



Część II – praktyczna



SKRYPT DLA STUDENTÓW BIOLOGII

**Antoni Różalski
Beata Bartodziejska
Maria Lipińska
Danuta Krajewska-Pietrasik
Joanna Radziejewska-Lebrecht
Stanisław Walisch**

ĆWICZENIA Z MIKROBIOLOGII OGÓLNEJ

WYDANIE V

Antoni Różalski
Beata Bartodziejska
Maria Lipińska
Danuta Krajewska-Pietrasik
Joanna Radziejewska-Lebrecht
Stanisław Walisch

Część II – praktyczna

ĆWICZENIA Z MIKROBIOLOGII OGÓLNEJ

● SKRYPT DLA STUDENTÓW BIOLOGII

WYDANIE V



WYDAWNICTWO
UNIwersytetu
ŁÓDZKIEGO

ŁÓDŹ 2007

REDAKCJA NAUKOWO-DYDAKTYCZNA

„FOLIA BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA”

Zofia Józwiak, Zofia Szweda-Lewandowska

RECENZENT

Helena Oberman

REDAKTOR WYDAWNICTWA UŁ

Małgorzata Szymańska

REDAKTOR TECHNICZNY

Wiesława Lubiech

KOREKTORZY

Danuta Bąk, Anna Ciach

OKŁADKĘ PROJEKTOWAŁA

Barbara Grzejszczak

Zdjęcia wykorzystane na okładce: © Depositphotos.com/trans961

© Copyright by Uniwersytet Łódzki, Łódź 2007

Wydane przez Wydawnictwo Uniwersytetu Łódzkiego

Wydanie V (dodruk). W.04182.14.3.S

ISBN 978-83-7171-635-5

Wydawnictwo Uniwersytetu Łódzkiego

90-131 Łódź, ul. Lindleya 8

www.wydawnictwo.uni.lodz.pl

e-mail: ksiegarnia@uni.lodz.pl

tel. (42) 665 58 63, faks (42) 665 58 62

Druk i oprawa: Quick Druk

SPIS TREŚCI

Zasady pracy z drobnoustrojami	5
Ćwiczenie 1. Temat: Mikroskopy. Mikrometry	8
Ćwiczenie 2. Temat: Metody hodowli drobnoustrojów	12
Ćwiczenie 3. Temat: Podstawy diagnostyki drożdży	14
Ćwiczenie 4. Temat: Cytologia komórki drożdżowej	16
Ćwiczenie 5. Temat: Diagnostyka bakterii – morfologia mikroskopowa i makroskopowa bakterii	19
Ćwiczenie 6. Temat: Cytologia komórki bakteryjnej. Morfologia mikroskopowa bakterii. Część I	21
Ćwiczenie 7. Temat: Cytologia komórki bakteryjnej. Część II	24
Ćwiczenie 8. Temat: Mutacja S → R	26
Ćwiczenie 9. Temat: Morfologia i cytologia promieniowców	28
Ćwiczenie 10. Temat: Metody liczenia drobnoustrojów	30
Ćwiczenie 11. Temat: Wpływ czynników fizycznych i chemicznych na drobnoustroje. Część I	35
Ćwiczenie 12. Temat: Wpływ czynników fizycznych i chemicznych na drobnoustroje. Część II	37
Ćwiczenie 13. Temat: Metabolizm bakterii. Część I. Źródła węgla i azotu wykorzystywane przez bakterie	41
Ćwiczenie 14. Temat: Metabolizm bakterii. Część II. Właściwości glikolityczne i lipolityczne bakterii	43
Ćwiczenie 15. Temat: Metabolizm bakterii. Część III. Właściwości proteolityczne i oksydoredukcyjne bakterii	45
Ćwiczenie 16. Temat: Metabolizm. Część IV. Mikrometody i szybkie testy do badania właściwości biochemicznych drobnoustrojów	47
Ćwiczenie 17. Temat: Bakterie fotosyntetyzujące	49
Ćwiczenie 18. Temat: Bakterie halofilne	51
Ćwiczenie 19. Temat: Wzajemne oddziaływania pomiędzy drobnoustrojami. Część I. Typy oddziaływania pośredniego	53
Ćwiczenie 20. Temat: Wzajemne oddziaływania pomiędzy drobnoustrojami. Część II. Praktyczne wykorzystanie zjawiska antybiozy	58
Ćwiczenie 21. Temat: Wzajemne oddziaływanie pomiędzy drobnoustrojami. Część III. Bakteriocyny	63
Ćwiczenie 22. Temat: Bakteriofagi jako przykład bezpośredniego oddziaływania pomiędzy drobnoustrojami	67
Ćwiczenie 23. Temat: Naturalne środowiska bytowania drobnoustrojów: woda, gleba i powietrze	71
Ćwiczenie 24. Temat: Przykłady praktycznego wykorzystania drobnoustrojów. Fermentacje: alkoholowa i mlekowa oraz biosynteza kwasu cytrynowego	74
Ćwiczenie 25. Temat: Praktyczne zastosowanie mikrobiologii. Badanie stopnia zanieczyszczenia kosmetyków drobnoustrojami	80
Literatura pomocnicza i uzupełniająca	83

ZASADY PRACY Z DROBNOUSTROJAMI

Przepisy BHP obowiązujące w pracowni mikrobiologicznej

1. W pracowni obowiązuje noszenie odzieży ochronnej. Odzież wierzchnią należy zostawić w szatni.

2. Do laboratorium nie wolno wносить żadnych przedmiotów poza niezbędnymi do pracy. Teczki i torebki pozostawić w przeznaczonym do tego miejscu.

3. Spożywanie posiłku oraz palenie tytoniu w pracowni jest zabronione.

4. W czasie pracy z materiałem zakaźnym konieczna jest jak najdalej idąca ostrożność. Wszystkie czynności należy wykonywać zgodnie z ogólnie przyjętymi zasadami badań mikrobiologicznych.

5. Materiałem do badań lub hodowli drobnoustrojów należy manipulować jedynie za pomocą odpowiednich instrumentów. W przypadku zniszczenia próbki materiału zakaźnego lub hodowli drobnoustrojów (rozbicia, zgniecenia) należy, po zawiadomieniu prowadzącego zajęcia, niezwłocznie przystąpić do dezynfekcji.

6. W czasie wykonywania posiewów należy dokładnie opalać eżę (ogrzewać do czerwoności na całej długości). Hodowle bakteryjne, próbki z posiewami oraz materiałem zakaźnym należy ustawiać w statywach, a nie kłaść na stole. Do posiewów hodowli płynnych stosować pipety, których wylot (ustnik) zabezpieczony jest wacikiem. Pipetą pasterowską (również zabezpieczoną wacikiem) posługiwać się jedynie za pomocą „smoczka”, pompki gruszkowej lub nasadki na pipetę. Do tego celu można również użyć pipety automatycznej (z jałowymi końcówkami). Nie wolno pipetować pipetą pasterowską za pomocą ust. Szczególną ostrożność zachować przy posiewaniu hodowli grzybów i promieniowców, zwłaszcza kiedy pracuje się z hodowlami silnie zarodnikującymi. Specjalne względy bezpieczeństwa należy zachować podczas pracy z drobnoustrojami chorobotwórczymi.

7. Sprzęt laboratoryjny (pipety, bagietki, szkiełka mikroskopowe), po wykorzystaniu, należy wrzucać do specjalnie do tego przeznaczonych naczyń (słoików) z płynem dezynfekującym.

8. Zużyte hodowle drobnoustrojów oraz naczynia używane w trakcie pracy (próbówki, kolby, płytki) należy odłożyć do przygotowanych w tym celu wanienek, wiader lub koszy.

9. W pracowni powinny znajdować się łatwo dostępne: apteczka pierwszej pomocy, gaśnica przeciwpożarowa i koc azbestowy oraz płyn do dezynfekcji ogólnej i osobistej.

10. Po zakończeniu pracy należy zdezynfekować stół laboratoryjny, pozostawić w porządku mikroskop, a używany sprzęt położyć na swoje miejsce.

11. Z pracowni nie wolno wynosić badanego materiału, hodowli i preparatów.

12. Po zakończeniu zajęć należy sprawdzić, czy został wyłączony gaz w palniku, woda na stanowisku pracy oraz wykorzystywana aparatura (zasilacze do mikroskopów, łaźnie wodne i inne urządzenia).

13. Przed wyjściem z sali należy odkazić, a następnie umyć ręce. Fartuch ochronny powinien pozostać w szafie przeznaczonej dla studentów.

Regulamin zajęć dydaktycznych w Instytucie Mikrobiologii i Immunologii Uniwersytetu Łódzkiego

1. Praca w laboratorium mikrobiologicznym, ze względu na swoją specyfikę, wymaga spokoju i skupienia. Z tych powodów w czasie ćwiczeń laboratoryjnych nie należy bez potrzeby chodzić po sali, wykonywać zbyt gwałtownych ruchów, prowadzić rozmów itp.

2. Wszystkie zajęcia objęte są dyscypliną studiów zgodnie z *Regulaminem studiów*.

3. Przed przystąpieniem do ćwiczeń student zobowiązany jest przygotować się teoretycznie, zgodnie z podanym piśmiennictwem. Brak należytego przygotowania może spowodować niedopuszczenie do wykonywania ćwiczeń, a tym samym ich niezaliczenie.

4. W przypadku spóźnienia o dopuszczeniu do wykonywania ćwiczenia decyduje prowadzący zajęcia.

5. Każde ćwiczenie należy protokołować. Sposób protokołowania ustala prowadzący zajęcia.

6. Poszczególne ćwiczenia powinny być zaliczone (podpisane w zeszycie) przez prowadzącego zajęcia. Zaliczenie odbywa się na podstawie oceny przygotowania teoretycznego, pracy i protokołu doświadczeń i obserwacji.

7. Zaliczenie pracowni (końcowe zaliczenie ćwiczeń) odbywa się na koniec semestru na podstawie ocen uzyskanych w trakcie zajęć i stopni ze sprawdzianów teoretycznych i praktycznych.

8. Ćwiczenie(a) opuszczone, usprawiedliwione (nie więcej niż dwa w semestrze lub trzy na rok) student powinien zaliczyć teoretycznie. Sposób zaliczenia ustala prowadzący zajęcia.

9. Szczegółowe zasady zaliczenia ustalają prowadzący zajęcia w porozumieniu z kierownikiem ćwiczeń, tj. osobą prowadzącą wykład lub kierownikiem katedry lub zakładu.

10. Należy stosować się do wszystkich przepisów regulaminu BHP oraz wykonywać wszystkie polecenia prowadzących zajęcia.

11. Sprawy sporne lub nie regulowane w niniejszym regulaminie rozstrzyga kierownik katedry lub zakładu.

Ćwiczenie 1

Temat: Mikroskopy. Mikrometry

Wprowadzenie

W trakcie ćwiczeń studenci zostaną zapoznani z budową i działaniem różnych typów mikroskopów oraz z metodami pomiarów obiektów mikroskopowych, tj. komórek bakterii i drożdży. Budowa różnych typów mikroskopów, a także zasady ich działania oraz przeznaczenie zostały omówione teoretycznie w rozdziale 6 części I skryptu.

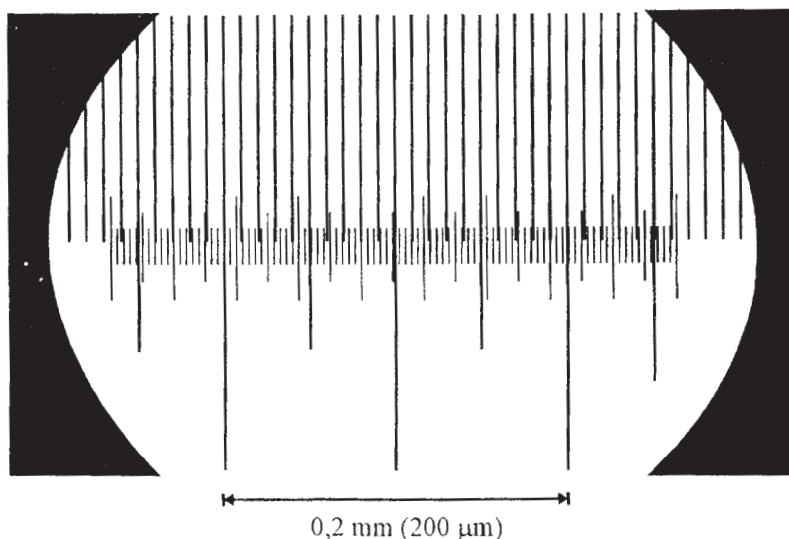
Na ćwiczeniach z mikrobiologii posługujemy się mikroskopem świetlnym. Poniżej zamieszczono uwagi praktyczne do używania tego typu mikroskopu.

1. Mikroskop powinien być utrzymany w czystości, dotyczy to zwłaszcza jego części optycznych.
2. Po zakończeniu pracy należy go przykryć lub schować do szafki (w pracowni do wspólnej szafy).
3. Mikroskop należy chronić przed działaniem kwasów, zasad i rozpuszczalników organicznych.
4. Powierzchnię soczewek należy czyścić, posługując się papierkiem japońskim lub miękką ściereczką.
5. Obiektywy immersyjne po pracy należy oczyścić z olejku suchą szmatką. Bez potrzeby nie należy ich wykręcać.

Pomiaru obiektów pod mikroskopem dokonuje się przy użyciu mikrometru obiektywowego i mikrometru okularowego. Mikrometr obiektywowy stanowi szkiełko podstawowe z wygrawerowaną w środku podziałką długości 1 lub 2 mm, która podzielona jest na dziesiątne i setne części milimetra. Odległość pomiędzy dwiema kreseczkami skali wynosi 0,01 mm (10 μm). Za pomocą tego mikrometru dokonuje się kalibracji mikrometru okularowego, którego skala podzielona jest na 50 lub 100 równych odcinków, z których co dziesiąty jest numerowany. Mikrometr okularowy umieszcza się na przysłonie,

znajdującej się wewnątrz okularu. Sposób kalibrowania skali okularowej i pomiaru wielkości komórek pod mikroskopem przedstawiono poniżej w punktach.

1. Mikrometr obiektywowy umieszcza się na stoliku mikroskopu.
2. Należy odnaleźć w polu widzenia skalę obiektywową, przy użyciu obiektywu i okularu o powiększeniu $10\times$.
3. Wstawić do okularu mikrometr okularowy i ustawić okular tak, aby obie skale były równoległe (rys. 1).



Rys. 1. Kalibrowanie mikrometru okularowego (objaśnienia w tekście)

4. Skalę obiektywową przesunąć tak, aby jej pierwsza, dłuższa kreska pokrywała się z numerowaną kreską skali okularowej. Powinno to mieć miejsce na lewo od środka pola widzenia. Następnie szukamy pokrywających się podziałek obu skal z prawej strony pola widzenia.

5. Należy policzyć liczbę kresek podziałki obiektywowej, znajdujących się pomiędzy pokrywającymi się skrajnymi liniami obu skal. Obliczając stosunek liczby podziałek skali obiektywowej do liczby podziałek skali okularowej otrzymujemy mikrometryczną wartość jednej działki skali mikrometru okularowego (dla danego okularu i danego obiektywu).

6. Następnie należy zastąpić skalę obiektywową preparatem bakterii lub drożdży i policzyć liczbę podziałek skali okularowej przypadających na komórkę (jej długość i szerokość, ewentualnie średnicę). Liczba otrzymana

po przemnożeniu tej wartości przez ustaloną uprzednio wartość skali okularowej da nam wielkość komórki w μm .

Część teoretyczna

1. Zapoznanie studentów z przepisami BHP i zasadami pracy w pracowni.
2. Mikroskopy – typy, budowa, zasady użycia i zastosowanie (mikroskop świetlny, kontrastowo-fazowy, fluorescencyjny, z ciemnym polem widzenia, polaryzacyjno-interferencyjny, elektronowy transmisyjny i skaningowy).
3. Praca z mikroskopem świetlnym przypomnienie zasad prawidłowej obsługi i konserwacji.

Część praktyczna

Dzień I

1. Praca z mikroskopem świetlnym – ustawienie mikroskopu, obliczenie zdolności rozdzielczej dla wszystkich obiektywów.
2. Obliczenie powierzchni pola widzenia mikroskopu przy użyciu mikrometru obiektywowego (uzyskane wyniki zamieścić w tabeli – patrz niżej).
4. Pokaz mikroskopu fluorescencyjnego i z ciemnym polem widzenia.

Dzień II

1. Mikroskop elektronowy – budowa, zasada działania, przygotowanie preparatu, obserwacje preparatów, zastosowanie mikroskopu (zajęcia w pracowni mikroskopu elektronowego).
2. Kalibracja mikrometru okularowego i pomiar wielkości komórki drożdżowej i bakteryjnej przy jego użyciu.
3. Pomiar wielkości komórki drożdżowej przy zastosowaniu papierka milimetrowego. Sposób wykonania pomiaru wyjaśni prowadzący zajęcia.

Tabela 1.1. Obliczanie zdolności rozdzielczej
i pola widzenia mikroskopu

Obiektyw	$d = \frac{\lambda}{NA}$	$S = \Pi r^2$
10 ×		
40 ×		
60 ×		
90 ×		
100 ×		

d – zdolność rozdzielcza mikroskopu, NA – apertura numeryczna,
 λ – 0,55 μm – długość fali świetlnej, r – promień pola widzenia.

Obliczanie rzeczywistej wielkości komórki drożdżowej:

$$\text{wymiar rzeczywisty} = \frac{\text{wymiar pozorny (w mm)} \times 1000}{\text{powiększenie mikroskopu}} (\mu\text{m})$$

Ćwiczenie 2

Temat: Metody hodowli drobnoustrojów

Wprowadzenie

Na zajęciach zostaną zaprezentowane podstawowe metody hodowli tlenowców i beztlenowców. Zagadnienia z tym związane zostały wyczerpująco omówione od strony teoretycznej w rozdziale 8 części I skryptu.

Część teoretyczna

1. Podłoża i warunki optymalne do hodowli drobnoustrojów.
2. Hodowla statyczna, napowietrzana, ciągła, synchronizowana.
3. Hodowle beztlenowców – metody zapewnienia warunków beztlenowych.

Część praktyczna

Dzień I

1. Posiew *Escherichia coli* na skos agarowy.
2. Posiew *Saccharomyces cerevisiae* do kolb z brzezką (kolby inkubować w cieplarni na wytrząsarce – hodowla napowietrzana lub w cieplarni – hodowla zwykła) i na płytce brzezkowej.
3. Posiew *Clostridium sporogenes* lub *Clostridium perfringens* na podłoże Wrzoska, płytkę Fortnera, płytkę krwawą (do anaerostatu), bulion cukrowy pod parafiną, bulion cukrowy (korek beztlenowy), słupek agarowy.

Dzień II

1. Opis wzrostu posianych drobnoustrojów.