



Nauka i technologia dla żywności

## Projekt badawczy

**Temat: Bakterie i ich rola w technologii żywności**

### Wprowadzenie:

Mikrobiologia jest nauką o najmniejszych organizmach żywych (mikroorganizmach drobnoustrojach) zasiedlających ziemską biosferę. Wyraz ten pochodzi z języka greckiego, od trzech słów: *mikros* – mały, *bios* – życie, *logos* – wiedza. Wśród mikroorganizmów bakterie stanowią najliczniejszą (choć nie jedyną) i najbardziej zróżnicowaną pod względem budowy i właściwości grupę. Ze względu na bardzo niewielkie rozmiary, od 1 do 10  $\mu\text{m}$ , bakterii długo nie można było zobaczyć, mimo że ich istnienia domyślano się już od dłuższego czasu. Dopiero wynalezienie mikroskopu świetlnego, wyposażonego w soczewki o dużym powiększeniu, pozwoliło je zobaczyć i bliżej poznać.

Bakterie mają bardzo prostą budowę, łatwo przystosowują się do zmiennych warunków środowiska, a w sprzyjających warunkach mogą się bardzo szybko rozmnażać. Spotyka się je w ogromnych ilościach w każdym środowisku na Ziemi, a wiele z nich żyje wewnątrz lub na większych istotach żywych. Zwykle bakterie kojarzą się z chorobami i obawiamy się kontaktu z nimi, jednak w rzeczywistości większość z nich jest dla nas przyjazna. Człowiek nauczył się nawet wykorzystywać właściwości bakterii do zaspokojenia własnych potrzeb i stąd ich znacząca rola w technologii żywności. Bakterie stosuje się m.in. do produkcji serów, jogurtów, kiszonych ogórków, etanolu itp.

### Cel projektu:

Celem praktycznym projektu jest zobaczenie przez uczniów bakterii, czyli tego, czego na co dzień wokół siebie dostrzec nie możemy oraz podkreślenie ich pozytywnej roli w życiu człowieka. Wymiernym efektem pracy ucznia będzie przygotowanie prezentacji w programie PowerPoint zatytułowanej „Bakterie – dużo o nich wiem i chętnie....zjem!”



## **Cele kształcenia:**

### Uczeń:

- wyjaśnia znaczenie słowa mikrobiologia,
- wymienia podstawowe cechy bakterii,
- dzieli bakterie na grupy uwzględniając różne kryteria,
- wymienia sposoby wykorzystania bakterii dla potrzeb przemysłowo-rolniczych,
- podaje przykłady bakterii stosowanych w technologii żywności,
- wymienia zarówno pozytywne, jak i negatywne skutki działania bakterii,
- samodzielnie sporządza skosy w probówkach do posiewu bakterii,
- w komorze laminarnej wykonuje posiew bakterii na skosie,
- stosuje właściwe materiały oraz narzędzia do sporządzania podłoży oraz posiewu bakterii,
- analizuje i opisuje obserwowane hodowle na skosach w probówkach,
- stosuje właściwy materiał biologiczny oraz przyrządy do sporządzania preparatów mikroskopowych utrwalonych,
- wykonuje preparaty bakteryjne utrwalane i barwione metodą Grama,
- wyjaśnia różnice w budowie pomiędzy bakteriami gramdodatnimi i gramujemnymi,
- analizuje i opisuje wykonywane preparaty mikroskopowe,
- wyjaśnia czym jest imersja,
- stosuje obiektyw imersyjny do obserwacji preparatów bakteryjnych,
- stosuje kamerę mikroskopową do rejestrowania obrazów mikroskopowych.

## **Pytanie kluczowe:**

### **Jaka jest rola bakterii w produkcji żywności?**

#### **Bakterie i ich rola w technologii żywności**

Bakterie należą do najczęściej występujących w przyrodzie form życia, są bardzo małe i można je obserwować tylko pod mikroskopem. Spotyka się je w ogromnych ilościach w każdym środowisku na Ziemi, nawet takim, które cechują ekstremalne warunki uniemożliwiające przeżycie innym organizmom. Wiele z nich żyje wewnątrz lub na innych większych istotach żywych. Wiele form tych mikroorganizmów znajduje się w powietrzu. Bakterie nie prowadzą w nim aktywnego życia, ale wykorzystują je do przemieszczania się w kierunku właściwego dla siebie środowiska.

Niewielkie rozmiary bakterii (rzędu kilku mikrometrów) były przyczyną tego, że przez długi czas bakterie pozostawały nieznanne i niezbadane. Bakterie zostały zauważone po raz pierwszy dopiero w 1686 roku przez holenderskiego przyrodnika i przedsiębiorcę Antoniego van Leeuwenhoek'a przy użyciu własnoręcznie wykonanego mikroskopu. Zaobserwowane organizmy nazwał on „animalcules”. A. van Leeuwenhoek bardzo mocno wyprzedził swoją epokę i ówczesny świat nie był przygotowany na jego odkrycia. Jego osiągnięcia poszły w zapomnienie, a mikrobiologia ożyła dopiero po 200-tu latach. Nazwa bakterie wprowadzona została w 1838r. przez niemieckiego przyrodnika Christiana

Gottfrieda Ehrenberga. Wzięła się ona od greckiego słowa *baktērion* oznaczającego pałeczkę.

Podczas zajęć uczniowie będą mogli zobaczyć to, czego przez kilkadziesiąt lat nie udawało się zobaczyć, czyli bakterie. Narzędziem, które w tym celu zostanie wykorzystane będzie mikroskop laboratoryjny STUDAR Z1, preparaty mikroskopowe bakteryjne oraz barwniki i inne odczynniki chemiczne niezbędne do barwienia bakterii.

Preparat mikroskopowy jest to szkiełko podstawowe (przedmiotowe) z umieszczonym na jego powierzchni materiałem biologicznym. Warunkiem uzyskania preparatu dobrej jakości jest oczyszczenie i odtłuszczenie szkiełka podstawowego. Zanieczyszczenia fizyczne usuwa się z powierzchni szkiełka przez potarcie suchą bawełnianą szmatką. Szkiełka odtłuszczamy poprzez 2-3-krotne opalenie nad płomieniem palnika.

Preparaty można mikroskopować bezpośrednio po wykonaniu lub poddać je barwieniu. Barwienie jest to proces fizyko-chemiczny polegający na wnikięciu barwnika do wnętrza komórki mikroorganizmu i utworzeniu barwnego kompleksu z cytoplazmą lub wewnątrzkomórkowymi strukturami komórki. Barwienie ma na celu ułatwienie obserwacji cech morfologicznych i diagnostycznych komórek mikroorganizmów np. kształtu, wielkości, ułożenia komórek, zdolności ruchu, występowania i rozmieszczenia wici i rzęsek, obecności otoczek, a także sposobu rozmnażania oraz tworzenia i rozmieszczenia form przetrwanych w komórce.

O barwieniu preparatów utrwalonych mówimy w sytuacji, gdy barwieniu poddaje się utrwalone (martwe) komórki drobnoustrojów. Utrwalanie polega na termicznym lub chemicznym zabiciu mikroorganizmów i przytwierdzeniu ich do powierzchni szkiełka podstawowego. Celem utrwalania jest ułatwienie stosowanym barwnikom penetracji przez ścianę komórkową i ich wnikięcie do wnętrza komórki oraz odsłonięcie w ścianach komórkowych mikroorganizmów związków, z którymi wiążą się barwniki. Chemiczna metoda utrwalania polega na naniesieniu na wysuszony rozmaz mikroorganizmów odpowiedniego odczynnika (np. formaliny, alkoholu, eteru). Po kilku minutach preparat wysycha i jest przygotowany do barwienia. Termiczna metoda utrwalania polega na 2-3-krotnym przeciągnięciu szkiełka podstawowego z wysuszonym rozmazem mikroorganizmów w płomieniu palnika.

Ze względu na złożoność technik barwienia preparatów dzieli się je na proste i złożone. Barwienie proste, czyli monochromatyczne (jednobarwne) polega na zastosowaniu jednego barwnika do wizualizacji komórek mikroorganizmów (barwienie pozytywne) lub zabarwienia tła preparatu (barwienie negatywne). Barwienie złożone, czyli polichromatyczne (wielobarwne) polega na zastosowaniu dwóch lub więcej barwników w ściśle określonej kolejności.

Bakterie są komórkami prokariotycznymi (prejądrowymi). Oznacza to, że nie posiadają jądra komórkowego, a jego odpowiednikiem jest **nukleoid (genofor)** – nośnik informacji genetycznej w postaci DNA. Poza nim w komórce bakteryjnej znajdują się: otoczką, ściana komórkowa, błona cytoplazmatyczna, wici (rzęski), fimbrie (pile), cytoplazma, mezosomy, rybosomy, plazmidy oraz nukleoid (genofor).

Komórki bakteryjne i ich kolonie mogą przyjmować różne kształty:

- Ziarniaki (*Coccus*) – kuliste.

- Pałeczki (*Bacterium*) – wydłużone.
- Laseczki (*Bacillus*) – wydłużone z przetrwalnikami.
- Promieniowce (*Actinomycetales*) – nitkowato rozgałęzione.
- Przecinkowce (*Vibrio*) – przypominające przecinki.
- Maczugowce (*Corynebacteriaceae*) – przypominające maczugi.
- Wrzecionowce – o kształcie wrzeciona.
- Śrubowce (*Spirillum*) – kształt falisty.
- Krętki (*Spirochaetes*) – kształt przypominający korkociąg.
- Nitkowce – komórki bardzo wydłużone.

W przypadku ziarniaków wyróżnić można:

- Dwinki – para komórek.
- Czworaczki (tetrydy) – cztery komórki.
- Pakietowce – regularne prostopadłościanny.
- Paciorkowce – sznur wielu komórek.
- Gronkowce – zbiór komórek o kształcie grona.

Ze względu na wytrzymałość temperaturową bakterie można podzielić następująco:

- psychrofile – temperatura optymalna 15 °C (zakres: 0-30 °C)
- mezofile – optimum 30-38 °C (zakres: 10-45 °C)
- termofile – 40-75 °C

Bakterie mogą oddychać zarówno tlenowo, jak i beztlenowo. Bakterie tlenowe uzyskują energię w wyniku spalania substancji organicznych z udziałem tlenu. Można je podzielić na tlenowce bezwzględne, którym tlen jest niezbędny do życia i giną przy jego braku i tlenowce względne, które żyją w środowisku tlenowym, jednak gdy tlenu zabraknie zdolne są do oddychania beztlenowego.

Bakterie beztlenowe uzyskują energię w procesie fermentacji (mlekowej, masłowej, metanowej itd.), rozkładając substancje organiczne bez udziału tlenu. Je także można podzielić na bezwzględne beztlenowce, dla których tlen jest toksyczny oraz względne beztlenowce, które żyją w środowisku beztlenowym, lecz tlen nie jest dla nich toksyczny i gdy dostanie się do ich środowiska potrafią wykorzystać go do oddychania.

Podczas zajęć uczniowie dokonają posiewów bakterii tlenowych i beztlenowych na podłożach hodowlanych w probówkach i płytkach Petriego oraz będą mieli możliwość obserwacji formy i rodzaju wzrostu bakterii, zarówno z dostępem, jak i bez dostępu tlenu.

Niektóre bakterie są autotroficzne (samożywne), co oznacza, że potrafią same dla siebie produkować pożywienie, przekształcając proste związki nieorganiczne w organiczne, wykorzystując światło słoneczne lub związki chemiczne. Inne są heterotroficzne (cudzożywne), co z kolei oznacza, że przeżywają tylko dzięki odżywianiu się gotowymi substancjami organicznymi.

Większość bakterii nie może samodzielnie poruszać się zbyt daleko, dlatego bakterie heterotroficzne znajdują sobie żywiciela, aby na nim lub w nim żyć. Czasami to współzycie układu się całkiem dobrze i jest korzystne zarówno dla bakterii, jak i jej gospodarza. Taki układ nazywamy symbiozą. Bakterie żyjące, np. w żołądkach krów

pomagają im w trawieniu trawy. Bakterie *Escherichia coli* (*E. coli*) żyją w naszych jelitach nie wyrządzając nam żadnej szkody. Taki układ nazywamy komensalizmem. Czasem bakterie są pasożytami, które żyjąc w organizmie swego żywiciela mogą przynosić mu dużo szkody uwalniając trujące związki chemiczne, zwane toksynami. Bakterie wywołujące choroby nazywamy patogenami. Ponadto bakterie, które w jednym miejscu są komensalami, w innym będą patogenami np. bakterie *E. coli* przedostając się z jelit do układu moczowego wywołują objawy chorobowe.

Bakterie pełnią w przyrodzie wiele bardzo ważnych funkcji:

- w ekosystemach pełnią rolę reducentów – rozkładają substancje organiczne na prostsze związki nieorganiczne. Dzięki bakteriom zachowany zostaje obieg materii i energii w przyrodzie
- uczestniczą w obiegu azotu, siarki, fosforu i węgla w przyrodzie
- żyją w symbiozie z wieloma gatunkami organizmów na Ziemi, np. umożliwiają wielu roślinożercom (np. przeżuwaczom, termitom) trawienie celulozy
- gatunki pasożytnicze wywołują choroby u wielu organizmów, regulując w ten sposób ich populacje i usuwając z nich osobniki słabe
- uczestniczą w samooczyszczaniu wód oraz procesach glebotwórczych.

Bakterie wykorzystywane są także w wielu gałęziach przemysłu. W przemyśle spożywczym umożliwiają produkcję np. serów, jogurtów, kiszonych ogórków i kapusty (bakterie mlekowe), octu. W przemyśle farmaceutycznym bakterie wykorzystywane są do produkcji leków (np. insuliny, antybiotyków) oraz szczepionek. Stosuje się je również do produkcji acetonu, etanolu, aminokwasów, witamin, hormonów i enzymów. W nauce są podstawowymi organizmami modelowymi wykorzystywanymi w badaniach biochemicznych i genetycznych. Ze względu na małe rozmiary i szybki metabolizm wykorzystywane są w inżynierii genetycznej i biologii molekularnej. Bakterie znajdują również zastosowanie w ochronie środowiska. Są głównym składnikiem osadu czynnego w biologicznych oczyszczalniach ścieków. Bakterie rozkładające węglowodory mogą wspomagać usuwanie skutków wycieków ropy lub innych olejów z tankowców. Ponadto niektóre gatunki mogą zastępować pestycydy w walce ze szkodnikami.

Istnieje jednak szereg negatywnych skutków działania bakterii dla człowieka i innych organizmów żywych. Są to przede wszystkim choroby, które wywołują te drobnoustroje. Organizm człowieka zamieszkuje ok. 1000 gatunków bakterii. Żyją głównie w układzie pokarmowym, gdzie uczestniczą w trawieniu oraz syntezują wiele ważnych dla człowieka substancji (np. witaminę K, kwas foliowy, biotynę). Zamieszkują także skórę, układ oddechowy.

Wiele pasożytniczych bakterii może wywoływać choroby zakaźne. Odżywiają się one kosztem ludzkiego organizmu zaburzając jego funkcjonowanie. Niebezpieczne dla człowieka mogą być także gatunki niepasożytnicze oraz bakterie występujące naturalnie w organizmie.

Niektóre bakterie podczas swojego życia wytwarzają substancje szkodliwe dla innych organizmów i wydalają je do środowiska, w którym żyją. Substancje te nazywane są egzotoksynami. Przykładem egzotoksyny jest botulina (jad kiełbasiany) – jedna z najsilniejszych znanych neurotoksyn wytwarzana przez beztlenowe laseczki *Clostridium*



*botulinum*, używana w medycynie do leczenia niektórych chorób, znana głównie w medycynie kosmetycznej jako botox. Egzotoksyny wytwarzają głównie bakterie gram-dodatnie (np. laseczka tężca, gronkowiec złocisty), ale także gram-ujemne (np. przecinkowiec cholery). Egzotoksyny są antygenami, mogą więc wywoływać odpowiedź immunologiczną organizmu.

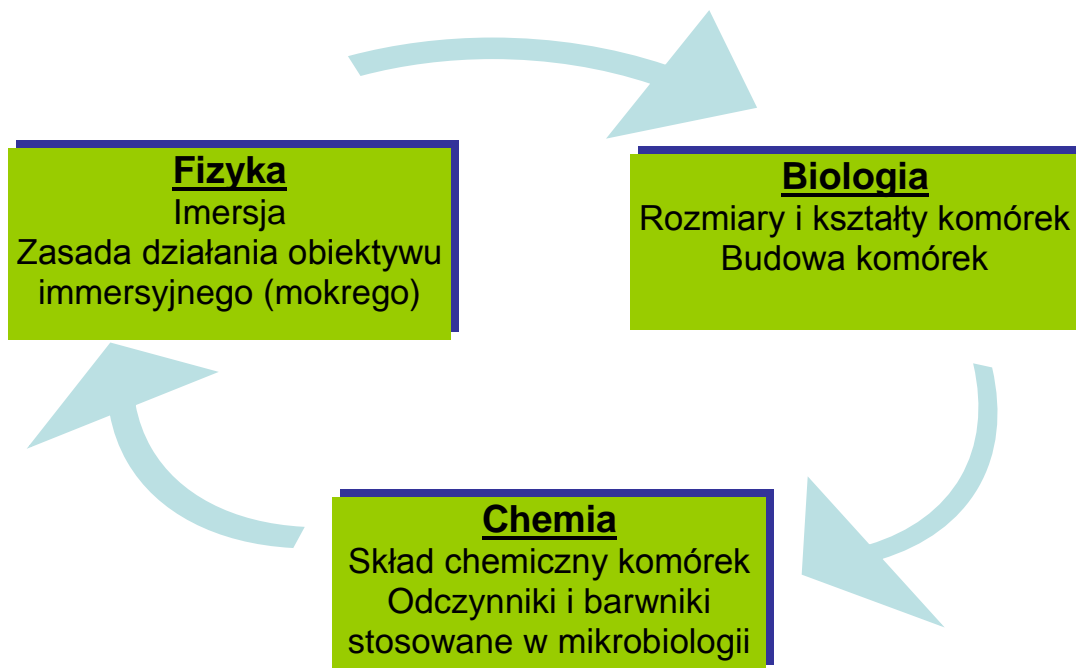
Podczas zajęć uczniowie poznają różne rodzaje i gatunki bakterii oraz ich rolę i znaczenie dla przemysłu, gospodarki i życia codziennego.

Dzięki wykorzystaniu w laboratorium kamery mikroskopowej umożliwiającej rejestrację obrazów, ich gromadzenie, zestawianie, porównywanie itp., uczniowie będą mogli nie tylko zobaczyć drobnoustroje, ale również zapisać obrazy wykonanych przez siebie preparatów bakteryjnych. Zarejestrowane obrazy uczniowie będą mogli wykorzystać podczas opracowywania wyników badań i przygotowywania prezentacji uzyskanych wyników w programie Power Point.

Zastosowanie kamery umożliwia nie tylko rejestrację obrazów w komputerze, ale pozwala również na podgląd obrazów w czasie rzeczywistym, a więc na bieżącą i ciągłą obserwację preparatu. Pozwoli to znacznie usprawnić proces dydaktyczny i ułatwi współpracę z uczniami. Będą oni mogli znacznie sprawniej odnaleźć, zaobserwować i zarejestrować właściwe obrazy mikroskopowe, bez konieczności ich żmudnego, ręcznego odwzorowywania.

Wykorzystanie kamery w pracy z uczniami znacznie ułatwi nauczycielowi dotarcie do większego grona uczniów, a uczniom pozwoli zdobywać wiedzę, rejestrować ją i przekazywać dalej w nowoczesny, a zarazem atrakcyjny sposób.

## **Integracja treści przedmiotowych:**



### Wykorzystanie matematyki i technologii informacyjnej:

- gromadzenie i porządkowanie informacji i danych niezbędnych podczas wykonywania kolejnych zadań,
- wykorzystanie kamery mikroskopowej oraz programu komputerowego do rejestrowania oraz obróbki obrazów gotowych i wykonanych samodzielnie preparatów mikroskopowych,
- tworzenie prezentacji efektów pracy w laboratorium z mikroskopem przy wykorzystaniu programu PowerPoint.

### Materiały i środki dydaktyczne:

- mikroskop laboratoryjny,
- kamera mikroskopowa wraz z oprogramowaniem,
- komputer,

- podłoża hodowlane do wzrostu bakterii,
- materiał biologiczny (bakterie),
- barwniki do barwienia preparatów bakteryjnych,
- szkło i drobny sprzęt laboratoryjny,
- instrukcje do ćwiczeń laboratoryjnych,
- karty pracy.

### **Metody pracy:**

- praca z mikroskopem (obserwacje mikroskopowe),
- praca z kamerą mikroskopową i programem komputerowym do rejestrowania i obróbki obrazów mikroskopowych,
- praca z podłożami mikrobiologicznymi (sporządzanie podłoża dla wzrostu bakterii w formie skosu w probówce),
- praca z materiałem biologicznym (przygotowanie utrwalanych preparatów bakteryjnych),
- praca z barwnikami (barwienie preparatów utrwalonych – jednym barwnikiem oraz metodą Grama),
- dyskusja i porównanie wyników,
- praca z komputerem (przygotowanie prezentacji w programie PowerPoint).

### **Etapy projektu:**

<b>etap</b>	<b>działania</b>	<b>czas</b>
<b>Organizacja</b>	- ustalenie stanowisk pracy, - poznanie podstawowych urządzeń oraz narzędzi niezbędnych podczas realizacji zadań	20 minut
<b>Planowanie</b>	- przedstawienie zadań do realizacji podczas zajęć - ustalenie kolejności i czasu wykonywania poszczególnych zadań	20 minut
<b>Realizacja</b>	1. Sporządzanie podłoży w formie skosów w probówce.	20 minut
	2. Posiew bakterii tlenowych z rodzaju <i>Bacillus</i> i <i>Escherichia</i> na skosie w probówce, w komorze laminarnej.	25 minut
	3. Posiew bakterii beztlenowych z rodzaju <i>Clostridium</i> na podłoże w płytkach Petriego.	15 minut
	4. Oglądanie i opisywanie wzrostu bakterii tlenowych na skosie oraz bakterii beztlenowych w płytce Petriego.	20 minut



	5. Przygotowanie preparatów bakteryjnych utrwalonych i barwionych metodą Grama oraz ich obserwacja w mikroskopie.	40 minut
	6. Obserwacja preparatów przy użyciu kamery mikroskopowej i rejestracja obrazów w komputerze i na przenośnym dysku.	20 minut
	7. Przygotowanie prezentacji w programie PowerPoint z wykonanych w ramach zajęć badań i obserwacji oraz z wyciągniętych wniosków.	90 minut
<b>Prezentacja</b>	- karty pracy, - prezentacja wykonana w programie PowerPoint.	-
<b>Ocena</b>	- samoocena (uczeń), - ocena opisowa (nauczyciel).	-

### **Szczegółowy opis zadań na etapie realizacji projektu:**

#### **Zadanie 1**

#### **Sporządzanie podłoży w formie skosów w probówce**

##### Opis zadania (co robimy, dlaczego)

Bakterie oraz inne drobnoustroje, podobnie jak wszystkie inne organizmy żywe, do wzrostu i rozwoju potrzebują odpowiednich substancji pokarmowych. W warunkach laboratoryjnych substancje takie dostarczane są im za pośrednictwem podłoży hodowlanych o ściśle określonym składzie, sporządzonych w szkle laboratoryjnym. W ramach zajęć uczniowie będą sporządzać podłoża (bulion zwykły z agarem) w formie skosów w probówkach.

##### Możliwe trudności w czasie realizacji zadania (zapobieganie, radzenie sobie z trudnościami)

Wykonanie zadania wymaga od ucznia skupienia, opanowania i precyzji. Trudności w czasie realizacji tego zadania mogą wynikać z dość wysokiej temperatury podłoża hodowlanego, które należy wlać do probówki. Podłoże sporządzane jest z dodatkiem agaru, który podobnie jak żelatyna umożliwi zestalenie (zastygnięcie) podłoża po obniżeniu jego temperatury. Podłoże musi więc być mocno ciepłe, żeby nie zestaliło się podczas jego wlewania do probówek. Stosowanie rękawic pozwala skutecznie radzić sobie z tym problemem. Podczas wlewania podłoża do probówki należy zachować ostrożność, nie rozlać podłoża i nie poparzyć sobie rąk. Trudności podczas realizacji tej części zadania będą wynikały przede wszystkim z małej średnicy probówki oraz braku wprawy i doświadczenia uczniów w wykonywaniu prac laboratoryjnych. Realizacja całego zadania wymaga również pracy z włączonym palnikiem gazowym, należy więc zachować szczególną ostrożność podczas pracy z ogniem, aby się nie poparzyć i nie spalić łatwopalnych elementów wyposażenia, np. korków z waty. Najlepszym rozwiązaniem problemów pojawiających się podczas realizacji zadania będzie przede wszystkim opanowanie i skupienie podczas zajęć oraz współpraca z prowadzącym zajęcia.

### Kto wykonuje zadanie (uczeń samodzielnie, uczniowie w parach, ...)

Każdy uczeń pracuje indywidualnie, samodzielnie wylewa podłoże do próbki i pozostawia je do zastygnięcia w formie skosu, w oparciu o instruktaż, nadzór i pomoc prowadzącego ćwiczenia oraz w oparciu o informacje znajdujące się w instrukcji przygotowanej dla ucznia.

### Sposób wykonania

Zadanie to należy wykonać zgodnie z informacjami i wskazówkami zamieszczonymi w **Instrukcji nr 1** przygotowanej dla uczniów wykonujących zadanie. Instrukcja została umieszczona w dalszej części opracowania.

### Wskazówki dla ucznia (na co zwrócić uwagę, czego nie przeoczyć, co pominąć ...)

Szczególną uwagę podczas wykonywania zadania 1 należy zwrócić na następujące kwestie:

- pracę należy wykonywać przy włączonym palniku gazowym.
- należy pamiętać o założeniu rękawiczki przed złapaniem kolby z podłożem, a kolbę chwytać od spodu, a nie za szyjkę, żeby uniknąć spalenia rękawicy i poparzenia się podczas opalania brzegu kolby w trakcie realizacji zadania.
- brzeg kolby z podłożem należy opalić poprzez kilkakrotne przesunięcie przez płomień zarówno przed, jak i po wlaniu podłoża do próbki, w celu usunięcia drobnoustrojów.
- korka z waty, którym zamknięta jest kolba z podłożem oraz korka celulozowego, którym zamknięta jest sterylna próbka nie należy odkładać na stół laboratoryjny, lecz trzymać w rękach, zgodnie z instrukcją prowadzącego zajęcia.
- próbkę należy napęlić podłożem maksymalnie w 1/3 jej objętości, a po jej zamknięciu korkiem celulozowym odłożyć natychmiast do zastygnięcia w formie skosu, a więc ułożyć ją opierając pod kątem ok. 20-30° w stosunku do powierzchni.
- nie należy poruszać probówką w trakcie zestalania się podłoża żeby nie uszkodzić powierzchni skosu (w zależności od temperatury powietrza w laboratorium przez ok. 10-15 minut).
- po zestaleniu się podłoża próbkę należy opisać w celu umożliwienia późniejszej identyfikacji posiewanych drobnoustrojów oraz osoby wykonującej posiew,
- wszystkie napisy na próbce umieszczać nieco poniżej korka, w poprzek próbki, a nie wzdłuż, tak żeby zajmować jak najmniejszą powierzchnię.

### Oczekiwany efekt pracy ucznia (zdjęcie, wypełniona karta pracy, ...)

W efekcie pracy ucznia w ramach wykonywania zadania 1 oczekuje się opanowania przez niego techniki sporządzania podłoża w formie skosu w próbce. Uczeń powinien opanować również wiedzę teoretyczną dotyczącą podłoży hodowlanych oraz ich cech i rodzajów.

### Oczekiwania wobec nauczyciela opiekuna

Rolą nauczyciela podczas realizacji tego zadania jest instruowanie i szkolenie ucznia, nadzorowanie wykonywanych przez niego czynności, wspieranie go, zachęcanie do cierpliwej i spokojnej pracy oraz sprawdzanie wiedzy teoretycznej ucznia, którą powinien przyswoić sobie przed przystąpieniem do zajęć. Nauczyciel powinien nadzorować pracę ucznia, jednak powinien unikać wykonywania pracy za niego, nawet jeśli jakieś zadanie zajmuje uczniowi więcej czasu, niż pozostałym uczestnikom zajęć. Uczeń powinien mieć

szansę sprawdzenia się i wykazania samodzielnością.

Rolą nauczyciela jest również przydzielenie każdemu z uczniów jednej sterylnej probówki, w której uczeń sporządzi skos oraz kolby z upłynnionym, gorącym podłożem agarowym (1 kolba z podłożem na każdy stół laboratoryjny – pozwoli to nadzorować pracę uczniów i uniknąć poparzeń!).

## Zadanie 2

### Posiew bakterii tlenowych z rodzaju *Bacillus* i *Escherichia* na skosie w probówce, w komorze laminarnej

#### Opis zadania (co robimy, dlaczego)

Po przygotowaniu podłoża hodowlanego w szkle laboratoryjnym musimy wprowadzić bakterie na to podłoże, aby mogły na nim rosnąć i rozwijać się. Podłoże jest sterylne (jałowe), co pozwala sądzić, że po wprowadzeniu na nie interesujących nas bakterii nastąpi wzrost jedynie tych drobnoustrojów. Żeby istotnie tak się stało należy podczas posiewu bakterii zachować jak najbardziej sterylne warunki. Do zachowania takich warunków służą m.in. komory laminarne, w których uczniowie będą dokonywali posiewów trzech gatunków bakterii na przygotowane w zadaniu pierwszym skosy. Posiewane bakterie to: *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* oraz *Bacillus megaterium*.

#### Możliwe trudności w czasie realizacji zadania (zapobieganie, radzenie sobie z trudnościami)

Trudności podczas realizacji tego zadania mogą wynikać przede wszystkim z braku wprawy w posługiwaniu się eżą oraz braku zarówno doświadczenia, jak i znajomości przez uczniów podstawowych technik stosowanych podczas posiewu drobnoustrojów. Najlepszym rozwiązaniem niezmiennie pozostaje tutaj spokój i cierpliwość, a także skupienie podczas zajęć i współpraca z prowadzącym zajęcia. Uczeń powinien starać się wykonywać polecenia nauczyciela i nie wahać się prosić o pomoc w sytuacjach kiedy ma jakiegokolwiek wątpliwości.

#### Kto wykonuje zadanie (uczeń samodzielnie, uczniowie w parach, ...)

Każdy uczeń pracuje samodzielnie, samodzielnie dokonuje posiewu bakterii na skosie w oparciu o instruktaż, nadzór i pomoc prowadzącego ćwiczenia oraz w oparciu o informacje znajdujące się w instrukcji przygotowanej dla ucznia.

#### Sposób wykonania

Zadanie to należy wykonać zgodnie z informacjami i wskazówkami zamieszczonymi w **Instrukcji nr 2** przygotowanej dla uczniów wykonujących zadanie. Instrukcja została umieszczona w dalszej części opracowania.

#### Wskazówki dla ucznia (na co zwrócić uwagę, czego nie przeoczyć, co pominąć, ...)

Szczególną uwagę podczas wykonywania zadania 2 należy zwrócić na następujące kwestie:

- posiewu należy dokonać w komorze laminarnej, przy włączonym palniku.

- eżę, za pomocą której będziemy przenosić na skos materiał biologiczny, należy każdorazowo wyżarzyć w płomieniu palnika, zarówno przed, jak i po wykonaniu posiewu.
- celulozowych korków zamykających probówki z materiałem do posiewu oraz z czystym skosem nie należy odkładać w żadne miejsce komory, lecz trzymać w rękach.
- po wyżarzeniu eży poczekać chwilę przed pobraniem materiału biologicznego z probówki, ponieważ zbyt gorącą eżę można uszkodzić bądź spalić bakterie.
- pobierać niewielką ilość materiału biologicznego z probówki delikatnie dotykając 2-3 razy powierzchni skosu, na której gołym okiem widoczne są wyrosłe kolonie bakterii.
- materiał biologiczny nanosić na czysty skos wykonując zygzakowatą linię na powierzchni skosu, uważając przy tym, żeby nie uszkodzić podłoża w probówce i nie wbijać oczka eży w głąb podłoża .

Oczekiwany efekt pracy ucznia (zdjęcie, wypełniona karta pracy, ...)

W efekcie wykonania zadania 2 uczeń powinien opanować technikę posiewu drobnoustrojów na skosach w probówkach. Oczekiwany efekt pracy ucznia będzie również wyhodowanie na skosie w probówce bakterii, które będą wykorzystane do sporządzania preparatów utrwalonych barwionych metodą Grama oraz identyfikacji bakterii gramodatnich i gramujemnych.

Oczekiwania wobec nauczyciela opiekuna

Rolą nauczyciela podczas realizacji tego zadania jest instruowanie i szkolenie ucznia, nadzorowanie wykonywanych przez niego czynności, wspieranie go oraz zachęcanie do cierpliwej i spokojnej pracy. Nauczyciel powinien nadzorować pracę ucznia, jednak powinien unikać wykonywania pracy za niego, nawet jeśli jakieś zadanie zajmuje uczniowi więcej czasu, niż pozostałym uczestnikom zajęć. Uczeń powinien mieć szansę sprawdzenia się, wykazania samodzielnością, jednocześnie jednak nie powinien bać się czy wstydzić zadawać pytań nauczycielowi czy prosić go o radę.

Rolą nauczyciela jest również przydzielenie ucznia do jednej z trzech komór laminarnych, w których będą odbywały się posiewy trzech różnych gatunków bakterii, sprawdzenie czy probówki zostały przed posiewem odpowiednio oznakowane oraz dopilnowanie, żeby po posiewie probówki trafiły do ciepłarki i były inkubowane w temperaturze 37°C.

### **Zadanie 3**

#### **Posiew bakterii beztlenowych z rodzaju *Clostridium* na podłoże w płytkach Petriego**

Opis zadania (co robimy, dlaczego)

Ze względu na ich stosunek do tlenu bakterie można najogólniej podzielić na bakterie tlenowe i beztlenowe. Beztlenowce, to bakterie których wzrost i rozwój następuje w warunkach beztlenowych, a więc bez dostępu tlenu. Czy rzeczywiście jest to możliwe? Czy bakterie mogą się rozwijać bez dostępu tlenu? Uczniowie będą mogli sami sprawdzić czy istotnie tak jest dokonując posiewu bakterii beztlenowych z rodzaju *Clostridium* w płytkach Petriego metodą płytek tartych, a później zaobserwować ich wzrost bądź jego brak.

Możliwe trudności w czasie realizacji zadania (zapobieganie, radzenie sobie

### z trudnościami)

W czasie realizacji tego zadania nie przewiduje się większych trudności. Jego realizacja wymaga zachowania jałowych warunków, a więc pracy z włączonym palnikiem gazowym, należy więc zachować szczególną ostrożność podczas pracy z ogniem, aby się nie poparzyć. Najlepszym rozwiązaniem niezmiennie pozostaje tutaj spokój i cierpliwość, a także skupienie podczas zajęć i współpraca z prowadzącym zajęcia. Uczeń powinien starać się wykonywać polecenia nauczyciela i nie wahać się prosić o pomoc w sytuacjach kiedy ma jakiegokolwiek wątpliwości.

### Kto wykonuje zadanie (uczeń samodzielnie, uczniowie w parach, ...)

Uczniowie pracują w parach, w oparciu o instruktaż, nadzór i pomoc prowadzącego ćwiczenia oraz w oparciu o informacje znajdujące się w instrukcji przygotowanej dla ucznia.

### Sposób wykonania

Zadanie to należy wykonać zgodnie z informacjami i wskazówkami zamieszczonymi w **Instrukcji nr 3** przygotowanej dla uczniów wykonujących zadanie. Instrukcja została umieszczona w dalszej części opracowania.

### Wskazówki dla ucznia (na co zwrócić uwagę, czego nie przeoczyć, co pominąć, ...)

Szczególną uwagę podczas wykonywania zadania 3 należy zwrócić na następujące kwestie:

- wprowadzając materiał biologiczny na podłoże hodowlane do płytki należy uchylać wieczko płytki w jak najmniejszym stopniu, aby uniknąć zakażeń.
- pracę należy wykonywać przy włączonym palniku gazowym.
- brzegi płytki należy bardzo dokładnie okleić plastrem, żeby zapewnić drobnoustrojom warunki beztlenowe.

### Oczekiwany efekt pracy ucznia (zdjęcie, wypełniona karta pracy, ...)

W efekcie wykonania zadania 3 uczeń powinien opanować technikę posiewu drobnoustrojów w płytkach Petriego metodą płytek tartych. Oczekiwany efekt pracy ucznia będzie również wyhodowanie w płytce bakterii beztlenowych z rodzaju *Clostridium*, które będą wykorzystane do sporządzania preparatów utrwalonych barwionych metodą Grama.

### Oczekiwania wobec nauczyciela opiekuna

Rolą nauczyciela podczas realizacji tego zadania jest instruowanie ucznia i nadzorowanie wykonywanych przez niego czynności. Nauczyciel powinien służyć uczniowi radą i pomocą, dawać wskazówki i zachęcać do działania.

Rolą nauczyciela jest również przydzielenie każdej parze uczniów jednej sterylnej płytki Petriego z podłożem, w której uczniowie dokonają posiewu oraz przydzielenie skosu z bakteriami z rodzaju *Clostridium*, z którego będzie pobierany materiał biologiczny do posiewu. Nauczyciel powinien dopilnować, żeby po posiewie i zestaleniu podłoży w płytkach trafiły one do cieplarki i były inkubowane w temperaturze 37°C.

## **Zadanie 4**

### **Oglądanie i opisywanie wzrostu bakterii tlenowych na skosie oraz bakterii beztlenowych w płytce Petriego**

#### Opis zadania (co robimy, dlaczego)

Obserwacje cech morfologicznych i rozwojowych pojedynczych komórek drobnoustrojów prowadzi się stosując mikroskopowe preparaty przyżyciowe albo preparaty utrwalone. Zbiór komórek wyrastających na skosie w probówce lub na podłożu stałym w płytce Petriego nazywamy kolonią. Obserwacji cech morfologicznych całych kolonii drobnoustrojów możemy dokonać gołym okiem, uwzględniając następujące cechy: wielkość i kształt kolonii, brzeg, powierzchnię i wyniosłość kolonii, kolor, przejrzystość, konsystencję i zapach kolonii. Uczniowie, na podstawie obserwacji makroskopowych (gołym okiem) określą cechy morfologiczne posiewanych bakterii tlenowych i beztlenowych oraz określą łączące je cechy wspólne oraz cechy różnicujące.

#### Możliwe trudności w czasie realizacji zadania (zapobieganie, radzenie sobie z trudnościami)

Podstawowe trudności, na które uczeń może natknąć się podczas realizacji tego zadania wynikają z niedostatecznego opanowania przez niego podstaw teoretycznych dotyczących znajomości cech morfologicznych bakterii i ich określania oraz braku staranności i dokładności podczas sporządzania opisów oglądanych materiałów.

Najlepszym rozwiązaniem niezmiennie pozostaje tutaj właściwe przygotowanie się ucznia do zajęć, a także skupienie podczas zajęć i współpraca z prowadzącym zajęcia. Uczeń powinien starać się wykonywać polecenia nauczyciela i nie wahać się prosić o pomoc w sytuacjach kiedy ma jakiegokolwiek wątpliwości.

#### Kto wykonuje zadanie (uczeń samodzielnie, uczniowie w parach, ...)

Każdy uczeń pracuje indywidualnie, w oparciu o instruktaż, nadzór i pomoc prowadzącego ćwiczenia oraz w oparciu o informacje znajdujące się w instrukcji przygotowanej dla ucznia.

#### Sposób wykonania

Zadanie to należy wykonać zgodnie z informacjami i wskazówkami zamieszczonymi w **Instrukcji nr 4** przygotowanej dla uczniów wykonujących zadanie. Instrukcja została umieszczona w dalszej części opracowania.

#### Wskazówki dla ucznia (na co zwrócić uwagę, czego nie przeoczyć, co pominąć, ...)

Szczególną uwagę podczas wykonywania zadania 4 należy zwrócić na określenie wszystkich możliwych do określenia cech morfologicznych kolonii wyrosłych na skosach i w płytkach Petriego oraz stosowanie w tym celu prawidłowych określeń, które zostały zawarte w **Instrukcji nr 4**. Zadanie należy wykonać dokładnie, wnikliwie analizując wyrost kolonie bakterii.

#### Oczekiwany efekt pracy ucznia (zdjęcie, wypełniona karta pracy, ...)

Wymiernym efektem pracy ucznia podczas realizacji tego zadania będzie wypełnienie

#### **Karty pracy do zadania 4**

#### Oczekiwania wobec nauczyciela opiekuna

Role nauczyciela w tym zadaniu jest rozdanie uczniom probówek i płytek Petriego z wyrosłymi na nich koloniami bakterii (po jednej probówce i płytce na parę) oraz rozdanie,



zebranie i nadzorowanie wypełniania przez uczniów Karty pracy do zadania 4. Nauczyciel powinien służyć uczniowi radą i pomocą, dawać wskazówki i zachęcać do działania, jednak uczeń powinien pracować samodzielnie.

## **Zadanie 5**

### **Przygotowanie preparatów bakteryjnych utrwalonych i barwionych metodą Grama oraz ich obserwacja w mikroskopie**

#### **Opis zadania (co robimy, dlaczego)**

Preparat mikroskopowy jest to szkiełko podstawowe (przedmiotowe) z umieszczonym na jego powierzchni materiałem biologicznym. O barwieniu preparatów utrwalonych mówimy w sytuacji, gdy barwieniu poddaje się utrwalone (martwe) komórki drobnoustrojów. Utrwalanie polega na termicznym lub chemicznym zabiciu mikroorganizmów i przytwierdzeniu ich do powierzchni szkiełka podstawowego. Celem utrwalania jest ułatwienie stosowanym barwnikom penetracji przez ścianę komórkową i ich wnikięcie do wnętrza komórki oraz odsłonięcie w ścianach komórkowych mikroorganizmów związków, z którymi wiążą się barwniki.

Preparaty można mikroskopować bezpośrednio po wykonaniu lub poddać je barwieniu. Barwienie jest to proces fizyko-chemiczny polegający na wnikięciu barwnika do wnętrza komórki mikroorganizmu i utworzeniu barwnego kompleksu z cytoplazmą lub wewnątrzkomórkowymi strukturami komórki. Barwienie ma na celu ułatwienie obserwacji cech morfologicznych i diagnostycznych komórek mikroorganizmów. W ramach zadania uczniowie przygotowują preparat utrwalany z mieszaniny różnych bakterii, utrwalają go, barwią i oglądają w mikroskopie przy użyciu imersji.

#### **Możliwe trudności w czasie realizacji zadania (zapobieganie, radzenie sobie z trudnościami)**

Podstawowe trudności, na które uczeń może natknąć się podczas realizacji tego zadania wynikają z:

- niedostatecznego opanowania przez ucznia podstaw teoretycznych dotyczących znajomości budowy i zasady działania mikroskopu oraz niezadowalającego opanowania techniki mikroskopowania,
- braku podstaw teoretycznych dotyczących sposobu przygotowania preparatu utrwalanego barwionego metodą Grama,
- braku staranności i dokładności podczas sporządzania preparatu,
- nakładania zbyt dużej lub zbyt małej kropli olejku imersyjnego na preparat, co znacznie utrudnia lub wręcz uniemożliwia znalezienie obrazu preparatu w mikroskopie,
- braku cierpliwości, skupienia i opanowania ze strony ucznia podczas pracy z mikroskopem.

Najlepszym rozwiązaniem niezmiennie pozostaje tutaj właściwe przygotowanie się ucznia do zajęć, a także skupienie podczas zajęć i współpraca z prowadzącym zajęcia. Uczeń powinien starać się wykonywać polecenia nauczyciela i nie wahać się prosić o pomoc w sytuacjach kiedy ma jakiegokolwiek wątpliwości.

Kto wykonuje zadanie (uczeń samodzielnie, uczniowie w parach, ...)

Każdy uczeń pracuje samodzielnie, samodzielnie wykonuje preparat, utrwała go i barwi w oparciu o instruktaż, nadzór i pomoc prowadzącego ćwiczenia oraz w oparciu o informacje znajdujące się w instrukcji przygotowanej dla ucznia.

Sposób wykonania

Zadanie to należy wykonać zgodnie z informacjami i wskazówkami zamieszczonymi w **Instrukcji nr 5** przygotowanej dla uczniów wykonujących zadanie. Instrukcja została umieszczona w dalszej części opracowania.

Wskazówki dla ucznia (na co zwrócić uwagę, czego nie przeoczyć, co pominąć, ...)

Szczególną uwagę podczas wykonywania tego zadania należy zwrócić na następujące kwestie:

- szkiełko przedmiotowe, przed sporządzeniem rozmazu, należy opisać rysując np. literę lub strzałkę, aby po barwieniu wiedzieć, z której strony nanieśliśmy materiał,
- rozmaz na szkiełku przedmiotowym należy robić na tyle duży, żeby mógł wyschnąć w jak najkrótszym czasie.
- rozmaz należy utrwalić poprzez kilkakrotne przesunięcie szkiełka przedmiotowego przez płomień palnika, pamiętając o tym, żeby szkiełko było skierowane rozmazem do góry; w przeciwnym razie można spalić preparat.
- należy przestrzegać czasu i procedury barwienia – kolejności stosowania poszczególnych barwników i odczynników.
- po barwieniu preparat należy wysuszyć.
- na preparat nie należy nakładać szkiełka przykrywkowego, lecz nanieść kroplę olejku immersyjnego i oglądać w mikroskopie pod obiektywem powiększającym 100 razy.
- zgodnie z definicją imersji kropla olejku immersyjnego musi wypełniać przestrzeń pomiędzy obiektywem, a preparatem, a więc kropla olejku znajdująca się na szkiełku przedmiotowym musi dotykać obiektywu,
- kropla olejku immersyjnego nie powinna być ani zbyt duża, ani zbyt mała, ponieważ utrudnia to, a czasem wręcz uniemożliwia znalezienie obrazu preparatu w mikroskopie,
- znajdujący się pod stolikiem mikroskopu aparat Abbego z kondensorem musi być podniesiony maksymalnie do góry podczas stosowania obiektywu powiększającego 100 razy, po to żeby właściwie doświetlić obraz widziany w mikroskopie.

Oczekiwany efekt pracy ucznia (zdjęcie, wypełniona karta pracy, ...)

Wymiernym efektem pracy ucznia w efekcie realizacji zadania 5 będzie opanowanie w teorii i praktyce metodyki barwienia metodą Grama oraz wypełnienie **Karty pracy do zadania 5**.

Oczekiwania wobec nauczyciela opiekuna

Rolą nauczyciela podczas realizacji tego zadania jest instruowanie ucznia i nadzorowanie jego pracy podczas przygotowywania preparatu, podczas jego utrwalania i barwienia oraz podczas pracy przy mikroskopie. Nauczyciel powinien nadzorować pracę ucznia, jednak

powinien unikać wykonywania pracy za niego. Nauczyciel powinien służyć uczniowi radą i pomocą oraz powinien dawać wskazówki pomagające w wykonaniu zadania.

Rolą nauczyciela w tym zadaniu jest również rozdanie uczniom szkiełek przedmiotowych, kolbek z mieszaniną różnych rodzajów bakterii oraz Kart pracy do zadania 5, a także zebranie i nadzorowanie wypełniania tych kart.

## **Zadanie 6**

### **Obserwacja preparatów przy użyciu kamery mikroskopowej i rejestracja obrazów w komputerze i na przenośnym dysku**

#### Opis zadania (co robimy, dlaczego)

Obserwacje mikroskopowe pozwalają stwierdzić obecność drobnoustrojów w badanych próbach, jednak z punktu widzenia poznawczego i edukacyjnego, ważna jest również możliwość zapisu i obróbki obrazów preparatów mikroskopowych. Uczniowie będą mieli taką możliwość dzięki wykorzystaniu w laboratorium kamery mikroskopowej umożliwiającej rejestrację obrazów wykonanych preparatów. W pakiecie z kamerą znajduje się program komputerowy, który umożliwi uczniom zapisanie obrazu preparatu na komputerze, a następnie na własnym dysku przenośnym, co umożliwi wykorzystanie zapisanych zdjęć w prezentacji przygotowywanej w programie PowerPoint.

#### Możliwe trudności w czasie realizacji zadania (zapobieganie, radzenie sobie z trudnościami)

Nie przewiduje się szczególnych trudności w trakcie wykonywania tego zadania. Można wprawdzie napotkać na problemy ze strony programu komputerowego czy samej kamery, jednak są to problemy natury technicznej i konstrukcyjnej, niezależne od ucznia czy nauczyciela.

#### Kto wykonuje zadanie (uczeń samodzielnie, uczniowie w parach, ...)

W laboratorium mikrobiologicznym znajduje się jeden komputer i mikroskop wyposażony w kamerę mikroskopową. Każdy uczeń pracuje indywidualnie, przy tym komputerze i mikroskopie, w oparciu o instruktaż, nadzór i pomoc prowadzącego ćwiczenia oraz w oparciu o informacje znajdujące się w instrukcji przygotowanej dla ucznia.

#### Sposób wykonania

Zadanie to należy wykonać zgodnie z informacjami i wskazówkami zamieszczonymi w **Instrukcji nr 6** przygotowanej dla uczniów wykonujących zadanie. Instrukcja została umieszczona w dalszej części opracowania.

#### Wskazówki dla ucznia (na co zwrócić uwagę, czego nie przeoczyć, co pominąć, ...)

Szczególną uwagę podczas wykonywania tego zadania należy zwrócić na to, żeby preparat w mikroskopie był właściwie doświetlony i wyraźny, tak aby w efekcie użycia kamery uzyskać zdjęcie jak najlepszej jakości, pozwalające na obserwację jak największej ilości szczegółów preparatu.

#### Oczekiwany efekt pracy ucznia (zdjęcie, wypełniona karta pracy, ...)

Wymiernym efektem pracy ucznia w efekcie realizacji zadania 5 będą zdjęcia preparatów mikroskopowych barwiony metodą Grama, które uczeń wykonał samodzielnie oraz gotowe zdjęcia różnych bakterii wykorzystywanych w technologii żywności. Zdjęcia te

uczeń będzie mógł zapisać na dysku przenośnym, a następnie zamieścić w prezentacji komputerowej wykonanej w programie PowerPoint w ramach kolejnego zadania.

#### Oczekiwania wobec nauczyciela opiekuna

Rolą nauczyciela podczas realizacji tego zadania jest instruowanie ucznia i nadzorowanie jego pracy przy mikroskopie, kamerze i komputerze. Nauczyciel powinien nadzorować pracę ucznia, jednak powinien unikać wykonywania pracy za niego. Uczeń powinien mieć szansę wykazania się samodzielnością i umiejętnością wykonywania prostych zadań w komputerze, np. zapisywania danych na dysku przenośnym. Nauczyciel powinien służyć uczniowi radą i pomocą, powinien dawać wskazówki pomagające w wykonaniu zadania oraz powinien nadzorować pracę ucznia.

### **Zadanie 7**

#### **Przygotowanie prezentacji w programie PowerPoint z wykonanych w ramach zajęć badań i obserwacji oraz z wyciągniętych wniosków**

##### Opis zadania (co robimy, dlaczego)

Zadaniem wykonywanym w laboratorium komputerowym zwięzającym pracę w laboratorium mikrobiologicznym jest sporządzenie krótkiej prezentacji w programie PowerPoint, w której uczniowie zamieszczają najistotniejsze informacje związane z tematyką realizowanego projektu, zdjęcia wykonanych samodzielnie w laboratorium preparatów mikroskopowych oraz wnioski wynikające z realizacji tematu.

##### Możliwe trudności w czasie realizacji zadania (zapobieganie, radzenie sobie z trudnościami)

Realizacja tego zadania wymaga od uczniów znajomości podstaw programu PowerPoint, która pozwoli na stworzenie prezentacji stanowiącej podsumowanie wykonanych badań, analiz i obserwacji. Trudności w czasie realizacji tego zadania wynikać więc mogą przede wszystkim z niedostatecznej znajomości przez uczniów obsługi komputera i programu PowerPoint, który będzie niezbędny do prawidłowego wykonania tego zadania.

##### Kto wykonuje zadanie (uczeń samodzielnie, uczniowie w parach, ...)

Przy jednym komputerze znajduje się jeden uczeń, w związku z czym każdy uczeń pracuje indywidualnie, w oparciu o instruktaż, nadzór i pomoc prowadzącego ćwiczenia.

##### Sposób wykonania

Zadanie to należy wykonać zgodnie z informacjami i wskazówkami zamieszczonymi w **Instrukcji nr 7** przygotowanej dla uczniów wykonujących zadanie. Instrukcja została umieszczona w dalszej części opracowania.

##### Wskazówki dla ucznia (na co zwrócić uwagę, czego nie przeoczyć, co pominąć, ...)

Uczeń powinien przede wszystkim zwrócić uwagę na właściwe rozplanowanie sobie zadań, tak żeby zdążył wykonać zadanie w założonym czasie. Powinien się skupić na wykonywanej pracy, wykonywać prezentację samodzielnie i sam powinien szukać rozwiązań i pomysłów na zaprezentowanie zgromadzonego materiału i własnej wiedzy. W prezentacji uczeń powinien skupić się przede wszystkim na własnych obserwacjach, zdobytych podczas zajęć doświadczeniach, spostrzeżeniach i odczuciach, a nie na wiedzy książkowej i teoretycznej.

### Oczekiwany efekt pracy ucznia (zdjęcie, wypełniona karta pracy, ...)

Efektom pracy ucznia wykonanej w ramach tego zadania będzie opracowanie wykonane w programie PowerPoint zawierające obserwacje, wyniki badań, zdjęcia oraz wnioski wynikające z realizowanych w ramach zajęć laboratoryjnych zadań.

### Oczekiwania wobec nauczyciela opiekuna

Rolą nauczyciela podczas realizacji tego zadania jest instruowanie ucznia oraz nadzorowanie wykonywanych przez niego zadań. Uczeń powinien mieć szansę wykazania się samodzielnością i kreatywnością. Nauczyciel powinien służyć uczniowi radą i pomocą podczas wykonywania prezentacji, powinien dawać wskazówki, stymulować do działania, jednak nie powinien podsuwać gotowych rozwiązań.

Rolą nauczyciela jest również zebranie wszystkich gotowych opracowań na jeden dysk przenośny w celu oceny pracy ucznia wykonanej podczas zajęć.

## **Instrukcja - krok po kroku dla ucznia (w języku ucznia)**

### **Instrukcja nr 1**

#### Instrukcja sporządzania podłoża w formie skosów w probówce:

- przygotuj sterylną probówkę i poluzuj nieco zamykający ją korek, tak aby bez problemu wyciągnąć korek jedną ręką,
- chwyć ręką w rękawicy, od spodu kolbę z gorącym upłynnionym podłożem hodowlanym (bulion z agarem),
- drugą ręką otwórz kolbę wyciągając z niej korek z waty w taki sposób, żeby trzy palce – kciuk, palec wskazujący oraz środkowy – pozostały wolne,
- opal brzeg kolby przesuwając go kilkakrotnie przez płomień palnika,
- wyciągnij korek celulozowy zamykający probówkę za pomocą trzech wolnych palców i opierając brzeg kolby o brzeg probówki napełnij ją podłożem w 1/3 jej objętości,
- zamknij probówkę celulozowym korkiem,
- ponownie opal brzeg kolby przesuwając go kilkakrotnie przez płomień palnika,
- opal korek z waty zamykający kolbę poprzez dwu-, trzykrotne przesunięcie przez płomień palnika,
- zamknij kolbę z podłożem korkiem z waty,
- odstaw kolbę z podłożem, zdejmij rękawicę, dociśnij korek celulozowy zamykający probówkę,
- odłóż probówkę z podłożem układając ją pod kątem ok. 20-30°, do zastygnięcia w formie skosu,
- poczekaj ok. 10-15 minut, do całkowitego zestalenia skosu,
- w celu umożliwienia późniejszej identyfikacji posiewanych drobnoustrojów oraz osoby wykonującej posiew opisz probówkę w następujący sposób:
  - data posiewu, inicjały wykonującego posiew, E.c. – w przypadku gdy posiewane bakterie to *Escherichia coli*,
  - data posiewu, inicjały wykonującego posiew, B.s. – w przypadku gdy posiewane bakterie to *Bacillus subtilis*,

- data posiewu, inicjały wykonującego posiew, B.s. – w przypadku gdy posiewane bakterie to *Bacillus megaterium*.

### Instrukcja nr 2

Instrukcja wykonywania posiewu bakterii tlenowych z rodzaju *Bacillus* i *Escherichia* na skosie w probówce, w komorze laminarnej:

- probówkę z przygotowanym skosem umieść w komorze laminarnej,
- eżę wyżarz trzymając ją pionowo przez kilka, kilkanaście sekund w płomieniu palnika,
- jedną probówkę z przygotowanym czystym skosem oraz drugą ze skosem, na którym znajdują się bakterie, które będą posiewane, umieść w lewej ręce, jedną nad drugą, powierzchnią skosu do góry,
- małym palcem prawej ręki chwyć i wyciągnij korek z probówki zawierającej bakterie, eżę dotknij delikatnie 2-3 razy powierzchni skosu w miejscu gdzie widoczne są kolonie bakterii, a następnie zamknij probówkę korkiem,
- małym palcem prawej ręki chwyć i wyciągnij korek z probówki z czystym skosem, eżę przenieś bakterie na skos delikatnie „rysując” oczkiem eży linię falistą na powierzchni skosu (należy uważać, żeby podczas posiewu nie uszkodzić powierzchni skosu), a następnie zamknij probówkę korkiem,
- eżę wyżarz trzymając ją pionowo przez kilka, kilkanaście sekund w płomieniu palnika,
- probówkę z wykonanym posiewem wyjmij z komory laminarnej, umieść w statywie i wstaw do cieplarki; inkubuj w temperaturze 37°C.

### Instrukcja nr 3

Instrukcja posiewu bakterii beztlenowych z rodzaju *Clostridium* na podłoże w płytkach Petriego:

- przygotuj jałową płytkę Petriego z podłożem hodowlanym,
- eżę wyżarz trzymając ją pionowo przez kilka, kilkanaście sekund w płomieniu palnika i odczekaj chwilę aż wystygnie,
- małym palcem prawej ręki chwyć i wyciągnij korek z probówki zawierającej bakterie *Clostridium*, eżę dotknij delikatnie 2-3 razy powierzchni skosu w miejscu gdzie widoczne są kolonie bakterii, a następnie zamknij probówkę korkiem,
- delikatnie uchyl wieczko płytki i na powierzchni znajdującego się w niej podłoża delikatnie „rysuj” oczkiem eży linię falistą (należy uważać, żeby podczas posiewu nie uszkodzić powierzchni podłoża), a następnie zamknij płytkę,
- eżę wyżarz trzymając ją pionowo przez kilka, kilkanaście sekund w płomieniu palnika,
- brzegi płytki Petriego oklej bardzo dokładnie plastrem, tak aby zapewnić beztlenowe warunki hodowli,
- płytkę opisz na jej powierzchni (data posiewu, inicjały posiewającego) i umieść w cieplarce, w temperaturze 37°C do inkubacji.

### Instrukcja nr 4

Instrukcja oglądania i opisywania wzrostu bakterii tlenowych na skosie oraz bakterii beztlenowych w płytce Petriego:



- przygotuj probówkę z posiewanymi bakteriami tlenowymi z rodzaju *Escherichia* bądź *Bacillus* oraz płytkę Petriego z posiewanymi bakteriami beztlenowymi z rodzaju *Clostridium*,
- przyjrzyj się koloniom, które wyrosły na powierzchni podłoża i scharakteryzuj je wspomagając się informacjami podanymi poniżej,

- Wielkość kolonii – duże, średnie, małe, drobne, średnica kolonii podana w milimetrach
- Kształt kolonii:



- Brzeg kolonii:



- Powierzchnia kolonii: gładka, szorstka, pomarszczona, nitkowata, ziarnista, matowa, błyszcząca;
- Wyniosłość kolonii ponad powierzchnię podłoża:



- Kolor kolonii: barwa samej kolonii np. biała, kremowa, beżowa, żółta; zabarwienie podłoża wokół kolonii, strefa przejaśnienia wokół kolonii itp.
  - Przejrzystość kolonii: przejrzysta, mętna, opalizująca, nieprzejrzysta;
  - Konsystencję kolonii sprawdza się za pomocą ezy i określa jako: suchą, lepłą, śluzową;
  - Zapach kolonii - mydlany, kwaśny, piwa, miodu, kasztanów, gnilny itp.
- wypełnij Kartę pracy do zadania 4.

### Instrukcja nr 5

#### Instrukcja przygotowania preparatów bakteryjnych utrwalonych i barwionych metodą Grama oraz ich obserwacji w mikroskopie:

- odtłuść szkiełko przedmiotowe poprzez kilkakrotne przesunięcie szkiełka przez płomień palnika,
- na odtłuszczone szkiełko przedmiotowe nanieś pipetą 1-2 krople mieszaniny bakterii,
- eżę wyżarz w płomieniu palnika i poczekaj chwilę, aż wystygnie,

- używając ezy wykonaj rozmaz kropli mieszaniny bakterii w środkowej części szkiełka przedmiotowego,
- wysusz preparat w temperaturze pokojowej, a następnie utrwaj termicznie przesuwając szkiełko kilkakrotnie przez płomień palnika, skierowane rozmazem do góry(!),
- po ostygnięciu preparatu umieść go na podstawce w zlewie i rozpocznij barwienie,
- na preparat nakrop barwnik podstawowy – roztwór fioletu krystalicznego – na ok. 2-3 minuty, a po upływie tego czasu zlej barwnik,
- na preparat nakrop utrwalacz – płyn Lugola – na ok. 1 minutę, a po upływie tego czasu zlej utrwalacz,
- preparat odbarwiaj kilkakrotnie nakrapiając i zlewając z jego powierzchni mieszaninę alkoholu z acetonem,
- preparat spłukaj dokładnie i bardzo delikatnie wodą
- na preparat nakrop barwnik kontrastowy – fuksynę lub safraninę – na ok. 30 sekund, a po upływie tego czasu zlej barwnik,
- preparat spłukaj dokładnie i bardzo delikatnie wodą,
- osusz preparat bardzo delikatnie bibułą.
- oglądaj w mikroskopie z użyciem olejku immersyjnego (pod obiektywem powiększającym 100-krotnie),
- na preparat nanieś kroplę olejku imersyjnego,
- włącz mikroskop do gniazda prądu,
- za pomocą śruby makrometrycznej opuść stolik mikroskopu w najniższe położenie,
- umieść przygotowany preparat bakteryjny w urządzeniu krzyżowym na stoliku,
- włącznikiem włącz oświetlenie mikroskopu,
- pokrętlą potencjometru zwiększ oświetlenie,
- za pomocą urządzenia rewolwerowego z obiektywami ustaw obiektyw powiększający 100-krotnie (obiektyw imersyjny) w osi optycznej mikroskopu,
- stolik z preparatem podnieś maksymalnie do góry, aż do zetknięcia się kropli olejku imersyjnego znajdującego się na preparacie z obiektywem; czynność tę koniecznie obserwuj na poziomie stolika, czyli patrząc z boku, a nie w okular mikroskopu,
- obserwując preparat przy tak dużym powiększeniu (obiektyw 100x), aparat oświetlający Abbego podnieś maksymalnie do góry, żeby jak najlepiej doświetlić preparat,
- patrząc w okular upewnij się, że pole widzenia w mikroskopie jest jasne i właściwie oświetlone, światło nie razi w oczy, a jednocześnie dobrze oświetla pole widzenia w mikroskopie; w razie konieczności dostosuj jasność obrazu do swojego oka za pomocą pokręta potencjometru oraz aparatu Abbego,
- po ustawieniu stolika z preparatem, patrząc w okular bardzo powoli opuszczaj stolik z preparatem za pomocą śruby makrometrycznej, aż do chwili znalezienia obrazu,
- jeśli obraz nie zostanie znaleziony, wówczas należy podnieść stolik ponownie do góry i ponownie, bardzo powoli opuszczać stolik z preparatem aż do chwili uzyskania obrazu,
- należy pamiętać, że obiektyw musi być cały czas zanurzony w olejku imersyjnym znajdującym się na preparacie,
- za pomocą śruby mikrometrycznej uzyskaj ostry obraz preparatu,
- skonsultuj otrzymany obraz z prowadzącym zajęcia,
- wypełnij Kartę pracy do zadania 5.

## Instrukcja nr 6

### Instrukcja obserwacji preparatów przy użyciu kamery mikroskopowej i rejestracji obrazów w komputerze i na przenośnym dysku:

- w mikroskopie wyposażonym w kamerę mikroskopową ustaw pokrętkę potencjometru (3) na najmniejszy wskaźnik jasności,
- za pomocą śruby makrometrycznej (10) opuść stolik mikroskopu (9) w najniższe położenie,
- umieść obserwowany obiekt (preparat) na stoliku mikroskopu,
- włącznikiem (2) włącz oświetlenie mikroskopu,
- pokrętką potencjometru (3) zwiększ oświetlenie,
- za pomocą urządzenia rewolwerowego z obiektywami (13) ustaw obiektyw powiększający 5-krotnie w osi optycznej mikroskopu,
- stolik z preparatem podnieś maksymalnie do góry; czynność tę koniecznie obserwuj na poziomie stolika, czyli patrząc z boku, a nie w okular mikroskopu,
- obserwując preparat przy małym powiększeniu (obiektyw 5x), aparat oświetlający Abbego opuść maksymalnie w dół,
- po ustawieniu stolika z preparatem uruchom program Motic Images Plus 2.0 klikając odpowiednią ikonę na monitorze komputera,
- najedź kursorem na okienko uchwycić obraz i kliknij dwukrotnie,
- patrząc w monitor komputera powoli opuszczaj stolik z preparatem za pomocą śruby makrometrycznej (10), aż do chwili znalezienia obrazu na monitorze komputera,
- jeśli obraz nie zostanie znaleziony, wówczas należy podnieść stolik ponownie do góry i ponownie, powoli opuszczać stolik z preparatem, aż do chwili uzyskania obrazu,
- za pomocą śruby mikrometrycznej (11) uzyskaj ostry obraz preparatu,
- kliknij ikonę zaawansowane ustawienia znajdującą się w lewej górnej części ekranu,
- na dole wyświetlającej się listy kliknij polecenie szybkiej kalibracji One-Click Calibration, upewniając się, że w okienku obok wyświetla się słowo Biological oznaczające kalibrację preparatów biologicznych,
- kliknij ikonę aparatu fotograficznego znajdującą się w lewej górnej części ekranu,
- kliknij polecenie przechwyty,
- nazwij zdjęcie i zapisz jako plik na swoim przenośnym dysku,
- zmień obiektyw w mikroskopie lub preparat znajdujący się na stoliku i powtórz procedurę

## Instrukcja nr 7

### Instrukcja wykonania prezentacji komputerowej w programie PowerPoint, zatytułowanej „Bakterie – dużo o nich wiem i chętnie....zjem!”, podsumowującej zadania i obserwacje wykonane w ramach projektu.

Na podstawie zadań wykonywanych w laboratorium mikrobiologicznym należy przygotować prezentację podsumowującą projekt. W prezentacji powinny znaleźć się zdjęcia wykonanych preparatów mikroskopowych oraz obserwacje, wnioski i własne spostrzeżenia jakich uczniowie dokonali podczas ćwiczeń. Podczas realizacji prezentacji pozostawia się uczniom dużą dowolność i swobodę w sposobie jej wykonania. Każda prezentacja powinna być indywidualnym opracowaniem, zarówno pod względem treści,

jak i formy, która pokaże twórczy charakter studenta, jego indywidualność, zaangażowanie w realizowane zadanie oraz indywidualne podejście do prezentowanego zagadnienia. W związku z tym, podczas przygotowywania prezentacji uczeń powinien skupić się przede wszystkim na własnych obserwacjach, zdobytych podczas zajęć doświadczeniach, spostrzeżeniach i odczuciach, a nie na wiedzy książkowej i teoretycznej.

**Karta pracy do zadania 4 - załącznik**

**Karta pracy do zadania 5 - załącznik**

# BAKTERIE – CECHY, PODZIAŁ, ZNACZENIE I ZASTOSOWANIE.

## MIKROSKOPIA I PREPARATYKA MIKROSKOPOWA

**Mikrobiologia** jest nauką o najmniejszych organizmach żywych (mikroorganizmach drobnoustrojach) zasiedlających ziemską biosferę. Wyraz ten pochodzi z języka greckiego, od trzech słów: *mikros* – mały, *bios* – życie, *logos* – wiedza. Wśród mikroorganizmów **bakterie** stanowią najliczniejszą (choć nie jedyną) i najbardziej zróżnicowaną pod względem budowy i właściwości grupę. Ze względu na bardzo niewielkie rozmiary, od 1 do 10  $\mu\text{m}$ , bakterii długo nie można było zobaczyć, mimo że ich istnienia domyślano się już od dłuższego czasu. Dopiero wynalezienie mikroskopu świetlnego, wyposażonego w soczewki o dużym powiększeniu, pozwoliło je zobaczyć i bliżej poznać.

Typowa komórka bakteryjna ma zwykle ok. 1  $\mu\text{m}$  średnicy i 5  $\mu\text{m}$  długości. Występują również bakterie o mniejszych rozmiarach – wiele ziarniaków ma średnicę 0,5  $\mu\text{m}$ . Największym znanym obecnie gatunkiem bakterii jest *Thiomargarita namibiensis* – gatunek bakterii siarkowej wyizolowany z osadu dennego u wybrzeży Namibii w 1997 roku i opisany dwa lata później jako największa znana bakteria. Nazwa *Thiomargarita* oznacza „siarkową perłę”, ze względu na charakterystyczny obraz widziany pod mikroskopem przypominający sznur pereł. Pojedyncza komórka ma zwykle od 0,1 do 0,3 mm średnicy, ale może osiągać nawet ok. 0,75 mm, a więc ok. 1,5 mm długości.

Bakterie mają bardzo prostą budowę, łatwo przystosowują się do zmiennych warunków środowiska, a w sprzyjających warunkach mogą się bardzo szybko rozmnażać. Spotyka się je w ogromnych ilościach w każdym środowisku na Ziemi, a wiele z nich żyje wewnątrz lub na większych istotach żywych. Zwykle bakterie kojarzą się z chorobami i obawiamy się kontaktu z nimi, jednak w rzeczywistości większość z nich jest dla nas przyjazna. Człowiek nauczył się nawet wykorzystywać właściwości bakterii do zaspokojenia własnych potrzeb i stąd ich znacząca rola w technologii żywności. Bakterie stosuje się m.in. do produkcji serów, jogurtów, kiszonych ogórków, etanolu itp.

Bakterie są komórkami prokariotycznymi (prejądrowymi). Oznacza to, że nie posiadają jądra komórkowego, a jego odpowiednikiem jest **nukleoid (genofor)** – nośnik informacji genetycznej w postaci DNA. Poza nim w komórce bakteryjnej znajdują się: otoczka, ściana komórkowa, błona cytoplazmatyczna, wić (rzęski), fimbrie (pile), cytoplazma, mezosomy, rybosomy, plazmidy oraz nukleoid (genofor).

Budowa komórki bakteryjnej:

- **otoczka** – śluzowata otoczka, zbudowana z wielocukrów lub z białek; chroni przed wyschnięciem, a u pasożytów, uniemożliwia związaną białek powierzchniowych bakterii przez receptory komórek żernych,

- **ściana komórkowa** – martwy składnik komórki, otoczka o funkcji ochronnej i szkieletowej, jej głównym składnikiem jest mureina,
- **błona komórkowa (cytoplazmatyczna) – półprzepuszczalna błona biologiczna oddzielająca wnętrze komórki od świata zewnętrznego**, jest położona pomiędzy ścianą komórkową a cytoplazmą; zbudowana jest z białka i fosfolipidów; błona pełni funkcję transportową przepuszczając substancje odżywcze do wnętrza komórki i wydalając zbędne metabolity; transport ten może się odbywać na drodze pasywnej, zgodnie z gradientem stężeń lub aktywnej wbrew gradientowi stężeń z wykorzystaniem energii oraz enzymów – permeaz,
- **wić – organellum ruchu wyrastające z powierzchni komórki, u bakterii mogą występować także rzęski; rzęski** to zewnątrzkomórkowe struktury odpowiadające za ruch bakterii; najczęściej spotykane są wśród bakterii spiralnych i cylindrycznych; zbudowane są z białka kurczliwego – flagelliny i zakotwiczone są w cytoplazmie, błonie i ścianie komórkowej za pomocą haczyka i ciała podstawowego (bazalnego); liczba i rozmieszczenie rzęsek ma znaczenie taksonomiczne,
- **fimbrie (pile)** – to zewnątrzkomórkowe wypustki cytoplazmatyczne, krótsze niż rzęski, zbudowane głównie z niekurczliwego białka; wyróżnia się dwa typy fimbrii – pospolite, umożliwiające adhezję komórki i płciowe (pilusy) biorące udział w procesie koniugacji; występują głównie u bakterii Gram-ujemnych,
- **cytoplazma - substancja koloidalna wypełniająca wnętrze komórki;** wypełnienie komórki, w którym zawieszono są organelle wewnątrzkomórkowe; składa się w 80% z wody i substancji organicznych; stanowi środowisko reakcji enzymatycznych,
- **mezosomy** - wypuklenia błony cytoplazmatycznej, które stanowią miejsce zakotwiczenia nukleoidu, biorą udział w syntezie ściany komórkowej i zawierają enzymy oddechowe – cytochromy,
- **rybosomy – organelle zawieszono w cytoplazmie, biorące udział w syntezie białek;** zbudowane są głównie z RNA; w cytoplazmie mogą tworzyć skupiska zwane polisomami,
- **plazmid** – cząsteczka DNA występująca poza nukleoidem, zdolna do autonomicznej (niezależnej) replikacji,
- **nukleoid (genofor) – obszar cytoplazmy, w którym znajduje się kolisty nić kwasu deoksyrybonukleinowego (DNA); bakteryjny odpowiednik jądra komórkowego;** tu znajduje się informacja genetyczna odnośnie podstawowych funkcji życiowych komórki bakterii; nukleoid jest zakotwiczony w błonie cytoplazmatycznej, jej wypukleniu - mezosomie lub w ścianie komórkowej.

Komórki bakteryjne i ich kolonie mogą przyjmować różne kształty:

- Ziarniaki (*Coccus*) – kuliste.
- Pałeczki (*Bacterium*) – wydłużone.



- Laseczki (*Bacillus*) – wydłużone z przetrwalnikami.
- Promieniowce (*Actinomycetales*) – nitkowato rozgałęzione.
- Przecinkowce (*Vibrio*) – przypominające przecinki.
- Maczugowce (*Corynebacteriaceae*) – przypominające maczugi.
- Wrzecionowce – o kształcie wrzeciona.
- Śrubowce (*Spirillum*) – kształt falisty.
- Krętki (*Spirochaetes*) – kształt przypominający korkociąg.
- Nitkowce – komórki bardzo wydłużone.

W przypadku ziarniaków wyróżnić można:

- Dwoinki – para komórek.
- Czworaczki (tetrydy) – cztery komórki.
- Pakietowce – regularne prostopadłościanny.
- Paciorkowce – sznur wielu komórek.
- Gronkowce – zbiór komórek o kształcie grona.

Ze względu na wytrzymałość temperaturową bakterie można podzielić następująco:

- psychrofile – temperatura optymalna 15 °C (zakres: 0-30 °C)
- mezofile – optimum 30-38 °C (zakres: 10-45 °C)
- termofile – 40-75 °C.

Bakterie mogą oddychać zarówno tlenowo, jak i beztlenowo. **Bakterie tlenowe** uzyskują energię w wyniku spalania substancji organicznych z udziałem tlenu. Można je podzielić na tlenowce bezwzględne, którym tlen jest niezbędny do życia i giną przy jego braku i tlenowce względne, które żyją w środowisku tlenowym, jednak gdy tlenu zabraknie zdolne są do oddychania beztlenowego. **Bakterie beztlenowe** uzyskują energię w procesie fermentacji (mlekowej, masłowej, metanowej itd.), rozkładając substancje organiczne bez udziału tlenu. Je także można podzielić na bezwzględne beztlenowce, dla których tlen jest toksyczny oraz względne beztlenowce, które żyją w środowisku beztlenowym, lecz tlen nie jest dla nich toksyczny i gdy dostanie się do ich środowiska potrafią wykorzystać go do oddychania.

Niektóre bakterie są **autotroficzne (samożywne)**, co oznacza, że potrafią same dla siebie produkować pożywienie, przekształcając proste związki nieorganiczne w organiczne, wykorzystując światło słoneczne lub związki chemiczne. Wśród bakterii autotroficznych wyróżniamy:

- **Fotoautotrofy**, które wykorzystując energię słoneczną syntezują związki organiczne,
- **Chemoautotrofy** uzyskujące energię poprzez utlenianie związków nieorganicznych (najczęściej są to związki siarki, żelaza, azotu, wodoru cząsteczkowy).

Inne bakterie są **heterotroficzne (cudzożywne)**, co z kolei oznacza, że przeżywają tylko dzięki odżywianiu się gotowymi substancjami organicznymi, które pobierają ze środowiska. Są to najczęściej saprofity rozkładające szczątki innych organizmów lub pasożyty wywołujące różne choroby. Mogą także żyć w symbiozie z innymi organizmami i od nich pobierać pokarm.

Bakterie rozmnażają się poprzez podział komórki, w wyniku którego powstaje kolejna komórka bakteryjna. Jest ona genetycznie identyczna z komórką macierzystą. Częstotliwość podziałów jest różna. Zależy od gatunku bakterii oraz od warunków panujących w środowisku. Może trwać od 5 min do nawet 360h. Bakterie rozmnażają się bezpłciowo, jednak może zachodzić wymiana materiału genetycznego pomiędzy komórkami tego samego gatunku. Proces ten zwany jest koniugacją.

Większość bakterii nie może samodzielnie poruszać się zbyt daleko, dlatego bakterie heterotroficzne znajdują sobie żywiciela, aby na nim lub w nim żyć. Czasami to współzycie układa się całkiem dobrze i jest korzystne zarówno dla bakterii, jak i jej gospodarza. Taki układ nazywamy **symbiozą**. Bakterie żyjące, np. w żołądkach krów pomagają im w trawieniu trawy. Bakterie *Escherichia coli* (*E. coli*) żyją w naszych jelitach nie wyrządzając nam żadnej szkody. Taki układ nazywamy **komensalizmem**. Czasem bakterie są **pasożytami**, które żyjąc w organizmie swego żywiciela mogą przynosić mu dużo szkody uwalniając trujące związki chemiczne, zwane toksynami. Bakterie wywołujące choroby nazywamy patogenami. Ponadto bakterie, które w jednym miejscu są komensalami, w innym będą patogenami np. bakterie *E. coli* przedostając się z jelit do układu moczowego wywołują objawy chorobowe.

**Mikroskop** (gr. *mikros* – mały; *skopeo* – patrzeć, obserwuję) jest przyrządem optycznym pozwalającym na obserwację obiektów o niewielkich rozmiarach, najczęściej niewidocznych gołym okiem. Aby zobaczyć mikroorganizmy należy z badanego materiału biologicznego wykonać preparaty mikroskopowe, które następnie ogląda się pod mikroskopem przy odpowiednio dobranym powiększeniu.

**Preparat mikroskopowy** jest to szkiełko podstawowe (przedmiotowe) z umieszczonym na jego powierzchni materiałem biologicznym. Warunkiem uzyskania preparatu dobrej jakości jest oczyszczenie i odtłuszczenie szkiełka podstawowego. Zanieczyszczenia fizyczne usuwa się z powierzchni szkiełka przez potarcie suchą bawełnianą szmatką. Szkiełka odtłuszczamy poprzez 2-3-krotne opalenie nad płomieniem palnika. Preparaty można mikroskopować bezpośrednio po wykonaniu lub poddać je barwieniu.

**Barwienie** jest to proces fizyko-chemiczny polegający na wniknięciu barwnika do wnętrza komórki mikroorganizmu i utworzeniu barwnego kompleksu z cytoplazmą lub wewnątrz-komórkowymi strukturami komórki. Barwienie ma na celu ułatwienie obserwacji cech morfologicznych i diagnostycznych komórek mikroorganizmów np. kształtu, wielkości, ułożenia komórek, zdolności ruchu, występowania i rozmieszczenia wici i rzęsek, obecności otoczek, a także sposobu rozmnażania oraz tworzenia i rozmieszczenia form przetrwalnych w komórce.

O barwieniu preparatów utrwalonych mówimy w sytuacji, gdy barwieniu poddaje się utrwalone (martwe) komórki drobnoustrojów. Utrwalanie polega na termicznym lub chemicznym zabiciu mikroorganizmów i przytwierdzeniu ich do powierzchni szkiełka podstawowego. Celem utrwalania jest ułatwienie stosowanym barwnikom penetracji przez ścianę komórkową i ich wniknięcie do wnętrza komórki oraz odsłonięcie w ścianach komórkowych mikroorganizmów związków, z którymi wiążą się barwniki.

Chemiczna metoda utrwalania polega na naniesieniu na wysuszony rozmaz mikroorganizmów odpowiedniego odczynnika (np. formaliny, alkoholu, eteru). Po kilku minutach preparat wysycha i jest przygotowany do barwienia. Termiczna metoda utrwalania polega na 2-3-krotnym przeciągnięciu szkiełka podstawowego z wysuszonym rozmazem mikroorganizmów w płomieniu palnika.

Ze względu na złożoność technik barwienia preparatów dzieli się je na proste i złożone.

**Barwienie proste**, czyli monochromatyczne (jednobarwne) polega na zastosowaniu jednego barwnika do wizualizacji komórek mikroorganizmów (barwienie pozytywne) lub zabarwienia tła preparatu (barwienie negatywne).

**Barwienie złożone**, czyli polichromatyczne (wielobarwne) polega na zastosowaniu dwóch lub więcej barwników w ściśle określonej kolejności.

**Barwienie proste pozytywne** – polega na zabarwieniu komórek mikroorganizmów w formie utrwalonej z zastosowaniem jednego barwnika. Tło preparatu po barwieniu pozostaje bezbarwne. W tym barwieniu zastosowanie znalazły głównie zasadowe barwniki anilinowe (błękit metylenowy, zieleń malachitowa, zieleń brylantowa, fuksyna zasadowa, czerwień obojętna, fiolet krystaliczny, goryczkowy i metylowy). Zasadowe barwniki wykazują silne powinowactwo do kwaśnej cytoplazmy wewnątrzkomórkowej mikroorganizmów tworząc z nią trwałe, barwne kompleksy.

**Barwienie proste negatywne** – polega na zabarwieniu tła nieutrwalonego preparatu z zastosowaniem jednego barwnika i powstaniu kontrastu pomiędzy wybarwionym tłem i bezbarwną komórką. Do barwienia negatywnego zastosowanie znalazły kwaśne lub gruboziarniste barwniki (fuksyna kwaśna, eozyna, erytrozyna, czerwień Kongo, nigrozyna, Kolargol, tusz chiński). Należy pamiętać, że preparat barwiony metodą negatywną nie jest utrwalany tylko suszony w powietrzu atmosferycznym.

**Barwienie złożone pozytywne** – polega na zastosowaniu minimum dwóch barwników w celu zabarwienia komórek na różne kolory (barwienie Grama) lub zabarwienia struktur wewnątrzkomórkowych np. przetrwalników i całych komórek (barwienie Wirtza/Schaeffer-Fultona).

**Barwienie metodą Grama** – jest barwieniem różnicującym, które pozwala wyodrębnić dwie zasadniczo odmienne grupy bakterii charakteryzujące się inną budową strukturalną ściany komórkowej. Wyróżniamy bakterie Gram-ujemne i Gram-dodatnie. W wyniku barwienia metodą Grama bakterie Gram-ujemne barwią się na kolor różowy, a bakterie Gram-dodatnie na kolor fioletowy. Jednak, żeby dokładnie zrozumieć mechanizm barwienia należy w pierwszej kolejności zapoznać się z budową ściany komórkowej tych grup bakterii. Ściana komórkowa bakterii jest elastyczną

strukturą nadającą komórce określony kształt. Stanowi barierę ochronną przed czynnikami zewnętrznymi, jest przepuszczalna dla substancji niskocząsteczkowych i soli mineralnych. Szkielet ściany komórkowej bakterii składa się z polimeru – peptydoglikanu, zwanego mureiną. Peptydoglikan składa się z łańcuchów polisacharydowych, usieciowanych przez mostki peptydowe. Każdy łańcuch polisacharydowy zbudowany jest z N-acetyloglukozaminy i kwasu N-acetylmureinowego połączonych wiązaniem  $\beta$ -1,4-glikozydowym. Białka umieszczone w zewnętrznej warstwie ściany komórkowej różnią się w zależności od rodzaju i szczepu bakterii.

**Ściana komórkowa bakterii Gram-dodatnich** jest zbudowana z 40 warstw mureiny. Chemicznie około 30-70% suchej masy ściany stanowi peptydoglikan. W strukturze peptydoglikanu występują kwasy tejchojowe i lipotejchojowe, które wystając nad powierzchnię warstwy mureiny tworzą cienką powłokę polisacharydową. Ścianę komórkową bakterii Gram-dodatnich można usunąć za pomocą enzymu – lizozymu, naturalnie występującego w łzach i błonach śluzowych jamy nosowej. Komórkę Gram-dodatnią po usunięciu ściany komórkowej nazywamy protoplastem.

**Ściana komórkowa bakterii Gram-ujemnych** składa się zaledwie z 2-3 warstw mureiny, co stanowi około 10-20%. Otoczona jest zewnętrzną błoną złożoną z lipopolisacharydów, fosfolipidów, lipoproteidów i białek. Fosfolipidy występują głównie w wewnętrznej warstwie zewnętrznej błony, a lipoproteidy łączą zewnętrzną błonę z peptydoglikanem. Warstwa lipopolisacharydowa zawiera duże ilości jonów wapnia, co czyni ją odporną na działanie lizozymu. Komórki bakterii Gram-ujemnych o usuniętej ścianie komórkowej nazywamy sferoplastami.

#### **Zasada barwienia metodą Grama:**

- 1) **Fiolet krystaliczny** jest zasadowym, słabo rozpuszczalnym barwnikiem, który w roztworze tworzy kationy. Łatwo penetruje przez ścianę komórkową i błonę cytoplazmatyczną bakterii Gram-ujemnych i Gram-dodatnich wnikając do wnętrza komórki. Na tym etapie wszystkie komórki wybarwione są na fioletowo.
- 2) Następnie na preparat nanosi się  **płyn Lugola**, który stanowi roztwór jodu w jodku potasu. Jony jodu łatwo przenikają do wnętrza komórki, podobnie jak cząsteczki fioletu krystalicznego. Kationy barwnika reagują z jonami jodu tworząc wielkocząsteczkowe, nierozpuszczalne w wodzie kompleksy. Wszystkie komórki nadal zabarwione są na kolor fioletowy.
- 3) Trzeci etap polega na naniesieniu odbarwiacza (roztworu alkoholu lub mieszaniny acetonu z alkoholem). **Odbarwiacz** wnika w warstwy mureiny bakterii powodując dehydratację. W wyniku usunięcia wody następuje zagęszczenie sieci mureiny, a tym samym zmniejszenie pustych przestrzeni w wielowarstwowych ścianach komórkowych. Ponadto w wyniku działania odbarwiacza u bakterii Gram-ujemnych zniszczeniu ulega zewnętrzna błona lipopolisacharydowa eksponując cienką warstwę mureiny. Kompleks barwnika z jodem zostaje uwięziony pod zwartą i grubą warstwą mureiny w komórkach bakterii Gram-dodatnich, natomiast z komórek bakterii Gram-ujemnych jest on łatwo wmywany odbarwiaczem. Na tym

etapie następuje właściwe zróżnicowanie komórek. Komórki Gram-dodatnie z uwięzionym kompleksem barwnika nadal mają zabarwienie fioletowe, podczas gdy komórki Gram-ujemne stają się bezbarwne po wypłukaniu kompleksu.

- 4) Ostatnim etapem jest dodatek barwnika kontrastowego – **safraniny**. Barwnik ten, podobnie jak fiolet krystaliczny, wykazuje charakter zasadowy, słabo rozpuszcza się w wodzie, a w roztworze tworzy kationy, które łatwo penetrują poprzez warstwę mureiny i łączą się z ujemnie naładowanymi cząsteczkami takimi jak kwasy tejchojowe, peptydy czy główki fosfolipidów. Ponieważ kolor safraniny jest mniej intensywny niż fioleto krystalicznego komórki Gram-dodatnie pozostają **fioletowe**. Bezbarwne komórki Gram-ujemne zabarwione safraniną przyjmują kolor **różowy**.

Zdarza się, że komórki Gram-dodatnie barwią się metodą Grama jak komórki Gram-ujemne. Zjawisko to nazywamy **Gram-zmiennością**. Dotyczy ono głównie bakterii z rodzajów *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium* i *Propionibacterium*. Gram-zmienność może być spowodowana wiekiem hodowli (późne fazy wzrostu), brakiem w podłożu składników odżywczych niezbędnych do syntezy ściany komórkowej (są to dla bakterii warunki stresowe) oraz dotyczyć komórek bakterii będących w fazie podziału. Czasami efekt gram-zmienności mogą wywołać takie czynniki jak: zbyt długie utrwalanie preparatu w płomieniu palnika lub za długi etap odbarwiania.

#### Bakterie pełnią w przyrodzie wiele bardzo ważnych funkcji:

- w ekosystemach pełnią rolę reducentów – rozkładają substancje organiczne na prostsze związki nieorganiczne. Dzięki bakteriom zachowany zostaje obieg materii i energii w przyrodzie
- uczestniczą w obiegu azotu, siarki, fosforu i węgla w przyrodzie
- żyją w symbiozie z wieloma gatunkami organizmów na Ziemi, np. umożliwiają wielu roślinożercom (np. przeżuwaczom, termitom) trawienie celulozy
- gatunki pasożytnicze wywołują choroby u wielu organizmów, regulując w ten sposób ich populacje i usuwając z nich osobniki słabe
- uczestniczą w samooczyszczaniu wód oraz procesach glebotwórczych.

Bakterie wykorzystywane są także w wielu gałęziach przemysłu. W przemyśle spożywczym umożliwiają produkcję np. serów, jogurtów, kiszonych ogórków i kapusty (bakterie mlekowe), octu. W przemyśle farmaceutycznym bakterie wykorzystywane są do produkcji leków (np. insuliny, antybiotyków) oraz szczepionek. Stosuje się je również do produkcji acetonu, etanolu, aminokwasów, witamin, hormonów i enzymów. W nauce są podstawowymi organizmami modelowymi wykorzystywanymi w badaniach biochemicznych i genetycznych. Ze względu na małe rozmiary i szybki metabolizm wykorzystywane są w inżynierii genetycznej i biologii molekularnej. Bakterie znajdują również zastosowanie w ochronie środowiska. Są głównym składnikiem osadu czynnego w biologicznych oczyszczalniach ścieków. Bakterie rozkładające węglowodory mogą wspomagać usuwanie skutków wycieków ropy lub innych olejów z tankowców. Ponadto niektóre gatunki mogą zastępować pestycydy w walce ze szkodnikami.

Istnieje jednak szereg negatywnych skutków działania bakterii dla człowieka i innych organizmów żywych. Są to przede wszystkim choroby, które wywołują te drobnoustroje. Organizm człowieka zamieszkuje ok. 1000 gatunków bakterii. Żyją głównie w układzie pokarmowym, gdzie uczestniczą w trawieniu oraz syntezują wiele ważnych dla człowieka substancji (np. witaminę K, kwas foliowy, biotynę). Zamieszkują także skórę, układ oddechowy.

Wiele pasożytniczych bakterii może wywoływać choroby zakaźne. Odżywiają się one kosztem ludzkiego organizmu zaburzając jego funkcjonowanie. Niebezpieczne dla człowieka mogą być także gatunki niepasożytnicze oraz bakterie występujące naturalnie w organizmie.

Niektóre bakterie podczas swojego życia wytwarzają substancje szkodliwe dla innych organizmów i wydalają je do środowiska, w którym żyją. Substancje te nazywane są egzotoksynami. Przykładem egzotoksyny jest botulina (jad kielbasiany) – jedna z najsilniejszych znanych neurotoksyn wytwarzana przez beztlenowe laseczki *Clostridium botulinum*, używana w medycynie do leczenia niektórych chorób, znana głównie w medycynie kosmetycznej jako botox. Egzotoksyny wytwarzają głównie bakterie gram-dodatnie (np. laseczka tężca, gronkowiec złocisty), ale także gram-ujemne (np. przecinkowiec cholery). Egzotoksyny są antygenami, mogą więc wywoływać odpowiedź immunologiczną organizmu.





3. Porównaj kolonie wyrosłe w próbówce z tymi, które wyrosły w płytce Petriego. Czy są między nimi różnice świadczące o tlenowym i beztlenowym charakterze wzrostu? Jeśli tak, to jakie? Jeśli nie, to czy są między nimi jakiegokolwiek różnice?

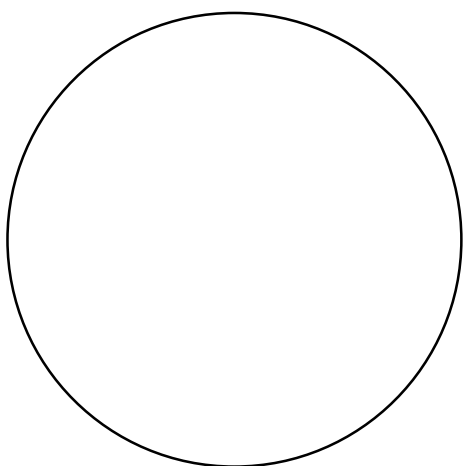
Imię i nazwisko ucznia, klasa

Miejscowość, data

## KARTA PRACY DO ZADANIA 5

### Przygotowanie preparatów bakteryjnych utrwalonych i barwionych metodą Grama oraz ich obserwacja w mikroskopie

1. Wykonaj preparat bakteryjny utrwalony i barwiony metodą Grama, obejrzyj w mikroskopie pod imersją (obiektyw powiększający 100-krotnie + kropla olejku imersyjnego). Narysuj widziane w mikroskopie obiekty, opisz je i scharakteryzuj (powiększenie mikroskopu, co widać na rysunku – jakie kształty i barwy bakterii).



2. Wyjaśnij dlaczego bakterie w preparacie wybarwiły się na różne kolory.