

dr 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   | Budowa komórki prokariotycznej i eukariotycznej                               |
| 3   | Metabolizm organizmów                                                         |
| 4   | Występowanie drobnoustrojów w środowisku wodnym, glebie i powietrzu           |
| 5   | Występowanie drobnoustrojów w środowisku wodnym, glebie i powietrzu – cd.     |
| 6   | Biologiczne badanie wód – rola bioindykatorów w określaniu jakości środowiska |
| 7   | Biocenoza osadu czynnego                                                      |
| 8   | Zajęcia zaliczeniowe                                                          |

# 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, szkiełko 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 równoległe 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  $\mu\text{m}$ ),
- odczytać ilość działek ze skali śruby okularu mikrometrycznego (uwzględniając jednocześnie ewentualne pełne obroty śruby) odpowiadających przesunięciu krzyża na odcinku 100  $\mu\text{m}$ ,
- uzyskane dane wykorzystać do ułożenia proporcji i wykonać potrzebne obliczenia:

100  $\mu\text{m}$  – a działek skali śruby mikrometrycznej

x  $\mu\text{m}$  – 1 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 1998.
2. Libudzisz Z., Kowal K., Żakowska Z.: Mikrobiologia techniczna, t.1, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2007.
3. Zmysłowska I.: Mikrobiologia ogólna i środowiskowa, Wydawnictwo Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego, Olsztyn 2002.

## Ćwiczenie 2

### 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 obiektynu 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. Kunicki-Goldfinger W. J. H.: Życie bakterii, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1998.
2. Różalski A.: Ćwiczenia z mikrobiologii ogólnej, cz.1 i cz.2, Wydawnictwo Uniwersytetu Łódzkiego, Łódź 1998.
3. Zmysłowska I.: Mikrobiologia ogólna i środowiskowa, Wydawnictwo Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego, Olsztyn 2002.
4. Solomon E.P., Berg L.R., Martin D.W., Villee C.A.: Biologia, Oficyna Wydawnicza Multico, Warszawa 2000.
5. Czubaj A.: Biologia, Państwowe Wydawnictwa Rolnicze i Leśne, Warszawa 1999.

## Ćwiczenie 3 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, oksydacyjna, 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,

szczepy bakteryjne: *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:**

probówki (20 i 60cm<sup>3</sup>), płytki Petriego, zlewki (50 i 500cm<sup>3</sup>), słoiki 1L Twist, kolby stożkowe (100 i 500cm<sup>3</sup>), biureta, moździerz porcelanowy, piasek, bibuła filtracyjna, cylindry miarowe (50 i 100cm<sup>3</sup>), 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 <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> 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:

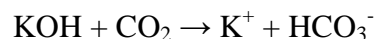
- masę roślinną rozetrzeć w moździerzu z piaskiem; uzyskaną miazgę wymieszać z 96% alkoholem etylowym z dodatkiem acetonu; po ponownym utarciu mieszaninę przesączyć przez sączek bibułowy; ekstrakt chronić przed światłem.
- przygotować pasek bibuły filtracyjnej o wymiarach 2x20 cm i bibuły chromatograficznej; 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; **rozdział 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 uspienia 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 CO<sub>2</sub> (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 CO<sub>2</sub> obliczyć ze wzoru:

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

gdzie: y - aktywność oddechowa gleby [mM CO<sub>2</sub>/ g gleby/ doba], V<sub>0</sub> - objętość KOH użyta do absorpcji CO<sub>2</sub> [ml], V - objętość KOH nie zobojętniona przez HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> [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. Kunicki-Goldfinger W.: Życie bakterii, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1998.
2. Różalski A.: Ćwiczenia z mikrobiologii ogólnej, cz.1 i cz.2, Wydawnictwo Uniwersytetu Łódzkiego, Łódź 1998.
3. Schlegel H.: Mikrobiologia ogólna, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2001.
4. Zmysłowska I.: Mikrobiologia ogólna i środowiskowa, Wydawnictwo Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego, Olsztyn 2002.
5. Solomon E.P., Berg L.R., Martin D.W., Vilee C.A.: Biologia, Oficyna Wydawnicza Multico, Warszawa 2000.
6. Uziak Z.: Przewodnik do ćwiczeń z fizjologii roślin, Wydawnictwo Akademii Rolniczej, Lublin 1985.



## Ćwiczenie 4 Występowanie drobnoustrojów w środowisku wodnym, glebie i powietrzu

### **Cel ćwiczeń:**

Zapoznanie się z warunkami występowania drobnoustrojów w wodzie  
Poznanie metod oznaczania mikrobiologicznego zanieczyszczenia wody

### **Zagadnienia teoretyczne:**

1. Metody liczenia drobnoustrojów
2. Czynniki decydujące o występowaniu drobnoustrojów w wodzie
3. Wskaźniki stanu sanitarnego wody (miano i wskaźnik coli)
4. Metody oznaczania mikrobiologicznego zanieczyszczenia wody

### **Materiały:**

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

### **Aparatura i szkło:**

mikroskop świetlny z obiektywem immersyjnym, komora Thoma, probówki, płytki Petriego

### **Wykonanie ćwiczenia:**

1. 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  $1 \text{ mm}^3$  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 mm, szerokość - 1/20 mm, długość - 1/20 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  $1 \text{ mm}^3$  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  $3 \text{ cm}^3$  0,85% NaCl; zawiesinę bakterii rozcieńczyć trzykrotnie,
- mieszać  $0,5 \text{ cm}^3$  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-rem 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:

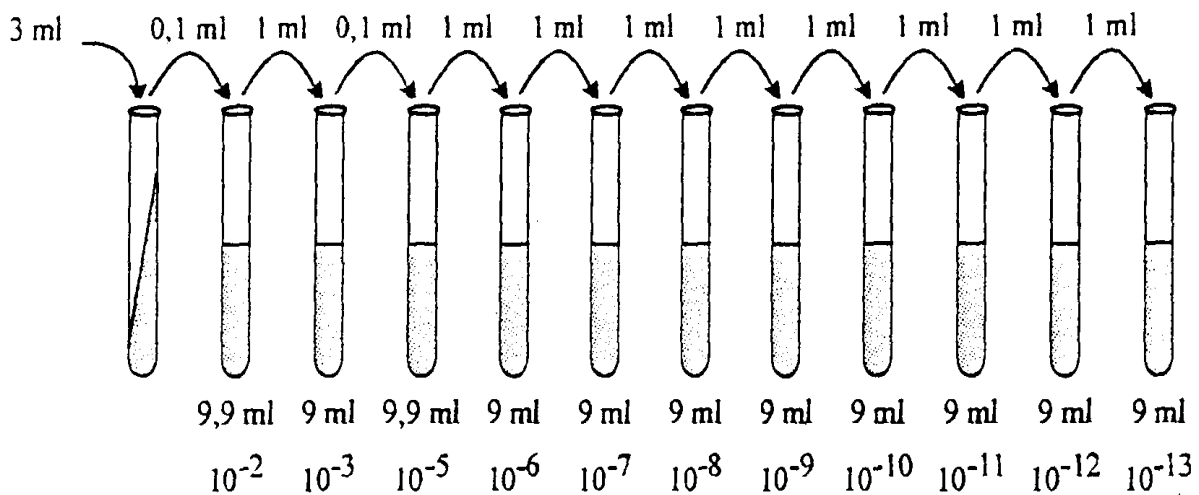
$$\text{Liczba bakterii w } 1 \text{ cm}^3 = \frac{\text{liczba bakterii} \times Y \times 1000}{\text{liczba drożdży}},$$

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

## 2. 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  $3 \text{ cm}^3$  0,85% NaCl,
- przygotować rozcieńczenia wg schematu na rys. 1,



Rys. 1. Schemat rozcieńczeń zawiesiny bakterii

- wysiać po  $1 \text{ cm}^3$  zawiesiny *E. coli* - na 2 płytki z podłożem ENDO z rozcieńczeń:  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  i  $10^{-9}$ ,
- hodowlę inkubować przez noc w temperaturze  $37^\circ\text{C}$ ,
- po okresie inkubacji zliczyć wyrosłe kolonie na podłożach odżywczych,
- liczbę komórek w zawiesinie wyjściowej obliczyć mnożąc liczbę wyrosłych koloni przez dane rozcieńczenie.

## 3. Oznaczanie bakterii grupy coli metodą fermentacyjną probówkową – badania wstępne

W metodzie tej określa się najbardziej prawdopodobną liczbę bakterii grupy coli w  $100 \text{ cm}^3$  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

### **Literatura:**

1. Różalski A.: Ćwiczenia z mikrobiologii ogólnej, cz. 1 i cz.2, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1998.
2. Schlegel H.: Mikrobiologia ogólna, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2001.
3. Zmysłowska I.: Mikrobiologia ogólna i środowiskowa, Wydawnictwo Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego, Olsztyn 2002.
4. Libudzisz 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.

## Cwiczenie 5

### Występowanie drobnoustrojów w wodzie, glebie i powietrzu – cd.

#### **Cel ćwiczeń:**

Zapoznanie się z warunkami występowania drobnoustrojów w glebie i powietrzu  
Poznanie metod oznaczania mikrobiologicznego zanieczyszczenia gleby i powietrza

#### **Zagadnienia teoretyczne:**

1. Czynniki decydujące o występowaniu drobnoustrojów w glebie i powietrzu
2. Lokalizacja występowania drobnoustrojów w glebie
3. Pojęcie bioaerozolu
4. Wskaźniki stanu sanitarnego gleb (miano i wskaźnik coli); organizmy wskaźnikowe w powietrzu (*Pseudomonas fluorescens*, promieniowce, gronkowce)
5. Metody oznaczania mikrobiologicznego zanieczyszczenia gleby i powietrza

#### **Materiały:**

sól fizjologiczna, ziemia ogrodowa, 1% woda peptonowa, odczynnik Nesslera, agar odżywczy, podłoże TSA

#### **Aparatura i szkło:**

mikroskop świetlny z obiektywem immersyjnym, probówki, płytki Petriego

#### **Wykonanie ćwiczenia:**

1. Oznaczanie miana bakterii amonifikacyjnych w próbce gleby metodą NPL

Przebieg ćwiczenia:

- 1g świeżej masy gleby zawiesić w 9 cm<sup>3</sup> płynu fizjologicznego (rozcieńczenie 10<sup>-1</sup>), wytrząsając kilka minut,
- wykonać szereg rozcieńczeń: do szeregu probówek zawierających 4,5 cm<sup>3</sup> płynu fizjologicznego dodawać po 0,5 cm<sup>3</sup> poprzedniego rozcieńczenia (rozcieńczenia 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-6</sup>),
- z każdego rozcieńczenia wysiać po 1 cm<sup>3</sup> do dwóch probówek z 9 cm<sup>3</sup> wody peptonowej,
- hodowlę inkubować 7 dni w temp. 26°C,
- po okresie inkubacji wykonać obserwacje wzrostu bakterii (zmętnienie, obecność kożucha, osadu), a także oznaczenia odczynu pH podłoża oraz obecności amoniaku - odczynnikiem Nesslera,
- odczyn podłoża sprawdzić zanurzając krótki fragment paska wskaźnikowego w pożywkę,
- do probówek dodać po 0,2 cm<sup>3</sup> odczynnika Nesslera; pomarańczowa barwa świadczy o obecności amoniaku,
- stwierdzenie wzrostu bakterii, obecności amoniaku i alkalizacji podłoża do pH ok. 8,0 - 9,0 świadczy o zaszłym procesie amonifikacji; wynik oznaczenia podać jako NPL i miano bakterii amonifikacyjnych (wielkość NPL i miano odczytuje się z tablic opracowanych na podstawie rachunku prawdopodobieństwa).

2. Oznaczanie ogólnej liczby bakterii w powietrzu metodą sedymentacyjną

Przebieg ćwiczenia:

- przygotować trzy płytki Petriego z agarem odżywcym,
- 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 1m<sup>3</sup> 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.
3. Oznaczanie ogólnej liczby bakterii w powietrzu metodą zderzeniową z użyciem impaktora Andersena

Przebieg ćwiczenia:

- przygotować 6 płytek Petriego zawierających podłoże TSA,
- po zdjęciu przykrywek, szalki (odpowiednio oznakowane) umieścić w segmentach impaktora (urządzenie pozwala na pobieranie prób frakcji bioaerozolu o różnych rozmiarach cząstek: >7 μm, 7,0-4,7μm, 4,7-3,3μm, 3,3-2,1μm, 2,1-1,1μm, 1,1-0,65μm),
- włączyć pompę próżniową dla zapewnienia przepływu powietrza przez impaktor, jednocześnie rozpocząć pomiar czasu poboru próby powietrza,
- po zakończeniu poboru próby powietrza zanotować czas, a następnie wyjąć szalki z impaktora, i umieścić na nich przykrywki,
- szalki Petriego umieścić w inkubatorze w temperaturze 37°C na 24 godziny,
- po zakończeniu okresu inkubacji zliczyć wyrosłe kolonie,
- skorygować liczbę koloni zgodnie z tabelą korelacji Andersena i określić liczbę jednostek koloniotwórczych w 1m<sup>3</sup> powietrza wg. wzoru:

$$\text{CFU [m}^3] = \frac{\text{liczba kolonii}}{\text{obj. powietrza}}$$

$$\text{Objętość powietrza [m}^3] = \frac{28,3 \times \text{czas pomiaru}}{1000}$$

### Literatura:

1. Różalski A.: Ćwiczenia z mikrobiologii ogólnej, cz. 1 i cz. 2, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1998.
2. Schlegel H.: Mikrobiologia ogólna, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2001.
3. Zmysłowska I.: Mikrobiologia ogólna i środowiskowa, Wydawnictwo Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego, Olsztyn 2002.
4. Libudzisz 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 Kolkwitza-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 %<br>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. Turoboyski L.: Hydrobiologia techniczna, Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa 1979.
2. Kocwowa E.: Biologia w ochronie zdrowia i środowiska, Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa 1982.
3. Bobrowski M.M.: Podstawy biologii sanitarnej, Wydawnictwo Ekonomia i Środowisko, Białystok 2002.
4. Kańska Z., Grabińska-Łoniewska A., Łebkowska M., Rzechowska E.: Ćwiczenia laboratoryjne z biologii sanitarnej. Część 1. Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej, Warszawa 1993.
5. Kańska Z., Grabińska-Łoniewska A., Łebkowska M., Rzechowska E.: Ćwiczenia laboratoryjne z biologii sanitarnej. Część 2. Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej, Warszawa 2001.
6. Jura C.: Bezkręgowce, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2002.
7. 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 <sup>a</sup>                                                                                                                                            |                 |
| skupienia zooglealne <sup>b</sup>                                                                                                                                          |                 |
| pierwotniaki i bezkręgowce w tym <sup>b</sup> :<br>orzęski<br>wiciowce<br>ameby nagie<br>ameby skorupkowe<br>słonecznice<br>wrotki<br>nicienie<br>skąposzczety             |                 |
| bakterie rozproszone <sup>c</sup>                                                                                                                                          |                 |
| śrubowce <sup>b</sup>                                                                                                                                                      |                 |
| krętki <sup>b</sup>                                                                                                                                                        |                 |
| 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:<br>zwarte ( )                      otwarte ( )<br>mocne ( )                      słabe ( )<br>regularne ( )                      nieregularne ( ) |                 |

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<br>mocne<br>regularne | otwarte<br>słabe<br>nieregularne | -<br>-<br>- |

### Literatura

1. Kańska Z., Grabińska-Łoniewska A., Łebkowska M., Rzechowska E.: Ćwiczenia laboratoryjne z biologii sanitarnej. Część 1, Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej, Warszawa 1993.
2. Eikelboom D.H., van Buijsen H.J.J.: Podręcznik mikroskopowego badania osadu czynnego, Wydawnictwo Seidel-Przywecki, Szczecin 1999.
3. Bobrowski M.M.: Podstawy biologii sanitarnej, Wydawnictwo Ekonomia i Środowisko, Białystok 2002.
4. Zmysłowska I.: Mikrobiologia ogólna i środowiskowa, Wydawnictwo Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego, Olsztyn 2002.
5. Błaszczak M.K.: Mikroorganizmy w ochronie środowiska, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2007.
6. Libudzisz Z., Kowal K., Żakowska Z.: Mikrobiologia techniczna, t.2, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2008.