

Nauka i technologia dla żywności

## Projekt badawczy

**Temat: Metody oznaczania i usuwania drobnoustrojów z żywności**

### Wprowadzenie:

Produkt spożywczy zawiera w swoim składzie wiele cennych związków chemicznych (cukry, białka, kwasy organiczne, witaminy i wiele innych), które nie tylko decydują o pożądanych dla konsumenta walorach sensorycznych wytworzonego produktu (smak, barwa, zapach i in.) ale także kształtują jego odpowiednią wartość odżywczą. Produkty takie stanowią równocześnie i dla obecnych wszędzie mikroorganizmów (gleba, woda, powietrze), doskonałe podłoże, wykorzystywane do własnego rozwoju. Często ich pojawienie się w gotowej żywności świadczy o pogorszeniu jej jakości, a nawet zagrożeniu bezpieczeństwa zdrowotnego wyrobów, gdyż niektóre z nich są szkodliwe a nawet chorobotwórcze. Produkcja żywności wymaga więc zminimalizowania liczby lub całkowitego usunięcia z niej drobnoustrojów, zwłaszcza patogennych i powodujących zepsucie. Można to osiągnąć poprzez: ograniczenie skażenia mikrobiologicznego w czasie produkcji i przechowywania żywności, zahamowanie lub ograniczenie wzrostu drobnoustrojów i kiełkowania zarodników obecnych w żywności a także zabicie komórek wegetatywnych i spor. Wytworzona żywność powinna być zatem utrwalona. W przemysłowych procedurach utrwalania żywności do hamowania i niszczenia drobnoustrojów wykorzystywane są: wysoka i niska temperatura, próżnia, modyfikowana atmosfera, niskie pH, kwasy organiczne, konserwanty, mikroflora konkurencyjna (konserwowanie biologiczne), filtracja, napromieniowanie a także nowe czynniki oraz technologie (wysokie ciśnienie hydrostatyczne lub zmienne pole elektryczne).

Generalnie efektywność hamowania i niszczenia drobnoustrojów, niezależnie od zastosowanej metody utrwalania, jest tym większa, im mniejsze jest zanieczyszczenie żywności drobnoustrojami oraz gdy są one uszkodzone.

Z technologicznego punktu widzenia równie ważne są zarówno ilość jak też rodzaj mikroorganizmów, wywołujących zanieczyszczenie, a tym samym psucie gotowych produktów. Identyfikacja drobnoustrojów, charakterystycznych dla danego surowca, poznanie wzajemnych współzależności oraz wpływu procesu wytwarzania i przechowywania żywności na żywotność mikroorganizmów, pozwala przewidzieć kierunek przemian metabolicznych a także ewentualnych zmian składu chemicznego zarówno surowców jak też gotowych produktów. W rezultacie staje się możliwe opracowanie skutecznych metod utrwalania i przechowywania żywności.

PROJEKT REALIZOWANY W PARTNERSTWIE:

Człowiek – najlepsza inwestycja



## **Cel projektu:**

Celem praktycznym projektu jest poznanie metod oznaczania drobnoustrojów, rodzajów drobnoustrojów oraz sposobów ich usuwania z żywności i otoczenia.

Wymiernym efektem pracy ucznia będzie przygotowanie prezentacji w programie PowerPoint zatytułowanej „Sposoby zapewnienia bezpieczeństwa mikrobiologicznego żywności”.

## **Cele kształcenia:**

### Uczeń:

- wymienia źródła zanieczyszczenia żywności,
- wymienia warunki sprzyjające rozwojowi drobnoustrojów w żywności,
- podaje przykłady pozytywnego i negatywnego oddziaływania mikroorganizmów w produkcji żywności,
- wymienia i opisuje podstawowe sposoby zabezpieczania żywności przed zepsuciem,
- charakteryzuje podstawowe metody termiczne utrwalania żywności,
- stosuje właściwy materiał biologiczny oraz przyrządy do oznaczania ilości bakterii w wybranych surowcach i produktach spożywczych,
- analizuje i opisuje obserwowane hodowle w płytkach Petriego,
- analizuje i opisuje wpływ wybranych metod utrwalania na drobnoustroje,
- stosuje kamerę mikroskopową do rejestrowania obrazów mikroskopowych,
- analizuje wykonane samodzielnie posiewy,
- wykonuje proste obliczenia ilości drobnoustrojów w produktach spożywczych,
- zbiera materiały (zdjęcia) z realizacji poszczególnych zadań do przygotowywanej w PowerPoint prezentacji pt. „Sposoby zapewnienia bezpieczeństwa mikrobiologicznego żywności”.

## **Pytanie kluczowe:**

### **Jak walczyć ze szkodliwymi drobnoustrojami w żywności?**

#### **Metody oznaczania i usuwania drobnoustrojów z żywności**

Drobnoustroje zasiedlają praktycznie wszystkie środowiska na ziemi i w zależności od gatunku, także okoliczności, mogą być nie tylko pożyteczne, wręcz nieodzowne dla człowieka. Już 3000 lat p.n.e. człowiek korzystał z procesów mikrobiologicznych podczas produkcji wina, piwa, octu czy fermentowanych napojów mlecznych i mimo iż nie wiedział o istnieniu drobnoustrojów, to z powodzeniem wykorzystywał je na własne potrzeby. Wtedy były to procesy przebiegające samorzutnie. Dopiero poznanie drobnoustrojów, pogłębienie wiedzy o nich, a także poznanie procesów ich przemiany materii umożliwiło celowe ich wykorzystanie w procesach przemysłowych: fermentacyjnych, biosyntezy złożonych związków organicznych, w technologii żywności i jej konserwacji. Duża ich różnorodność występowania powoduje, że czasami bywają bardzo szkodliwe a nawet chorobotwórcze (patogenne). Z punktu widzenia technologa żywności drobnoustroje mogą być niezbędne w danym procesie, uczestnicząc w kształtowaniu pożądanych cech produktu (walory odżywcze i smakowo – zapachowe, wydłużenie trwałości) ale także i niepożądane, powodując zepsucie żywności. Mikroorganizmy dostają się do żywności m.

in. z surowcem, jednakże ich źródłem może być również proces produkcji (linia technologiczna, personel i pomieszczenia produkcyjne). Na rozwój mikroorganizmów w żywności wpływa: temperatura, kwasowość (pH), wilgotność, dostępność tlenu i składników odżywczych a także obecność substancji antymikrobiologicznych.

Surowce dostarczane do zakładu produkcyjnego mogą być skażone różnymi drobnoustrojami. Są wśród nich i te niepożądane wytwarzające toksyny (mykotoksyny).

- Warzywa zielone i korzeniowe zanieczyszczają np. *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Clostridium* drożdże i pleśnie, natomiast owoce: pałeczki z grupy coli, bakterie mlekowe, *Micrococcus*, *Bacillus*, drożdże oraz pleśnie.
- Mięso i drób mogą zawierać, powodujące zepsucie, np. *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Bacillus* oraz pleśnie: *Penicillium* i *Mucor*.
- Ryby i surowce pochodzenia morskiego często zanieczyszczają: *Pseudomonas*, *Achromobacter* i *Micrococcus*.
- Mleko: *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Achromobacter*, *Pseudomonas*.
- Ziarno zbóż skażone mogą być pleśniami: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Rhizopus*, a także bakteriami mlekowymi i mikrokokami.
- Woda: zanieczyszczona może być bakteriami siarkowymi, *Pseudomonas*, *Escherichia coli*, *Achromobacter*, *Vibrio* i grzybami np. *Mucor*.

Wskaźnikiem braku przestrzegania zasad higienicznych przez personel są tzw. drobnoustroje wskaźnikowe, do których należą bakterie jelitowe, gronkowce, beztlenowe laseczki oraz drożdże i pleśnie. Wskazują one na skażenie odchodami ludzi i zwierząt, gnijącymi i rozkładającymi się resztkami organicznymi oraz na złe warunki higieniczne w miejscu wytwarzania żywności. Spośród bakterii jelitowych (bakterie z grupy coli, enterokoki oraz *Clostridia* redukujące siarczyny), dla człowieka najbardziej niebezpieczne jest skażenie żywności bakteriami z grupy coli, z których wprawdzie nie wszystkie są patogenami, ale sama ich obecność świadczy o stosunkowo niedawnym kontakcie badanej żywności z kałem ludzkim. W związku z tym bardzo prawdopodobna jest równoczesna obecność patogennych dla człowieka wirusów i bakterii. Enterokoki wykazują większą odporność na niekorzystne warunki zewnętrzne, więc ich obecność świadczyć może o skażeniu żywności fekaliami. Z kolei rodzaj *Clostridia* są niebezpiecznymi bakteriami beztlenowymi, które wytwarzają przetrwalniki (endospory) oraz najdłużej utrzymują się poza jelitami ludzi i zwierząt. Oprócz grup wskaźnikowych ważny jest też poziom drobnoustrojów, należących do tzw. grup fizjologicznych, czyli drobnoustrojów charakteryzujących się określonymi cechami fizjologicznymi (zdolnością do degradacji białek, skrobi, tłuszczu, rozwojem w niskich temperaturach czy przy ograniczonym dostępie tlenu). W tych grupach są wszystkie drobnoustroje warunkujące psucie się żywności podczas przechowywania. Te drobnoustroje to saprofity, czyli organizmy rozkładające martwą materię organiczną.

Podczas zajęć uczniowie poznają różne rodzaje drobnoustrojów oraz ich rolę i znaczenie dla przemysłu. Dzięki wykorzystaniu w laboratorium kamery mikroskopowej uczniowie będą mogli zapisać obrazy wykonanych przez siebie preparatów bakteryjnych. Zarejestrowane obrazy będą mogli wykorzystać podczas opracowywania wyników badań i przygotowywania prezentacji w programie PowerPoint. Zastosowanie kamery pozwoli znacznie usprawnić proces dydaktyczny i ułatwi współpracę z uczniami. Będą oni mogli znacznie sprawniej odnaleźć, zaobserwować i zarejestrować właściwe obrazy

mikroskopowe, bez konieczności ich ręcznego odwzorowywania a jednocześnie nauczą się przekazywać wiedzę w atrakcyjniejszy sposób.

Żywność przeznaczona do spożycia nie może zagrażać zdrowiu człowieka i powinna być utwalona. Zabiegi przetwórcze, w tym przede wszystkim, metody utwalania, mają podstawowe znaczenie dla zapewnienia odpowiedniej jakości i bezpieczeństwa produktów żywnościowych. Przy wyborze metod utwalania konieczne jest uwzględnienie oporności bakterii, ze względu na formy przetrwalne niektórych z nich, każde o odmiennej budowie i dużej oporności na działanie szkodliwych czynników środowiskowych. Do hamowania i niszczenia drobnoustrojów wykorzystywana jest między innymi wysoka i niska temperatura. Czynnikiem decydującym o efektywności utwalania cieplnego jest dawka ciepła (temperatura i czas ogrzewania). Metodami, w których wykorzystywane są wysokie temperatury podczas utwalania żywności są: pasteryzacja i sterylizacja. Pasteryzacja jest prowadzona w temperaturze poniżej 100°C, przeważnie temp. 65-85°C i jej celem jest zniszczenie wszystkich wegetatywnych komórek patogenów oraz większości komórek bakterii, drożdży i pleśni, które mogłyby spowodować zepsucie. W praktyce przemysłowej stosuje się dwie metody pasteryzacji:

- ogrzewanie w 60-85°C przez 1-30 minut (LTLT-Low Temperature, Low Time),
- ogrzewanie w 71-74°C przez 15-40 sekund (HTST-High Temperature, Short Time).

Odmianą pasteryzacji jest też tyndalizacja (pasteryzacja frakcjonowana), polegająca na trzykrotnej pasteryzacji, w odstępach 24 godzinnych oraz termizacja, prowadzona 15 sek w temp. 55-65°C, najczęściej połączona z hermetycznym pakowaniem.

Steryлизację żywności prowadzi się w temperaturze od 100°C do 121,1°C przez okres od kilku do kilkudziesięciu minut. Parametry procesu (temperatura, czas) są ustalane indywidualnie dla każdego produktu w zależności od wielkości opakowania i metody wyjaławiania (okresowa, ciągła). W procesie sterylizacji zniszczeniu ulegają wszystkie formy drobnoustrojów, łącznie z przetrwalnikami bakterii oraz zarodnikami grzybów pleśniowych.

Metody utwalania żywności wykorzystujące wysokie temperatury wywołują tak korzystne jak i negatywne zmiany w żywności. Do pozytywnych należy inaktywacja drobnoustrojów i enzymów powodujących psucie się żywności, niszczenie toksyn oraz przeprowadzanie niektórych związków zawartych w żywności z formy nieprzyswajalnej w przyswajalną. Podstawowym założeniem utwalania żywności przez ogrzewanie jest osiągnięcie jej mikrobiologicznej stabilności. Postacie wegetatywne drobnoustrojów są zawsze mniej ciepłooporne od form przetrwalnikowych, przy czym największymi różnicami ciepłooporności charakteryzują się bakterie. Temperatura letalna dla wegetatywnych bakterii mezofilnych wynosi ok. 50 – 60°C a dla przetrwalników 90 -100°C a niektóre wytrzymują nawet 120°C w czasie kilkudziesięciu minut. Najmniej odporne na ogrzewanie są drożdże i to zarówno formy wegetatywne, jak i przetrwalnikowe. Zarodniki drożdży giną zwykle już w temperaturze poniżej 100°C, chociaż i tu trafiają się wyjątki, jak np. drożdże osmofilne, wytrzymujące ogrzewanie w temperaturze 100°C przez ponad 20 minut. W technologii żywności w procesie termicznego niszczenia drobnoustrojów, działa się zwykle ciepłym, wilgotnym powietrzem i w tym przypadku ilość inaktywowanych drobnoustrojów maleje w miarę upływu czasu ogrzewania. W technologii żywności unika się zbyt długiego ogrzewania w wysokich temperaturach, gdyż składniki żywności są wrażliwe na wysoką temperaturę. Najbardziej wrażliwe na ogrzewanie są niektóre



witaminy. Nawet umiarkowane ogrzewanie do temperatury 70 – 80°C przez kilka minut, powoduje wyraźne obniżenie działania biologicznego witamin C, B<sub>1</sub> i B<sub>12</sub>. Na ogrzewanie mało odporne są niektóre białka np. albuminy i globuliny a także niektóre aminokwasy (siarkowe, lizyna). Wyraźne zmiany, prowadzące do obniżenia wartości biologicznej żywności występują podczas długotrwałego ogrzewania w temperaturach przekraczających 100°C w czasie sterylizacji, smażenia i prażenia. Korzystnie natomiast na trawienie cukrowców złożonych, np. skrobi, wpływają takie procesy i operacje cieplne, jak pieczenie czy gotowanie. W utrwalaniu mikrobiologicznym, opartym na działaniu wyższych temperatur bardzo ważny jest podział żywności na trzy zasadnicze grupy:

- żywność niekwaśna lub mało kwaśna o pH > 4,6 – np. mleko, mięso, drób, ryby, skorupiaki, groszek, fasola, szpinak, szparagi, buraki;
- żywność kwaśna o pH 3,7 – 4,6 – gruszki, morele, pomidory, czerwona kapusta;
- żywność bardzo kwaśna o pH < 3,7 – kiszona kapusta i ogórki, większość owoców.

Żywność mało kwaśna do termicznego utrwalenia wymaga ogrzewania w temperaturze powyżej 100°C, kwaśna w temperaturach poniżej 100°C, natomiast żywność bardzo kwaśna w niektórych przypadkach może odznaczać się znaczną trwałością, natomiast w innych – w celu zniszczenia drożdży, pleśni czy enzymów, powodujących jej psucie (jabłka, jagody) wymaga łagodnego ogrzewania.

Stosowanie niskich temperatur (chłodzenie i mrożenie) jest obecnie jedną z najpowszechniej wykorzystywanych metod utrwalania żywności. Przechowywanie żywności schłodzonej jak też mrożonej zapewnia w dużym stopniu zachowanie jej wartości żywieniowej.

Metody chemiczne są związane z użyciem substancji konserwujących a biologiczne wynikają z aktywności mikroorganizmów prowadzących procesy fermentacyjne. Biologiczne utrwalanie, czyli fermentacja żywności jest najstarszą a zarazem najskuteczniejszą metodą konserwacji, znaną w Europie już w czasach starożytnych (ok. 5000-9000 lat p.n.e.). Dzięki produktom metabolizmu i enzymom wytwarzanym przez drobnoustroje, żywność (przetwory mleczne, kiszonki warzywne, wędliny, pieczywo na zakwasach), uzyskuje charakterystyczne cechy sensoryczne, a także trwałość i bezpieczeństwo higieniczne. Istotnym elementem zabezpieczenia utrwalanej żywności jest stosowanie odpowiednich opakowań.

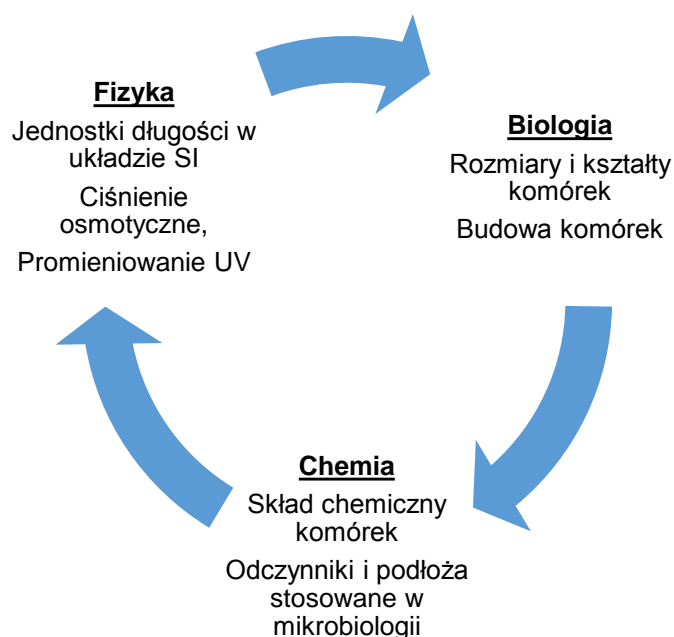
Do dezynfekcji powierzchni urządzeń produkcyjnych, narzędzi i opakowań (foliowych, tekturowych) w przemyśle znajduje też zastosowanie promieniowania ultrafioletowego (UV). To promieniowanie jest wykorzystywane także do dezynfekcji ścian, sufitów, powietrza w otoczeniu produkcji oraz całych pomieszczeń, w których odbywa się pakowanie gotowych wyrobów. Naturalnym źródłem emisji promieni UV jest słońce, a sztucznym - lampy rtęciowe. Szczególnie zabójczą aktywnością charakteryzuje się promieniowanie UV w zakresie długości fal 240-280 nm. To promieniowanie działa letalnie na formy wegetatywne i przetrwalniki bakterii, a także wirusy. Człowiek jest źródłem zanieczyszczeń mikrobiologicznych powietrza podczas mówienia, kaszlu czy kichania.

Generalnie efektywność hamowania i niszczenia drobnoustrojów, niezależnie od zastosowanej metody utrwalania, jest tym większa, im mniejsze jest zanieczyszczenie żywności drobnoustrojami oraz gdy są one uszkodzone.

Wymienione metody utrwalania powodują redukcję liczby żywych drobnoustrojów

znajdujących się w żywności. Najefektywniejszą z nich wydaje się być wysoka temperatura, stosowana w procesach sterylizacji, jednak ta temperatura pozbawia żywność cennych składników (witaminy, aminokwasy, węglowodany), czyniąc produkt mniej wartościowym. Producenci żywności poszukują w związku z tym mniej drastycznych metod utrwalania. W grupie tych metod znajdują się m.in. napromieniowanie oraz stabilizacja biologiczna, która jednocześnie zwiększa wartość żywieniową i dietetyczną żywności.

#### **Integracja treści przedmiotowych:**



#### **Wykorzystanie matematyki i technologii informacyjnej:**

- gromadzenie i porządkowanie informacji i danych niezbędnych podczas wykonywania kolejnych zadań,
- wykorzystywanie formuł matematycznych do opracowywania wyników badań, dotyczących obliczania ogólnej ilości drobnoustrojów w wodzie, produktach spożywczych, powietrzu i na powierzchni stołu laboratoryjnego oraz rękach.
- interpretacja uzyskanych wyników,
- 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 w formie płynnej i zestalonej,

- materiał biologiczny: bakterie (*Bacillus subtilis* i *Escherichia coli*),
- szkło, szablony 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 materiałem biologicznym (przygotowanie hodowli mikroorganizmów na podłożach stałych w płytkach Petriego),
- praca z barwnikami (barwienie preparatów utrwalonych – jednym barwnikiem),
- dyskusja i porównanie wyników,
- praca z komputerem oraz przygotowanie prezentacji w programie PowerPoint).

#### **Etapy projektu:**

<b>etap</b>	<b>działania</b>	<b>czas</b>
<b>Organizacja</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ustalenie stanowisk pracy,</li> <li>- poznanie podstawowych urządzeń oraz narzędzi niezbędnych podczas realizacji zadań</li> <li>- poznanie podstawowych zasad wykonywania rozcieńczeń materiału biologicznego,</li> <li>- poznanie zasad posiewów drobnoustrojów z surowców i produktów na podłoża stałe,</li> </ul>	15 minut
<b>Planowanie</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- przedstawienie zadań do realizacji podczas zajęć</li> <li>- ustalenie kolejności i czasu wykonywania poszczególnych zadań</li> </ul>	15 minut
<b>Realizacja</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Przygotowanie podłoży do posiewu drobnoustrojów w płytkach Petriego i posiew bakterii <i>Escherichia coli</i> i <i>Bacillus subtilis</i>.</li> <li>2. Ocena skuteczności działania wybranych środków dezynfekcyjnych na bakterie <i>Escherichia coli</i> i <i>Bacillus subtilis</i>.</li> <li>3. Badanie skuteczności filtracji, jako sposobu wyjąławiania produktów płynnych.</li> <li>4. Badanie skuteczności pasteryzacji w zwalczaniu drobnoustrojów.</li> <li>5. Oznaczanie ogólnej ilości bakterii w mleku pasteryzowanym metodą płytkową.</li> <li>6. Badanie czystości mikrobiologicznej surowców roślinnych (owoców) i produktów spożywczych.</li> <li>7. Obserwacja preparatów i hodowli drobnoustrojów przy użyciu kamery mikroskopowej oraz</li> </ol>	<p>15 minut</p> <p>25 minut</p> <p>30 minut</p> <p>30 minut</p> <p>15 minut</p> <p>30 minut</p> <p>20 minut</p>

	<p>rejestracja obrazów w komputerze i na przenośnym dysku.</p> <p>8. Przygotowanie prezentacji w programie PowerPoint z wykorzystanych w ramach zajęć badań i obserwacji oraz z wyciągniętych wniosków.</p>	90 minut
<b>Prezentacja</b>	<p>- karty pracy,</p> <p>- prezentacja wykonana w programie PowerPoint.</p>	-
<b>Ocena</b>	<p>- samoocena (uczeń),</p> <p>- ocena opisowa (nauczyciel).</p>	-

### Szczegółowy opis zadań na etapie realizacji projektu:

#### **Zadanie 1.**

#### **Przygotowanie podłoża do posiewu drobnoustrojów w płytkach Petriego i posiew bakterii *Escherichia coli* i *Bacillus subtilis***

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

Drobnoustroje jak wszystkie inne organizmy żywe, do wzrostu i rozwoju wymagają odpowiednich substancji pokarmowych. Czerpią je, w warunkach laboratoryjnych, za pośrednictwem podłoża hodowlanych o ściśle określonym składzie, sporządzanych w szkle laboratoryjnym. W ramach zadania uczniowie będą najpierw sporządzać podłoża (bulion zwykły z agarem) w płytkach Petriego, a następnie będą posiewać na zestalonym podłożu bakterie (*Escherichia coli* i *Bacillus subtilis*).

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

Praca w laboratorium mikrobiologicznym wymaga od ucznia opanowania i skupienia. Szczególną uwagę należy zwrócić na zachowanie sterylnych warunków podczas pracy z dość ciepłym podłożem. Pracujemy przy włączonym palniku gazowym na stanowisku, by nie doprowadzić do zakażeń wtórnych podłoża, które sporządzane jest z zestalaczami (agar, żelatyna). Podłoże podczas wylewania do płytek Petriego musi być mocno ciepłe, żeby się nie zestaliło w czasie wylewania do szkła laboratoryjnego. Należy zachować ostrożność, by nie poparzyć sobie rąk. Stosowanie rękawic pozwala skutecznie radzić sobie z problemem. Należy też zachować ostrożność podczas pracy z włączonym palnikiem, by się nie poparzyć i nie spalić łatwopalnych elementów wyposażenia, np. korków z waty. Trudności, jakie może napotkać uczeń podczas realizacji tego zadania mogą wynikać z braku wprawy i doświadczenia, ze strony uczniów.

Najlepszym rozwiązaniem, pojawiających się ewentualnie problemów podczas realizacji zadania, będzie przede wszystkim opanowanie i skupienie podczas trwania zajęć oraz współpraca z prowadzącym.

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



Uczniowie pracują w zespołach i przygotowują przy jednym stole laboratoryjnym po trzy płytki zestalonego podłoża dla dwóch rodzajów bakterii (*Escherichia coli* i *Bacillus subtilis*). Przy jednym stanowisku pracy znajduje się jeden uczeń, każdy 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 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 trzymać od spodu, 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 szkła laboratoryjnego, by nie dopuścić do jego wtórnego zakażenia drobnoustrojami,
- korka z waty, którym zamknięta jest kolba z podłożem nie należy odkładać na stół laboratoryjny, lecz trzymać w rękach, zgodnie z instrukcją prowadzącego zajęcia,
- jedną ręką w rękawicy trzyma się od spodu kolbę z podłożem a drugą wyciąga korek z kolby, jednocześnie dwoma palcami tej samej ręki (kciuk i pierwszy palec), uchyla się wierzchnią część płytki Petriego i wylewa płynne podłoże na dno,
- rozprowadza się równomiernie podłoże, delikatnie poruszając płytką po powierzchni stołu, kreśląc ósemki bądź koła,
- płytki opisuje się (pisakiem na wierzchniej części) w następujący sposób:
  - **Płytką nr 1** – *E.c.* – posiewane będą bakterie nie wytwarzające przetrwalników tj. *Escherichia coli*, data posiewu, inicjały wykonującego posiew,
  - **Płytką nr 2** – *B.s.* - posiewane będą bakterie wytwarzające przetrwalniki tj. *Bacillus subtilis*, data posiewu, inicjały wykonującego posiew,
- podczas wlewania do płytek podłoża czy wprowadzania materiału biologicznego zawsze uchyla się wierzchnią część płytek, odsłaniając część powierzchni podłoża,
- za pomocą jałowej pipety pobiera się zawiesinę bakteryjną z oznaczonych kolb na stanowiskach i przy pomocy głaszczki rozprowadza się ją po całej powierzchni podłoża

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

W efekcie pracy ucznia w ramach wykonywania zadania oczekuje się opanowania techniki sporządzania podłoża w płytce Petriego i posiewania, metodą płytek tartych, zawiesiny bakterii na zestalone podłoże w płytce.

#### Oczekiwania wobec nauczyciela opiekuna

Rolą nauczyciela podczas realizacji tego zadania jest instruowanie i szkolenie ucznia, nadzorowanie wykonywanych przez niego czynności, wspieranie go, motywowanie

pytania i sugestiami, zachęcanie do cierpliwej i spokojnej pracy. Nauczyciel powinien nadzorować pracę ucznia, jednak powinien unikać wykonywania pracy za niego, nawet wtedy, gdy jakieś zadanie zajmuje uczniowi więcej czasu, niż pozostałym uczestnikom zajęć. Uczeń powinien mieć szansę sprawdzenia się, wykazania samodzielnością. Rolą nauczyciela jest również przydzielanie każdemu z uczniów sterylnej płytki Petriego oraz kolby z upłynnionym, gorącym podłożem agarowym.

**(Jedna kolba z podłożem na każdy stół laboratoryjny – pozwoli to nadzorować pracę uczniów i uniknąć poparzeń!)**

## **Zadanie 2.**

### **Ocena skuteczności działania wybranych środków dezynfekcyjnych na bakterie *Escherichia coli* i *Bacillus subtilis***

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

Wskaźniki higieniczne żywności są to grupy bakterii dostające się do żywności w wyniku niewłaściwej higieny produkcji i braku higieny osobistej pracowników. Przez wiele lat podstawowymi wskaźnikami higienicznymi w produkcji żywności były bakterie pochodzenia kałowego. Dzisiaj, pomimo że *Escherichia coli* są nadal stosowane, jako wymagania norm zakładowych, to producenci żywności włączają do tej grupy i inne drobnoustroje np. *Bacillus subtilis*. Obecność bakterii coli świadczy o możliwości zanieczyszczenia kałowego, a więc o możliwej obecności bakterii chorobotwórczych. Bakterie z rodzaju *Bacillus* potrafią z kolei niekorzystne warunki środowiskowe wykorzystać do wytworzenia form przetrwalnych, by w sprzyjających okolicznościach z łatwością ponownie się rozwijać i rozmnażać. Przetrwalniki są niezwykle odporne na wysoką temperaturę. Sprawdzimy w związku z tym, czy wybrane środki dezynfekcyjne są skuteczne w walce z tymi drobnoustrojami.

#### 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 drobnym sprzętem laboratoryjnym a także braku doświadczenia w badaniach mikrobiologicznych. Najlepszym rozwiązaniem pozostaje tutaj spokój i cierpliwość a także skupienie podczas zajęć i współpraca z prowadzącym. 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, ...)

To zadanie uczniowie wykonują w zespołach. Uczniowie na swoich stanowiskach wycinają krążki z bibuły oraz nasączają je środkami dezynfekcyjnymi. Następnie jeden zespół wprowadza krążki nasączone środkami dezynfekcyjnymi do płytki nr 1 - z zawiesiną bakterii *Escherichia coli*, a drugi - do płytki nr 2 z *Bacillus subtilis*.

#### 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:

- wycinamy odpowiednie krążki z bibuły i nasączamy je środkiem dezynfekcyjnym, każdy krążek innym,
- nasączone krążki przenosimy za pomocą pincety na podłoże i delikatnie przyciskamy je do podłoża, uważając by go nie uszkodzić

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

W efekcie wykonania zadania uczeń powinien opanować jeden ze sposobów badania skuteczności oddziaływania środków dezynfekcyjnych na wzrost drobnoustrojów. Oczekiwany efekt pracy ucznia będzie również wyhodowanie bakterii oddalonych w różnej odległości od krążków nasączanych środkami dezynfekcyjnymi. Wykonane posiewy będą wykorzystywane przez innych uczniów do oceny skuteczności działania wybranych środków dezynfekcyjnych na bakterie *Escherichia coli* oraz *Bacillus subtilis*. Wymiernym efektem pracy ucznia będzie też zapisanie spostrzeżeń z posiewów na podstawie dostarczonych po inkubacji (temp. 37°C) płytek wcześniej przygotowanych przez innych uczniów, w **karcie pracy do zadania 2**. Będą mogli również wykonać zdjęcia z otrzymanych gotowych posiewów.

#### 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. Nauczyciel powinien nadzorować pracę ucznia, jednak powinien unikać wykonywania pracy za niego. Rolą nauczyciela jest również sprawdzenie czy płytki zostały przed posiewem odpowiednio oznakowane oraz dopilnowanie, żeby płytki po posiewie trafiły do cieplarki i były inkubowane w temperaturze 37°C. Od nauczyciela oczekiwana jest pomoc w przydzielaniu uczniom gotowych posiewów.

### **Zadanie 3.**

#### **Badanie skuteczności filtracji jako sposobu wyjaławiania produktów płynnych**

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

Filtrowanie należy do mechanicznych sposobów sterylizacji (wyjaławiania) produktów płynnych. Metody filtracyjne stosuje się w przypadku roztworów szczególnie wrażliwych na podwyższone temperatury, które zmieniają ich fizyczne i chemiczne właściwości. Do wyjaławiania służą najczęściej filtry membranowe o porach od 0,20 – 0,40 (0,75) µm średnicy. Ponieważ pory są mniejsze od wymiarów bakterii, odfiltrowane drobnoustroje osadzają się na filtrze, a uzyskany filtrat jest jałowy. Znane są różne typy filtrów jak np. świece Chamberlanda wykonane w kształcie dużych probówek z niepolerowanej porcelany, filtry Berkefelda ze sprasowanej ziemi krzemkowej o przeciwnym do świec Chamberlanda kierunku przesączania, filtry Zeitza wykonane z azbestu o kształcie krążków umieszczanych w specjalnych aparatach umożliwiającym sączenie czy filtry ze spiekanego szkła tzw. filtry Schotta. Ponadto są też stosowane filtry membranowe, które wykorzystamy na zajęciach, wykonane z octanu celulozy o małej średnicy porów. Są to cienkie krążki, które umieszcza się w specjalnych nasadkach metalowych. Filtrację produktów płynnych przeprowadza się w ten sposób, że filtry umieszcza się na kolbie

ssawkowej, podłącza do próżni a następnie sączy.

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

Podstawowa trudność, na którą uczeń może natknąć się podczas realizacji tego zadania wynika z niedokładności ułożenia membrany w metalowej obudowie filtra, co może powodować przenikanie cieczy filtracyjnej między membraną a obudową filtra.

Z innych problemów, jakie mogą pojawić się w trakcie realizacji zadania to najczęściej wynikają one z:

- niedostatecznego opanowania przez ucznia podstaw teoretycznych dotyczących znajomości zasady działania mikroskopu oraz niezadowalającego opanowania techniki mikroskopowania przez uczniów,
- braku podstaw teoretycznych, dotyczących przygotowania preparatu przyżyciowego, barwionego w kropli spłaszczonej,
- braku cierpliwości, skupienia i opanowania ze strony ucznia podczas pracy z mikroskopem.

Najlepszym rozwiązaniem pozostaje tutaj niezmiennie spokój i cierpliwość a także skupienie podczas zajęć i współpraca z prowadzącym. 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, ...)

Podczas otrzymywania filtratów uczniowie pracują w zespołach. Przy dwóch stołach laboratoryjnych planuje się umieszczenie stacji do filtrowania drobnoustrojów z badanych płynów. Po uzyskaniu filtratów z zawiesiny drożdży każdy uczeń pracuje już samodzielnie. Samodzielnie też wykonuje preparaty przyżyciowe, obliczając ilość komórek drożdży w próbce kontrolnej oraz filtratach, z wykorzystaniem hemocytometru (komora Thoma). Wszystkie czynności wykonuje w oparciu o instruktaż, nadzór i pomoc prowadzącego 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 należy zwrócić na następujące kwestie:

- szkiełko przedmiotowe z wygrawerowaną komorą Thoma odnajdujemy najpierw stosując powiększenie obiektywu 5x lub 10x, przy opuszczonym w dół aparacie Abbego a następnie zmieniając obiektyw na 40x, podnosimy w górę aparat Abbego,
- za każdym razem wprowadzamy materiał biologiczny na czyste szkiełko przedmiotowe za pomocą pipetki,
- szkiełko przykrywkowe delikatnie i pod kątem upuszczamy na kroplę zawiesiny,
- obserwujemy pod mikroskopem komórki drożdży, przy powiększeniu obiektywu 40x.

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

W efekcie wykonania zadania uczeń powinien nie tylko opanować technikę sporządzania preparatu przyżyciowego w kropli spłaszczonej, czy nabrać wprawy w posługiwaniu się hemocytometrem, ale przede wszystkim na podstawie obserwacji ilości żywych komórek drożdży w zawieszynie kontrolnej i filtratach (przez bibułę filtracyjną i membranę) powinien zaobserwować skuteczność działania filtracji, jako sposobu wyjąławiania produktów płynnych. Spostrzeżenia i wnioski powinien też zapisać w Karcie pracy do zadania 3.

### Oczekiwania wobec nauczyciela opiekuna

Rolą nauczyciela podczas realizacji tego zadania jest nadzorowanie wykonywanych przez ucznia czynności, wspieranie go, zachęcanie do cierplivej pracy podczas przygotowywania preparatu oraz odnajdywania pod odpowiednim powiększeniem obiektywu komory Thoma. Nauczyciel powinien nadzorować pracę ucznia, jednak powinien unikać wykonywania pracy za niego. Rolą nauczyciela jest również rozdanie uczniom specjalnych szkiełek przedmiotowych z wygrawerowaną siatką komory Thoma oraz szkiełek przykrywkowych, Kart pracy do zadania 3, a także zebranie i nadzorowanie wypełniania tych kart.

## **Zadanie 4.**

### Badanie skuteczności pasteryzacji w zwalczaniu drobnoustrojów

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

Pasteryzacja pozwala na częściowe wyjąławianie produktu. Stosowana jest często do produktów spożywczych w celu przedłużenia ich trwałości przez zniszczenie większości wegetatywnych form drobnoustrojów. Pasteryzacji poddaje się mleko, śmietanę, lody, soki owocowe, kompoty, przetwory mięsne i wiele innych. Pasteryzacja, w zależności od rodzaju produktu, polega na krótszym lub dłuższym ogrzewaniu, najczęściej w temperaturze 70 – 90<sup>0</sup>C. Czas ogrzewania może być też różny, np. 5 – 10 minut w temperaturze około 70<sup>0</sup>C, może wynosić od kilku do kilkudziesięciu sekund w temperaturze 80 – 90<sup>0</sup>C.

Uczniowie będą badali skuteczność pasteryzacji, sporządzając preparat przyżyciowy w kropli spłaszczonej, z dodatkiem błękitu metylenowego i licząc komórki w próbie kontrolnej przed pasteryzacją oraz próbach przetrzymywanych w łaźni wodnej w temperaturze około 80<sup>0</sup>C (5 i 15 minut).

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

Należy przestrzegać czasu pasteryzacji oraz warunków prowadzenia tego procesu.

Inne trudności, które mogą pojawić się w trakcie wykonywania zadania wynikać mogą z:

- niedostatecznego opanowania przez ucznia podstaw teoretycznych dotyczących zasady działania mikroskopu oraz słabego opanowania techniki mikroskopowania,
- braku staranności podczas sporządzania preparatu przyżyciowego, barwionego w kropli spłaszczonej,
- braku cierpliwości, skupienia i opanowania ze strony ucznia podczas pracy z mikroskopem.



Najlepszym rozwiązaniem pozostaje tutaj niezmiennie spokój i cierpliwość a także skupienie podczas zajęć i współpraca z prowadzącym. 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, ...)

Proces pasteryzacji przeprowadzany w probówkach we wrzącej łaźni wodnej w czasie 5 i 15 minut, uczniowie przeprowadzają wspólnie. Po wystudzeniu jednak prób, są one przenoszone na stanowiska (stoły laboratoryjne), przy których każdy uczeń samodzielnie wykonuje preparaty przyżyciowe, barwi je i liczy żywe oraz martwe (niebieskie) komórki w próbie kontrolnej oraz w próbach poddanych pasteryzacji. Wszystkie czynności wykonuje w oparciu o instruktaż, nadzór i pomoc prowadzącego 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 należy zwrócić na następujące kwestie:

- za każdym razem wprowadzamy materiał biologiczny na czyste szkiełko przedmiotowe za pomocą pipetki,
- barwnik nakrapiamy na kroplę zawiesiny drożdży,
- szkiełko przykrywkowe delikatnie i pod kątem upuszczamy na kroplę zawiesiny i barwnika,
- obserwujemy komórki drożdży, stosując powiększenie obiektywu 40x

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

W efekcie wykonania zadania uczeń powinien nie tylko opanować technikę sporządzania preparatu przyżyciowego, barwionego w kropli spłaszczonej, ale przede wszystkim na podstawie obserwacji ilości żywych i martwych komórek drożdży w zawiesinie kontrolnej bez pasteryzacji oraz w próbach przetrzymywanych w łaźni wodnej (5 minut i 15 minut) powinien określić skuteczność działania wysokiej temperatury na dane drobnoustroje. Swoje spostrzeżenia i wnioski powinien też zapisać w karcie pracy do zadania 4.

Oczekiwania wobec nauczyciela opiekuna

Rolą nauczyciela podczas realizacji tego zadania jest pomoc przy przenoszeniu na stanowiska prób poddanych pasteryzacji (5 i 15 minut) a także instruowanie ucznia, nadzorowanie wykonywanych przez niego czynności, wspieranie go, zachęcanie do cierplivej pracy podczas przygotowywania preparatu, barwienia oraz pracy przy mikroskopie. Nauczyciel powinien nadzorować pracę ucznia, jednak powinien unikać wykonywania pracy za niego. Rolą nauczyciela jest również rozdanie uczniom szkiełek przedmiotowych oraz przykrywkowych, **Kart pracy do zadania 4** a także zebranie i nadzorowanie wypełniania tych kart.

## Zadanie 5.

### Oznaczanie ogólnej ilości bakterii w mleku pasteryzowanym metodą płytkowa

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

Do liczenia komórek drobnoustrojów, wyrosłych na odpowiednich podłożach, często są wykorzystywane metody pośredniego liczenia. Wykonuje się posiew określonej objętości badanej próby na podłożu stałym a po okresie inkubacji oblicza się ilość wyrosłych kolonii. Przyjmując, że z jednej komórki wyrasta jedna kolonia oblicza się ilość komórek w  $1\text{cm}^3$  lub 1g badanego produktu.

Metody te są szybkie, lecz jednocześnie obarczone błędem, wynikającym z tego, że skupienia kilku (nawet kilkudziesięciu) komórek dają w efekcie wzrost jednej kolonii oraz pozwalają obliczyć wyłącznie ilości żywych komórek, zdolnych do wzrostu w danej temperaturze i na danym podłożu.

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

Praca w laboratorium mikrobiologicznym wymaga wiele cierpliwości i skupienia. Szczególną uwagę należy zwrócić na zachowanie sterylnych warunków i pracę z włączonym palnikiem w czasie posiewu drobnoustrojów, by nie doprowadzić do zakażeń wtórnych ale także zachować ostrożność, aby się nie poparzyć. Trudności, na które uczeń może natknąć się podczas realizacji tego zadania mogą wynikać z braku wprawy i doświadczenia w wykonywaniu prac laboratoryjnych. Najlepszym rozwiązaniem problemów, pojawiających się podczas realizacji zadania będzie przede wszystkim skupienie się podczas trwania zajęć oraz współpraca z prowadzącym.

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

Uczniowie pracują w zespołach i przygotowują posiewy mleka nierozcieńczonego i rozcieńczonego (1:10 oraz 1:100) metodą płytek lanych. Przy każdym stole laboratoryjnym uczniowie otrzymują zestaw 6 jałowych płytek. Po okresie inkubacji obliczają ilość wyrosłych kolonii z płytek przygotowanych wcześniej, przez innych uczniów. Uczniowie pracują w oparciu o instruktaż, nadzór i pomoc prowadzącego zajęcia 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 zadania 3 należy zwrócić na następujące kwestie:

- pracę należy wykonywać przy włączonym palniku gazowym,
- należy prawidłowo sporządzić rozcieńczenia badanej próby mleka ( $10^{-1}$  i  $10^{-2}$ ),
- wprowadzając badany materiał a potem podłoże hodowlane do płytki, należy za każdym razem wieczko płytki uchylać w jak najmniejszym stopniu, aby uniknąć zakażeń,
- w celu zmniejszenia błędów oznaczenia, mleko nierozcieńczone i rozcieńczone posiewa się na dwóch równoległych płytkach.
- posiewy mleka wykonujemy metodą płytek lanych tzn. najpierw wprowadzamy badaną

próbę mleka do płytki a potem zalewamy ją rozpuszczonym podłożem,

- ruchem kolistym lub ósemki rozprowadzamy podłoże z próbą równomiernie w płytce,
- po zestaleniu podłoża opisujemy swoją płytkę, podając własne inicjały (nazwisko i imię) i datę posiewu,
- należy odstawić płytkę do inkubacji w cieplarni, w temperaturze 32°C.

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

W efekcie pracy ucznia w ramach wykonywania zadania 5 oczekuje się, że uczeń opanuje technikę posiewu drobnoustrojów w płytkach Petriego metodą płytek lanych, nabierze też wprawy w sporządzaniu rozcieńczeń płynnych produktów i wykorzysta te doświadczenia do obliczenia ilości drobnoustrojów w 1 cm<sup>3</sup> mleka, metodą pośrednią.

Oczekiwany efekt pracy ucznia będzie również wypełnienie przez niego Karty pracy do zadania 5. Wymiernym efektem jego pracy podczas realizacji zadania będzie możliwość wykonania zdjęć za pomocą kamery mikroskopowej gotowych (po inkubacji) wyrosłych kolonii drobnoustrojów. Zdjęcia te uczeń będzie mógł zapisać na dysku przenośnym i wykorzystać w prezentacji komputerowej wykonanej w programie PowerPoint, w ramach jednego z kolejnych zadań.

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 przydzielanie uczniom jałowych płytek Petriego, w których będą dokonywali posiewu mleka oraz płytek po inkubacji, z którymi uczeń będzie pracował podczas realizacji tego zadania. Nauczyciel powinien też dopilnować, żeby po posiewie płytki trafiły do cieplarki i były inkubowane w temperaturze 32°C. Nadzoruje też wypełnianie przez uczniów Karty pracy do zadania 5.

## **Zadanie 6.**

### **Badanie czystości mikrobiologicznej surowców roślinnych (owoców) i produktów spożywczych**

Opis zadania (co robimy, dlaczego)

Surowce roślinne to owoce, warzywa i ziarno zbóż. Drobnoustroje występują nie tylko na ich powierzchni. Czasami występują także wewnątrz tkanki. Do zakażenia drobnoustrojami może dojść poprzez blizny szypułkowe i mechaniczne uszkodzenia skórki. W zdrowych optycznie jabłkach wykryto w komorach nasiennych *Penicillium expansum* oraz niektóre gatunki z rodzajów *Monilia* i *Mucor*. W procesach przetwarzania surowców roślinnych duża część mikroflory zostaje usunięta przez mycie. Jest sprawą oczywistą, że warunki przerobowe surowców mogą ukierunkować rozwój poszczególnych grup fizjologicznych drobnoustrojów, przy czym jakiegokolwiek zaburzenia w technologii mogą sprzyjać rozwojowi niekorzystnej mikroflory. Ważna jest nie tylko jakość, ale też liczebność mikroflory wywołującej zepsucia surowców lub produktów. Produkty przetworzone tracą część naturalnych właściwości i przez to stają się bardziej podatne na zakażenia mikrobiologiczne. Mikroflora surowców roślinnych może być przyczyną nie tylko zepsucia produktów żywnościowych, ale również chorób u ludzi. Psucie świeżych owoców powodowane jest najczęściej przez pleśnie (*Rhizopus*,

*Penicillium*) i wiele innych. Należy też się liczyć z możliwością nagromadzenia mykotoksyn, np. patuliny czy aflatoksyn, tworzonych przez gatunki pleśni z rodzajów *Penicillium* i *Aspergillus*.

Mikroflorę powierzchniową surowców roślinnych można ocenić ilościowo metodą zmywu tamponem z waty, zwilżonym płynem fizjologicznym, z którego później wypłukuje się drobnoustroje do określonej ilości płynu. Uczniowie będą sporządzali preparaty z płynu zawierającego wypłukane drobnoustroje ze skórki jabłek i będą je barwili metodą Grama, by móc się przyjrzeć z bliska mikroflorze tak powszechnie lubianych owoców. Barwienie ma na celu ułatwienie obserwacji cech morfologicznych i diagnostycznych komórek mikroorganizmów. W ramach zadania uczniowie przygotowują preparat utrwalany z mieszaniny bakterii, utrwalą go, zabarwią 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 ze znajomości budowy i zasady działania mikroskopu oraz 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 utrudnia a nawet uniemożliwia znalezienie obrazu preparatu w mikroskopie,
- braku cierpliwości, i opanowania ze strony ucznia podczas pracy z mikroskopem.

Najlepszym rozwiązaniem niezmiennie pozostaje tutaj właściwe przygotowanie się ucznia do zajęć, a także skupienie podczas ich trwania 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, utrwalą 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 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 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 należy 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 imersyjnego 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 6 będzie określenie czystości mikrobiologicznej surowca na przykładzie jabłka, opanowanie w teorii i praktyce metodyki barwienia metodą Grama oraz wypełnienie **Karty pracy do zadania 6**.

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, oraz Kart pracy do zadania 6, a także zebranie i nadzorowanie wypełniania tych kart.

## **Zadanie 7.**

### Obserwacja preparatów i hodowli drobnoustrojów przy użyciu kamery mikroskopowej oraz 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 i hodowli drobnoustrojów. 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 samego programu komputerowego, programu 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 wyposażony w kamerę mikroskopową. 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 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, ...)

Szczególną uwagę podczas wykonywania tego zadania należy zwrócić na to, żeby preparat w mikroskopie był właściwie doświetlony i wyraźny, aby można było uzyskać zdjęcie jak najlepszej jakości, pozwalające na dokładną obserwację szczegółów preparatu.

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

Wymiernym efektem pracy ucznia podczas realizacji zadania będą wykonane, za pomocą kamery, zdjęcia sporządzanych preparatów, które uczeń będzie mógł zapisać na dysku przenośnym, a następnie będzie mógł wykorzystać w przygotowywanej prezentacji komputerowej, w programie PowerPoint.

### 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 jego pracę.

## **Zadanie 8.**

### **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 preparatów i posiewów drobnoustrojów oraz spostrzeżenia a także 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 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 mikroskopie znajduje się jeden uczeń, każdy 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 8** przygotowanej dla uczniów wykonujących zadanie. Instrukcja została umieszczona w dalszej części opracowania.

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

Ze względu na to, że czasu na wykonanie tego zadania jest stosunkowo niewiele, 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.

### 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 zadań realizowanych na zajęciach laboratoryjnych.

### 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 przygotowania podłoża do posiewu drobnoustrojów w płytce Petriego i posiew bakterii *Escherichia coli* i *Bacillus subtilis*

#### ❖ Instrukcja wylewania podłoża do dwóch jałowych płytek Petriego

- wyciągnij z metalowej puszkii Schimmelbuscha dwie jałowe płytki Petriego,
- chwyć ręką w rękawicy, od spodu kolbę z gorącym upłynnionym podłożem hodowlanym (np. agar odżywczy, bulion z agarem),
- drugą ręką otwórz kolbę z podłożem wyciągając z niej korek z waty w taki sposób, żeby trzy palce tj. kciuk, palec wskazujący oraz środkowy - pozostały wolne,
- opal brzeg kolby (wylot), przesuając go kilkakrotnie przez płomień palnika,
- otwórz płytkę Petriego, trzymając jej wierzchnią część pod kątem, za pomocą trzech wolnych palców i opierając brzeg kolby o spodnią część płytki napełnij ją podłożem tak by przykryć nim dno płytki.
- zamknij płytkę Petriego i na stole laboratoryjnym ruchem kolistym, bądź kreśląc ósemki (2 – 3 razy), rozprowadź równomiernie podłoże w płytce,
- pozostaw płytkę do zastygnięcia podłoża,
- ponownie opal brzeg kolby z podłożem, przesuając go kilkakrotnie przez płomień palnika,
- zamknij kolbę z podłożem korkiem z waty,
- odstaw kolbę z podłożem i zdejmij rękawicę,
- w podobny sposób wlej podłoże do drugiej płytki Petriego, zachowując podobnie jak przy pierwszej, warunki jałowe przygotowania podłoża,
- odczekaj 10 – 15 minut, do całkowitego zestalenia podłoża w obu płytkach,
- opisz płytki, podając następujące dane na każdej z nich:
  - **Płytkę nr 1** – *E.c.* – posiewane będą bakterie nie wytwarzające przetrwalników tj. *Escherichia coli*, data posiewu, inicjały wykonującego posiew,
  - **Płytkę nr 2** – *B.s.* - posiewane będą bakterie wytwarzające przetrwalniki tj. *Bacillus subtilis*, data posiewu, inicjały wykonującego posiew,

#### ❖ Posiew bakterii *Escherichia coli* oraz *Bacillus subtilis* na zestalone podłoża

- za pomocą pipety pobierz z kolby 1cm<sup>3</sup> zawiesiny bakteryjnej *Escherichia coli*, wprowadź ją do płytki nr 1 i rozprowadź materiał przy pomocy głaszczki po całej powierzchni podłoża a nadmiar płynu usuń z płytki,
- podobnie postępuj z płytką nr 2 pobierz z kolby 1cm<sup>3</sup> zawiesiny bakteryjnej *Bacillus subtilis*, wprowadź ją do płytki nr 2 i rozprowadź materiał przy pomocy głaszczki po całej powierzchni podłoża a nadmiar płynu usuń z płytki,
- zamknij płytki i odstaw na stole laboratoryjnym.

### Instrukcja nr 2.

#### Instrukcja wykonania oceny skuteczności działania wybranych środków dezynfekcyjnych na bakterie *Escherichia coli* i *Bacillus subtilis*

#### ❖ Wycinanie krążków z bibuły (3-4 sztuki o średnicy 1-2 cm

- Nasączenie krążków, każdego innym środkiem, spośród: 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, incidur-środek bakteriobójczy, octenisept- środek do przemywania i odkażania ran i alkohol (70% i 90%),

- Nakładanie krążków na zastygłe podłoża z materiałem biologicznym w płytkach Petriego nr 1 – *E.c.* i nr 2 - *B.s.*
- Płytki inkubować 24 godziny w temperaturze 37°C,
- Po okresie inkubacji określić w mm strefy zahamowania wzrostu bakterii wokół krążków i porównać wrażliwość badanych szczepów bakterii na różne środki dezynfekcyjne .

Wypełnij **Kartę pracy do zadania 2.**

### **Instrukcja nr 3.**

**Instrukcja badania skuteczności filtracji, jako sposobu wyjąławiania produktów płynnych**

Skuteczność filtracji zawiesiny drożdży jest badana poprzez obliczenie ilości komórek drożdży w:

- ✓ zawiesinie wyjściowej (bez filtracji), (**kolba nr 1**),
  - ✓ filtracie - po przepuszczeniu zawiesiny przez bibułę filtracyjną, (**kolba nr 2**),
  - ✓ filtracie – po przepuszczeniu zawiesiny drożdży przez filtr membranowy o porach 0,2 – 0,22 μm, (**kolba nr 3**).
- ❖ **Kolba nr 1** z zawiesiną drożdży jest próbą kontrolną (wyjściową). Sporządzamy preparat drożdży w kropli spłaszczonej i obliczamy ilość komórek drożdży w 1cm<sup>3</sup> płynu, wykorzystując do obliczeń komorę Thoma.
  - ❖ Zawiesinę drożdży z kolby nr 1 przefiltrować przez sącdek z bibułą filtracyjną. W tym celu należy wykorzystać przygotowany zestaw filtracyjny na stanowisku i przepuścić 100 cm<sup>3</sup> zawiesiny przez bibułę. Z odbieralnika filtratu (**kolba nr 2**) pobrać kroplę i wykonać preparat w kropli spłaszczonej a następnie wykorzystać siatkę komory Thoma do obliczeń ilości komórek drożdży w tym filtracie.
  - ❖ Zawiesinę drożdży (kolba nr 1) przefiltrować przez membranę filtracyjną o porach 0,2 – 0,22 μm. W tym celu do metalowego kubka, przygotowanego zestawu filtracyjnego na stanowisku, wlej 50 cm<sup>3</sup> zawiesiny z kolby nr 1 i przyciskiem pompy włącz filtrowanie. Po zakończonej filtracji, wyłącz pompę, wyciągnij wtyczkę z prądu i otwórz odbieralnik z filtrem (**kolba nr 3**). Z odbieralnika filtratu pobierz kroplę i wykonaj preparat drożdży w kropli spłaszczonej. Oblicz ilość drobnoustrojów w 1cm<sup>3</sup> filtratu (**kolba nr 3**) po zastosowaniu filtracji membranowej.

Za każdym razem do ustalenia ilości komórek drożdży wykorzystaj w obliczeniach siatkę **komory Thoma.**

Liczy się ilość komórek w 80 małych kwadratach (w każdym kwadracie ilość komórek znajdujących się wewnątrz pola plus połowa znajdujących się na liniach) i oblicza średnią przypadającą na jeden kwadrat.

Liczba komórek w 1 cm<sup>3</sup> badanego płynu (x) wynosi:

$$X = c \cdot d \cdot 4000 \cdot 1000$$

gdzie: c – średnia ilość komórek przypadających na jeden mały kwadrat,  
d – rozcieńczenie badanej próby.

Wyniki z obliczeń wpisz w **Karcie pracy do zadania 3.**

#### Instrukcja nr 4.

##### Instrukcja badania skuteczności pasteryzacji w zwalczaniu drobnoustrojów

- ❖ Skuteczność pasteryzacji badamy przetrzymując zawiesinę drożdży ( $5 \text{ cm}^3$ ) w probówkach we wrzącej łaźni wodnej 5 minut i 15 minut.

- pobierz ze statywu dwie probówki i wprowadź po  $5 \text{ cm}^3$  zawiesiny drożdży,
- wstaw jedną probówkę do zlewki z czasem pasteryzacji 5 minut, a drugą do zlewki z czasem pasteryzacji 15 minut,
- po zebraniu próbek od wszystkich (4 stoły laboratoryjne), oba zestawy, wstaw do wrzącej łaźni wodnej (aparatus Kocha),

- ✓ czas pasteryzacji 5 minut:

- po 5 minutach wyciągnij z łaźni wodnej jeden zestaw próbek,
- odstaw probówki do wystygnięcia,
- po ochłodzeniu zawiesiny w probówkach wykonaj preparat drożdży w kropli spłaszczonej z dodatkiem błękitu metylenowego,
- zastosuj powiększenie obiektywu najpierw 5 lub 10x a następnie odszukaj obraz komórek drożdży, stosując powiększenie obiektywu 40x,
- w 10 różnych polach widzenia policz komórki żywe (niezabarwione) i martwe (zabarwione na niebiesko),

- ✓ czas pasteryzacji 15 minut

- po 15 minutach wyciągnij z łaźni wodnej drugi zestaw próbek,
- odstaw probówki do wystygnięcia,
- po ochłodzeniu z zawiesiny drożdży wykonaj preparat przyżyciowy w kropli spłaszczonej z dodatkiem błękitu metylenowego,
- zastosuj powiększenie obiektywu najpierw 5 lub 10x a następnie odszukaj obrazu komórek drożdży stosując powiększenie obiektywu 40x,
- w 10 różnych polach widzenia policz komórki żywe (niezabarwione) i martwe (zabarwione na niebiesko),

Oblicz procent komórek martwych drożdży (zabarwionych na niebiesko) po 5 minutach i 15 minutach pasteryzacji.

Wyniki z obliczeń zapisz w tabeli, w **Karcie pracy do zadania 4**

#### Instrukcja nr 5

##### Instrukcja oznaczania ogólnej ilości bakterii w mleku pasteryzowanym metodą płytkowa

- Mleko w opakowaniu dokładnie wymieszaj przez 20 – 30 odwróceń,
- Sporządź dwa rozcieńczenia mleka  $10^{-1}$  i  $10^{-2}$ ,
- Jałową pipetą pobierz z kartonika  $1 \text{ cm}^3$  mleka i wprowadź do pierwszej probówki z  $9 \text{ cm}^3$  jałowej wody destylowanej,



- Dokładnie wymieszaj zawartość probówki przez kilkakrotne wciąganie i wypuszczanie płynu do probówki, otrzymujesz rozcieńczenie płynu wyjściowego 1:10 ( $10^{-1}$ ),
- Zapisz pisakiem na probówce to rozcieńczenie,
- Drugą jałową pipetą pobierz  $1\text{cm}^3$  z pierwszego rozcieńczenia i wprowadź do drugiej probówki z  $9\text{ cm}^3$  wyjałowionej wody, wymieszaj zawartość probówki jak poprzednio, wpuszczając i wypuszczając płyn do probówki, otrzymujesz w ten sposób kolejne rozcieńczenie 1:100 ( $10^{-2}$ ),
- Zapisz pisakiem na probówce to rozcieńczenie,
- Z każdego rozcieńczenia pobierz jałową pipetą po  $1\text{cm}^3$  roztworu i wprowadź na trzy płytki Petriego,
- Zalej płytki agarem odżywczym ,
- Inkubuj w temperaturze  $30^\circ\text{C}$ , 72 godziny,

Oblicz ogólną ilość bakterii ( $X$ ) w  $1\text{cm}^3$  badanego mleka, korzystając ze wzoru:

$$X = \frac{\Sigma C}{(N_1 + 0,1 \cdot N_2)} \cdot d$$

gdzie:

$\Sigma C$  – suma kolonii bakteryjnych we wszystkich płytkach wybranych do liczenia,

$N_1$  – liczba płytek pierwszego liczonego rozcieńczenia,

$N_2$  - liczba płytek drugiego liczonego rozcieńczenia,

$d$  - wielkość najniższego rozcieńczenia z dwóch rozcieńczeń wybranych do analizy

Wszystkie obliczenia a także własne uwagi i spostrzeżenia zapisz **w Karcie pracy do zadania 5.**

### **Instrukcja nr 6.**

Instrukcja badania czystości mikrobiologicznej surowców roślinnych (owoców) i produktów spożywczych

➤ Przygotowanie mieszaniny drobnoustrojów ze skórki jabłek

- obierz cienko jabłko,
- skórkę pokrój na wąskie paski i włóż do kolby o poj.  $100\text{ cm}^3$ ,
- wlej następnie do kolby ze skórką  $50\text{ cm}^3$  jałowej wody,
- wstrząsaj 5 razy po kilkanaście sekund kolbę ze skórką i wodą, aby wymyć drobnoustroje ze skórki,

➤ W celu identyfikacji drobnoustrojów obecnych na skórce jabłka wykonaj preparat utrwalony i barwiony jednym barwnikiem - fioletem krystalicznym

- odtłuść szkiełko przedmiotowe poprzez kilkakrotne przesunięcie szkiełka przez płomień palnika,
- na odtłuszczone szkiełko przedmiotowe nanieś pipetą 1-2 krople mieszaniny bakterii z kolby,
- 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 utrwal 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,
- preparat s płukaj 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,
- pokrętle 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 pokrętle 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,
- jeżeli 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 6.**

### **Instrukcja nr 7.**

Instrukcja obserwacji preparatów i hodowli drobnoustrojów przy użyciu kamery mikroskopowej oraz rejestracji obrazów w komputerze i na przenośnym dysku

- w mikroskopie wyposażonym w kamerę mikroskopową ustaw pokrętko potencjometru na najmniejszy wskaźnik jasności,
- za pomocą śruby makrometrycznej opuść stolik mikroskopu w najniższe położenie,
- umieść obserwowany obiekt (preparat) na stoliku mikroskopu,
- włącznikiem włącz oświetlenie mikroskopu,
- pokrętkiem potencjometru zwiększ oświetlenie,
- za pomocą urządzenia rewolwerowego z obiektywami 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 (hodowlę) przy małym powiększeniu (obiektyw 5x), aparat oświetlający Abbego opuść maksymalnie w dół,
- po ustawieniu stolika z preparatem (hodowlą) uruchom program Motic Images Plus 2.0, klikając odpowiednią ikonę na monitorze komputera,
- najedź kursorem na okienko uchwyć obraz i kliknij dwukrotnie,
- patrząc w monitor komputera powoli opuszczaj stolik z preparatem za pomocą śruby makrometrycznej, aż do chwili znalezienia obrazu na monitorze komputera,
- jeżeli 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 uzyskaj ostry obraz preparatu (hodowli),
- 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,

### **Instrukcja nr 8.**

Instrukcja wykonania prezentacji komputerowej w programie PowerPoint zatytułowanej „Sposoby zapewnienia bezpieczeństwa mikrobiologicznego żywności,”  
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 hodowli na podłożach stałych w płytkach Petriego oraz obserwacje, wnioski i własne spostrzeżenia uczniów podczas ćwiczeń. Przy 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 ucznia, jego indywidualność, zaangażowanie w realizowane zadania 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 i spostrzeżeniach w trakcie wykonywania doświadczeń a znacznie mniej na wiedzy książkowej i teoretycznej.

Czas na realizację tego zadania jest stosunkowo krótki, dlatego należy właściwie rozłożyć siły i zaplanować realizację poszczególnych elementów prezentacji, aby zmieścić się w wymaganym czasie.

**Karta pracy do zadania 2.**

**Karta pracy do zadania 3.**

**Karta pracy do zadania 4.**

**Karta pracy do zadania 5.**

**Karta pracy do zadania 6.**

Imię i nazwisko ucznia, klasa

Miejscowość, data

### KARTA PRACY DO ZADANIA 2

#### Ocena skuteczności działania wybranych środków dezynfekcyjnych na bakterie *Escherichia coli* i *Bacillus subtilis*

- ✓ Określić w mm strefy zahamowania wzrostu bakterii wokół krążków i porównać wrażliwość badanych szczepów bakterii na różne środki dezynfekcyjne .

Środek dezynfekcyjny	<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
1		
2		
3		
4		

- 1 – 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,  
2 – Incidur - środek bakteriobójczy,  
3 – Octenisept,  
4 – Alkohol.

**Wnioski:**



Imię i nazwisko ucznia, klasa

Miejscowość, data

### KARTA PRACY DO ZADANIA 3

#### Badanie skuteczności filtracji, jako sposobu wyjąławiania produktów płynnych

- ✓ **Policzyć ilość komórek w poszczególnych próbach:**
- ✓ zawiesinie wyjściowej (bez filtracji), (**kolba nr 1**),
- ✓ filtracie - po przepuszczeniu zawiesiny przez bibułę filtracyjną, (**kolba nr 2**),
- ✓ filtracie – po przepuszczeniu zawiesiny drożdży przez filtr membranowy o porach 0,2 – 0,22  $\mu\text{m}$ , (**kolba nr 3**).

Obliczenia wykonać w 16 małych kwadratach (w każdym kwadracie ilość komórek znajdujących się wewnątrz pola plus połowa znajdujących się na liniach). Do tabeli wpisz średnią ilość komórek przypadających na jeden mały kwadrat.

Nr kwadratu	Próba nr 1	Próba nr 2	Próba nr 3
1.			
2.			
3.			
4.			
5.			
6.			
7.			
8.			
9.			
10.			
11.			
12.			
13.			
14.			
15.			
16.			
<b>Średnia liczba komórek</b>			

✓ **Obliczyć liczbę komórek w 1 cm<sup>3</sup> badanego płynu (X):**

$$X = c \cdot d \cdot 4000 \cdot 1000$$

gdzie: c – średnia ilość komórek przypadających na jeden mały kwadrat,  
d – rozcieńczenie badanej próby.

<b>Rodzaj badanej próby</b>	<b>Średnia liczba komórek w małym kwadracie</b>	<b>Liczba komórek w 1 cm<sup>3</sup> badanej próby</b>
<b>1</b>		
<b>2</b>		
<b>3</b>		

**Wnioski:**

Imię i nazwisko ucznia, klasa

Miejscowość, data

### KARTA PRACY DO ZADANIA 4

#### Badanie skuteczności pasteryzacji w zwalczaniu drobnoustrojów

- ❖ Obejrzyj w mikroskopie, pod obiektywem powiększającym 40-krotnym, preparaty drożdży *Saccharomyces cerevisiae* w kropli spłaszczonej z dodatkiem błękitu metylenowego.
- ❖ W 10 różnych polach widzenia (pole widzenia w mikroskopie zmieniać, przesuwając preparat na stoliku) policzyć ilość komórek żywych oraz martwych.
- ❖ Oblicz udział komórek martwych w próbce według wzoru (X):

$$X = \frac{b}{(a + b)} \cdot 100\%$$

gdzie:

a – średnia liczba (z dziesięciu pomiarów) komórek żywych, b – średnia liczba (z dziesięciu pomiarów) komórek martwych

- ❖ Wyniki obserwacji i obliczeń umieścić w tabeli.

Pole widzenia	Zawiesina drożdży nie poddana pasteryzacji		Zawiesina drożdży ogrzewana 5 minut		Zawiesina drożdży ogrzewana 15 minut	
	Liczba komórek żywych	Liczba komórek martwych	Liczba komórek żywych	Liczba komórek martwych	Liczba komórek żywych	Liczba komórek martwych
1.						
2.						
3.						
4.						
5.						
6.						
7.						
8.						
9.						
10.						
Suma						
% komórek martwych						

**Wnioski:**

Imię i nazwisko ucznia, klasa

Miejscowość, data

### KARTA PRACY DO ZADANIA 5

#### Oznaczanie ogólnej ilości bakterii w mleku pasteryzowanym metodą płytkowa

- ✓ **Policz liczbę kolonii wyrosłych na poszczególnych płytkach i zapisz wyniki w tabeli.**

Nr płytki	Liczba kolonii (rozcieńczenie $10^{-1}$ )	Liczba kolonii (rozcieńczenie $10^{-2}$ )
1.		
2.		
3.		
Suma kolonii		

- ✓ **Oblicz ogólną ilość bakterii ( $X$ ) w  $1\text{cm}^3$  badanego mleka, korzystając ze wzoru:**

$$X = \frac{\Sigma C}{(N_1 + 0,1 \cdot N_2)} \cdot d$$

gdzie:

$\Sigma C$  – suma kolonii bakteryjnych we wszystkich płytkach wybranych do liczenia,

$N_1$  – liczba płytek pierwszego liczonego rozcieńczenia,

$N_2$  - liczba płytek drugiego liczonego rozcieńczenia,

$d$  - wielkość najniższego rozcieńczenia z dwóch rozcieńczeń wybranych do analizy

**Wnioski:**



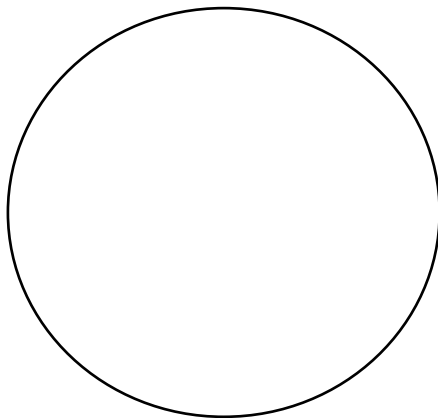
Imię i nazwisko ucznia, klasa

Miejscowość, data

### KARTA PRACY DO ZADANIA 6

#### **Badanie czystości mikrobiologicznej surowców roślinnych (owoców) i produktów spożywczych**

- ✓ Wykonaj preparat bakteryjny utrwalony i barwiony jednym barwnikiem – fioletem krystalicznym, obejrzyj w mikroskopie pod imersją (obiektyw powiększający 100 – krotnie + kropla olejku immersyjnego). Narysuj widziane w mikroskopie obiekty, opisz je i scharakteryzuj (powiększenie mikroskopu, co widać na rysunku – jakie są kształty bakterii).



**Wnioski:**