na podłożu płynnym (bulion odżywczy)

Drobnoustrój	Rysunek		Typ wzrostu		Typ oddychania
	O	B	O	B	
Oznakowanie próbówki					
<i>Bacillus subtilis</i>					
<i>Bacillus cereus</i>					
<i>Escherichia coli</i>					
<i>Pseudomonas fluorescens</i>					
<i>Streptococcus faecalis</i>					
<i>Streptococcus lactis</i>					
<i>Staphylococcus aureus</i>					
<i>Serratia marcescens</i>					
<i>Proteus vulgaris</i>					
<i>Micrococcus</i> sp.					
<i>Sarcina lutea</i>					
<i>Salmonella enteritidis</i>					

O – warunki tlenowe; B – warunki beztlenowe

Wnioski:

Data

zaliczenie



ĆWICZENIE 7

**TEMAT: CHARAKTERYSTYKA WZROSTU BAKTERII
TLENOWYCH I WZGLĘDNIE BEZTLENOWYCH
NA PODŁOŻU STAŁYM (AGAR ODŻYWCZY)**

Cel: Zapoznanie studentów z metodami obserwacji (lupa, binokular), wyglądem i cechami branymi pod uwagę przy charakterystyce morfologicznej kolonii bakterii

Materiały:

1. Lupa, binokular
2. Płytki z posianymi do pojedynczych kolonii szczepami *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia marcescens*, *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus lactis*, *Micrococcus sp.*, *Sarcina lutea*, *Salmonella enteritidis*
3. Płytki z posianym metodą odciskową i metodą rozmazów materiałem z poprzedniego ćwiczenia
4. Dermatograf

Wykonanie:

1. Przeprowadzić obserwację morfologii kolonii szczepów o znanej przynależności systematycznej (patrz: Materiały - punkt 2)
2. Podać charakterystykę kolonii, biorąc pod uwagę uwzględniane przy takiej charakterystyce cechy (patrz: Tabela 11)
3. Wyniki obserwacji zapisać w poniższej tabeli
4. Przeprowadzić obserwację płytki ze wzrostem szczepów z różnorodnych źródeł (patrz: ćwiczenie poprzednie)
5. Zaznaczyć dermatografem 3 dowolnie wybrane kolonie i nadać im na denku płytki, kolejne numery od 1 do 3
6. Podać charakterystykę morfologii kolonii szczepów, oznaczonych numerami od 1 do 3, o nieznanym przynależności systematycznej.
7. Zapisać wyniki obserwacji w poniższej tabeli

Tabela 11

Charakterystyka morfologiczna kolonii wybranych szczepów bakterii na (podłożu podstawowym pełnym) agarze odżywczym

Drobnoustrój	kształt	wyniesienie	brzeg	struktura	prze- rzystość	barwa	wielkość	zmiany w podłożu
<i>Bacillus subtilis</i>								
<i>Bacillus cereus</i>								

<i>Escherichia coli</i>									
<i>Pseudomonas fluorescens</i>									
<i>Streptococcus faecalis</i>									
<i>Streptococcus lactis</i>									
<i>Staphylococcus aureus</i>									
<i>Serratia marcescens</i>									
<i>Proteus vulgaris</i>									
<i>Micrococcus sp.</i>									
<i>Sarcina lutea</i>									
<i>Salmonella enteritidis</i>									
Oznakowanie probówki									
1									
2									
3									

Wnioski:

Data

zaliczenie



ĆWICZENIE 8

TEMAT: CHARAKTERYSTYKA WZROSTU BAKTERII - POSIEW KŁUTY NA WYSOKI SŁUPEK AGAROWY

Cel: Zapoznanie studentów z cechami bakterii możliwymi do odczytu przy posiewach kłutych – na przykładzie wybranych szczepów bakterii

Materiały:

1. 24-godzinny materiał w postaci czystych kolonii szczepów: *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia marcescens*, *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus lactis*, *Micrococcus sp.*, *Sarcina lutea*, *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes*
2. Probówki z półpłynnym agarem odżywczym
3. Eża prosta
4. Dermatograf

Wykonanie:

1. Przy pomocy ezy prostej pobrać materiał z pojedynczej kolonii szczepu wzorcowego
2. Wykonać posiew kłuty każdego ze szczepów wzorcowych (do dna) na wysoki słupek agarowy
3. Oznaczyć probówkę z posiewem numerem szczepu (patrz: Tab. 12)
4. Posiewy inkubować w 37°C przez 24h
5. Po inkubacji odczytać wyniki posiewów, tj. określić typ wzrostu oraz typ oddychania charakteryzujący dany drobnoustrój
6. Na podstawie zasięgu wzrostu, odległości od kanału wklucia, określić zdolność szczepów do poruszania się ruchem swoistym
7. Wyniki odczytów zapisać w Tabeli 12

Tabela 12

Charakterystyka wzrostu wybranych szczepów wzorcowych bakterii na podłożu półpłynnym (agar odżywczy) – posiew kłuty

Drobnoustrój	Rysunek	Typ wzrostu	Typ oddychania	Ruch
<i>Bacillus subtilis</i>				
<i>Bacillus cereus</i>				
<i>Escherichia coli</i>				
<i>Pseudomonas fluorescens</i>				
<i>Streptococcus faecalis</i>				
<i>Streptococcus lactis</i>				
<i>Staphylococcus aureus</i>				
<i>Serratia marcescens</i>				
<i>Proteus vulgaris</i>				
<i>Micrococcus sp.</i>				
<i>Sarcina lutea</i>				
<i>Salmonella enteritidis</i>				
<i>Listeria monocytogenes</i>				

Wnioski:

Data

zaliczenie

Rozdział 8

WZROST DROBNOUSTROJÓW BEZTLENOWYCH

Do grupy drobnoustrojów **ściśle** (bezwzględnie) beztlenowych występujących w żywności należą bakterie z rodzajów:

- *Clostridium*, *Desulfotomaculum*
- *Sarcina*, *Methanosarcina*, *Thiosarcina*
- *Propionibacteriaceae*, *Lactobacteriaceae*



Warunkiem **niezbędnym** dla wzrostu bakterii beztlenowych jest **eliminacja tlenu** ze środowiska wzrostowego. Można to osiągnąć **metodami fizycznymi, chemicznymi i biologicznymi**.

Metody fizyczne usuwania tlenu ze środowiska wzrostowego polegają na:

- gotowaniu podłoża przed posiewem (regeneracja podłoża)
- nawarstwianiu na zregenerowane podłoże płynne warstwy parafiny
- zalewaniu posiewu w próbówce warstwą agaru
- dodatku do podłoża "ciał" adsorbujących O_2 (np. kawałków wątroby, serc wołowych, farszu mielonego mięsa, skrawków marchwi, ziemniaków, itp.)
- stosowaniu anaerostatu (urządzenia, w którym powietrze zastępowane jest gazem lub mieszaniną gazów obojętnych dla beztlenowców, tj. H_2 , N_2 , CO_2)

Metody chemiczne usuwania tlenu ze środowiska wzrostowego polegają na

- umieszczeniu substancji redukujących łatwo utleniających poza podłożem, takich jak, np.:
 - pirogallol w środowisku zasadowym ($\text{pirogallol} + O_2 \text{ z powietrza} = \text{trioksybenzol}$ (barwa ciemnobrązowa))
 - tiosiarczan sodu (roztwór $Na_2S_2O_3$ w 10% ługu) 1g wiąże~ 60ml O_2
- dodaniu związków silnie redukujących bezpośrednio do podłoża wzrostowego, takich jak, np.:
 - 1% glukozy,
 - 0,1n Na_2SO_3
 - opiółków żelaza zredukowanego w strumieniu N_2 ,
 - substancji biologicznie czynnych, tj.: cysteina, kwas askorbinowy, tioglikolan sodu, glutation ($C_{10}H_{17}O_6N_3S$), itp.
- Obecnie najczęściej wykorzystuje się firmowo przygotowywane zestawy eliminujące tlen ze środowiska. W tym celu hodowle wkłada się do hermetycznego naczynia, do

którego dodajemy koperty, tzw. gas generating kits, w których do uciętego rogu dodajemy określona ilość wody. Zachodzi wówczas reakcja chemiczna wiązania tlenu. Istotne jest przy tym, że w zależności od wymogów hodowlanych możemy zastosować różne zestawy tworzące różne warunki beztlenowe.

Metody biologiczne usuwania tlenu ze środowiska wzrostowego polegają na:

- wspólnej hodowli ścisłych beztlenowców ze ścisłymi tlenowcami (metoda Fortnera) w tym celu:
 - beztlenowce sacharolityczne na podłożu węglowodanowym, np.
 - *Cl. acetobutylicum*, *Cl. pasteurianum* hodujemy z *B. subtilis*, *S. marcescens* lub *Mycoderma cerevisiae*
 - beztlenowce proteolityczne na podłożu białkowym
 - *Cl. sporogenes*, *Cl. putrefaciens* hodujemy z *B. subtilis*, *E. coli*, *P. vulgaris*



ĆWICZENIE 9

TEMAT: METODY FIZYCZNE HODOWLI DROBNOUSTROJÓW BEZTLENOWYCH

Materiały:

1. Probówka z aktywnie rosnącą hodowlą *Clostridium sporogenes*
2. Eza z oczkiem; pipeta pasteurowska
3. Jałowa parafina lub 2% agar wodny
4. Probówki z podłożem BHI (wyciąg mózgowo-rdzeniowy)
5. Anaerostat
6. Dermatograf

Wykonanie:

1. Probówki z bulionem wątrobowym ponumerować od 1 - 4 i postępować z nimi przed posiewem następująco:
 - A - podgrzać do 100°C w łaźni wodnej i szybko schłodzić pod bieżącą wodą
 - B - podgrzać do 100°C na łaźni wodnej i szybko schłodzić pod bieżącą wodą, a po posiewie nawarstwić 1,0 ml jałowej parafiny lub agarem wodnym
 - C - nie poddawać żadnym zabiegom
 - D - nie poddawać żadnym zabiegom, a po posiewie umieścić w anaerostacie
2. Przenieść po jednym oczku ezy hodowli *Clostridium sporogenes* do probówek z bulionem wątrobowym
3. Probówki oznaczone literą D umieścić w anaerostacie
4. Usunąć powietrze z anaerostatu przy pomocy pompy próżniowej
5. Zastąpić powietrze CO₂
6. Anaerostat z probówkami inkubować w 37°C przez 24h
7. Wyniki odczytów zamieścić w tabeli 13

Tabela 13

Charakterystyka wzrostu *Clostridium sporogenes* na wybranych podłożach (fizyczne metody usuwania O_2)

Metoda umożliwiająca uzyskania beztlenowych warunków	Rodzaj podłoża	Opis wzrostu; Charakterystyczne cechy			
		A	B	C	D
M. FIZYCZNE					
regeneracja/adsorpcja	BHI płynne + kawałki serc wołowych,		-	-	-
nawarstwienie	jw. agar wodny (lub parafina)	-		-	-
anaerostat	jw.	-	-	-	
-	jw.	-	-		-

Wnioski:

Data

zaliczenie



ĆWICZENIA

ĆWICZENIE 10

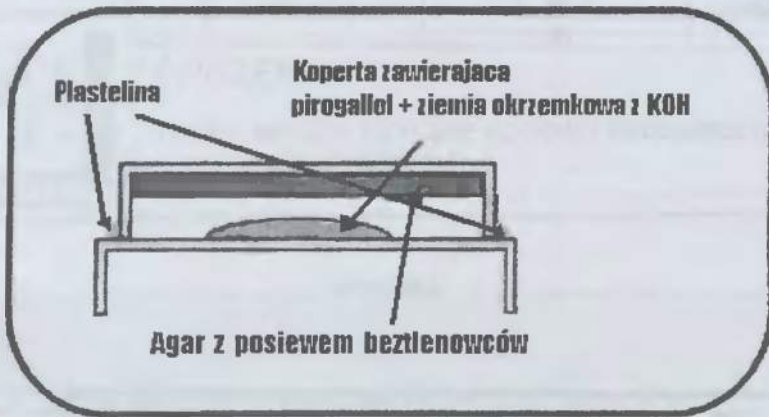
TEMAT: METODY CHEMICZNE HODOWLI DROBNOUSTROJÓW BEZTLENOWYCH

Materiały:

1. Probówka z aktywnie rosnącą hodowlą *Clostridium sporogenes*
2. Płytką z agarem odżywczym
3. Eza z oczkiem
4. Pakiet zawierający mieszaninę pirogallolu z ługiem
5. Plastelina
6. Dermatograf
 - Podłoża z dodatkiem związków wiążących O_2 z posianym materiałem do demonstracji i odczytów:
 - Clostridium Selective Agar (CLA)
 - Reinforced Clostridial Medium (RCM)
 - RCM + 0,5% agaru
 - Tryptone Yeast Extract Glucose Agar (TYEGA + Fe_2SO_3)

Wykonanie:

1. Na płytce posiać gęsto materiał pobrany eżą z aktywnie rosnącej hodowli *Clostridium sporogenes* na podłożu BHI
2. Pakiet zawierający mieszaninę pirogallolu z ługiem i ziemią krzemkową przytwierdzić plastrem na zewnętrznej stronie wieczka
3. Nad przytwierdzonym pakietem ustawić denko płytki z posiewem (posiew zwrócony w stronę pakietu)
4. Uszczelnić styk wieczka z denkiem plasteliną
5. Inkubować posiewy w 37°C przez 24h
6. Wyniki zanotować w tabeli 14

Rys 7**Schemat wykonania ćwiczenia 10****Tabela 14**

Charakterystyka wzrostu *Clostridium sporogenes* na wybranych podłożach (chemiczne metody usuwania O₂)

Metoda umożliwiająca uzyskanie warunków beztlenowych	Sposób posiewu	Rodzaj podłoża	Opis wzrostu; Charakterystyczne cechy
M.CHEMICZNE			
pochłaniacz O ₂ w sąsiedztwie podłoża	posiew powierzchniowy (płytką)	CLA	
	posiew kluty (próbówka)	CLA	
związki wiążące O ₂ w składzie podłoża	posiew pipetą, eżą (próbówka)	RCM	
	posiew do wyczerpania (próbówki)	RCM+ 0,5% agaru	
	posiew do wyczerpania (próbówki)	TYEGA + Fe2SO3	

Wnioski:

Data

zaliczenie

**ĆWICZENIA****ĆWICZENIE 11****TEMAT: METODY BIOLOGICZNE HODOWLI
DROBNOUSTROJÓW BEZTLENOWYCH****Materiały:**

1. Probówka z aktywnie rosnącą hodowlą *Clostridium sporogenes*
2. Probówka z aktywnie rosnącą hodowlą drobnoustroju ściśle tlenowego, np. *Serratia marcescens*
3. Płytkę z agarem cukrowym (1% glukozy)
4. Eża z oczkiem
5. Skalpel
6. Plastelina
7. Dermatograf

Wykonanie:

1. Wyciąć w centralnej części płytki z agarem odżywczym, jałowym skalpelem, wąski pasek podłoża (~0,5 cm) i usunąć go poza płytkę
2. Na jednej połowie płytki eżą z oczkiem posiać gęsto *Clostridium sporogenes*, na drugiej wykonać posiew *Serratia marcescens*; posiewy stosownie oznakować dermatografem
3. Na wierzchniej stronie wieczka płytki ustawić denko z posiewem w odwróconej pozycji
4. Styk wieczka i denka uszczelnić plasteliną
5. Płytki inkubować w 37°C przez 24h
6. Wyniki odczytów zamieścić w tabeli 15

Rys 8

Schemat wykonania ćwiczenia 11

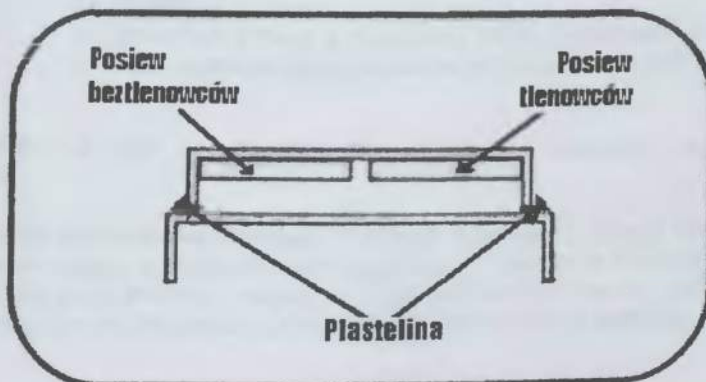


Tabela 15

Charakterystyka wzrostu *Clostridium sporogenes* na agarze cukrowym (biologiczna metoda usuwania O_2)

Metoda umożliwiająca uzyskania warunków beztlenowych	Sposób posiewu	Rodzaj podłoża	Opis wzrostu; Charakterystyczne cechy
M.BIOLOGICZNA			
pochłaniacz O_2 w sąsiedztwie podłoża	posiew powierzchniowy (płytką Fortnera)	agar cukrowy (z 1% glukozy)	

Wnioski:

Data

zaliczenie



Rozdział 9

MORFOLOGIA BAKTERII



DEFINICJA

Bakterie to mikroorganizmy o rozmiarach od 0,5 do ~5 μm . Obserwacja pojedynczych osobników, poznanie kształtu komórki, typowych wewnętrznych i zewnętrznych struktur komórkowych, typów urzęsienia, sposobu podziału, typowych form skupisk, itp. stało się możliwe dzięki rozwiniętej technice mikroskopowania. Cechy morfologiczne bakterii są wykorzystywane w systematyce.

METODY OKREŚLANIA MORFOLOGII KOMÓRKI:

1. **Oglądanie żywych, nie zabarwionych komórek** (preparat w kropli wiszącej).
Mała zdolność pochłaniania i odbijania przez bakterie światła sprawia, że komórki nie zabarwione trudno jest wyróżnić z tła. Najczęściej nie zabarwione komórki oglądamy stosując normalny mikroskop oraz preparat w tzw. kropli wiszącej w celu określenia zdolności do ruchu bakterii. Znacznie rzadziej stosowana jest technika oglądania bakterii z zastosowaniem techniki mikroskopowej ciemnego pola widzenia bądź fazokontrastu.
2. **Oglądanie zabarwionych komórek** (preparaty barwione)
Barwienie ma na celu wyróżnienie komórki lub jej struktur wewnętrznych i zewnętrznych z tła oraz odróżnienie ich od innych elementów preparatu. Stosuje się je zwykle przy określaniu: kształtu, wielkości, charakterystycznych form skupisk komórek, wyróżnianiu interesujących elementów budowy, itp.

W zależności od celu obserwacji stosowane mogą być różne metody barwienia.

Metody barwienia:

W zależności od liczby użytych barwników metody barwienia dzielimy na:

- A. **m. proste** - preparat wybarwiany jest przy pomocy jednego barwnika, np. m. Loefflera
- B. **m. złożone** - w metodach tych stosowane są dwa lub więcej barwników w określonej kolejności, co pozwala na wyróżnienie z tła więcej niż jednego elementu
 - • m. Grama
 - • m. Schaeffera-Fultona w modyfikacji Wirtza (wybarwianie przetrwalników)
 - • m. Ziehl-Neelsena (wybarwianie bakterii kwasoopornych)

W zależności od tego, czy barwimy tło czy wnętrze komórki, metody barwienia dzielimy na:

- **metody pozytywowe** – metody, w których zabarwiany zostaje obiekt lub element budowy będący przedmiotem zainteresowania, tło pozostaje niezabarwione
- **metody negatywowe** – metody, w których wybarwiane jest tło, podczas gdy obiekt lub element budowy będący przedmiotem zainteresowania pozostaje niezabarwiony.

- **metody pozytywno - negatywowe** – metody, w których wybarwimy zarówno tło, jak i wnętrze komórki. Metody te stosuje się do wykrywania otoczek bakteryjnych, w których wybarwione zostaje tło i wnętrze bakterii, zaś otoczka pozostaje nie zabarwiona, np.m. Burri-Ginsa



DEFINICJA

Barwniki: Są to wielkocząsteczkowe związki o charakterze soli, w których jeden jon jest barwnośny.

Barwniki zasadowe to sole, w których jonom barwnośnym jest **kation**; błękit metylenowy, fiolet krystaliczny, fiolet metylowy, błękit krezolowy, tianina, itp.

Barwniki kwaśne to sole w których jonom barwnośnym jest **anion**; błękit metylowy, fuksyna kwaśna, eozyna, zieleń metylowa.

Etapy przygotowywania preparatu :

- przygotowanie rozmazu
- wysuszenie rozmazu na powietrzu
- utrwalanie suchego rozmazu w płomieniu palnika
- barwienie

Utrwalenie ma na celu przytwierdzenie drobnoustrojów do powierzchni szkła oraz ich zabicie. Oprócz utrwalania w płomieniu stosuje się także niekiedy utrwalanie środkami chemicznymi takimi jak: formalina, alkohol etylowy, itp.



ĆWICZENIA

ĆWICZENIE 12

TEMAT: KALIBRACJA MIKROMETRU OKULAROWEGO

Cel : Zapoznanie studentów z możliwościami pomiarowymi mikroskopu (mikrometr przedmiotowy i okularowy)

Wielkość drobnoustrojów możemy określić przy pomocy:

- mikrometru okularowego
- metod nowoczesnych z zastosowaniem kamery telewizyjnej sprzężonej z komputerem


WSKAZÓWKA
**W
A
Ż
N**

Określanie wielkości drobnoustrojów znajduje zastosowanie praktyczne w określaniu przynależności systematycznej drożdży i pleśni. Pomiar wielkości komórek bakterii i drożdży pozwala na obliczanie biomasy.

Aby zastosować mikrometr okularowy musimy przeprowadzić jego kalibrację. Polega ona na określeniu długości jednej działki mikrometru okularowego przy określonym powiększeniu. Pomiaru dokonuje się poprzez określenie liczby działek mikrometru okularowego pokrywającej się bez reszty z określoną liczbą działek mikrometru przedmiotowego o znanej jednostce - równej $10\ \mu\text{m}$. Kalibrację wykonuje się oddzielnie dla każdego powiększenia oraz oddzielnie dla każdego mikroskopu.

Powiększenie mikroskopu obliczamy mnożąc: powiększenie okularu $\times$ powiększenie obiektywu $\times$ powiększenie tubusa (w niektórych mikroskopach o łamanym tubusie występuje dodatkowe powiększenie tubusa $1,2 - 1,5\times$).

Mikrometr przedmiotowy - szkiełko przedmiotowe, na którym skala o długości $1\ \text{mm}$ podzielona została na 100 równych odcinków (działek), z których każdy (1 działka) ma długość $1/100\ \text{mm}$ ($10\ \mu\text{m}$).

Mikrometr okularowy - okrągłe szkiełko, wkładane do okularu, na którym jest skala podzielona na 100 równych części o jednostce (działce) wymagającej kalibracji. Kalibrację mikrometru okularowego przeprowadza się w sposób podany poniżej (a).

ZASADY TECHNIKI OBSERWACJI MIKROSKOPOWYCH

1. Kondensor ustawić w pozycji bezpośrednio pod stolikiem mikroskopu
2. Ustawić lusterko wklęsłe w sposób pozwalający na dobre oświetlenie całego pola widzenia przy małym powiększeniu (np. $5, 10\times$)
3. Przygotowany preparat umieścić na ruchomym stoliku mikroskopu, na drodze biegu promieni świetlnych
4. Nanieść kropelkę olejku immersyjnego na preparat
5. Ustawić obiektyw immersyjny nad preparatem
6. Patrząc z boku, obniżyć tubus śrubą makrometryczną, zanurzając go w olejku immersyjnym do momentu zetknięcia obiektywu ze szkiełkiem przedmiotowym
7. Patrząc w okular, podnosić bardzo wolno tubus śrubą makrometryczną do momentu uchwycenia konturów obrazu
8. Ustawić ostrość obrazu śrubą mikrometryczną
9. Zmieniając położenie kondensora poprawić oświetlenie obrazu
10. Wyszukać na preparacie pole widzenia zawierające elementy będące przedmiotem obserwacji poprzez przesuwanie stolika przedmiotowego mikroskopu
11. Po obejrzeniu preparatu unieść tubus, wyjąć preparat i wrzucić go do płynu odfekalnego
12. Przetrzeć dokładnie obiektyw suchą, lnianą szmatką



UWAGA! Pozostawienie oleju na obiektywie może nieodwracalnie uszkodzić obiektyw.

KALIBRACJA PODZIAŁKI MIKROMETRU OKULAROWEGO

1. Umieścić szkiełko przedmiotowe ze skalą (mikrometr przedmiotowy) na stoliku mikroskopu
2. Ustawić obiektyw mikroskopu na powiększenie 10x, znaleźć podziałkę na mikrometrze przedmiotowym
3. Ustawić skalę mikrometru okularowego i przedmiotowego w polu widzenia mikroskopu tak, by początek obu skal pokrywał się
4. Policzyć, ile działek (działka = odległość między jedną kreską, a drugą na skali mikrometru okularowego) (A) przypada na jedną działkę mikrometru przedmiotowego (B) przy danym powiększeniu po dokładnym nasunięciu na siebie początku obu skal. Określić, która kolejna kreska skali mikrometru okularowego pokrywa się dokładnie z kolejną kreską podziałki mikrometru przedmiotowego
5. Przy znanej wielkości działki mikrometru przedmiotowego równej $10\text{ }\mu\text{m}$, wielkość 1 działki mikrometru okularowego wyniesie przy danym powiększeniu $B \times 10\text{ }\mu\text{m} : A$.

Rys. 9

Obraz mikroskopowy trakcie kalibracji



Przykład:

Jeśli w 2 działkach mikrometru przedmiotowego (B) przy powiększeniu 100x, mieści się bez reszty 15 działek mikrometru okularowego (A) lub jeśli trzecia kreska skali mikrometru przedmiotowego (B) pokrywa się dokładnie z piętnastą kreską skali mikrometru okularowego (A), to wielkość 1 działki mikrometru okularowego (A), przy zastosowanym powiększeniu wynosi $2 \times 10 \mu\text{m} : 15 = 1,33 \mu\text{m}$.

Obliczyć powierzchnię pola widzenia mikroskopu przy danym powiększeniu

4. Określić, ile działek skali mikrometru przedmiotowego odpowiada średnicy pola widzenia mikroskopu przy danym powiększeniu
5. Obliczyć, jaka jest średnica pola widzenia ($2r$) w μm
6. Obliczyć promień pola widzenia (r) w μm przy danym powiększeniu
7. Obliczyć powierzchnię pola widzenia (πr^2) w μm^2 przy danym powiększeniu

**WSKAZÓWKA**

Znajomość powierzchni pola widzenia ma zastosowanie przy obliczaniu liczby drobnoustrojów w badanym materiale.

Tabela 16

Wynik kalibracji mikroskopu przy różnych powiększeniach:

Nr mikroskoku	Powiększenie okularu	Powiększenie obiektywu	Wielkość działki mikrometru okularowego $B \times 10 \mu\text{m} : A$	Promień (r) pola widzenia w μm	Powierzchnia pola widzenia (πr^2) w μm^2

Wnioski:

Data

zaliczenie

**ĆWICZENIA****ĆWICZENIE 13****TEMAT: MORFOLOGIA KOMÓRKI BAKTERYJNEJ**

Cel : Określanie kształtu i wielkości komórek oraz charakterystycznych form skupisk. Preparaty barwione metodą Loefflera - m. prosta pozytywna

CHARAKTERYSTYCZNE KSZTAŁTY KOMÓREK I FORMY SKUPISK BAKTERII**ZIARNIAKI****ZIARNIAK****COCCUS****DWOINKA****DIPLOCOCCUS****TETRADA**

(czwórnika)

**TETRACOCCUS****PAKIETOWIEC****SARCIHA****GRONKOWIEC****STAPHYLOCOCCUS****PŁOCIORKOWIEC****STREPTOCOCCUS****FORMY CYLINDRYCZNE****kokopaleczka****paleczka - bacterium****laseczka - bacillus****forma nitkowata**

W
A
Z
N

WSKAZÓWKA

W bakteriologii używa się także terminu laseczka – bacillus. Termin ten odnosi się do form pałeczkowatych posiadających zdolność wytwarzania endospor - przetrwalników.

Metoda barwienia błękitem metylenowym -Löefflera ma zastosowanie przy ustalaniu liczby drobnoustrojów w mleku oraz przy ustalaniu liczby żywych komórek drożdży w kulturach używanych w przemyśle fermentacyjnym. Żywe komórki drożdży nie barwią się błękitem, zaś komórki martwe są w preparacie wybarwione na kolor niebieski.

Materiały:

1. 24 h hodowle szczepów o znanej przynależności systematycznej
2. Płytki z posianym do pojedynczych kolonii materiałem z dowolnie wybranych źródeł
3. Szkiełka przedmiotowe
4. Probówka z jałowym płynem fizjologicznym
5. Zestaw do barwienia: mydélko, szmatka bawełniana, waniénka, tryskawka z wodą destylowaną, szczypce Corneta
6. Błękit metylenowy Löefflera

Wykonanie:

1. Odtłuścić szkiełko przedmiotowe przy pomocy mydélka i lnianej szmatki
2. Przygotować cienki rozmaz badanego materiału. W zależności od tego, czy materiałem wyjściowym jest 24 h hodowla na podłożu płynnym (patrz: Materiały - punkt 1) czy pojedyncza kolonia (patrz: Materiały- punkt 2) należy, odpowiednio:
3. Przenieść jałową eżą 1 -2 oczka na powierzchnię szkiełka przedmiotowego i rozprowadzić po powierzchni w formie cienkiego rozmazu
4. Nanieść kroplę płynu fizjologicznego z probówki i rozprowadzić w niej materiał pobrany eżą, z zachowaniem warunków jałowości, z brzegu typowej, pojedynczej kolonii
5. Wysuszyć rozmaz w powietrzu
6. Utrwalić suchy preparat w płomieniu palnika
7. Nawarstwić preparat błękitem metylenowym na 5 min
8. Spłukać preparat wodą; wysuszyć odciskając nadmiar wilgoci z preparatu przy pomocy bibuły filtracyjnej.
9. Nawarstwić preparat olejkim immersyjnym; oglądać pod mikroskopem posługując się obiektywem immersyjnym (100x)
10. Wyniki obserwacji mikroskopowych zamieścić w tabeli 17

Tabela 17**Charakterystyka morfologiczna komórki wybranych szczepów bakterii**

Drobnoustrój	Kształt komórki		Wielkość komórki (w μm)	Typowe formy skupisk komórek	
	rys.	opis		rys.	opis
<i>Bacillus subtilis</i>					
<i>Bacillus cereus</i>					
<i>Escherichia coli</i>					
<i>Pseudomonas fluorescens</i>					
<i>Streptococcus faecalis</i>					
<i>Streptococcus lactis</i>					
<i>Staphylococcus aureus</i>					
<i>Serratia marcescens</i>					
<i>Proteus vulgaris</i>					
<i>Micrococcus</i> sp.					
<i>Sarcina lutea</i>					
<i>Salmonella enteritidis</i>					
<i>Listeria monocytogenes</i>					
1					
2					
3					

Wnioski:

Data

zaliczenie



ĆWICZENIE 14

TEMAT: BARWIENIE BAKTERII METODĄ GRAMA

Cel : Zapoznanie studentów z metodą barwienia stosowaną powszechnie w diagnostyce bakterii



Metoda Grama jest bardzo popularna w diagnostyce bakterii, pozwala na różnicowanie bakterii na **Gram-dodatnie** i **Gram-ujemne**, na podstawie różnic w wybarwianiu się komórek. Komórki bakterii **Gram-dodatnich** wybarwiają się na **fioletowo**, komórki bakterii **Gram-ujemnych** na **czerwono**. Jest to metoda złożona, pozytywna.



W Zakładzie Mikrobiologii Żywności WNoŻiR AR stosowana jest modyfikacja Kopeloffa - Beermana.



Różnice w odmiennym wybarwianiu się komórek tą metodą są wynikiem różnic w budowie i składzie chemicznym ściany komórkowej bakterii.

Głównym składnikiem ściany komórkowej bakterii Gram-dodatnich jest peptydoglikan zwany mureiną. Wielowarstwowa mureina stanowić może u tych bakterii 40 - 80% masy komórki. W ścianie komórkowej bakterii Gram-ujemnych mureina stanowi niewielką frakcję ściany komórkowej. Głównym jej składnikiem są białka i lipoproteiny.

Bakterie Gram(+) różnią się od bakterii Gram(-) następującymi cechami:

1. Wrażliwością na antybiotyki. Szereg antybiotyków działa wyłącznie na bakterie G(+) lub G(-)
2. Wrażliwością na środki dezynfekcyjne
3. Zdolnością produkcji toksyn
4. Chorobotwórczością
5. Zdolnością do psucia produktów spożywczych. Bakterie G(+) rozwijając się w produktach zwykle nie powodują ich zepsucia

Materiały:

1. 24 h hodowle szczepów bakterii o znanej przynależności systematycznej
2. Szkiełka przedmiotowe; zestaw do odtłuszczenia szkiełka; bibuła filtracyjna; tryskawka z wodą destylowaną, wanienka do barwienia, szczypce Corneta
3. Eża bakteriologiczna z oczkiem
4. Roztwór A (roztwór wodny fioletu krystalicznego)
5. Roztwór B (roztwór wodny kwaśnego węglanu sodu)
6. Płyn Lugola (roztwór wodny jodu i jodku potasu)
7. Rozpuszczalnik organiczny (96% alkohol etylowy lub mieszanina 1:1 eteru i acetonu bądź chloroformu i acetonu)
8. Barwnik kontrastowy (wodny roztwór fuksyny fenolowej)
9. Mikroskop, olejki immersyjne
10. Dermatograf

Wykonanie:

1. Na odtłuszczonym szkiełku przedmiotowym przygotować cienki rozmaz materiału pobranego jałową eżą, z 24 h hodowli szczepu wzorcowego; odpowiednio oznakować preparat
2. Wysuszyć rozmaz na powietrzu
3. Utrwalić preparat w płomieniu palnika
4. Nawarstwić preparat roztworem A, dodając 2-3 krople roztworu B; barwić przez 2-3 min
5. Splukać preparat roztworem Lugola
6. Nawarstwić preparat świeżym płynem Lugola na ~2 min
7. Splukać preparat wodą
8. Odcisnąć nadmiar wilgoci bibułą filtracyjną (rozmaz powinien pozostać wilgotny)
9. Odbarwić preparat rozpuszczalnikiem organicznym (trzymając preparat ukośnie nad wanienką szczypcami Corneta łączyć rozpuszczalnik po kropli do momentu, gdy spływający ze szkiełka rozpuszczalnik będzie bezbarwny)
10. Splukać preparat wodą
11. Wysuszyć preparat na powietrzu
12. Nawarstwić preparat barwnikiem kontrastowym i pozostawić na 5-10 sekund
13. Splukać preparat wodą
14. Wysuszyć preparat bibułą
15. Oglądać pod immersją
16. Wyniki obserwacji zapisać w tabeli 18

MECHANIZM BARWIENIA SIĘ KOMÓREK BAKTERII W METODZIE GRAMA

1. Barwienie roztworem fioletu krystalicznego wspomagane jodem w K.J.

Barwnik przenika przez osłony komórkowe a J⁻ zastępuje Cl⁻ w cząsteczce barwnika tworząc duże, fioletowe agregaty wewnątrzkomórkowe.

2. Odbarwianie rozpuszczalnikiem organicznym.

Rozpuszczalnik organiczny rozpuszcza błonę cytoplazmatyczną bakterii Gram-dodatnich oraz błonę cytoplazmatyczną i błonę zewnętrzną bakterii Gram-ujemnych. Wskutek częściowego odwodnienia ściany komórkowej zmniejsza się wielkość "porów" w mureinie. W przypadku komórek z grubą warstwą mureiny (bakterie Gram - dodatnie) barwne kompleksy zostają zatrzymane wewnątrz komórki.

3. Barwienie kontrastowe safraniną lub fuksyną.

Odbarwione rozpuszczalnikiem organicznym komórki zabarwione zostają kolejnym barwnikiem stosowanym w tej metodzie.



Na kolor fioletowy barwią się jedynie komórki gramododatnie w prawidłowym stanie fizjologicznym. Szczepy przechowywane przez dłuższy okres czasu, poddane działaniu antybiotyków, środków dezynfekcyjnych czy konserwantów często wybarwiają się na kolor różowy. Przy prawidłowym barwieniu bakterie gramujemne nigdy, nie barwią się na kolor fioletowy.

Tabela 18
Wybarwianie się komórek wybranych szczepów bakterii metodą Grama

Drobnoustrój	Barwa komórek w preparacie	Bakterie Gram-dodatnie*	Bakterie Gram-ujemne*	Uwagi
<i>Bacillus subtilis</i>				
<i>Bacillus cereus</i>				
<i>Escherichia coli</i>				
<i>Pseudomonas fluorescens</i>				
<i>Streptococcus faecalis</i>				
<i>Streptococcus lactis</i>				
<i>Staphylococcus aureus</i>				
<i>Serratia marcescens</i>				
<i>Proteus vulgaris</i>				
<i>Micrococcus sp.</i>				
<i>Sarcina lutea</i>				
<i>Salmonella enteritidis</i>				
<i>Listeria monocytogenes</i>				

* - wstawić "x" we właściwym polu

Wnioski:

Data

zaliczenie



ĆWICZENIE 15

TEMAT: BARWIENIE ENDOSPOR - METODA SCHAEFFERA-FULTONA W MODYFIKACJI WIRTZA



Endospory - przetrwalniki są formami przetrwalnymi wytwarzanymi przez niektóre rodzaje bakterii. Zdolność taką posiadają laseczki z rodzaju *Bacillus* i *Clostridium*, przedstawiciele rodzajów *Sporosarcina*, *Sporolactobacillus* oraz riketsja gorączki Q.

Bodźcem do wytwarzania przez komórkę wegetatywną formy przetrwalnej jest stopniowe pogarszanie się warunków w środowisku wzrostowym (np. wyczerpywanie się składników pokarmowych, obniżanie się temperatury, itp.). Zwykle jedna komórka wytwarza jedną endosporę. Endospora jest bardziej oporna na niekorzystne czynniki działające w środowisku niż forma wegetatywna, która ją wytworzyła. W tym także bardziej oporna na penetrację barwników.

Zależnie od miejsca zlokalizowania endospory w komórce wegetatywnej oraz kształtu komórki z endosporą wyróżnić można 3 typy **sporulacji**: **bacillarny**, **klostridialny** i **plektridialny**. Rysunek 10 przedstawia schematycznie typy sporulacji. Dla celów diagnostycznych ma znaczenie fakt wytwarzania spor przez dany gatunek. Natomiast wymieniony powyżej sposób sporulacji ma znacznie mniejsze znaczenie diagnostyczne.

W pierwszym etapie wybarwiania endospor preparat zalewa się barwnikiem i podgrzewa. Umożliwia to penetrację barwnika przez grubą błonę endospory. W drugim etapie preparat odbarwia się najczęściej alkoholem. Prowadzi to do odbarwienia komórki, zaś endospory pozostają zabarwione. Po odbarwieniu preparat ponownie barwi się barwnikiem o innym kolorze, nie penetrującym do endospory. Uzyskujemy w ten sposób obraz komórki bakteryjnej zabarwionej jednym kolorem i wewnątrz endospory zabarwionej na inny kolor.

Fakt zdolności produkcji endospor przez bakterie ma znaczenie przy oznaczaniu przynależności systematycznej bakterii.

Rys. 10

Typy sporulacji



Bacilarny (centralny)

- bez zniekształcenia komórki wegetatywnej



Klostridialny (wrzecionowaty)



Plektridialny (buławkowaty)



W A Ż N

WSKAZÓWKA

Formy przetrwalne barwią się na zielono, komórki wegetatywne zabarwiają się na różowo.

Materiały:

1. 24h i 7-dniowe hodowle bulionowe szczepów wzorcowych: *B. subtilis*, *Cl. sporogenes*
2. 24 h hodowla bulionowa materiału namnożonego z przypraw
3. Szkiełka przedmiotowe; zestaw do barwienia
4. 5% roztwór wodny zieleni malachitowej
5. Roztwór wodny safraniny
6. Dermatograf.

Wykonanie:

1. Na odtłuszczonym szkiełku przedmiotowym przygotować cienki rozmaz materiału pobranego jałową eżą, z 24h i 7- dniowych hodowli szczepów wzorcowych
2. Odpowiednio oznakować preparaty po spodniej stronie szkiełka przedmiotowego
3. Wysuszyć rozmaz w powietrzu
4. Utrwalić preparat w płomieniu palnika
5. Utrwalony preparat nawarstwić roztworem zieleni malachitowej na 3 - 5 min. W trakcie barwienia podgrzewać preparat nad palnikiem trzykrotnie do ukazania się pary. Nie dopuścić do wyschnięcia barwnika na preparacie w trakcie podgrzewania
6. Spłukać nadmiar barwnika wodą
7. Nawarstwić preparat roztworem safraniny na 30 sek.
8. Spłukać preparat wodą
9. Wysuszyć preparat bibułą
10. Oglądać pod immersją
11. Wyniki obserwacji zanotować w tabeli 19

Tabela 19

Zdolność szczepów bakterii do wytwarzania endospor; typ sporulacji.

Drobnoustroj	Wiek hodowli	Obecność endospor	Typ sporulacji	
			rys.	opis
<i>B. subtilis</i>	24h			
<i>B. subtilis</i>	7 dni			
<i>B. cereus</i>	24h			
<i>B. cereus</i>	7 dni			
<i>B. thuringensis</i>	24h			
<i>B. thuringensis</i>	7 dni			
<i>Cl. sporogenes</i>	24h			
<i>Cl. sporogenes</i>	7 dni			

- * - brak
 + nieliczne
 ++ bardzo liczne
 +++ przewaga endospor

Wnioski:

Data

zaliczenie

**ĆWICZENIE 16****TEMAT: OTOCZKI BAKTERYJNE**

Cel : Zapoznanie studentów z metodyką wykrywania otoczek bakteryjnych



Otoczki bakteryjne są to warstwy śluzu zbudowanego najczęściej z polisacharydów otaczające ścianę komórkową bakterii, możliwe do wykrycia metodami mikroskopii optycznej.

Znaczenie otoczek dla życia bakterii w środowisku:

- ❖ W przypadku bakterii chorobotwórczych chronią je przed mechanizmami obronnymi organizmu – fagocytozą. Przez to zwiększa się ich patogenność.
- ❖ W środowisku zewnętrznym ułatwiają im adhezję do powierzchni i tworzenie biofilmów. Przyklejone dzięki warstwie śluzu drobnoustroje stają się bardziej odporne na środki dezynfekcyjne, wysuszenie oraz mechaniczne usunięcie.

Do wykrywania otoczek stosuje się metodyki złożone, negatywowo-pozytywowe. W pierwszym etapie barwienia stosuje się barwnik barwiący ciało bakterii ale nie barwiący otoczki. W drugim etapie stosuje się barwnik wielkocząsteczkowy wybarwiający tło preparatu. W ten sposób otoczka pozostaje niezabarwiona.

W niniejszym ćwiczeniu zostanie zastosowana metoda Burri-Ginsa z użyciem tuszu chińskiego jako barwnika wielkocząsteczkowego.



W
A
Ż
N
E

WSKAZÓWKA

Zdolność do wytwarzania otoczek ma znaczenie przy ustalaniu przynależności systematycznej bakterii.



W
A
Ż
N
E

WSKAZÓWKA

Na ciemnym tle pola widzenia (barwa zależna od rodzaju użytego tuszu) widoczne, zabarwione na kolor czerwony, komórki. Obszar niezabarwiony pomiędzy komórkami a tłem to **otoczka**.

Materiały:

1. 24h hodowle bulionowe szczepów wzorcowych wytwarzających otoczki *Klebsiella* sp.
2. 24h hodowla bulionowa materiału z przypraw
3. Szkiełka przedmiotowe; zestaw do barwienia
4. Czarny tusz kreślarski
5. Fuksyna fenolowa wg Ziehla
6. Dermatograf

Wykonanie:

1. Na szkiełko przedmiotowe nanieść kroplę hodowli bulionowej; obok umieścić kroplę tuszu kreślarskiego
2. Odpowiednio oznakować preparaty po spodniej stronie szkiełka przedmiotowego
3. Wymieszać obie krople kantem drugiego szkiełka, po czym krótszym bokiem szkiełka rozprowadzić materiał równomiernie po powierzchni drugiego
4. Wysuszyć preparat na powietrzu i utrwalić następnie w płomieniu palnika
5. Utrwalony preparat nawarstwić roztworem fuksyny fenolowej wg Ziehla na ~2 min
6. Spłukać preparat wodą
7. Wysuszyć preparat bibułą
8. Oglądać pod immersją
9. Wyniki obserwacji zanotować w poniższej tabeli
10. Wyniki obserwacji zamieścić w tabeli 20

Tabela 20

Zdolność szczepów bakterii do wytwarzania otoczek

Drobnoustrój	Kształt komórki + otoczka (rys.)	Obecność otoczki	Wielkość otoczki Średnica komórki: grubość otoczki
<i>Klebsiella</i> sp.			
<i>Serratia</i> sp.			
<i>Micrococcus</i> sp.			
szczonep X:			
1			
2			
3			

Wnioski:

Data

zaliczenie



ĆWICZENIE 17

TEMAT: OKREŚLANIE PROCENTOWEGO UDZIAŁU KOMÓREK ŻYWYCH W KULTURZE STARTEROWEJ

Cel : Zapoznanie studentów ze sposobami określania żywotności kultur starterowych stosowanych w praktyce produkcyjnej

Żywe drobnoustroje posiadają zdolność wybiórczego pochłaniania zewnątrzkomórkowych substancji. Dzięki temu nietoksyczne barwniki nie przenikają do wnętrza komórek. Zabicie bakterii niszczy mechanizm wybiórczego pochłaniania i umożliwia bardzo intensywne zabarwienie wewnątrzkomórkowych struktur.

Najczęściej używanym w tej metodyce barwnikiem jest błękit metylenowy. Zastosowanie go daje obraz, w którym komórki martwe są zabarwione na kolor niebieski, zaś żywe pozostają niezabarwione.

Metodyka ma zastosowanie przy określaniu żywotności kultur stosowanych w przemyśle fermentacyjnym i mleczarskim.

Materiały:

1. 24 i 72h hodowle wybranych szczepów drożdży *Saccharomyces cerevisiae*
2. Szkiełka przedmiotowe z kwadracikami o boku 1 cm
3. Zestaw do barwienia
4. Roztwór błękitu metylenowego
5. Eza z kalibrowanym oczkiem
6. Dermatograf

Wykonanie:

1. Na odtłuszczone szkiełko przedmiotowe przenieść po jednym oczku ezy z hodowli oraz błękitu metylenowego
2. Po dokładnym wymieszaniu obu kropel, rozprowadzić całość po powierzchni wydzielonego na szkiełku kwadracika o boku 1 cm
3. Pozostawić preparat do wysuszenia
4. Oglądać pod immersją
5. Komórki martwe barwią się na niebiesko, komórki żywe pozostają bezbarwne
6. Obejrzyć 10 losowo wybranych pól widzenia i określić:
 - a) liczbę wszystkich komórek w każdym polu widzenia (żywe i martwe - ab)
 - b) liczbę komórek zabarwionych na niebiesko w każdym polu widzenia (martwe - b)
 - c) liczbę komórek bezbarwnych w każdym polu widzenia (żywe - a)

7. Wyliczyć:

- ab1** - średnią liczbę komórek żywych i martwych w 1 polu widzenia,
b1 - średnią liczbę komórek martwych w 1 polu widzenia,
a1 - średnią liczbę komórek żywych w 1 polu widzenia.

8. Wyniki obserwacji zapisać w tabeli 21

Tabela 21

Nr pola widzenia	24h			24h			72h			72h		
	a	b	ab	a1	b1	ab1	a	b	ab	a1	b1	ab1
1												
2												
3												
4												
5												
6												
7												
8												
9												
10												

9. Obliczyć ogólną liczbę komórek (X) oraz liczbę komórek żywych (Y) w 1ml hodowli 24 i 72h, wg wzorów, odpowiednio:

$$X \text{ jtk/ml} = \frac{ab1 \times A}{B},$$

$$Y \text{ jtk/ml} = \frac{ab1 \times A}{B},$$

ab1 - średnia liczba wszystkich komórek z 10 pól widzenia (patrz: tabela 21)

A - liczba pól widzenia na powierzchni 1 cm² przy danym powiększeniu
(powierzchnia pola widzenia przy danym powiększeniu – patrz: tabela 16)

B - ilość materiału przenoszona kalibrowaną eżą (w ml)

jtk - jednostka tworząca kolonie

10. Określić procentowy udział komórek żywych i martwych w ogólnej liczbie mikroorganizmów /ml hodowli 24 i 72h

11. Wyniki zapisać w tabeli 22

12. Wyciągnąć wnioski

Czas hodowli	Średnia liczba komórek w 1 polu widzenia	Liczba jtk/ml hodowli x(y)	% udział komórek żywych w ogólnej liczbie
24h			
24h			
72h			
72h			

Wnioski:

Data

zaliczenie



ĆWICZENIE 18

TEMAT: RUCH DROBNOUSTROJÓW – OBSERWACJA RUCHU W KROPLI WISZĄCEJ

Cel : Doskonalenie techniki obserwacji mikroskopowej

Drobnoustroje mogą poruszać się dzięki:

1. Posiadananiu organelli ruchu - rzęski (większość pałeczek jelitowych)
2. Ruchom ciała (krętki)
3. Produkcji śluzu w jednym z biegunów komórki (bakterie ślizgowe)

Posiadanie organellów ruchu, jakimi są rzęski pozwala podzielić bakterie na ruchliwe (urzęsione) i nieruchliwe (nieurzęsione). Te ostatnie poruszają się w środowisku ruchami Browna (ruchy Browna to drgania cząstek zawieszonych w środowisku płynnym).

Szczepami posiadającymi rzęski są głównie formy cylindryczne (laseczki, pałeczki i formy spiralne). Rzęski posiadają także nieliczne ziarniaki, np. *Sarcina urea*.

Ruchliwość szczepu posiadającego rzęski może być cechą przejściową zależną od wieku hodowli (*B.subtilis*), czasu przetrzymywania na podłożach hodowlanych (możliwość przechodzenia z formy urzęsionej w nieurzęsioną), temperatury hodowli. *Listeria monocytogenes* posiada zdolność ruchu gdy hodowla jest w temp. 20°C. Hodowla w 37°C powoduje utratę tej zdolności.



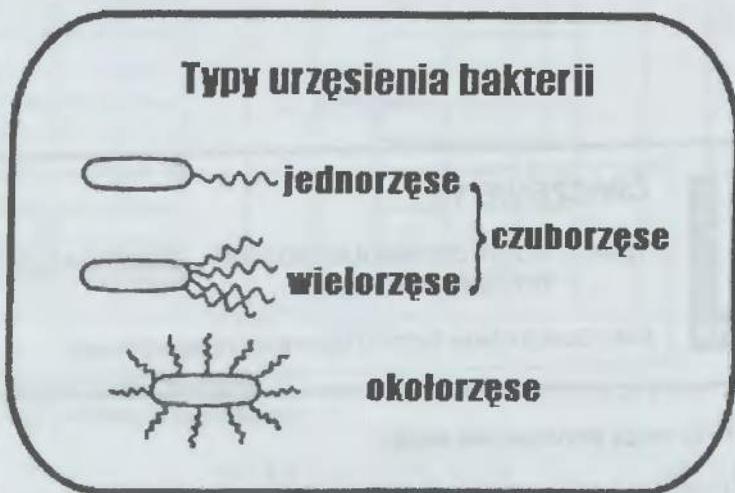
Określanie zdolności ruchu jest bardzo przydatne przy różnicowaniu bakterii, szczególnie pałeczek jelitowych.

Typy urzęsienia bakterii:

- jednorzęse - monotrichalne
- wielorzęse - lofotrichalne
- czuborzęse - amfitrichalne
- okolorzęse - peritrichalne

Oznaczanie typu urzęsienia jest możliwe przy stosowaniu specjalnych technik barwienia. Nie ma to jednak przydatności diagnostycznej.

Rys. 11



Materiały:

1. 18h hodowla bulionowa szczepów *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus cereus*, *Klebsiella* sp., *Streptococcus faecalis*
2. 18 h hodowla z wybranych przypraw
3. Szkiełka przedmiotowe z łezką (Lindnera), szkiełka nakrywkowe, wazelina, wykałaczka

Wykonanie:

1. Na nieodtłuszczone szkiełko nakrywkowe, w części centralnej tego szkiełka, nanieść 1 oczko 18h hodowli bulionowej wzorcowego szczepu
2. Na każdym z 4 rogów szkiełka nakrywkowego umieścić wykałaczką odrobinę wazeliny
3. Szkiełko Lindnera ustawić w taki sposób by łezka (wglębenie) znalazło się bezpośrednio nad kropelką hodowli na szkiełku nakrywkowym
4. Obniżyć szkiełko Lindnera do momentu zetknięcia z wazeliną na szkiełku nakrywkowym - pozwala to na przywarcie szkiełka nakrywkowego do przedmiotowego szkiełka Lindnera (preparat w kropli wiszącej)
5. Odwrócić preparat tak, by materiał na szkiełku nakrywkowym zwisał nad wgłębieniem szkiełka Lindnera (preparat w kropli wiszącej)
6. Ustawić preparat na stoliku mikroskopu, nawarstwić olejkim immersyjnym, oglądać pod immersją
7. Wyniki obserwacji zestawić w tabeli 23

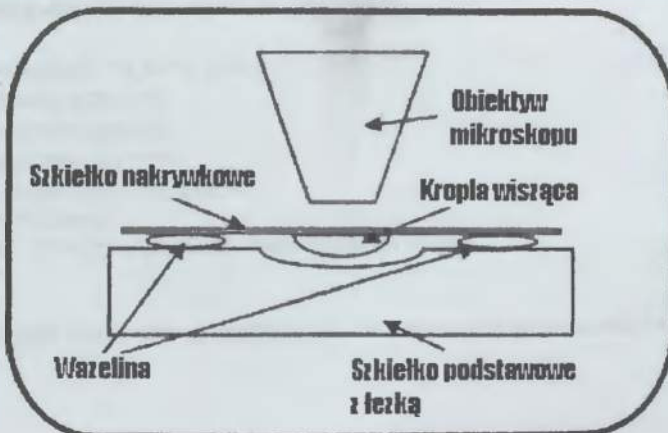
Tabela 23

Zdolność wybranych szczepów bakterii do poruszania się ruchem własnym.

Drobnoustrój	Ruch własny	Ruchy Browna	Sposób poruszania się	Typ urzęsienia
<i>Pseudomonas fluorescens</i>				
<i>Bacillus cereus</i>				
<i>Klebsiella</i> sp.				
<i>Streptococcus faecalis</i>				
przyprawa 1				
przyprawa 2				
przyprawa 3				

Rys. 12

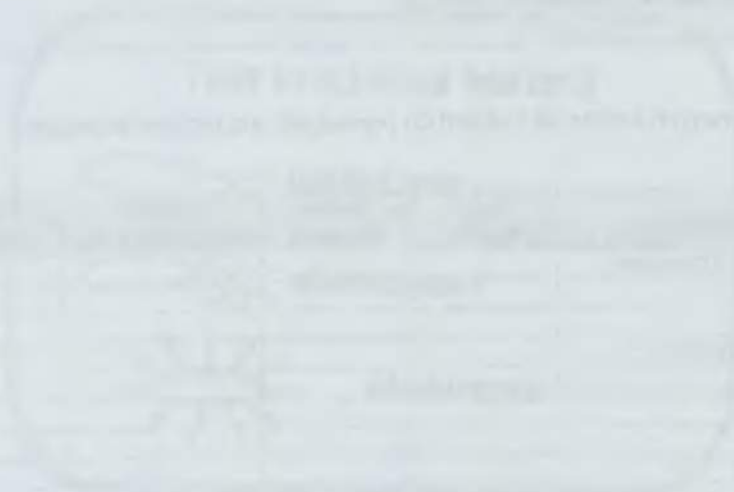
Badanie ruchu bakterii w kropli wiszącej



Wnioski:

Data

zaliczenie



Rozdział 10

WPŁYW ŚRODOWISKA NA MIKROORGANIZMY

Środowisko dla obecnych w nim mikroorganizmów jest źródłem składników odżywczych i energii oraz "odbiornikiem" produktów przemiany materii tych mikroorganizmów. Jednocześnie może ono, w różnorodny sposób oddziaływać na drobnoustroje.

Mikroorganizmy w większym niż inne organizmy stopniu uzależnione są od warunków środowiskowych. Powodem tego jest, między innymi, znaczna w stosunku do masy ciała, powierzchnia styku komórki ze środowiskiem zewnętrznym oraz brak systemów ochrony przed zmianami w środowisku zewnętrznym*. Powoduje to, że każda zmiana warunków środowiskowych wywołuje określoną reakcję biochemiczną komórki (np. zmiany koncentracji tlenu w środowisku powodują, że drobnoustroje względnie beztlenowe uruchamiają system oddychania tlenowego bądź beztlenowego).

*W przypadku wystąpienia w środowisku niekorzystnych warunków np. obniżenie pH, podwyższenie temperatury, drobnoustroje wytwarzają tzw. białka stresu które modulują ich procesy biochemiczne tak aby było możliwe przeżycie w zmienionym środowisku.

W środowisku na drobnoustroje działać mogą różne czynniki fizyczne, chemiczne i biologiczne.

Do grupy czynników fizycznych należą: temperatura, potencjał oksydo-redukcyjny, ciśnienie osmotyczne, napięcie powierzchniowe, promieniowanie elektromagnetyczne (promieniowanie jonizujące, promieniowanie UV, dźwięki, ultradźwięki), ciśnienie hydrostatyczne / mechaniczne, aktywność wodna (a_w)

Do grupy czynników chemicznych należą: stężenie jonów (pH), sole (kationy, aniony), związki powierzchniowo-czynne (mydła, detergenty, alkohole, fenole, krezole), dezynfektanty, barwniki, antybiotyki

Czynniki biologiczne to m.in. inne mikroorganizmy obecne w środowisku

Efekt działania dowolnego czynnika zależy od:

- drobnoustroju, na który działa
- liczebności populacji
- wieku drobnoustroju
- działającego czynnika
- jego stężenia (lub natężenia)
- czasu działania
- składu chemicznego środowiska w którym działa

Ten sam czynnik może różnie oddziaływać na obecne w środowisku mikroorganizmy, np. bakterie.

Może to być działanie:

- **stymulujące wzrost**
- **neutralne** (działający czynnik pozostaje bez wpływu na dany drobnoustrój)
- **bakteriostatyczne** (działający czynnik hamuje wzrost oraz wstrzymuje proces rozmnażania się danego drobnoustroju)
- **bakteriobójcze** (działający czynnik trwale uszkadza komórkę prowadząc do jej śmierci)

W odniesieniu do grzybów używamy terminu działanie – grzybobójcze (mykostatyczne) lub grzybobójcze.

Czynniki hamujące wzrost bakterii lub działające bakteriobójczo wykorzystywane są w praktyce przemysłowej, w medycynie, w rolnictwie.

WPLYW WYBRANYCH CZYNNIKÓW ŚRODOWISKA NA MIKROORGANIZMY

10.1. TEMPERATURA

Wzrost oraz inne przejawy aktywności życiowej mikroorganizmów mają miejsce w określonych przedziałach temperatur, różnych dla różnych drobnoustrojów. Przedział temperatur w których możliwy jest wzrost drobnoustrojów wyznaczają temperatury minimalna i maksymalna dla wzrostu. Jednocześnie wzrost konkretnego drobnoustroju jest najszybszy w temperaturze określanej jako optymalny dla wzrostu. Na podstawie różnic w zakresie temperatur, w którym możliwy jest wzrost, drobnoustroje podzielono umownie na psychrofile, psychrotrofy, mezofile, termofile i ekstremalne termofile (patrz: tabela 24)



Temperatura maksymalna jest to najwyższa temperatura, w której drobnoustroje mogą się rozmnażać. Powyżej temperatury maksymalnej dochodzi do trwałego uszkodzenia metabolizmu drobnoustrojów.

Temperatura minimalna to temperatura, poniżej której ustaje rozmnażanie komórek. Poniżej temperatury minimalnej drobnoustroje nie giną. W przypadku wzrostu temperatury powyżej minimalnej drobnoustroje ponownie zaczynają się dzielić.

Temperatura optymalna to taka, w której zachodzą najintensywniejsze podziały komórek. Warto zaznaczyć, że nie jest to zawsze temperatura najkorzystniejsza dla wszystkich procesów życiowych komórek.

Tabela 24

Zakresy temperatur w których możliwy jest wzrost różnych grup drobnoustrojów ($^{\circ}\text{C}$)

Grupa	Minimum	Optimum	Maksimum
psychrofile	-10	15	20
psychrotrofy	< 0	> 20	~37
mezofile	~15	37	~45
termofile	~30 - 45	~50	~80

Temperatura decyduje zarówno o szybkości reakcji chemicznych w komórce, jak i o stanie fizykochemicznym (strukturze) białek i kwasów nukleinowych komórki.

Zmiana temperatury w zakresie temperatur kardynalnych dla wzrostu (minimum-maksimum) spowoduje, odpowiednio:

- obniżanie temperatury od optymalnej do minimalnej powoduje spowolnienie metabolizmu komórkowego aż do jego ustania co manifestuje się zwolnieniem tempa podziałów komórek
- przyspieszenie procesów życiowych (wynik podwyższania temperatury od optymalnej do maksymalnej dla wzrostu). Przekroczenie temperatury maksymalnej dla wzrostu prowadzi do uszkodzenia struktur komórkowych i śmierci komórki



Zmiana temperatury hodowli pozwala na regulację procesów biochemicznych.

10.2. POTENCJAŁ OKSYDO-REDUKCYJNY – O/R (Eh)

Potencjał oksydo-redukcyjny określa zdolność układu do oddawania elektronów (utleniania się z jednoczesną redukcją innego układu) lub do ich przyjęcia (redukcji z jednoczesnym utlenieniem innego układu). Jednostką potencjału oksydo-redukcyjnego jest 1Volt (1V).

Praktycznie O/R potencjał wyraża proporcję molekuł utlenionych do zredukowanych. Gdy w pożywce znajduje się tlen to związki w niej zawarte występują w formie utlenionej i pożywka wykazuje potencjał dodatni. Gdy usuniemy tlen składniki pożywki przechodzą w postać zredukowaną i potencjał staje się ujemny. Wartość potencjału oksydo-redukcyjnego w środowisku zależy także od aktywności życiowej mikroorganizmów tlenowych, które zużywając tlen powodują przesunięcie potencjału w kierunku bardziej ujemnego. Można go modyfikować przy pomocy metod fizycznych, chemicznych i biologicznych (patrz: **Hodowla drobnoustrojów beztlenowych**)

Tabela 25

Potencjał oksydo-redukcyjny środowiska wzrostowego a wymogi tlenowe drobnoustrojów

O/R (Eh) w V	+0,4 do + 0,2			< 0,2
wymogi tlenowe	ściśle tlenowce (AEROBY)	względne beztlenowce	mikroaerofile	ściśle beztlenowce (ANAEROBY)

10.3. NAPIĘCIE POWIERZCHNIOWE

Napięcie powierzchniowe jest to zjawisko fizyczne na styku środowiska zawieszającego (warstwy płynnej) z powierzchnią komórki (fazą stałą). Mierzone jest w dynach/cm². Zmiany w napięciu powierzchniowym mają wpływ, m.in. na przepuszczalność błony cytoplazmatycznej, podziały komórkowe, wzrost komórki i typ wzrostu bakterii na podłożu płynnym.

Obecność hydrofilnych związków (związki posiadające grupy polarne) w ścianie komórkowej sprawia, że powierzchnia komórki jest łatwo zwilżana. W przypadku przewagi niepolarnych grup (związków hydrofobowych) na powierzchni komórki zwilżalność komórki obniża się, co prowadzi do wzrostu komórek w postaci agregatów.

Tabela 26

Typ wzrostu *Bacillus subtilis* w różnych środowiskach zawieszających

Środowisko zawieszające	Napięcie powierzchniowe (dyny/cm ²)	Typ wzrostu
woda destylowana (37°C)	70	brak
bulion odżywczy	60	błonka na powierzchni
etanol	20	jednolita zawiesina

10.4. AKTYWNOŚĆ WODNA (a_w)

Woda jest istotnym składnikiem komórki (stanowić może 70-98% masy ciała komórki). Pełni istotną rolę w procesach życiowych komórki (rozpuszczalnik związków nieorganicznych i organicznych, związek umożliwiający pobieranie i transport składników pokarmowych i produktów przemiany materii oraz biorący bezpośredni lub pośredni udział w procesach chemicznych i fizycznych zachodzących w komórce) oraz jest czynnikiem regulującym gospodarkę cieplną organizmu (pojemność cieplna).

Ilość **dostępnej wody wolnej** (nie związanej ze związkami chemicznymi) w środowisku określa możliwość rozwoju drobnoustrojów w tym środowisku.

Odwodnienie środowiska prowadzi do zahamowania procesów życiowych, wzrostu, rozmnażania komórki. Miara dostępności wody w środowisku, np. w środowisku żywności, jest jego aktywność wodna (a_w).

a_w środowiska można zmieniać przez:

- ▶ suszenie (suszenie na powietrzu, np. grzybów, ryb, mięsa, warzyw i owoców jest jedną z najstarszych metod konserwowania żywności)
- ▶ liofilizację (suszenie w stanie zamrożenia)
- ▶ suszenie metodą rozpyłową (mleko w proszku)
- ▶ zagęszczanie (dodatek soli, cukrów)

Wzrost stężenia rozpuszczalnych w wodzie związków, np. soli, cukrów prowadzi do obniżenia a_w środowiska.

Aktywność wodną mierzy się określając stosunek prężności pary wodnej nad roztworem do prężności pary nad rozpuszczalnikiem – wodą. Waha się ona od 1 do 0. Większość mikroorganizmów preferuje a_w środowiska wzrostowego $>0,99$. Wyjątek stanowią bakterie halofilne, osmofilne drożdże oraz kserofilne pleśnie, które tolerują bądź wręcz wymagają obniżonej aktywności wodnej środowiska wzrostowego.

Tabela 27

Wpływ określonego stężenia wybranych, rozpuszczalnych w wodzie, związków na aktywność wodną środowiska (bulion odżywczy)

% NaCl (w/v)	a_w		% glukozy (w/v)	a_w
0	0,999		0	0,999
2,5	0,986		10	0,990
5	0,974		20	0,980
10	0,940		40	0,958
20	0,875		60	0,935
30	0,800			

Drobnoustroje halofilne = bakterie

Drobnoustroje osmofilne = drożdże (grzyby mikroskopowe)

Drobnoustroje kserofilne = pleśnie (grzyby mikroskopowe)

10.5. WPŁYW pH ŚRODOWISKA NA DROBNOUSTROJE

Większość drobnoustrojów występujących w środowisku człowieka rozwija się najlepiej przy pH 7. Znaczne podwyższenie bądź obniżenie pH hamuje ich wzrost. Istnieją jednak grupy bakterii, które mogą rosnąć w bardzo niskim bądź wysokim pH.

W zależności od pH optymalnego dla wzrostu bakterii dzielimy je na:

- acidofile wzrost w zakresie pH: 2 - 3,5,
- neutrofile wzrost w zakresie pH: 5 - 8,
- alkalofile wzrost w zakresie pH: 9 - 10,5

Wyróżnia się także drobnoustroje rosnące w neutralnym pH ale posiadające także zdolność do wzrostu w niskim bądź wysokim pH. Nazywamy je wówczas alkalo- (zasado-) bądź acidotolerantnymi (kwasotolerancyjnymi).



WSKAZÓWKA

WAŻNE

Niskie pH stosuje się do konserwacji żywności - kwaszenie, marynowanie oraz do niszczenia drobnoustrojów występujących na tuszach wołowych i wieprzowych - „sprejowanie” kwasem octowym, cytrynowym, mlekowym.

Obniżanie pH środowiska jest jedną ze starszych metod konserwacji żywności. Kiszenie, marynowanie warzyw, owoców, grzybów jest stosowane do dnia dzisiejszego. Ponadto stosuje się także w praktyce sprejowanie tusz wieprzowych i wołowych kwasem octowym w celu przedłużenia ich trwałości oraz obniżenia liczby drobnoustrojów chorobotwórczych.

Należy jednak pamiętać, że uzyskanie efektu bakteriostatycznego nie zależy wyłącznie od uzyskanego pH lecz także od zastosowanego czynnika zakwaszającego.

10.6. DZIAŁANIE SOLI /KATIONÓW, ANIONÓW/ NA DROBNOUSTROJE

Sole – związki powstające w wyniku reakcji kwasów i zasad nieorganicznych wywierają określony wpływ na drobnoustroje. Efekt działania soli zależy od :

- koncentracji soli w roztworze
- stopnia jej dysocjacji
- rodzaju kationu i anionu powstającego w wyniku dysocjacji soli
- pH roztworu soli - roztwory soli kwaśnych i zasadowych

Wzrost większości drobnoustrojów jest możliwy przy ciśnieniu osmotycznym, roztworu w którym są zawieszone, zapewnionym przez dodatek 0,85% NaCl. Zwiększenie koncentracji NaCl ponad 3% hamuje ich wzrost. Szereg drobnoustrojów jednak, w tym chorobotwórczych (*St. aureus*, *L. monocytogenes*) wytrzymuje znacznie wyższe koncentracje (10 - 12%)

Niektóre drobnoustroje zaś tolerują stężenia do 30%. Drobnoustroje nie niszczone przez wysokie stężenia soli kuchennej nazywamy **halotolerantnymi** (halotolerancyjnymi), zaś rosnące w takich stężeniach **halofilnymi**.



UWAGI

WAŻNE

Wysokie koncentracje soli są wykorzystywane w przechowywaniu ryb, warzyw, serów i niekiedy masła.

10.7. BARWNIKI



Światło jest rodzajem promieniowania elektromagnetycznego, które jest rejestrowane przez oko. Widmo światła w zakresie widzialnym obejmuje fale od długości 360 (fiolet) do 810 nm. (czerwień).

Barwniki są związkami posiadającymi zdolność absorpcji określonych zakresów widma słonecznego. Pozostała, niezaabsorbowana część widma ulega odbiciu co odbieramy jako określony kolor. Energia pochłonięta przez barwnik działa uszkadzająco na bakterie przez co związki te wykazują dużą aktywność bakteriobójczą. Do niedawna były szeroko stosowane medycznie.

Barwniki o działaniu przeciwbakteryjnym:

A. Posiadające grupę trójfenylometanu:

- zieleń brylantowa, zieleń malachitowa, fiolet krystaliczny
- **stężenia hamujące wzrost** (bakterii G(+)) 1:75 000 - 1: 100 000, bakterii G(-) 10-krotnie wyższe)

B. Akrydyna i jej aminopochodne:

- akryflawina, aminakryna, proflawina
- szersze spektrum działania
- bakterie G(+), bakterie G(-), pierwotniaki - Plasmodium, Trypanosoma
- hamują syntezę DNA

10.8. ZWIĄZKI POWIERZCHNIOWO-CZYNNE

Związki powierzchniowo – czynne (związki zwilżające) jest to grupa związków obniżających napięcie powierzchniowe (patrz: NAPIĘCIE POWIERZCHNIOWE). Zawierają one grupę hydrofilną, rozpuszczalną w wodzie, oraz grupę hydrofobową, rozpuszczalną w tłuszczach.

Do grupy związków powierzchniowo-czynnych należą **mydła**, kwasy tłuszczowe, sole kwasów tłuszczowych, syntetyczne **detergenty**, alkohole, fenole i ich pochodne, krezole i ich pochodne.

W zależności od tego który z jonów jest rozpuszczalny w wodzie, związki powierzchniowo-czynne dzieli się na:

- kationowe
- anionowe (mydła)
- niejonowe (nie zawierające grup ulegających dysocjacji; np. Tween 80 = pochodna poli-oksy-etylenowa sorbitolo-mono-oleinianu)



ĆWICZENIE 19

**TEMAT: DEMONSTRACJA WPŁYWU TEMPERATURY
INKUBACJI NA WZROST WYBRANYCH SZCZEPÓW
WZORCOWYCH BAKTERII**

1. Odczytać wyniki inkubacji posiewów wzorcowych szczepów bakterii, różnicując ilością plusów intensywność wzrostu szczepu w każdej z temperatur
2. Na podstawie zakresu temperatur w których zanotowano wzrost każdego ze szczepów, zaklasyfikować każdy z nich do odpowiedniej grupy (patrz: tabela 24)
3. Wyniki obserwacji zanotować w tabeli 28

Rys. 13

Schemat wykonania ćwiczenia 19

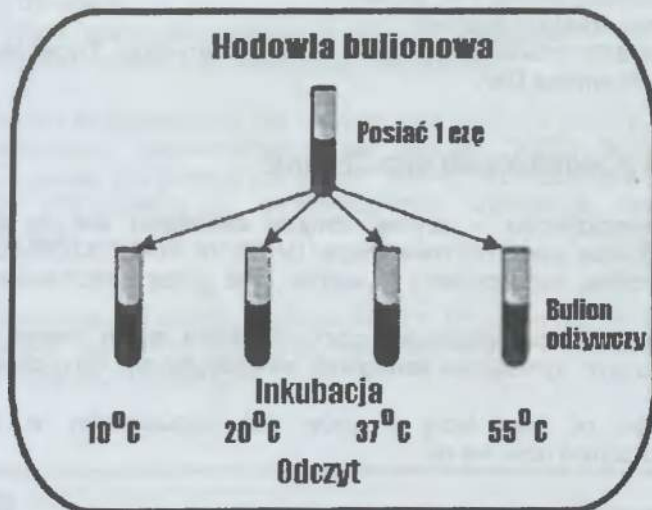


Tabela 28

Wpływ temperatury inkubacji na możliwości wzrostowe wybranych szczepów bakterii

	Temp. °C	10°	20°	37°	55°	Grupa
Nr	Szczep bakterii					
1	<i>Staphylococcus aureus</i>					
2	<i>Streptococcus faecalis</i>					
3	<i>Klebsiella oxytoca</i>					
4	<i>Salmonella anatum</i>					
5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>					
6	<i>Escherichia coli</i>					
7	<i>Alteromonas putrefaciens</i>					
8	<i>Bacillus stearothermophilus</i>					

* dotyczy obecności i intensywności wzrostu:

- brak wzrostu,
- + słaby wzrost,
- +++ obfity wzrost

Wnioski:

Data zaliczenie





ĆWICZENIA

ĆWICZENIE 20

TEMAT: DEMONSTRACJA WPŁYWU NAPIĘCIA
POWIERZCHNIOWEGO NA WZROST BAKTERII

1. Określić typ wzrostu bakterii testowych na bulionie odżywczym
2. Określić typ wzrostu bakterii testowych na bulionie odżywczym z różnym dodatkiem Tweenu 80
3. Wyniki obserwacji zanotować w tabeli 29

Rys. 14

Schemat wykonania ćwiczenia 20

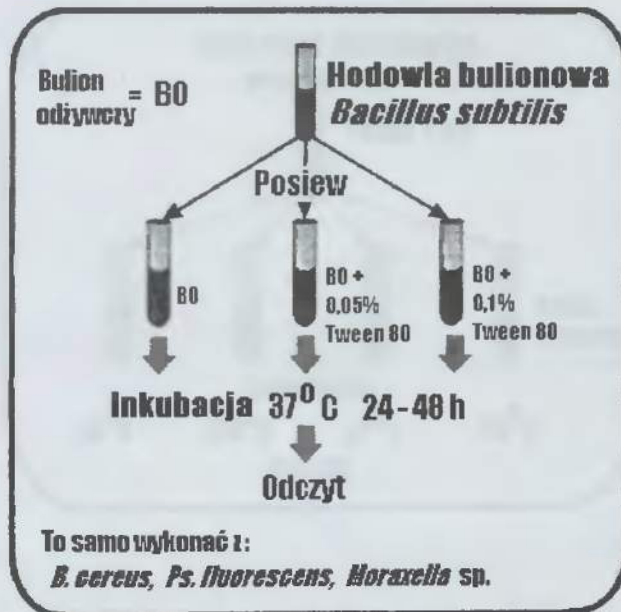


Tabela 29

Wpływ modyfikacji napięcia powierzchniowego pożywki na typ wzrostu wybranych szczepów bakterii

Stężenie (%) Tween 80	Charakterystyka	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Moraxella</i> sp.
0	wzrost*				
	typ wzrostu**				
0,05	wzrost*				
	typ wzrostu**				
0,1	wzrost*				
	typ wzrostu**				

* dotyczy obecności i intensywności wzrostu:

- brak wzrostu,

+ słaby wzrost,

+++ obfity wzrost

** typ wzrostu:

kożuszek (K) ,

blonka (B) na powierzchni,

wzrost dyfuzyjny (D),

osad na dnie (Os)

Wnioski:

Data

zaliczenie


ĆWICZENIA
ĆWICZENIE 21
TEMAT: DEMONSTRACJA WPŁYWU PROMIENIOWANIA UV NA WYBRANE SZCZEPY BAKTERII
Wykonanie:

1. Obejrzeć uważnie płytki z posianymi szczepami, ekspozycyjnymi na działanie promieniowania UV przez 1- 20 min.
2. Intensywność wzrostu szczepu na części płytki poddanej ekspozycji na działanie UV różnicować ilością +
3. Wyniki odczytów oraz wnioski zanotować w tabeli 30

Tabela 30
Wpływ czasu ekspozycji na działanie promieniowania UV (260nm) na możliwości wzrostowe wybranych szczepów bakterii (czas ekspozycji w min)

	Czas ekspozycji**	1'	1'	5'	5'	10'	10'	20'	20'	Wnioski
nr	Szczep bakterii		Z*		Z*		Z*		Z*	
1	<i>Staphylococcus aureus</i>									
2	<i>Streptococcus faecalis</i>									
3	<i>Klebsiella oxytoca</i>									
4	<i>Salmonella anatum</i>									
5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>									
6	<i>Escherichia coli</i>									
7	<i>Alteromonas putrefaciens</i>									
8	<i>Bacillus cereus</i>									

* po napromieniowaniu płytka z posianym szczepem inkubowana bez dostępu światła (zasłonięte płytki - Z)

** obecność i intensywność wzrostu po różnym czasie ekspozycji:

- brak wzrostu

+ słaby wzrost

+++ obfity wzrost

Wnioski:

Data

zaliczenie



ĆWICZENIE 22

TEMAT: WPŁYW AKTYWNOŚCI WODNEJ (A_w) ŚRODOWISKA
NA WZROST DROBNOUSTROJÓW

Materiały:

- Skosy agarowe zawierające szczepy wyizolowane ze środowisk o różnej aktywności wodnej:
 - przedstawiciel mikroflory jelitowej - *Escherichia coli*
 - szczep wyizolowany z ryby mocno solonej - *Halobacterium halobium*
 - szczep wyizolowany z masy karmelowej stosowanej przy produkcji śliwek w czekoladzie - *Saccharomyces rouxii*
 - szczep wyizolowany z suszonych śliwek kalifornijskich - *Aspergillus repens*
- 5 probówek z bulionem odżywczym (dla 4 szczepów + 1 probówka kontrolna)
- Po 1 probówce, dla każdego ze szczepów zawierającej, bulion odżywczy z dodatkiem 2,5; 5; 10, 20 i 30 (w/v) NaCl + po 1 probówce kontrolnej z analogicznymi stężeniami NaCl
- Po 1 probówce, dla każdego ze szczepów zawierającej, bulion odżywczy z dodatkiem 10, 20, 40 i 60 % (w/v) glukozy + po 1 probówce kontrolnej z analogicznymi stężeniami glukozy
- Densytmetr ATB 1550 (bioMerieux, Francja)
- Dermatograf



W
A
Ż
N

WSKAZÓWKA

Uwaga: Podłoża, na które posiany zostanie szczep *Halobacterium halobium* (patrz punkt 2- 4) zawierają dodatkowo jon Mg^{2+} (2% $MgSO_4 \times 7 H_2O$)- czynnik wspomagający wzrost *Halobacterium* sp.

Wykonanie:

1. Probówki zawierające bulion odżywczy oraz bulion odżywczy z dodatkiem określonych stężeń NaCl i glukozy odpowiednio oznakować (patrz: tabela 29)
2. Przenieść po 1 oczku ezy każdego ze szczepów do przynależnych mu probówek (patrz: Tabela 29)
3. Do oznakowania dotyczącego zawartości podłoża (patrz: punkt 1) dodać informację dotyczącą posianego szczepu (patrz: Tabela 29)
4. Dokładnie wytrząsać probówkę na wytrząsarce w celu równomiernego zawieszenia materiału
5. Oznaczyć wyjściowy stopień zmętnienia (wg skali Mc Farlanda) - X - lub wyjściową liczebność inokulum - Y - na densytopetrze
6. Wyniki zapisać w Tabeli 30
7. Inkubować posiewy odpowiednio: A w 37°C/ 48h, B, C i D w temperaturze pokojowej / 7 dni
8. Dokładnie wytrząsać probówki na wytrząsarce w celu równomiernego zawieszenia materiału, po czym oznaczyć stopień zmętnienia (wg skali Mc Farlanda) - X1 - lub odczytać liczebność populacji szczepów testowych - Y1 - na densytopetrze
9. Porównać reakcję mikroorganizmów wyizolowanych z różnych środowisk na zmiany w a_w środowiska modyfikowanej dodatkiem NaCl i glukozy

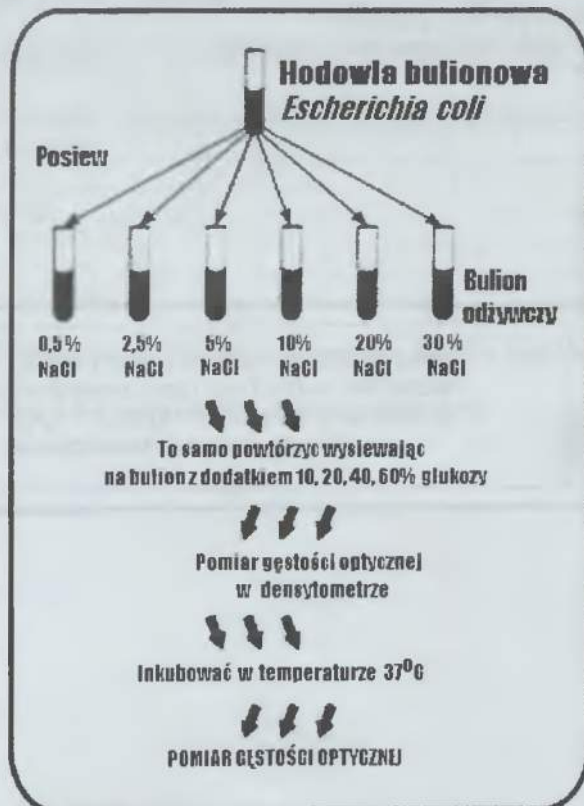
Rys. 15**Schemat wykonania ćwiczenia 22**

Tabela 31

Wyniki odczytów reakcji wybranych szczepów drobnoustrojów na zmiany w a_w środowiska wzrostowego przy użyciu określonych czynników modyfikujących a_w

Czynnik modyfikujący a_w	% w/v	a_w	Nr	<i>Escherichia coli</i>				<i>Halobacterium halobium</i>				<i>Saccharomyces rouxii</i>				<i>Aspergillus repens</i>			
				A		B		C		D		C		D		C		D	
				X	Y	X ₁	Y ₁	X	Y	X ₁	Y ₁	X	Y	X ₁	Y ₁	X	Y	X ₁	Y ₁
NaCl	0	0,999	1																
	2,4	0,986	2																
	5	0,974	3																
	10	0,940	4																
	20	0,875	5																
	30	0,800	6																
glukoza	0	0,999	7																
	10	0,990	8																
	20	0,980	9																
	40	0,958	10																
	60	0,935	11																

Wnioski:

Data

zaliczenie



ĆWICZENIE 23

TEMAT: WPLÝW pH ŚRODOWISKA NA WZROST BAKTERII

Cel : Demonstracja wpływu pH środowiska na wzrost wybranych szczepów bakterii

Wykonanie:

1. Odczytać wyniki posiewów szczepów wzorcowych na bulion odżywczy o różnym pH modyfikowanym dodatkiem kwasu mlekowego, octowego i HCl
2. Zaznaczyć odpowiednio próbówki, w których jest wzrost, różnice w intensywności wzrostu zróżnicować ilością +
3. Wyniki odczytów zanotować w tabeli 32

Tabela 32

Wpływ pH środowiska na wzrost wybranych szczepów bakterii

pH		3*	4*	5*	6*	7*	8*	9*
Szczep	kwas							
<i>S. aureus</i>	octowy							
	mlekowy							
	HCl							
<i>E. coli</i>	octowy							
	mlekowy							
	HCl							
<i>S. enteritidis</i>	octowy							
	mlekowy							
	HCl							
<i>K. oxytoca</i>	octowy							
	mlekowy							
	HCl							
<i>E. faecalis</i>	octowy							
	mlekowy							
	HCl							
<i>Alt. putrefaciens</i>	octowy							
	mlekowy							
	HCl							
<i>B. cereus</i>	octowy							
	mlekowy							
	HCl							

Saccharomyces sp.	octowy								
	mlekowy								
	HCl								

* dotyczy obecności i intensywności wzrostu:

- brak wzrostu
- + słaby wzrost
- +++ obfity wzrost

Wnioski:

Data

zaliczenie



ĆWICZENIE 24

TEMAT: DEMONSTRACJA WPŁYWU RÓŻNYCH STĘŻEŃ SOLI
NA WZROST WYBRANYCH SZCZEPÓW BAKTERII
POŁĄCZONA Z ODCZYTAMI WYNIKÓW GOTOWYCH
POSIEWÓW

Wykonanie:

1. Odczytać wyniki posiewów szczepów wzorcowych na bulion odżywczy z różnym dodatkiem NaCl i CaCl₂ (patrz: tabela 33)
2. Zaznaczyć odpowiednio probówki, w których ma miejsce wzrost; różnice w intensywności wzrostu zróżnicować ilością +
3. Wyniki odczytów zanotować w tabeli 33

Tabela 33

Wpływ różnych stężeń NaCl i CaCl_2 na wzrost wybranych szczepów bakterii

		NaCl				CaCl_2			
	stężenie (%)	0,85*	5,0*	10*	20*	0,85*	5,0*	10*	20*
nr	szczep								
1	<i>S. aureus</i>								
2	<i>E. coli</i>								
3	<i>S. enteritidis</i>								
4	<i>K. oxytoca</i>								
5	<i>E. faecalis</i>								
6	<i>Alt. putrefaciens</i>								
7	<i>B. cereus</i>								
8	<i>Ps. aeruginosa</i>								

* dotyczy obecności i intensywności wzrostu:

- brak wzrostu,
- + słaby wzrost,
- +++ obfity wzrost

Wnioski:

Data

zaliczenie



ĆWICZENIE 25

TEMAT: DEMOSTRACJA WPŁYWU RÓŻNYCH STĘŻEŃ,
RÓŻNYCH BARWNIKÓW NA WZROST WYBRANYCH
SZCZEPÓW BAKTERII POŁĄCZONA Z ODCZYTAMI
WYNIKÓW GOTOWYCH POSIEWÓW PRZEZ
STUDENTÓW

Tabela 34

Wpływ wybranych barwników na wybrane szczepy bakterii

Szczep*		1	2	3	4	5	6	7	8
Barwnik	Stężenie (%)								
fiolet krystaliczny (fiolet metylowy)	0,1								
	0,01								
	0,005								
błękit metylenowy ($C_{16}H_{18}N_3ScI$)	0,1								
	0,01								
	0,005								
eozyna (tetrabromofluoresceina) $C_{20}H_8O_5Br_4$	0,1								
	0,01								
	0,005								
czerwień fenolowa (fenolosulfoftaleina) $C_{19}H_{14}O_5S$	0,1								
	0,01								
	0,005								
zieleń malachitowa	0,1								
	0,01								
	0,005								
akryflawina	0,1								
	0,01								
	0,005								

* dotyczy obecności i intensywności wzrostu:

- brak wzrostu,
- + słaby wzrost,
- +++ obfity wzrost

Szczepy testowe :

1. *Ps. aeruginosa*
2. *E. coli*
3. *St. aureus*
4. *Ps. aeruginosa* ATCC 27853
5. *Kl. oxytoca*
6. *L. monocytogenes*

zaliczenie

Rozdział 11

ANTYBIOTYKI

Antybiotyki są produktami metabolizmu organizmów żywych, które hamują wzrost (**bakteriostaza**) lub nieodwracalnie uszkodzają - niszczą (**bakteriobójczość**) drobnoustroje. Producentami antybiotyków są głównie promieniowce z rodzaju *Streptomyces* (producenci 60% znanych antybiotyków), grzyby głównie z rodzaju *Penicillium*. Produkują je także bakterie właściwe, glony oraz organizmy wyższe.

Począwszy od 1960r do antybiotyków zaliczane są także związki uzyskane w wyniku chemicznej modyfikacji antybiotyków naturalnych. Aktualnie znanych jest około 3000 antybiotyków (< 5% wykorzystywanych jest w lecznictwie).

Antybiotyki, niezależnie od ich przeznaczenia (antybakteryjne, antygrzybicze, antynowotworowe, antywirusowe) są inhibitorami układów enzymatycznych.

Drobnoustroje bronią się przed antybiotykami poprzez uruchamianie różnych mechanizmów (np. w przypadku penicyliny wytwarzanie enzymu rozkładającego ten antybiotyk - penicylinazy). Wytworzone mechanizmy obronne są przekazywane z pokolenia na pokolenie, najczęściej jest to **oporność krzyżowa**. Polega to na tym, że pojawienie się oporności na jeden antybiotyk pociąga za sobą powstanie oporności na wiele innych. Problem powstawania oporności drobnoustrojów na antybiotyki jest jednym z ważniejszych w medycynie. Aby uniknąć powstawania szczepów opornych wprowadzono absolutny zakaz stosowania antybiotyków w żywieniu zwierząt oraz w konserwacji żywności. Jedynym wyjątkiem jest nizyna, stosowana najczęściej w mleczarstwie. Szczepy oporne na nizynę nie dają krzyżowej oporności na antybiotyki stosowane w medycynie.

Znanych jest szereg metod badania oporności bakterii na antybiotyki. Jedną z najczęściej stosowanych jest metoda krążkowa, w której krążki z bibuły nasączone antybiotykiem układa się na pożywkę agarową z posianymi drobnoustrojami. Dyfundujący do podłoża antybiotyk hamuje wzrost bakterii wokół krążka. Wielkość strefy zahamowania, oceniana w mm, porównywana jest z opornością szczepów wzorcowych przedstawioną w tabeli 35.

Tabela 35

Określanie wrażliwości na antybiotyki (średnica zahamowania wzrostu w mm) stopień wrażliwości (mm)

Grupa antybiotyków	Antybiotyk	Symbol	Dawka	Wrażliwy	Ślabo wrażliwy	Oporny
β-laktamowe	penicilina	Pe	10j.m.	>20 (>28*)	15-19 (21-27*)	<14 (<20*)
	ampicilina	Am	10mcg	>18 (>28*)	14-17 (22-27*)	<13 (<21*)
aminoglikozydowe	streptomycyna	S	30mcg	>20	15-19	<14
	neomycyna	N	30mcg	>19	13-18	<12
	gentamycyna	Ge	10mcg	>18	13-17	<12
tetracyklinowe	oxytetracyklina	T	30mcg	>20	15-19	<14
	doxycyklina (vibramycyna)	Dk	30mcg	>19	15-18	<14
makrolidowe	erytromycyna	E	15mcg	>22	14-21	<13
ryfamycyny	rifampicyna	Rf	10mcg	>18	13-17	<12
peptydowe	kolistyna	Ks	300j.m	>15	12-14	<11
inne	chloramfenikol	C	30mcg	>25	18-24	<17
syntetyczne	nitrofurantoina	Nf	200mcg	>23	17-22	<16

*dotyczy *Staphylococcus aureus*



ĆWICZENIE 26

**TEMAT: OKREŚLANIE WRAŻLIWOŚĆ BAKTERII NA
ANTYBIOTYKI METODĄ KRAŻKÓW BIBUŁOWYCH
(ANTYBIOGRAM)**

Materiały:

1. 24h hodowle bulionowe wybranych szczepów bakterii chorobotwórczych (patrz: Tabela 36)
2. Płytki z agarem odżywczym
3. Probówki z 0,4 ml jałowego płynu do rozcieńczeń
4. Krążki bibułowe z antybiotykami
5. Jałowe pipety 1ml, jałowe bagietki
6. Pęseta

Wykonanie:

1. Przenieść, z zachowaniem warunków jałowości, 0,1 ml 24h hodowli szczepu testowego do 0,4 ml rozcieńczalnika
2. Przenieść, z zachowaniem warunków jałowości, po 0,1 ml rozcieńczonej hodowli (1:10) na podłoże agarowe na płytce Petriego i rozprowadzić równomiernie po powierzchni jałową bagietką
3. Przy pomocy opalanej w płomieniu palnika pęsety, przenieść z zachowaniem warunków jałowości, krążki bibułowe nasączone antybiotykami na podłoże na płytce (odległość między krążkami nie powinna być mniejsza niż 2 cm)
4. Płytki inkubować w 37°C/18-24h
5. Zmierzyć średnice strefy zahamowania wzrostu
6. Wyniki zapisać w tabeli 36
7. Na ich podstawie określić stopień wrażliwości poszczególnych bakterii na dany antybiotyk (patrz: Tabela 35)
8. Porównać skuteczność działania określonego antybiotyku na różne bakterie; wskazać antybiotyk najsilniejszej działający na określony szczep bakterii zaznaczając kółkiem symbol oznaczający najsilniejszej działający antybiotyk.

Tabela 36

Stopień wrażliwości wybranych szczepów bakterii chorobotwórczych na wybrane antybiotyki

Nr	Szczep testowy	Antybiotyk (symbol)	Strefa hamowania wzrostu (mm)	Stopień wrażliwości szczepu
1	<i>Staphylococcus aureus</i>			

2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			
3	<i>Klebsiella oxytoca</i>			
4	<i>Salmonella enteritidis</i>			
5	<i>Escherichia coli</i>			
6	<i>Bacillus cereus</i>			
7	<i>Listeria monocytogenes</i>			

Wnioski:

Data

zaliczenie

Rozdział 12

METODY OZNACZANIA LICZBY MIKROORGANIZMÓW

Do metod oznaczania liczby mikroorganizmów w dowolnym środowisku zaliczane są:

- konwencjonalne, bezpośrednie i pośrednie metody określania liczby w 1 ml/g/cm^2
- metody szybkie – pośrednie - określające, między innymi liczebność drobnoustrojów na podstawie zmian chemizmu – poziom ATP, zmętnienia, przewodności elektrycznej pożywki, tj. zmian zachodzących w środowisku, w wyniku wzrostu w nim drobnoustrojów.



Metody bezpośrednie określania liczby drobnoustrojów polegają na bezpośrednim liczeniu odpowiednio przygotowanego materiału pod mikroskopem

Różnice pomiędzy określonymi metodami mikroskopowymi określania liczby sprowadzają się do różnych sposobów przeliczania liczby komórek widzianych pod mikroskopem na jednostkę masy, objętości lub powierzchni.

Do tej grupy metod należą:

1. Bezpośrednie liczenie komórek w preparacie barwionym
 - A. Określanie liczby komórek /1 g/ml
 - B. Określanie liczby komórek /1 cm^2 preparatu odciskowego (stosowane przy badaniu materiału o stałej konsystencji, np. tkanki)
2. Liczenie żywych, wybarwionych lub nie barwionych komórek przy pomocy różnego typu komór, np. komory Thoma, Howarda, Bürkera, itd. Metoda stosowana zwykle przy liczeniu większych komórek, np. komórek drożdży
3. Metoda filtrów membranowych

Metody pośrednie określania liczby drobnoustrojów (liczba JTK/g/ml)

W tej grupie metod od momentu przeprowadzenia analizy do czasu uzyskania wyników musi minąć czas potrzebny dla uzyskania widocznego wzrostu oznaczanych drobnoustrojów (czas inkubacji). Czas ten zależy od czasu 1 generacji oznaczanego mikroorganizmu i może wahać się od 24h do kilkunastu dni

Do metod pośrednich określania liczby należą, m.in.:

1. Metoda płytkowa
2. Metoda miana
3. Metoda NPL

4. Metoda spektrofotometryczna (pomiar stopnia zmętnienia)
5. Metoda filtrów membranowych

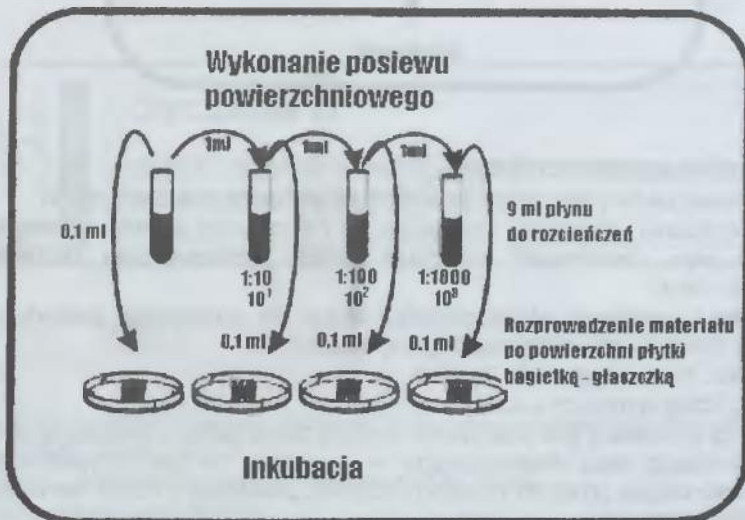
METODA PŁYTKOWA:

1. Metoda posiewów powierzchniowych
2. Metoda posiewów zalewanych
3. Metoda filtrów membranowych

SPOSÓB POSIEWU POWIERZCHNIOWEGO

- Na powierzchnię podłoża stałego na płytkach /wybór podłoża zależy od oznaczanej grupy drobnoustrojów/ przenieść po 0,1 ml z kolejnych rozcieńczeń dziesiętnych wyjściowego materiału
- W przypadku materiału płynnego, jednorodnego oraz spodziewanej, niskiej liczebności oznaczanej grupy drobnoustrojów, (na poziomie $10^2 - 10^3$ jtk/ml), wykonywać posiew bezpośredni wyjściowego materiału. Posiany materiał rozprowadzić po powierzchni podłoża, przy pomocy szklanej bagietki
- Posiewy inkubować w temperaturze optymalnej dla oznaczanej grupy drobnoustrojów
- Po inkubacji posiewów, do liczenia wybrać płytki na których liczba wyrosłych kolonii mieści się w przedziale 30 - 300
- Na wybranych do liczenia płytkach, w zależności od kierunku prowadzonych oznaczeń oraz użytego podłoża, liczyć bądź wszystkie wyrosłe kolonie, bądź kolonie rosnące w sposób charakterystyczny dla oznaczanego drobnoustroju (oznaczanej grupy)

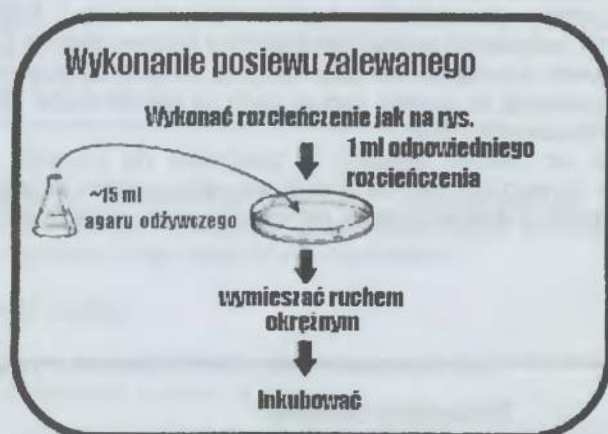
Rys. 16



SPOSÓB POSIEWU ZALEWANEGO

- Na dno pustej, jałowej płytki przenieść po 1 ml materiału z kolejnych rozcieńczeń dziesiętnych (lub nierozcieńczonego materiału wyjściowego o ile jest to materiał płynny, a spodziewana liczebność oznaczanych drobnoustrojów na poziomie $10^2 - 10^3$ jtk/ml)
- Zalać podłożem agarowym, rozpuszczonym i odpowiednio schłodzonym i dokładnie wymieszać
- Posiewy inkubować w temperaturze optymalnej dla oznaczanej grupy drobnoustrojów
- Po inkubacji posiewów, do liczenia wybrać płytki, na których liczba wyrosłych kolonii mieści się w przedziale 30 - 300
- Na wybranych do liczenia płytkach, w zależności od kierunku prowadzonych oznaczeń oraz użytego podłoża, liczyć bądź wszystkie wyrosłe kolonie, bądź kolonie rosnące w sposób charakterystyczny dla oznaczanego drobnoustroju (oznaczanej grupy)

Rys. 17



METODA FILTRÓW MEMBRANOWYCH

- Przefiltrować badany płyn przez filtr membranowy (patrz ćwiczenie nr 29)
- Przemyć ścianki urządzenia filtrującego 20 ml roztworu jałowej soli fizjologicznej, zebrany płyn przefiltrować (następuje zmycie drobnoustrojów pozostałych na ściankach filtra)
- Zdjąć filtr z podstawki jałową pincetą i ułożyć na powierzchni pożywki agarowej w płytce Petriego, powierzchnią filtrującą do góry
- Inkubować filtr w cieplarni 24-36 godz.
- Policzyc liczbę wyrosłych kolonii
- Metoda ta stosowana jest praktycznie do oznaczania ilości drobnoustrojów w wodzie oraz określania ilości drobnoustrojów w powietrzu. W tym przypadku specjalne urządzenie zasysa przez filtr określoną objętość powietrza, po czym filtr układa się na powierzchni pożywki

Rys. 18



ĆWICZENIA

ĆWICZENIE 27

TEMAT: BEZPOŚREDNIE LICZENIE BAKTERII W PREPARACIE BARWIONYM

Materiały:

1. Probówka z mlekiem prosto od krowy, probówka z mlekiem po 48 h przetrzymywania jej w temp. pokojowej
2. Szkiełka przedmiotowe z kwadracikami o boku 1 cm²
3. Kalibrowana eza z oczkiem
4. Zestaw do barwienia: mydélko, szmatka bawełniana, wanienka, tryskawka z wodą destylowaną, szczypce Corneta
5. Błękit metylenowy lub fiolet krystaliczny
6. Mikroskop

Wykonanie:

1. Odtłuścić szkiełko przedmiotowe
2. Pobrać po 1 oczku mleka kalibrowaną jałową ezą i rozprowadzić równomiernie na powierzchni kwadracika na szkiełku przedmiotowym
3. Wysuszyć rozmaz na powietrzu
4. Utrwalić suchy preparat w płomieniu palnika
5. Nawarstwić preparat błękitem metylenowym (fioletem krystalicznym) na ~ 3 min.
6. Splukać preparat wodą; wysuszyć odciskając nadmiar wilgoci z preparatu przy pomocy bibuły filtracyjnej
7. Nawarstwić preparat olejkiem immersyjnym, oglądać pod mikroskopem posługując się obiektywem immersyjnym (100x)
8. Określić liczbę form cylindrycznych i ziarniaków w każdym z 10. losowo wybranych pól widzenia
9. Określić ogólną liczbę bakterii (jtk/ml) w 1ml mleka o różnej świeżości
10. Wyniki obserwacji mikroskopowych zanotować w tabeli 37

Tabela 37

Liczebność bakterii w próbach mleka o różnej świeżości określana metodą bezpośredniego liczenia

Pole widzenia	Mleko prosto od krowy		Mleko po 48h w 20°C	
	ziarniaki	formy cylindryczne	ziarniaki	formy cylindryczne
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				
Średnia liczba w 1 polu widzenia				
liczba jtk/ml				

Wnioski:

Data

zaliczenie



ĆWICZENIE 28

TEMAT: LICZENIE KOMÓREK PRZY POMOCY KOMORY THOMA

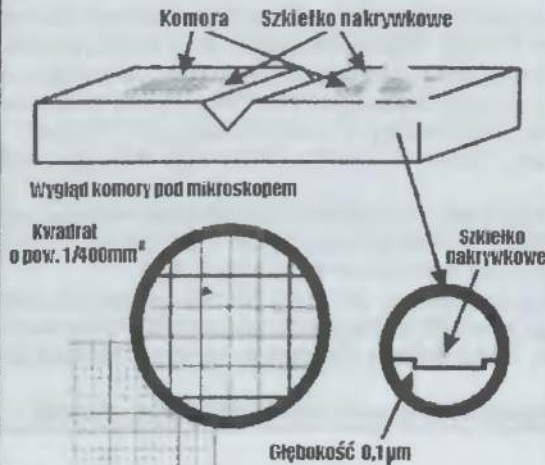


Komora Thoma (hemocytometr) przedstawiona została na rys. 19

Jest to gruba, szklana płytka z dwoma siatkami kwadratów o boku (a) $1/20$ mm i głębokości $0,1$ mm każdy. Powierzchnia jednego kwadratu (a^2) równa jest $1/400$ mm², zaś po przykryciu komory szkiełkiem nakrywkowym objętość każdego prostopadłościanu równa jest $1/400$ mm² x $0,1$ mm = $1/4000$ mm³. Każda z 2 siatek złożona jest z 400 identycznych kwadratów (20×20).

Rys. 19

Budowa komory Thoma



Liczba mikroorganizmów (x jtk) w 1 cm³ obliczyć wg wzoru:

$$x \text{ JKT/ cm}^3 = a \times 4 \times 10^6 \times R$$

gdzie:

a = średnia liczba komórek w 1 kwadraciku

4 x 10⁶ = przeliczenie objętości 1 kwadracika na 1 cm³

R = rozcieńczenie wyjściowego materiału

Zasada metody polega na liczeniu liczby komórek w losowo wybranych 20 kwadratach. Z uwagi na grubość komory i głębokość kwadratów komora pozwala na liczenie większych od bakterii mikroorganizmów, takich jak np., drożdże czy zarodniki lub strzępki grzybów. Do obliczeń stosować można także inny rodzaj komory – tzw. komorę Bürkera w której obliczanie ilości komórek wykonujemy podobnie jak w komorze Thoma. Do obliczeń ilości strzępek pleśni w takich produktach jak przecier pomidorowy stosuje się komorę Howarda.

Materiały:

1. Probówka z 24 h hodowlą drożdży (*Candida lipolitica*, *Candida utilis*)
2. Probówka z jałowym podłożem dla drożdży
3. Komora Thoma + szkiełko nakrywkowe
4. Eza z oczkiem
5. Błękit metylenowy z płynem rozjaśniającym
6. Mikroskop

Wykonanie:

1. Przytwierdzić szkiełko nakrywkowe do szkiełka z komorą Thoma
2. Ustawić siatkę komory Thoma na biegu promieni świetlnych mikroskopu, znaleźć siatkę przy powiększeniu obiektywu = 10x, przejść na powiększenie 40x. Nie zmieniać ustawienia mikroskopu. Zapamiętać położenie komory na stoliku mikroskopu
3. Dodać 1 kroplę barwnika z płynem rozjaśniającym do hodowli
4. Pobrać 1 oczko hodowli drożdży. Przytknąć do styku szkiełka nakrywkowego z komorą
5. Ustawić ostrość obrazu. W przypadku dużych liczebności, przygotować rozcieńczenie 10-tne wyjściowej hodowli przenosząc 1ml hodowli do 9 ml podłoża w probówce. Powtórzyć czynności wymienione w punkcie 1, 2 i 4
6. Policzyc liczbę komórek w 20 - 40 losowo wybranych kwadracikach. Ponieważ rozmieszczenie komórek w preparacie jest zwykle nierównomierne, dla zmniejszenia błędu obliczeń, liczbę średnią określać w oparciu o większą ilość losowo wybranych kwadratów
7. Wyniki z poszczególnych kwadracików zanotować w tabeli 38

Tabela 38

Określanie liczebności komórek w komorze Thoma

Nr kwadracika	Liczba komórek	Nr kwadracika	Liczba komórek
1		21	
2		22	
3		23	
4		24	
5		25	
6		26	
7		27	
8		28	
9		29	
10		30	
11		31	
12		32	
13		33	
14		34	
15		35	
16		36	
17		37	
18		38	
19		39	
20		40	
Średnia arytmetyczna z..... pól			

Wnioski:

Data

zaliczenie



ĆWICZENIE 29

TEMAT: BEZPOŚREDNIA METODA OZNACZANIA LICZBY BAKTERII PRZY POMOCY FILTRÓW MEMBRANOWYCH

Materiały:

1. Napój chłodzący, niegazowany po 48 h przetrzymywania otworzonej butelki w temp. pokojowej
2. Filtr membranowy o średnicy 4,5 cm i wielkości por 0,22 μm , aparat do filtracji
3. Pompa próżniowa, kolbka próżniowa
4. Szkiełko przedmiotowe, szkiełko nakrywkowe
5. Oranz akrydynowy, 0,1 % roztwór
6. Mikroskop epifluorescencyjny

Wykonanie:

1. Jałowy filtr membranowy umieszczony w osadce zwilżyć jałową wodą destylowaną (zapewnia to równomierne przyleganie filtra do aparatu)
2. Przesączyć 10 ml badanego napoju przez jałowy filtr membranowy
3. Nanieść na filtr 1ml roztworu oranżu akrydynowego, przesączyć
4. Nanieść na szkiełko przedmiotowe kroplę olejku immersyjnego
5. Umieścić na powierzchni wilgotny filtr (nie dopuścić do powstania pęcherzyków powietrza między filtrem a szkiełkiem)
6. Nawarstwić filtr 1 kroplą olejku immersyjnego
7. Określić ogólną liczbę bakterii w 10, losowo wybranych polach widzenia z uwzględnieniem komórek zabarwionych na zielono (żywe) i pomarańczowo (martwe)
8. Określić ogólną liczbę bakterii (jtk/ml) w 1 ml badanego napoju
9. Wyniki obserwacji mikroskopowych i obliczeń (określanie wielkości pola widzenia - patrz: MORFOLOGIA BAKTERII) zanotować w tabeli 39

Rys. 20



Tabela 39

Ogólna liczba bakterii w 1ml napoju określana metodą bezpośredniego liczenia na filtrach

Nr pola widzenia	Komórki żywe	Komórki martwe
1		
2		
3		
4		
5		
6		
7		
8		
9		
10		
średnia liczba w 1 polu widzenia		
Liczba jtk/ml		

Wnioski:

Data

zaliczenie



ĆWICZENIA

ĆWICZENIE 30

**TEMAT: OZNACZANIE OGÓLNEJ LICZBY DROBNOUSTROJÓW
W WODZIE METODĄ PŁYTKOWĄ**

Metodę tą stosuje się także do oznaczania liczby drobnoustrojów w napojach oraz żywności płynnej. Żywność stałą należy zhomogenizować z płynem do rozcieńczeń w stomacherze.

Materiały:

1. Próby wody pobranej z Zalewu Szczecińskiego
2. 3 x 3 płytki Petriego z agarem odżywczym
3. 3 x 3 jałowe płytki Petriego
4. Ciepłarki ustawione na 37°C i 20°C
5. Jałowe pipety i bagietki (głazeczki)
6. Kolbka z jałowym agarem odżywczym ostudzonym do 45°C
7. Po 4 probówki z płynem do rozcieńczeń (po 9 ml)

Wykonanie (patrz: Metoda płytkowa - sposób posiewu):

1. Przygotować kolejne rozcieńczenia dziesiętne badanej wody z Zalewu
2. Przenieść po 0,1 ml z rozcieńczeń 10^3 , 10^4 i 10^5 na powierzchnię AO na płytkach i rozprowadzić jałową bagietką po powierzchni. Płytki inkubować w 20°C/ 5 dni
3. Przenieść po 1 ml z rozcieńczeń 10^2 , 10^3 i 10^4 na dno jałowych płytek i zalać ostudzonym do ~ 45°C AO. Płytki inkubować w 37°C /24-48 h
4. Określić ogólną liczbę bakterii mezofilnych i psychrotrofowych w 1ml wody z Zalewu zgodnie z zasadą podaną: Metoda płytkowa - Sposób odczytu wyników posiewów - ad 1 i ad 2)
5. Wyniki odczytów zanotować w Tabeli 40

SPOSÓB ODCZYTU POSIEWÓW METODĄ PŁYTKOWĄ

ad1) posiewano po 0.1 ml z kolejnych 1 rozcieńczeń dziesiętnych, zatem:

$$\text{LICZBA jtk/g/ml} = L. \text{ WYROSŁYCH KOLONII} \times \text{ROZCIEŃCZENIE} \times 10$$

ad 2) posiewano po 1 ml z kolejnych rozcieńczeń dziesiętnych, zatem:

$$\text{LICZBA jtk/g/ml} = \text{LICZBA WYROSŁYCH KOLONII} \times \text{ROZCIEŃCZENIE}$$

Tabela 40

Ogólna liczba bakterii psychrotrofowych i mezofilnych w wodach Zalewu określana metodą płytkową

Posiane rozcieńczenie	Liczba wyrosłych kolonii					
	bakterie psychrofilne			bakterie mezofilne		
Nr płytki	1	2	3	1	2	3
10^2						
10^3						
10^4						
10^5						
X jtk/ml						

Wnioski:

Data

zaliczenie



ĆWICZENIE 31

TEMAT: OZNACZANIE OGÓLNEJ LICZBY DROBNOUSTROJÓW
W POWIETRZU METODĄ SEDYMENTACYJNĄ

Materiały:

1. Po 2 płytki Petriego o średnicy 10cm z agarem odżywczym (AO) i brzeczką zestaloną agarem (BA)

2. Ciepłarka ustawiona na 30°C

Wykonanie:

1. Otworzyć płytki i pozostawić odkryte przez 10 min.

2. Zamknąć płytki i ustawić dnem do góry w ciepłarce o temp. 30°C na 48h

3. Obliczyć ogólną liczbę bakterii i grzybów w 1 l (dm^3) powietrza wg wzoru (Omieleński):

$$x = \frac{a \times 100}{b \times k}, \quad \text{gdzie}$$

x = liczba bakterii (grzybów) w 10l (10 dm^3) powietrza,

a = średnia liczba kolonii z 2 płytek każdego z podłoży,

b = powierzchnia płytki w cm^2 ,

k = współczynnik czasu ekspozycji płytki
(5min - k=1; 10 min - k=2; 15 min - k=3),

100 = przelicznik powierzchni płytki na 100 cm^2

4. Wyniki zapisać w tabeli 41

W
A
Ż
N

Agar odżywczy stosuje się do oznaczania liczby bakterii zaś brzeczkę zestaloną agarem do oznaczania liczby drożdży i pleśni*.

* *brzeczką jest to ekstrakt wodny ze zmielonego, wcześniej podkiełkowanego jęczmienia, wykorzystywany przy produkcji piwa*

W nowoczesnych metodach oznaczania ilości drobnoustrojów w powietrzu stosuje się filtry membranowe. Filtry te wkłada się do urządzenia które zasysa 1 m³ powietrza. Następnie po filtracji filtr układa się na powierzchni podłoża agarowego które inkubuje się w odpowiedniej temperaturze. Po inkubacji oblicza liczbę wyrosłych na filtrze kolonii.

Tabela 41

Określanie ogólnej liczby bakterii i grzybów w powietrzu metodą sedymentacyjną

Grupa mikroorganizmów	Podłoże	Liczba wyrosłych kolonii	Liczba jtk w 10 dm ³ Powietrza
bakterie	AO 1		
	2		
grzyby	BO 1		
	2		

Wnioski:

Data

zaliczenie



ĆWICZENIA

ĆWICZENIE 32

TEMAT: OKREŚLANIE CZASU 1 GENERACJI WYBRANYCH SZCZEPÓW WZORCOWYCH



DEFINICJA

Czas jednej generacji jest to czas ubiegający od jednego podziału komórek do drugiego we właściwej fazie wzrostu logarytmicznego. W przypadku większości drobnoustrojów występujących w żywności tzw. drobnoustrojów zepsucia wynosi on w optymalnych warunkach 20 – 30 min. Znajomość czasu generacji pozwala na określenie terminu zepsucia produktów. Jest też on ważnym parametrem używanym w mikrobiologii prognostycznej (predictive microbiology) – dziale pozwalającym na matematyczne określanie trwałości produktów.

Materiały:

1. Aktywnie rosnące hodowle bulionowe (X) szczepów *E.coli*, *S.aureus* w fazie wzrostu logarytmicznego
2. 2 probówki z bulionem odżywczym po 9,99 ml (A i B)
3. Mikropipeta z jałowymi końcówkami na 200 μ l
4. Probówki z jałowym płynem fizjologicznym (po 9 ml)
5. Płytki z AO
6. Jałowe pipety 1ml i jałowe bagietki (głaszczki)
7. Mikro-shaker do mieszania materiału w probówkach

Wykonanie:

1. Przygotować wyjściowe hodowle szczepów wzorcowych (patrz: Materiały - punkt 1) przenosząc 0,01 ml hodowli X do probówki z 9,99 ml bulionu A, a następnie powtórzyć czynność przenosząc 0,01 ml hodowli A do probówki z 9,99 ml bulionu B. Na każdym z etapów dokładnie wymieszać materiał przy pomocy mikro-shakera
2. Przygotować 3 kolejne rozcieńczenia dziesiętne materiału B wykorzystując w tym celu probówki z jałowym płynem fizjologicznym (R 10, 100, 1-)
3. Wykonać posiew z kolejnych rozcieńczeń dziesiętnych na powierzchnię AO na płytkach. (Oznaczyć płytki symbolem 0, numerem szczepu, stanowiska i grupy oraz rozcieńczeniem)
4. Materiał B inkubować w 37°C przez 2 i 4 h
5. Po każdym z interwałów czasowych wykonywać posiew ilościowy na AO z rozcieńczeń 100, 1- i 10- oraz 1-, 10- i 100-, odpowiednio dla materiału inkubowanego przez 2 i 4 h
6. Płytki oznaczyć, odpowiednio, symbolem 2 i 4 oraz numerem szczepu, stanowiska i grupy oraz rozcieńczeniem
7. Kolejno wykonywane posiewy inkubować w 37°C/24-48h
8. Policzyc wyrosłe kolonie. Wyniki zanotować w Tabeli 42
9. Dla każdego z interwałów czasowych (0, 2 i 4) określić liczbę jtk /ml aktywnie rosnącej hodowli

Czas 1 generacji szczepów wzorcowych wyznaczyć wg wzoru:

$$g = \frac{(t - t_0) \lg 1,6}{\lg N - \lg N_0}$$

gdzie: g = czas 1 generacji,

N_0 = liczebność populacji w punkcie wyjścia t_0 ,

N = liczebność populacji po czasie t (odpowiednio po 2 lub 4 godzinach)

$t - t_0$ = czas między jednym a drugim oznaczeniem (2 lub 4 h)

Wyniki obliczeń zanotować w tabeli 42

Tabela 42

Odczyt czasu 1 generacji wybranych szczepów testowych w optymalnych warunkach

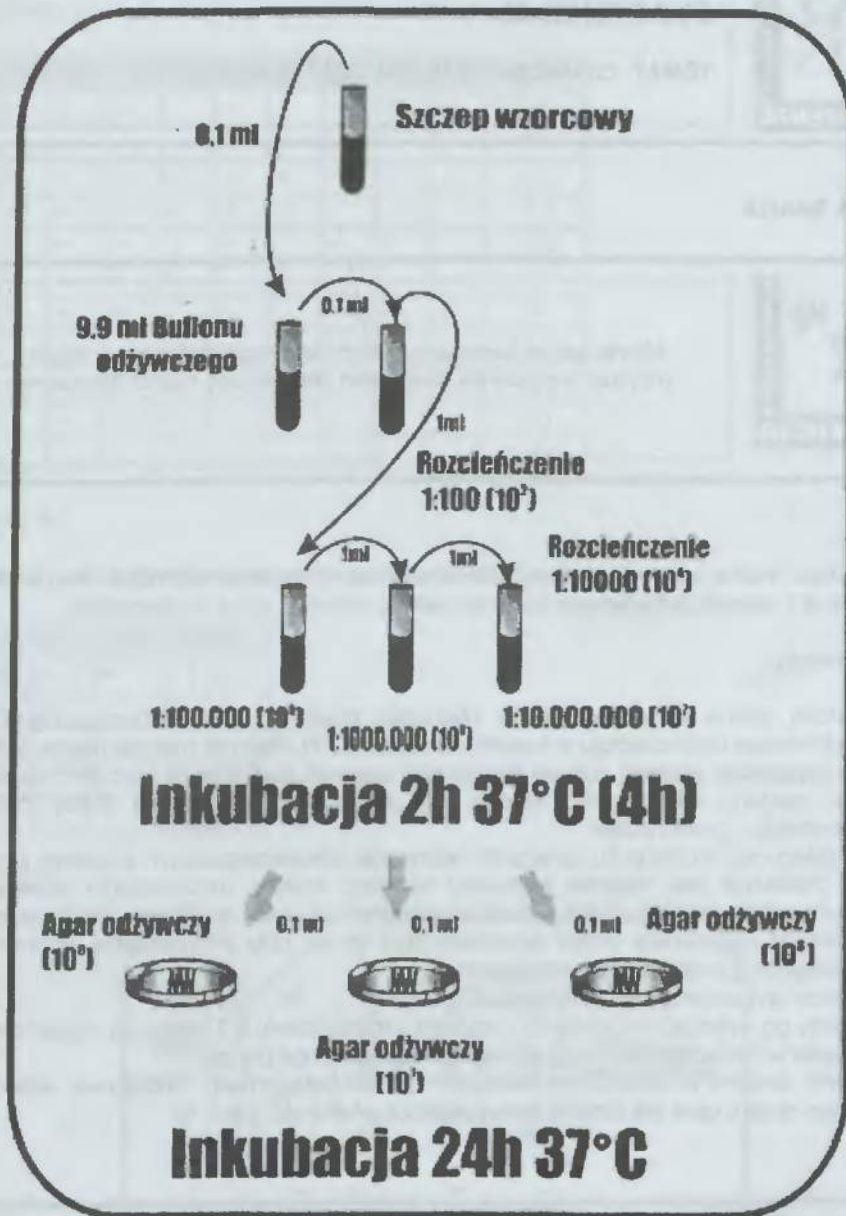
Szczep	Liczba wyrosłych kolonii					
	<i>Escherichia coli</i>			<i>Staphylococcus aureus</i>		
Czas inkubacji w 37°C	0h	2h	4h	0h	2h	4h
Rozcieńczenie						
10						
100						
1-						
10-						
100-						
Liczba jtk/ml						
g						

Wnioski:

Data

zaliczenie

Rys. 21




ĆWICZENIA
ĆWICZENIE 33
TEMAT: OZNACZANIE MIANA COLI W MLEKU
METODA MIANA

DEFINICJA

Miano jest to najmniejsza ilość badanego materiału w której znajduje się przynajmniej jeden interesujący nas drobnoustroj.

Im wartość miana jest wyższa tym materiał zawiera mniej drobnoustrojów. Np. miano 1 oznacza że w 1 jednostce badanego materiału jest co najmniej jeden drobnoustroj.

Zasada metody:

1. Metodą miana oznaczać można obecność dowolnej grupy drobnoustrojów lub konkretnego drobnoustroju w badanym materiale. W praktyce metodą miana określa się najczęściej bakterie jelitowe *Escherichia coli* oraz podobne do tego drobnoustroju tzw. bakterie kolipodobne. Stosuje się ją także do określania liczby bakterii *Salmonella* i gronkowców
2. W zależności od kierunku oznaczeń i wymogów mikrobiologicznych punktem wyjścia do posiewów jest materiał wyjściowy lub jego kolejne rozcieńczenia dziesiętne. W przypadku posiewu ilości większych-równych od 1g/ml posiewany materiał może wymagać regeneracji przed posiewem (ma to na celu przywrócenie sprawności fizjologicznej uszkodzonym komórkom)
3. Posiew wykonuje się w 1 powtórzeniu
4. Należy go wykonać (w przypadku posiewu z rozcieńczeń) z 3 kolejnych rozcieńczeń.
5. Posiew w metodzie miana wykonywany jest na podłoże płynne
6. Wynik dodatni to zmętnienie podłoża + ewentualne zmiany dodatkowe widoczne gołym okiem, takie jak zmiana barwy podłoża, obecność gazu, itp.


WSKAZÓWKA

Im wyższa wartość miana tym mniej drobnoustrojów znajduje się w badanym materiale!

Tabela 43

Przykłady odczytu miana przy posiewie 100 g/ml próby z różną konfiguracją podprób

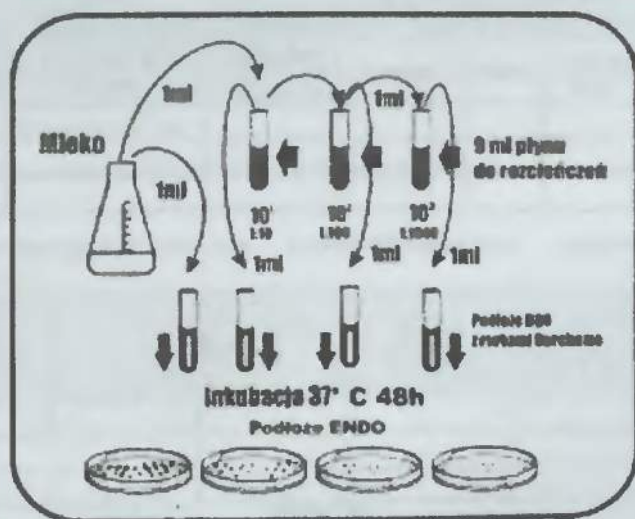
10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	Miano
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	↑ 10
+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	11,1
+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	12,2
+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	14,4
+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	16,6
+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	20
+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	25
+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	33,3
+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	50
+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	> 100

Tabela 44

Przykłady odczytu miana przy różnych wariantach posiewów

10	1	0,1	0,01	Miano
+	+	+	+	↑ 0,01
+	+	+	-	0,1
+	+	-	-	1
+	-	-	-	10
-	-	-	-	> 10

Rys. 22



Materiały:

1. Próby mleka inokulowane szczepem wzorcowym *E. coli*
2. Po 4 probówki z płynem do rozcieńczeń (po 9 ml)
3. Jałowe pipety
4. Probówki z podłożem BGB i rurkami Durhama
5. Ciepłarka ustawiona na 37°C
6. Dermatograf
7. Płytki z podłożem Endo

Wykonanie (patrz: Metoda miana - zasada metody):

1. Przygotować kolejne rozcieńczenia dziesiętne badanych prób mleka
2. Przenieść po 1 ml materiału nierozcieńczonego oraz po 1 ml z rozcieńczeń 10^1 , 10^2 i 10^3 do probówek z podłożem BGB. Probówki oznakować posianym rozcieńczeniem
3. Posiewy inkubować w 37°C /24-48 h
4. Odczytać wyniki posiewów; wynik dodatni = zmętnienie podłoża, gaz w rurkach Durhama, zmiana barwy podłoża z zielonej na żółtą
5. Wynik odczytu zanotować w tabeli 45
6. Potwierdzanie wyników : materiał z probówek z potencjalnie dodatnim wynikiem (obserwowane wszystkie zmiany lub któraś z wymienionych zmian) przesiać do pojedynczych kolonii na podłożu Endo. Posiewy inkubować w 37°C/ 24-48h
7. Typowe kolonie *E.coli* na podłożu Endo - ciemnoczerwone z taką zmianą barwy podłoża pod wzrostem, z metalicznym połyskiem lub różowe z ciemniejszym centrum
8. Określić miano coli w mleku; wyniki zanotować w tabeli 45

Tabela 45**Miano coli w mleku**

Posiane Rozcieńczenie	Zmiany widoczne w podłożu BGB			Wynik odczytu	Wynik potwierdzenia na podłożu Endo	Miano coli
	zmętni- enie	gaz	barwa			
10^1						
10^2						
10^3						

Wnioski:

Data

zaliczenie



ĆWICZENIE 34

TEMAT: OZNACZANIE MIANA BEZTLENOWYCH LASECZEK PRZETRWAŁNIKUJĄCYCH REDUKUJĄCYCH SIARCZANY W PRZYPRAWACH

W przewodach pokarmowych zwierząt i człowieka oprócz pałeczek *E. coli* i pałeczek kolipodobnych występują także duże ilości laseczek przetrwalnikujących, w tym także laseczek jadu kiełbasianego. Przetrwalniki te obecne są także w bardzo dużych ilościach, $>1 \times 10^6/g$, w przyprawach które dodaje się do wędlin i innych potraw. Stąd ich nadmierna ilość dyskwalifikuje przyprawy. Ponadto obecność przetrwalników laseczek beztlenowych w wodzie pitnej wskazuje na zanieczyszczanie kałowe które miało miejsce w przeszłości, gdy zanikły już inne wskaźniki zanieczyszczenia kałowego jak podwyższony poziom *E. coli*

Materiały:

1. Różne przyprawy dostępne w handlu detalicznym
2. Po 6 probówki z płynem do rozcieńczeń (po 9 ml)
3. Jałowe pipety
4. Jałowe duże probówki
5. Kolbka z jałowym podłożem Wrzosa
6. Kolbka z jałowym 2% agarą wodnym
7. Ciepłarka ustawiona na $37^\circ C$, waga laboratoryjna.
8. Dermatograf

Wykonanie (patrz: Metoda miana - zasada metody)

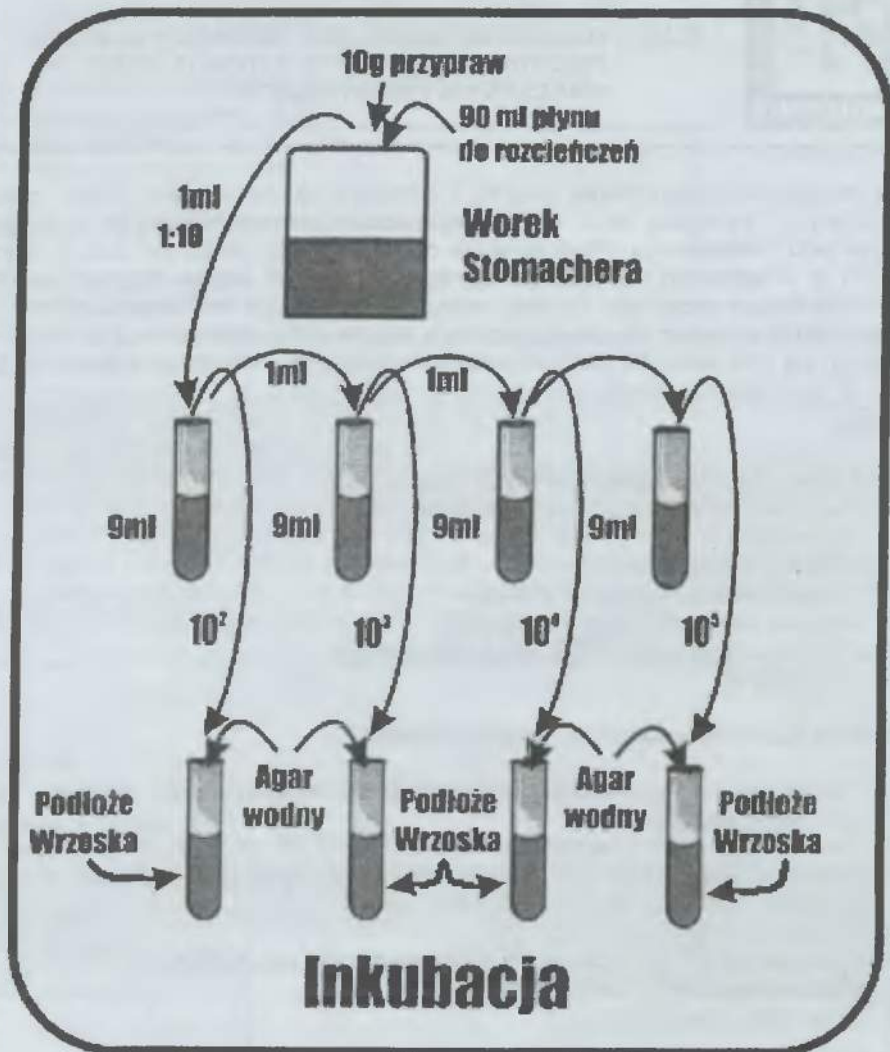
1. Przygotować kolejne rozcieńczenia dziesiętne badanych prób przypraw (pieprz, majeranek, papryka)
2. Przenieść po 1 ml z rozcieńczeń $10^2, 10^3, 10^4, 10^5, 10^6$ do jałowych probówek, zalać podłożem, nawarstwić 2-3 cm warstwą agaru wodnego. Probówki oznakować posianym rozcieńczeniem, nr stanowiska i grupy
3. Posiewy inkubować w $37^\circ C$ / 3 dni
4. Odczytać wyniki posiewów; wynik dodatni = zaciemnienie podłoża
5. Wynik odczytu zanotować w tabeli 46
6. Potwierdzanie wyników

Tabela 46

Miano beztlenowych laseczek przetrwalnikujących redukujących siarczany w przyprawach

Posiane Rozcieńczenie	Przyprawa	Wynik odczytu	Wynik potwierdzenia	Miano
10^2				
10^3				
10^4				
10^5				
10^6				

Rys. 23



Wnioski:

Data

zaliczenie



ĆWICZENIE 35

TEMAT: OZNACZANIE NPL BAKTERII Z GRUPY COLI
W WODZIE

METODA NPL (NAJBARDZIEJ PRAWDOPODOBNEJ LICZBY)

Metoda statystyczna

Zasada metody

1. Metodą NPL oznaczać można liczebność dowolnej grupy drobnoustrojów lub konkretnego drobnoustroju w badanym materiale
2. W zależności od kierunku oznaczeń i wymogów mikrobiologicznych punktem wyjścia do posiewów jest materiał wyjściowy lub jego kolejne rozcieńczenia dziesiętne. W przypadku potrzeby prowadzenie badań w kierunku drobnoustrojów o szczególnym znaczeniu (np. bakterii chorobotwórczych czy wskaźnikowych) posiew może dotyczyć ilości równych lub większych od 1g/ml. Ponadto posiewany materiał może wymagać regeneracji przed posiewem ilościowym (ma to na celu przywrócenie sprawności fizjologicznej uszkodzonym komórkom)
3. Posiew należy wykonać przynajmniej w 2 powtórzeniach (zwykle są to 3 lub 5 powtórzeń)
4. Należy go wykonać minimum (w przypadku posiewu z rozcieńczeń) z 3 kolejnych rozcieńczeń
5. Posiew w metodzie NPL wykonywany jest na podłoże płynne
6. Wynik dodatni, to zwykle zmętnienie podłoża + ewentualne zmiany dodatkowe widoczne gołym okiem, takie jak zmiana barwy podłoża, obecność gazu, itp.
7. Przy odczycie wyników określa się ilość wyników dodatnich przy posiewie danej ilości (danego rozcieńczenia) na maksymalną ilość możliwych wyników dodatnich (zależy to od ilości powtórzeń, np. przy 5 powtórzeniach maksymalna możliwa ilość wyników dodatnich równa jest 5)
8. Wyniki odczytywane są ze specjalnych tabel. Wybór tabeli zależy od ilości zastosowanych powtórzeń (patrz: tabela 47, 48)

Tabela 47

NPL mikroorganizmów w jednostce badanego materiału dla wariantu posiewu w dwóch powtórzeniach

1	0,1	0,01	NPL w 1 ml / g /
0	0	0	< 0,45
0	0	1	0,45
0	0	2	0,9
0	1	0	0,46
0	1	1	0,92
0	1	2	1,4
0	2	0	0,94
0	2	1	1,4

0	2	2	1,9
1	0	0	0,6
1	0	1	1,2
1	0	2	1,9
1	1	0	1,3
1	1	1	2,0
1	1	2	2,8
1	2	0	2,1
1	2	1	2,9
1	2	2	3,7
2	0	0	2,3
2	0	1	5,0
2	0	2	9,5
2	1	0	6,2
2	1	1	13
2	1	2	21
2	2	0	24
2	2	1	70
2	2	2	> 70

Tabela 48

NPL mikroorganizmów w jednostce badanego materiału dla wariantu posiewu w trzech powtórzeniach

1	0,1	0,01	NPL w 1 ml / g /		1	0,1	0,01	NPL w 1 ml / g /
0	0	0	< 0,3		2	0	0	0,91
0	0	1	0,3		2	0	1	1,4
0	0	2	0,6		2	0	2	2
0	0	3	0,9		2	0	3	2,6
0	1	0	0,3		2	1	0	1,5
0	1	1	0,61		2	1	1	2
0	1	2	0,92		2	1	2	2,7
0	1	3	1,2		2	1	3	3,4
0	2	0	0,62		2	2	0	2,1
0	2	1	0,93		2	2	1	2,8
0	2	2	1,2		2	2	2	3,5
0	2	3	1,6		2	2	3	4,2
0	3	0	0,94		2	3	0	2,9
0	3	1	1,3		2	3	1	3,6
0	3	2	1,6		2	3	2	4,4
0	3	3	1,9		2	3	3	5,3
1	0	0	0,36		3	0	0	2,3

1	0	1	0,72	3	0	1	3,9
1	0	2	1,1	3	0	2	6,4
1	0	3	1,5	3	0	3	9,5
1	1	0	0,73	3	1	0	4,3
1	1	1	1,1	3	1	1	7,5
1	1	2	1,5	3	1	2	12
1	1	3	1,9	3	1	3	16
1	2	0	1,1	3	2	0	9,3
1	2	1	1,5	3	2	1	15
1	2	2	2	3	2	2	21
1	2	3	2,4	3	2	3	29
1	3	0	1,6	3	3	0	24
1	3	1	2	3	3	1	46
1	3	2	2,4	3	3	2	110
1	3	3	2,9	3	3	3	> 110

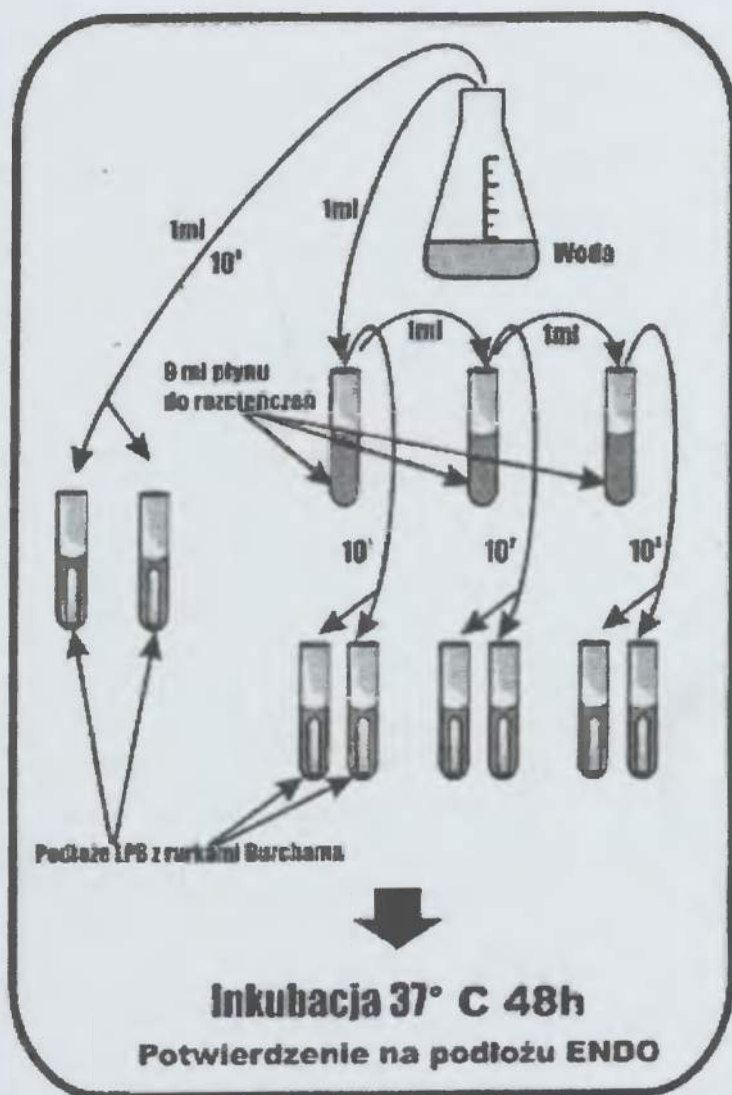
Materiały:

1. Próby mleka inokulowane szczepem wzorcowym *E.coli*
2. Po 4 probówki z płynem do rozcieńczeń (po 9 ml)
3. Jałowe pipety
4. Probówki z podłożem LPB i rurkami Durhama
5. Ciepłarka ustawiona na 37°C
6. Dermatograf
7. Płytki z podłożem Endo

Wykonanie (patrz: metoda NPL - zasada metody)

1. Przygotować kolejne rozcieńczenia dziesiętne badanych prób wody
2. Przenieść po 1 ml materiału nierozcieńczonego oraz po 1 ml z rozcieńczeń 10^1 , 10^2 i 10^3 do probówek z podłożem LPB. Posiew wykonać w 2 powtórzeniach. Probówki oznakować posianymi rozcieńczeniami
3. Posiewy inkubować w 37°C/ 24-48 h
4. Odczytać wyniki posiewów; wynik dodatni = zmętnienie podłoża, gaz w rurkach Durhama, zmiana barwy podłoża z fioletowej na żółtą
5. Wynik odczytu zanotować w tabeli 49
6. Potwierdzanie wyników; materiał z probówek z potencjalnie dodatnim wynikiem (obserwowane wszystkie zmiany lub któraś z wymienionych zmian) przesiać do pojedynczych kolonii na podłożu Endo. Posiewy inkubować w 37°C /24-48h
7. Typowe kolonie *E.coli* na podłożu Endo - ciemnoczerwone z taką zmianą barwy podłoża pod wzrostem, z metalicznym połyskiem lub różowe z ciemniejszym centrum
8. Określić NPL bakterii z grupy coli w wodzie; wyniki zanotować w tabeli 49

Rys. 24



Wnioski:

data.....

zaliczono.....





C 46858

Biblioteka Główna
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny
Księgozbiór Przyrodniczy

C-46858



520-000038366