

dr hab. Mariola Chomczyńska
dr Agnieszka Rożej

Laboratorium

Biologii i Mikrobiologii

II rok studiów stacjonarnych I-go stopnia – 30 godz.

Lp.	Wykaz ćwiczeń
1	Zasady mikroskopowania
2	Hodowla mikroorganizmów
3	Budowa komórki prokariotycznej i eukariotycznej
4	Metabolizm organizmów
5	Występowanie drobnoustrojów w środowisku wodnym, glebie i powietrzu
6	Biologiczne badanie wód – rola bioindykatorów w określaniu jakości środowiska
7	Biocenoza osadu czynnego

Ćwiczenie 1

Zasady mikroskopowania

Cel ćwiczeń:

Poznanie zasad mikroskopowania, nabycie umiejętności mierzenia wielkości obiektów mikroskopowych

Zagadnienia teoretyczne:

1. Rodzaje i przykłady zastosowań mikroskopów
2. Budowa i zasada działania zwykłego mikroskopu świetlnego
3. Powiększenie i zdolność rozdzielcza mikroskopu, immersja
4. Sposoby mierzenia obiektów mikroskopowych

Materiały:

preparaty mikroskopowe trwałe, owoce jarzębiny, liść kapusty, liść spichrzowy cebuli, sól fizjologiczna

Aparatura i szkło:

mikroskop świetlny, szkiełka podstawowe i nakrywkowe

Wykonanie ćwiczenia:

1. Przygotowanie preparatu mikroskopowego:

W celu przygotowania preparatu należy:

- umyć szkiełko podstawowe i osuszyć bibułą,
- nanieść kroplę soli fizjologicznej na szkiełko podstawowe,
- wprowadzić niewielki i cienki fragment tkanki (np. skórka z wewnętrznej strony liścia cebuli, skórka z owocu jarzębiny) do kropli soli fizjologicznej,
- całość przykryć szkiełkiem nakrywkowym.

2. Skalowanie okularu mikrometrycznego:

W celu wyskalowania okularu mikrometrycznego należy:

- umieścić na stoliku mikroskopu mikrometr przedmiotowy,
- włożyć na miejsce jednego z okularów okular mikrometryczny,
- patrząc przez okular mikrometryczny znaleźć obraz skali mikrometru przedmiotowego,
- ustawić skalę mikrometru przedmiotowego i numerowaną skalę okularu mikrometrycznego równolegle do siebie,
- ustawić podziałkę śruby mikrometrycznej okularu mikrometrycznego w pozycji 0,
- przesunąć ostrożnie mikrometr przedmiotowy tak aby wybrana długa działka skali mikrometru przedmiotowego (ale nie pierwsza) pokryła się z przecięciem krzyża okularu mikrometrycznego,
- przesunąć krzyż na następną długą działkę skali mikrometru przedmiotowego kręcąc śrubą mikrometryczną okularu mikrometrycznego (tj. przesunąć krzyż na odcinku 100 μm),
- odczytać ilość działek ze skali śruby okularu mikrometrycznego (uwzględniając jednocześnie ewentualne pełne obroty śruby) odpowiadających przesunięciu krzyża na odcinku 100 μm ,
- uzyskane dane wykorzystać do ułożenia proporcji i wykonać potrzebne obliczenia:
$$100 \mu\text{m} - a \text{ działka skali śruby mikrometrycznej}$$
$$x \mu\text{m} - 1 \text{ działka skali śruby mikrometrycznej,}$$

- wyskalować okular mikrometryczny dla obiektywów o powiększeniu 5x, 10x i 40x.

3. Pomiar wielkości komórek w przygotowanym preparacie:

Aby dokonać pomiaru wielkości wybranej komórki należy:

- włożyć na miejsce jednego z okularów mikroskopu okular mikrometryczny,
- znaleźć obraz preparatu w mikroskopie przy danym powiększeniu obiektywu,
- wyzerować skalę śruby mikrometrycznej i ustawić przecięcie krzyża w miejscu od którego pomiar będzie się zaczynał,
- kręcąc śrubą mikrometryczną okularu mikrometrycznego przesunąć krzyż nici do miejsca, gdzie pomiar będzie zakończony,
- odczytać ilość działek ze skali śruby okularu mikrometrycznego odpowiadającą przesunięciu krzyża na mierzonym odcinku,
- przeliczyć liczbę działek na mikrometry zgodnie z wcześniejszą kalibracją okularu mikrometrycznego dla danego powiększenia obiektywu.

Literatura:

1. Różalski A.: Ćwiczenia z mikrobiologii ogólnej, cz.1 i cz.2, Wydawnictwo Uniwersytetu Łódzkiego, Łódź 2014.
2. Zmysłowska I.: Mikrobiologia ogólna i środowiskowa, Wydawnictwo Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego, Olsztyn 2009.
3. Libudzisz Z., Kowal K., Żakowska Z.: Mikrobiologia techniczna, t.1, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2007.

Ćwiczenie 2

Hodowla drobnoustrojów

Cel ćwiczeń:

Poznanie warunków i sposobów prowadzenie hodowli mikroorganizmów, zapoznanie się z metodami liczenia drobnoustrojów

Zagadnienia teoretyczne:

1. Pojęcia podstawowe: posiew, kolonia, hodowla czysta, hodowla mieszana
2. Warunki hodowli drobnoustrojów (temperatura, tlenowość - potencjał oksydoredukcyjny, odczyn, składniki odżywcze)
3. Pożywki mikrobiologiczne (ich cechy i rodzaje)
4. Techniki posiewów mikrobiologicznych
5. Cechy wzrostu mikroorganizmów na podłożach stałych i płynnych
6. Metody liczenia drobnoustrojów (bezpośrednie i pośrednie)

Materiały:

hodowle bakterii właściwych z rodzajów: *Escherichia*, *Bacillus*, drożdże, sól fizjologiczna, r-ór fioletu krystalicznego, etanol (70%), agar odżywczy (zestalony i upłynniony)

Aparatura i szkło:

mikroskop świetlny z imersją, szkiełka podstawowe i nakrywkowe, ezy, płytki Petriego, kolby stożkowe, pipety, łaźnia wodna, pipety automatyczne, typy, próbówki, głaszczki

Wykonanie ćwiczenia:

1. Posiew powierzchniowy:

- odkorkować kolbę z pożywką i opalić jej wylot w płomieniu palnika
- uchylić lekko wieczko szalki Petriego i wlać do niej pożywkę tak aby utworzyła się na dnie kilkumilimetrowa warstwa (ok. 10 ml)
- zamknąć płytkę
- ponownie opalić wylot kolby z podłożem i zamknąć ją korkiem
- płytkę pozostawić na stole do czasu zestalenia
- po zestaleniu podłoża wykonać posiew w następujący sposób:
 - a) odkorkować próbówkę z zawiesiną bakteryjną (po wykonaniu ewentualnych rozcieńczeń – rys. 1) i opalić jej wylot w płomieniu palnika (korek trzymać przy użyciu małego palca prawej dłoni)
 - b) pobrać automatyczną pipetą objętość 0,1 cm³ badanego materiału (wyposażoną w jałowy tip)
 - c) ponownie opalić wylot próbówki w płomieniu palnika i zamknąć ją korkiem
 - d) odstawić próbówkę do statywu
 - e) pobraną objętość przenieść na powierzchnię pożywki lekko uchylając wieczko płytki
 - f) końcówkę pipety odłożyć do pojemnika z płynem dezynfekcyjnym a pipetę odstawić do statywu
 - g) materiał naniesiony na powierzchnię podłoża stałego rozprowadzić uprzednio wyjałowianą w płomieniu palnika głaszczką
 - h) po użyciu głaszczki opalić ją w płomieniu palnika i odstawić do statywu
 - i) opisać płytkę Petriego i przenieść do cieplarki

2. Posiew wgłębnny:

- odkorkować próbkę z zawiesiną bakteryjną bakteryjną (po wykonaniu ewentualnych rozcieńczeń – rys. 1) i opalić jej wylot w płomieniu palnika (korek trzymać przy użyciu małego palca prawej dłoni)
- pobrać automatyczną pipetą objętość 1 cm^3 badanego materiału (wyposażoną w jałowy tip)
- ponownie opalić wylot próbówki w płomieniu palnika i zamknąć ją korkiem
- odstawić próbkę do statywu
- uchylić lekko wieczko szalki Petriego i wprowadzić próbkę pobraną pipetą, zamknąć wieczko płytki
- końcówkę pipety odłożyć do pojemnika z płynem dezynfekcyjnym a pipetę odstawić do statywu
- odkorkować kolbę z pożywką i opalić jej wylot w płomieniu palnika
- utworzyć płytkę Petriego i wlać do niej upłynnioną i schłodzoną pożywkę (9 ml)
- zamknąć płytkę i całość lekko poruszać ruchem kolistym na stole
- ponownie opalić wylot kolby z podłożem i zamknąć ją korkiem
- płytkę pozostawić na stole do czasu zestalenia
- opisać płytkę Petriego i przenieść do ciepłarki

3. Oznaczanie liczby bakterii metodą Wrighta

Metoda ta oparta jest na ustaleniu liczby drobnoustrojów w porównaniu do znanej liczby komórek drożdży. Oznaczenie liczby komórek drożdży w 1 mm^3 wykonuje się za pomocą hemocytometru Thoma (lub Bürkera). Komora Thoma ma głębokość 0,1 mm; na jej dnie znajduje się siatka składająca się z 16 dużych kwadratów, każdy z nich podzielony jest na 16 małych; wymiary jednej małej komory wynoszą: wysokość - $1/10\text{ mm}$, szerokość - $1/20\text{ mm}$, długość - $1/20\text{ mm}$; tak więc powierzchnia małej komory wynosi $1/400\text{ mm}^2$, a jej objętość $1/4000\text{ mm}^3$.

Po przygotowaniu zawiesiny drożdży wprowadza się ją do komory Thoma. Następnie pod mikroskopem liczy się komórki drożdży w 5 dużych tj. w 80 małych kwadracikach komory. Liczbę komórek drożdży (Y) w 1 mm^3 ustala się według wzoru:

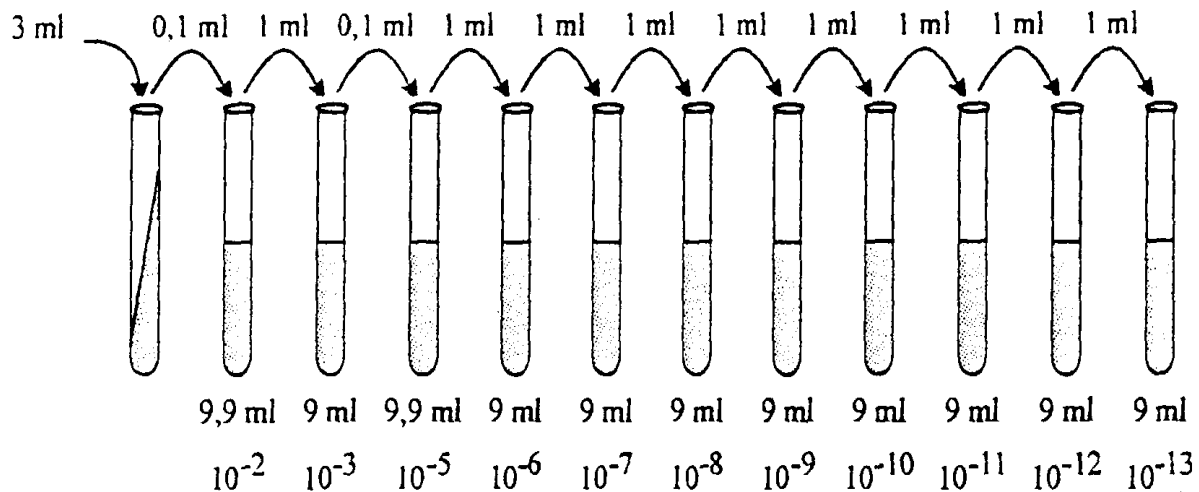
$$Y = \frac{\text{liczba komórek} \times \text{rozcieńczenie} \times 4000}{80}$$

Dla ustalenia liczby badanych drobnoustrojów, w tym wypadku, *B. subtilis* należy:

- skos z hodowlą *B. subtilis* zmyć 3 cm^3 0,85% NaCl; zawiesinę bakterii rozcieńczyć trzykrotnie,
- zmieszać $0,5\text{ cm}^3$ zawiesiny drożdży i $0,5\text{ cm}^3$ zawiesiny bakteryjnej,
- sporządzić rozmaz na szkiełku podstawowym, wysuszyć go a następnie utrwalić w płomieniu palnika,
- utrwalony rozmaz barwić r-r'em fioletu krystalicznego przez 2 minuty,
- fiolet zmyć wodą destylowaną i preparat wysuszyć,
- używając mikroskopu zliczyć liczbę komórek drożdży i bakterii w 20 polach widzenia,
- obliczyć liczbę komórek bakteryjnych według wzoru:

$$\text{Liczba bakterii w } 1 \text{ cm}^3 = \frac{\text{liczba bakterii } Y \times 1000}{\text{liczba drożdży}},$$

gdzie: (Y) - liczba komórek drożdży w 1 mm^3 , 1000 - przelicznik na 1 cm^3 .



Rys. 1. Schemat rozcieńczeń zawiesiny bakterii

Literatura:

1. Różalski A.: Ćwiczenia z mikrobiologii ogólnej, cz. 1 i cz.2, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2014.
2. Zmysłowska I.: Mikrobiologia ogólna i środowiskowa, Wydawnictwo Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego, Olsztyn 2009.
3. Zabłocka-Godlewska E.: Biologia dla studentów uczelni technicznych. Wydawnictwo Politechniki Śląskiej, Gliwice 2011.
4. Schlegel H.: Mikrobiologia ogólna, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2008.

Ćwiczenie 3

Budowa komórki prokariotycznej i eukariotycznej

Cel ćwiczeń:

Poznanie szczegółów budowy komórki prokariotycznej, eukariotycznej, roślinnej i zwierzęcej z jednoczesnym uwzględnieniem funkcji organelli komórkowych.

Zagadnienia teoretyczne:

1. Struktura komórki prokariotycznej (z uwzględnieniem budowy i funkcji rzęsek, fimbrii i otoczki)
2. Metoda barwienia bakterii wg Grama – budowa ściany komórkowej u bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych
3. Struktura komórki eukariotycznej – różnice w budowie komórki roślinnej i zwierzęcej
4. Funkcje organelli komórkowych

Materiały:

hodowle bakterii właściwych z rodzajów: *Escherichia*, *Bacillus*, skórka z wewnętrznej strony liścia spichrzowego cebuli lub liścia trzykrotki, zawiesina drożdży (*Sacharomyces cerevisiae*), sól fizjologiczna, 5% roztwór NaCl, roztwór fioletu krystalicznego, etanol (70%), płyn Lugola, fuksyna fenolowa, błękit metylenowy, gotowe preparaty bakterii: *Escherichia coli*, *Bacillus megaterium*, *Micrococcus luteus*, *Clostridium sporogenes*

Aparatura i szkło:

mikroskop świetlny, szkiełka podstawowe i nakrywkowe

Wykonanie ćwiczenia:

Obserwacje mikroskopowe przeprowadzić za pomocą zwykłego mikroskopu optycznego przy użyciu obiektywu suchego 40x oraz immersyjnego o powiększeniu 100x.

1. Morfologia komórek bakteryjnych

Obserwacja utrwalonych preparatów mikroskopowych następujących gatunków bakterii:

1. *Escherichia coli*
2. *Bacillus megaterium*
3. *Micrococcus luteus*
4. *Clostridium sporogenes*

2. Preparat przyżyciowy zwykły:

- na odtłuszczonym szkiełku podstawowym umieścić kroplę 0,85% roztworu NaCl (sól fizjologiczna), do którego za pomocą ezy bakteriologicznej, wysterylizowanej w płomieniu palnika, wprowadzić 24-godzinną hodowlę bakterii ze skosu agarowego,
- preparat przykryć szkiełkiem nakrywkowym.

3. Plazmoliza w komórkach skórki z wewnętrznej strony łuski cebuli i liścia trzykrotki:

- umyć szkiełko podstawowe,
- nanieść na szkiełko kroplę soli fizjologicznej,
- wprowadzić niewielki fragment skórki (cebuli lub trzykrotki) do kropli,

- całość przykryć szkiełkiem nakrywkowym, a obok szkiełka - z lewej strony nanieść kroplę stężonego roztworu NaCl - z prawej strony położyć pasek bibuły,
- obserwować preparat przy powiększeniu obiektywu 10x (40x), jednocześnie absorbując wodę z preparatu za pomocą paska bibuły,
- narysować etapy plazmolizy.

4. Barwienie bakterii metodą Grama:

- wykonać rozmaz 24-godzinnej hodowli bakterii na szkiełku podstawowym,
- wysuszyć preparat w temperaturze pokojowej, a następnie utrwalić, przeprowadzając preparat przez płomień palnika zawieszoną zwróconą ku górze,
- zalać preparat roztworem fioletu krystalicznego na 2 min, spłukać wodą, zalać płynem Lugola na 1 min.,
- zanurzyć preparat w 70% alkoholu etylowym na 30 sek., spłukać wodą,
- dobarwić preparat roztworem fuksyny zasadowej przez 10-20 sek., spłukać dokładnie wodą i wysuszyć na powietrzu,
- wykonać obserwacje mikroskopowe bakterii za pomocą obiektywu immersyjnego o powiększeniu 100x.

W wyniku barwienia bakterie Gram-dodatnie zostają zabarwione na fioletowo, a bakterie Gram-ujemne – na różowo.

5. Obserwacja komórek drożdży (*Sacharomyces cerevisiae*) – preparat przyżyciowy:

- na odtłuszczone szkiełko podstawowe nanieść kroplę hodowli płynnej *S. cerevisiae* (w przypadku hodowli na podłożu stałym drobnoustroje zawieszamy w 0,85% NaCl) i kroplę barwnika – błękitu metylenowego 1:10000. Całość przykryć szkiełkiem nakrywkowym,
- oglądać preparat pod mikroskopem stosując powiększenie 100x i 400x,
- obliczyć zawartość procentową komórek martwych drożdży: policzyć komórki zabarwione na niebiesko przypadające na 100 komórek drożdży.

Wynik barwienia: zabarwieniu ulegają komórki martwe, w których błona komórkowa, warunkująca barierę półprzepuszczalności traci właściwości wybiórcze i nie jest selektywna. Błękit metylenowy w środowisku wzrostu, w wyniku działania dehydrogenaz drożdży, przechodzi w formę zredukowaną, bezbarwny leukobłękit.

Literatura:

1. Różalski A.: Ćwiczenia z mikrobiologii ogólnej, cz.1 i cz.2, Wydawnictwo Uniwersytetu Łódzkiego, Łódź 2014.
2. Zmysłowska I.: Mikrobiologia ogólna i środowiskowa, Wydawnictwo Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego, Olsztyn 2009.
3. Kunicki-Goldfinger W. J. H.: Życie bakterii, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2005.
4. Grabińska-Łoniewska A., Słomczyńska B., Rutkowska-Narożniak A., Łebkowska M., Słomczyński T., Zborowska E.: Biologia środowiska. Wydawnictwo Seidel-Przywecki sp. z o.o., Warszawa 2011.

Ćwiczenie 4

Metabolizm organizmów

Cel ćwiczeń:

Zapoznanie się z przebiegiem podstawowych procesów metabolicznych towarzyszących neutralizacji zanieczyszczeń i wykorzystywanych w rozwiązaniach technologicznych inżynierii środowiska.

Zagadnienia teoretyczne:

1. Typy odżywiania się organizmów – źródła makroelementów i mikroelementów
2. Sposoby zdobywania energii – oddychanie tlenowe, beztlenowe, fermentacja
3. Rodzaje substratów energetycznych wykorzystywanych przez organizmy żywe
4. Asymilacja dwutlenku węgla: fotosynteza bakteryjna i roślinna, chemosynteza
5. Fosforylacja substratowa, oksydatywna, fotooksydacja

Materiały:

podłoża stałe, różnicujące: McConkey agar, ENDO agar, agar odżywczy + purpura bromokrezolowa + różne źródła węgla (glukoza, glicerol, mannitol, cytrynian Na, laktoza), agar odżywczy + skrobia,

podłoża płynne: bulion odżywczy + laktoza + purpura bromokrezolowa,

szczone bakterijne: *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis*, *Sarcina lutea*,

zielona masa roślinna (natka pietruszki lub in.), 96% alkohol etylowy, płyn rozwijający: toluen:

eter: aceton (10:2,5:2),

moczarka kanadyjska,

ziemia ogrodowa, 50mM KOH, 50mM HCl, glukoza, oranż metylowy.

Aparatura i szkło:

próbówki (20 i 60cm³), płytki Petriego, zlewki (50 i 500cm³), słoiki 1L Twist, kolby stożkowe (100 i 500cm³), biureta, moździerz porcelanowy, piasek, bibuła filtracyjna, cylindry miarowe (50 i 100cm³), bagietki z gumką recepturką, linijka z podziałką, termometr

Wykonanie ćwiczenia:

1. Identyfikacja szczepów bakteryjnych:

W celu identyfikacji szczepów należy:

- dokonać obserwacji wzrostu, wyglądu i barwy wyrosłych kolonii szczepów bakterii na stałych podłożach różnicujących, zmiany barwy podłoża stałego i płynnego w przypadku zdolności poszczególnych szczepów bakterii do rozkładu zawartych w podłożu źródeł węgla,
- rozpoznać szczepy bakterii na podstawie wyżej wymienionych cech na płytkach z numerowanymi posiewami.

2. Wpływ natężenia światła i temperatury na proces fotosyntezy:

Pomiary intensywności fotosyntezy oparte są na oznaczaniu wymiany gazowej roślin i polegają na określeniu ilości pobranego dwutlenku węgla lub wydzielonego tlenu. Do tego celu służą metody chemiczne bądź gazometryczne. Do nich m.in. zalicza się półilościową metodę

polegającą na liczeniu pęcherzyków tlenu wydzielonego przez fotosyntetyzujące gałązki roślin wodnych.

Przebieg ćwiczenia:

- gałązkę moczarki kanadyjskiej umieścić w pętli gumki recepturowej przymocowanej do szklanej bagietki i zanurzyć (wierzchołkiem do dołu) w probówce (lub cylindrze) z wodą wodociągową wzbogaconą kilkoma kroplami mineralnej wody gazowanej,
- całość umieścić w kolbie stożkowej napełnionej wodą,
- ustalić 2 punkty w odległości 2 i 45 cm między źródłem światła a rośliną,
- w każdym punkcie kolejno umieścić moczarkę i określić ilość wydzielanych pęcherzyków tlenu; pomiary wykonywać w ciągu 2 minut po 4 minutach adaptacji roślin do warunków świetlnych, trzykrotnie dla każdej odległości od źródła światła,
- wyniki badań zestawić w tabeli,

Tabela 1. Wpływ natężenia światła na proces fotosyntezy

odległość od źródła światła (cm)	ilość pęcherzyków O ₂ w ciągu 2 minut			
	powtórzenia			
	1	2	3	średnia
2				
45				

- do dwu kolb stożkowych napełnionych wodą wodociągową o temperaturze 5°C i 25°C wstawiać kolejno probówkę z zanurzoną w wodzie gałązką moczarki kanadyjskiej,
- po odczekaniu 4 minut, w celu adaptacji moczarki do warunków temperaturowych, liczyć wydzielane pęcherzyki tlenu przez 2 minuty,
- pomiar w każdej temperaturze powtórzyć trzykrotnie,
- wyniki badań zestawić w tabeli,

Tabela 2. Wpływ temperatury na proces fotosyntezy

temperatura (°C)	ilość pęcherzyków O ₂ w ciągu 2 minut			
	powtórzenia			
	1	2	3	średnia
5				
25				

3. Wyodrębnianie i rozdzielanie barwników asymilacyjnych:

Reakcje fotosyntezy zachodzą w specjalnych strukturach komórkowych zawierających barwniki fotosyntetyczne. U fotosyntetyzujących *Procaryota* odbywają się one w wypustkach błon plazmatycznych, zaś w komórkach *Eucaryota* w chloroplastach. Barwniki związane z fotosyntezą zalicza się do trzech głównych klas: chlorofili, karotenoidów i fikobilin. Chlorofile i karotenoidy są związkami dobrze rozpuszczalnymi w rozpuszczalnikach organicznych, a fikobiliny dobrze rozpuszczają się w wodzie.

Przebieg ćwiczenia:

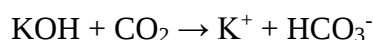
- masę roślinną rozetrzeć w moździerzu z piaskiem; uzyskaną miazgę wymieszać z 96% alkoholem etylowym z dodatkiem acetonu; po ponownym utarciu mieszaninę przesączyć przez sączek bibułowy; ekstrakt chronić przed światłem.
- przygotować pasek bibuły filtracyjnej o wymiarach 2x20 cm i bibuły chromatograficznej; nanieść kolejno kroplami w jednym miejscu (3 cm od dolnej krawędzi bibuły) wyciąg barwników; po każdym naniesieniu kropli pasek bibuły wysuszyć,

- do cylindra wlać płyn rozwijający (warstwa 1-1,5 cm); pasek bibuły z naniesionymi barwnikami umieścić w cylindrze tak, aby końcem dotykał płynu rozwijającego; cylinder szczelnie przykryć; **rozdziół barwników prowadzić pod włączonym dygestorium!**; po 30 minutach wyjąć pasek bibuły, dokładnie wysuszyć i rozpoznać barwniki.

4. Oznaczanie aktywności oddechowej mikroorganizmów glebowych indukowanej substratem (glukozą):

Występujące w glebie mikroorganizmy oraz zwierzęta bezkręgowce pobierają w procesie oddychania z powietrza glebowego tlen, a wydzielają dwutlenek węgla, co można wykazać doświadczalnie. Zazwyczaj ok. 10% mikroorganizmów glebowych zachowuje aktywność. Pozostałe 90% znajduje się w stanie uśpienia lub życia utajonego. Po wprowadzeniu do gleby odpowiednich składników pokarmowych, stężenie aktywnych komórek rośnie.

Miarą aktywności oddechowej organizmów jest ilość wydzielonego dwutlenku węgla. W trakcie ćwiczenia wydzielany CO₂ (produkt oddychania) ulega absorpcji w roztworze KOH, stosownie do reakcji:



Nadmiar KOH jest określony ilościowo za pomocą miareczkowania HCl.

Przebieg ćwiczenia:

- do dwóch słoików litrowych wprowadzić po 400g żyznej ziemi ogrodowej; do jednego z nich dodać 4g glukozę i wymieszać dokładnie cukier z ziemią,
- do słoików wstawić małe zlewki zawierające po 20ml KOH (50mM); słoje szczelnie zakręcić i pozostawić na 24h,
- po inkubacji wyjąć zlewki, zawartość przelać do kolb stożkowych o pojemności 100ml; dodać 2-3 krople wskaźnika pH – oranżu metylowego; nadmiar KOH miareczkować 50mM HCl do zmiany barwy z żółtej na czerwoną,
- ilość wydzielonego CO₂ obliczyć ze wzoru:

$$y = \frac{(V_0 - V) \cdot 50}{1000 \cdot m}$$

gdzie: y - aktywność oddechowa gleby [mM CO₂/ g gleby/ doba], V₀ - objętość KOH użyta do absorpcji CO₂ [ml], V - objętość KOH nie zobojętniona przez HCO₃⁻ [ml], odpowiadająca objętości HCl zużytego do miareczkowania, m - masa próbki gleby w słoju [g],

- porównać aktywność oddechową mikroorganizmów glebowych indukowaną i nie indukowaną dodatkiem glukozę.

Literatura:

1. Różalski A.: Ćwiczenia z mikrobiologii ogólnej, cz.1 i cz.2, Wydawnictwo Uniwersytetu Łódzkiego, Łódź 2014.
2. Zmysłowska I.: Mikrobiologia ogólna i środowiskowa, Wydawnictwo Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego, Olsztyn 2009.
3. Schlegel H.: Mikrobiologia ogólna, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2008.
4. Zabłocka-Godlewska E.: Biologia dla studentów uczelni technicznych. Wydawnictwo Politechniki Śląskiej, Gliwice 2011.

Ćwiczenie 5

Występowanie drobnoustrojów w środowisku wodnym, glebie i powietrzu

Cel ćwiczeń:

Zapoznanie się z warunkami występowania drobnoustrojów w wodzie

Poznanie metod oznaczania mikrobiologicznego zanieczyszczenia wody, gleby i powietrza

Zagadnienia teoretyczne

1. Czynniki decydujące o występowaniu drobnoustrojów w wodzie, glebie i powietrzu
2. Wskaźniki stanu sanitarnego wody i gleb (miano i wskaźnik coli); organizmy wskaźnikowe w powietrzu (*Pseudomonas fluorescens*, promieniowce, gronkowce, grzyby mikroskopowe)
3. Metody oznaczania mikrobiologicznego zanieczyszczenia wody, gleby i powietrza

Materiały:

sól fizjologiczna, podłoże ENDO, fiolet krystaliczny, agar odżywczy, hodowla *Escherichia coli*

Aparatura i szkło:

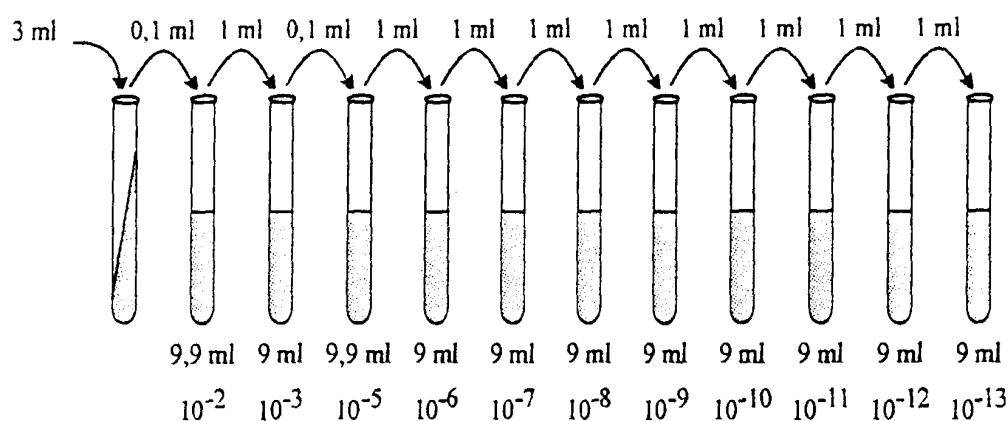
probówki, płytki Petriego

Wykonanie ćwiczenia:

1. Oznaczanie liczby bakterii metodą płytkową:

W metodzie płytkowej liczbę komórek bakterii w badanej próbce określa się na podstawie liczby koloni wyrosłych po okresie inkubacji na podłożu odżywczym. Dla ustalenia liczby bakterii tj. *E. coli* należy:

- sporządzić zawiesinę bakterii *E. coli* zmywając hodowlę ze skosu 3 cm³ 0,85% NaCl,
- przygotować rozcieńczenia wg schematu na rys. 1,



Rys. 1. Schemat rozcieńczeń zawiesiny bakterii

- wysiać po 1 cm³ zawiesiny *E. coli* - na 2 płytki z podłożem ENDO z rozcieńczeń: 10⁻⁷, 10⁻⁸ i 10⁻⁹,
- hodowle inkubować przez noc w temperaturze 37°C,
- po okresie inkubacji zliczyć wyrosłe kolonie na podłożach odżywczych,
- liczbę komórek w zawiesinie wyjściowej obliczyć mnożąc liczbę wyrosłych kolonii przez dane rozcieńczenie.

2. Oznaczanie bakterii grupy coli metodą fermentacyjną probówkową – badania wstępne:

W metodzie tej określana jest najbardziej prawdopodobna liczba bakterii grupy coli w 100 cm³ badanej próbki (NPL) przy pomocy tablic sporządzonych na podstawie rachunku prawdopodobieństwa. Aby ustalić liczbę komórek bakterii należy:

- przygotować pożywkę z laktozą i purpurą bromokrezolową (pożywka LBP)
- przygotować rozcieńczenia badanej wody: 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵
- z każdego rozcieńczenia wysiać bakterie - po 1 ml - do 2 probówek zawierających po 9 ml pożywki
- hodowle inkubować przez 24 godzin w temperaturze 37°C
- po okresie inkubacji odczytać wyniki: za wynik dodatni przyjąć wystąpienie pęcherzyków gazu przy wstrząsaniu pożywki i jednocześnie zmętnienie oraz zakwaszenie podłoża (objawiające się zmianą barwy pożywki); za wynik ujemny przyjąć brak gazu i brak zakwaszenia podłoża
- odczytać NPL dla 2-probówkowego systemu posiewu z tablic rachunku prawdopodobieństwa

3. Oznaczanie ogólnej liczby bakterii w powietrzu metodą sedymencyjną:

Przebieg ćwiczenia:

- przygotować trzy płytki Petriego z agarem odżywczym,
- ustawić płytki w miejscu poboru próbki powietrza, zdjąć wieczka i poddać płytki ekspozycji, przez 10 minut; w tym czasie drobnoustroje sedymentują na powierzchnię pożywki,
- płytki zakryć, inkubować 24h w temp. 37°C,
- policzyć kolonie wyrosłe na płytkach, obliczyć liczbę bakterii w 1m³ powietrza wg wzoru:

$$A = \frac{5 \cdot a \cdot 10^4}{\pi \cdot r^2 \cdot t}$$

gdzie: a - średnia liczba kolonii bakterii na płytce, r - promień płytki Petriego [cm], t - czas ekspozycji [min],

- zinterpretować wynik oceniając stopień zanieczyszczenia powietrza zgodnie z odpowiednią normą.

Literatura:

1. Różalski A.: Ćwiczenia z mikrobiologii ogólnej, cz. 1 i cz.2, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2014.
2. Schlegel H.: Mikrobiologia ogólna, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2008.
3. Zmysłowska I.: Mikrobiologia ogólna i środowiskowa, Wydawnictwo Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego, Olsztyn 2009.
4. Libudziś Z., Kowal K., Żakowska Z.: Mikrobiologia techniczna, t.1, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2007.
5. Normy: PN-EN ISO 6222:2004, PN-EN ISO 7899-1:2004, PN-EN ISO 7899-2:2004, PN-EN ISO 9308-1:2004/Ap2005, PN-EN ISO 9308-3:2002, PN-ISO 8199:2001, PN-75/C-04615 – arkusz 05, PN-77/C-04615 – arkusz 07, PN-89/Z-04111.01, PN-89/Z-04111.02, PN-89/Z-04111.03

Ćwiczenie 6

Biologiczne badanie wód – rola bioindykatorów w określaniu jakości środowiska

Cel ćwiczeń:

Zapoznanie się z możliwością monitoringu jakości środowiska za pomocą organizmów żywych. Nabycie umiejętności rozpoznawania wybranych przedstawicieli grzybów, glonów, pierwotniaków, nicieni, wrotków, pierścienic.

Zagadnienia teoretyczne:

1. Klasyfikacja wód zgodna z Ramową Dyrektywą Wodną (2000/60/WE). Stan ekologiczny wód. Elementy jakości wód
2. Charakterystyka bakterii, grzybów, glonów, pierwotniaków, nicieni, wrotków, pierścienic i owadów
3. Pojęcie bioindykacji
4. Saprobowość i trofizm – system saprobów Kolkwita-Marrsona oraz metody oceny stanu ekologicznego wód płynących zgodne z Ramową Dyrektywą Wodną
5. Proces samooczyszczania wód – rola organizmów żywych

Materiały:

próbki planktonu pobrane ze zbiorników wodnych różniących się przynależnością do stref saprobowych

Aparatura i szkło:

mikroskop świetlny, szkiełka podstawowe, szkiełka nakrywkowe

Wykonanie ćwiczenia:

1. Analiza planktonu metodą Pantlego i Bucka:

Przebieg ćwiczenia:

- nanieść badaną próbkę planktonu na szkiełko podstawowe i przykryć szkiełkiem nakrywkowym,
- ustawić wyraźny obraz przygotowanego preparatu w mikroskopie,
- przeglądając 20 pól widzenia zliczać osobniki poszczególnych gatunków,
- określić przynależność saprobową poszczególnych gatunków na podstawie wykazu organizmów wskaźnikowych,
- przypisać zdiagnozowanym gatunkom wartość saprobowości „s” według danych podanych w tabeli 1,

Tabela 1. Wartości saprobowości „s”

strefa saprobowości	znak umowny strefy	wartość saprobowości - s
ksenosaprobowa	x	0
oligosaprobowa	o	1
betamezosaprobowa	b	2
alfamezosaprobowa	a	3
polisaprobowa	p	4

- obliczyć udziały procentowe poszczególnych gatunków,
- przypisać poszczególnym gatunkom częstotliwość względną „h” według danych zawartych w tabeli 2,

Tabela 2. Wartości częstotliwości względnej „h”

liczba osobników danego gatunku w % ogólnej ilości osobników	częstotliwość względna – „h”
<1	1
1-3	2
4-10	3
10-20	5
20-40	7
40-100	9

- uzyskane dane zestawić według przykładu podanego w tabeli 3,

Tabela 3. Analiza planktonu metodą Pantlego i Bucka

gatunek	liczba osobników	osobniki danego gatunku w %	wskaźnik „s”	wskaźnik „h”	s • h
a	10	10	3	3	9
b	25	25	2	7	14
c	25	25	1	7	7
d	40	40	2	9	18
suma	100	100	-	26	48

- obliczyć wartość wskaźnika saprobowości „S” według wzoru:

$$S = \frac{\sum s \cdot h}{\sum h},$$

- podać interpretację obliczonego wskaźnika „S” tj. zakwalifikować zbiornik, z którego pobrano próbę planktonu, do danej strefy saprobowości według danych przedstawionych w tabeli 4.

Tabela 4. Określanie stref saprobowości za pomocą wskaźnika saprobowości „S”

zakres wartości wskaźnika - S	zaliczenie do strefy
1,0-1,5	oligosaprobowa
1,5-2,5	betamezosaprobowa
2,5-3,5	alfamezosaprobowa
3,5-4,0	polisaprobowa

- wymienione wyżej czynności powtórzyć dla kolejnej próby planktonu pochodzącej ze zbiornika o odmiennej przynależności do stref saprobowych.

Literatura:

1. Bobrowski M.M.: Podstawy biologii sanitarnej, Wydawnictwo Ekonomia i Środowisko, Białystok 2002.
2. Kańska Z., Grabińska-Łoniewska A., Łebkowska M., Rzechowska E.: Ćwiczenia laboratoryjne z biologii sanitarnej. Część 2. Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej, Warszawa 2001.
3. Jura C.: Bezkręgowce, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2002.
4. Ramowa Dyrektywa Wodna (2000/60/WE).

Ćwiczenie 7

Biocenoza osadu czynnego

Cel ćwiczenia:

Zapoznanie się ze strukturą i funkcjonowaniem osadu czynnego oraz jego rolą w biologicznym oczyszczaniu ścieków.

Zagadnienia teoretyczne:

1. Podstawy biologicznego oczyszczania ścieków metodą osadu czynnego
2. Morfologia osadu czynnego
3. Grupy morfologiczno-funkcjonalne organizmów w osadzie czynnym
4. Funkcje organizmów w osadzie czynnym

Materiały:

osad czynny z miejskiej oczyszczalni ścieków

Aparatura i szkło:

mikroskop świetlny, szkiełka podstawowe

Wykonanie ćwiczenia:

1. Ogólna ocena osadu czynnego:

Przebieg ćwiczenia:

- nanieść badaną próbkę osadu na szkiełko podstawowe, umieścić preparat na stoliku mikroskopu, obserwacje prowadzić pasami przy powiększeniu obiektywu 10x i 40x,
- przy prowadzeniu obserwacji za pomocą obiektywu o 10x powiększeniu zaobserwować kształt, budowę i wielkość kłaczków osadu, określić zagęszczenie bakterii nitkowatych (indeks FI od 0 do 5) i przedstawicieli *Protozoa* i *Metazoa* (skala 0-3) reprezentujących: orzęski, wiciowce, ameby nagie, ameby skorupkowe, słonecznice, wrotki, nicienie, skąposzczety (podczas analizy, w razie potrzeby, posłużyć się tablicami z rysunkami schematycznymi organizmów osadu czynnego),
- przy prowadzeniu obserwacji za pomocą obiektywu o 40x powiększeniu zaobserwować budowę i wielkość pierwotniaków oraz spójność kłaczków osadu, określić zagęszczenie bakterii nie związanych z kłaczkami tj. rozproszonych (skala 0-3), śrubowców – *Spirillae* (skala 0-3) i krętków – *Spirochaetae* (skala 0-3),
- wyniki analizy zestawić w tabeli 1,
- ocenić jakość osadu na podstawie tabeli 2.

Tabela 1. Formularz analizy mikroskopowej osadu czynnego

parametr	wartość indeksu
bakterie nitkowate ^a	
skupienia zooglealne ^b	
pierwotniaki i bezkręgowce w tym ^b : orzęski wiciowce ameby nagie ameby skorupkowe słonecznice wrotki nicienie skąposzczety	
bakterie rozproszone ^c	
śrubowce ^b	
krętki ^b	
a skala 0-5	
b skala 0-3 (brak – liczne komórki/kolonie w preparacie)	
c skala 0-3 (brak – liczne komórki/kolonie w polu widzenia)	
charakterystyka kłaczek: zwarte () otwarte () mocne () słabe () regulane () nieregulane ()	

Tabela 2. Ocena jakości osadu

jakość	dobra	średnia	zła
indeks nitek	< 3	3 - 4	4 - 5
bakterie wolnożyjące	0 - 1	2 - 3	> 3
śrubowce	0	1	> 2
orzęski/ameby skorupkowe	≥ 1	< 1	0
wiciowce/ameby nagie	0	1 - 2	≥ 3
struktura kłaczek	zwarte mocne regulane	otwarte słabe nieregulane	- - -

Literatura

1. Bobrowski M.M.: Podstawy biologii sanitarnej, Wydawnictwo Ekonomia i Środowisko, Białystok 2002.
2. Zmysłowska I.: Mikrobiologia ogólna i środowiskowa, Wydawnictwo Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego, Olsztyn 2009.
3. Błaszczak M.K.: Mikroorganizmy w ochronie środowiska, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2007.
4. Libudysz Z., Kowal K., Żakowska Z.: Mikrobiologia techniczna, t.2, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2008.
5. Eikelboom D.H., van Buijsen H.J.J.: Podręcznik mikroskopowego badania osadu czynnego, Wydawnictwo Seidel-Przywecki, Szczecin 1999.