



Nauka i technologia dla żywności

Projekt badawczy

Temat: Dwulicowe grzyby, czyli drożdże i pleśnie w żywności

Wprowadzenie:

Świat grzybów jest zadziwiający i wart głębszego poznania. Grzyby tworzą w świecie roślin grupę organizmów obejmującą ponad 100000 różnorodnych gatunków. Są to organizmy eukariotyczne, jedno – lub wielokomórkowe o różnym kształcie oraz rozmiarach, posiadające właściwe jądro komórkowe otoczone błoną jądrową i chromosomy. Nie potrafią same produkować pokarmu. Dużo gatunków: *Zygomycetes* (sprzężniaki), *Ascomycetes* (workowce) i *Deuteromycetes* (*Fungi imperfecti* – grzyby niedoskonałe) znalazło przemysłowe zastosowanie. Spośród grzybów powszechnie wykorzystywane są drożdże i pleśnie. Drożdże to grzyby jednokomórkowe o kształcie owalnym, kulistym bądź cylindrycznym. Postacią wegetatywną pleśni jest natomiast mniej lub bardziej rozgałęziony, jedno lub wielokomórkowy strzępek o znacznej, dochodzący nawet do kilku centymetrów długości.

Dobrym środowiskiem do rozwoju drożdży oraz pleśni są produkty żywnościowe. Te mikroorganizmy mogą spowodować jej zepsucie a niekiedy nawet wywołać groźne zatrucia pokarmowe u człowieka, np. pleśnie z rodzaju *Fusarium* (*roseum*, *poae*) oraz *Aspergillus* (*flavus*, *ochraceus*). Z tych powodów w procesie produkcji i przechowywania żywności staramy się zahamować rozwój wszystkich szkodliwych mikroorganizmów, zredukować ich liczbę albo całkowicie usunąć je z produktu.

W żywności są też obecne pożyteczne drobnoustroje, których metabolizm korzystnie wpływa na zmianę cech sensorycznych surowca, poprawę jego wartości odżywczej i dietetycznej np. w pieczywie, winie, serach pleśniowych typu camembert, rokwar czy rokpol.

Cel projektu:

Celem praktycznym projektu jest poznanie różnych form wegetatywnych grzybów na przykładzie pleśni i drożdży, ich struktury komórkowej, sposobów hodowli na różnych podłożach a także określenie ich ilości, żywotności oraz wielkości komórek drożdży. Wymiernym efektem będzie przygotowanie prezentacji w programie PowerPoint zatytułowanej „Świat miniaturowych grzybów”.



Cele kształcenia:

Uczeń:

- wyjaśnia pochodzenie słowa grzyby,
- wymienia i wyjaśnia różnice między drożdżami i pleśniami,
- wymienia warunki sprzyjające rozwojowi drożdży i pleśni w żywności,
- podaje przykłady pozytywnego i negatywnego oddziaływania drożdży i pleśni w żywności,
- wymienia i opisuje podstawowe formy wegetatywne drożdży i pleśni,
- opisuje podstawowe elementy budowy komórki grzybów,
- stosuje właściwy materiał biologiczny oraz przyrządy do sporządzania preparatów mikroskopowych,
- wykonuje posiewy grzybów w płytkach Petriego,
- wykonuje proste i barwione preparaty przyżyciowe w kropli spłaszczonej,
- analizuje i opisuje obserwowane preparaty mikroskopowe,
- analizuje i opisuje hodowle wyrosłe w płytkach Petriego,
- wykonuje proste obliczenia ilości i żywotności komórek drożdży,
- stosuje kamerę mikroskopową do rejestrowania obrazów mikroskopowych.

Pytanie kluczowe:

Jaką rolę pełnią grzyby (drożdże i pleśnie) w żywności?

Dwulicowe grzyby, czyli drożdże i pleśnie w żywności

Grzyby według obecnie obowiązującej systematyki zalicza się do królestwa *Mycota* (*Fungi*). Są to organizmy eukariotyczne, posiadające wyraźnie uformowane jądro komórkowe, otoczone błoną jądrową. Grzyby są organizmami heterotroficznymi, które do procesów życiowych (metabolizmu) potrzebują związków węgla i azotu. Dzięki mikoryzie - symbiozie z korzeniami wielu roślin i drzew, grzyby otrzymują węglowodany, a rośliny zyskują substancje odżywcze oraz ochronę przed patogenami. W komórkach grzybów wyróżnia się ścianę komórkową i protoplast, z wyraźnie uformowanym jądrem, w którym występują chromosomy. Z innych struktur obecne są też:

Mitochondria zawierające białka i inne niż jądro DNA. Średnica mitochondriów wynosi 0,5 – 0,8 μm a ich liczba w komórce może dochodzić do 100.

Rybosomy są to organelle syntezujące białka. Ich wymiary to 20 – 80 nm.

Retikulum endoplazmatyczne, stanowiące system kanalików, rureczek i pęcherzyków, służących do wewnątrzkomórkowego transportu substancji.

Błona cytoplazmatyczna, która wykazuje budowę trójwarstwową. Jej warstwa zewnętrzna przylegająca do wewnętrznej strony ściany komórkowej, zwana plazmolemą, bierze aktywny udział w procesie przyjmowania i wydalania substancji przez komórkę.

Ściana komórkowa, która w około 80% zbudowana jest z polisacharydów: celulozy, glukanu, chityny, chitozanu i mannanu.

Wakuole (wodniczki) obecne zarówno u grzybów strzępkowych jak też u drożdży. W wakuolach mogą występować polifosforany (wolutyna) i lipidy, stanowiące substancje zapasowe. U wielu grzybów często magazynowany jest też glikogen, którego ilość może wynosić do 30% masy cytoplazmy.

Grzyby stanowią różnorodną grupę mikroorganizmów. Swoją nazwę zawdzięczają

grzybom kapeluszowym, chociaż bardzo się od nich różnią i to nie tylko wielkością czy kształtem. Podczas zajęć uczniowie będą mieli możliwość zaobserwowania różnych rodzajów i gatunków grzybów. Poznają i porównują morfologię wielu z nich. Umożliwi im to nie tylko mikroskop laboratoryjny STUDAR Z1 z obiektywami o różnych powiększeniach, preparaty mikroskopowe i barwniki, lecz także kamera mikroskopowa, rejestrująca obrazy w komputerze. Pozwoli to obserwować mikroorganizmy w sposób ciągły, bez konieczności ręcznego odwzorowywania obrazów. Wykorzystanie kamery w pracy z uczniami znacznie ułatwi też nauczycielowi dotarcie do większego grona uczniów. Uczniom z kolei pozwoli rejestrować „zdobywaną wiedzę” w atrakcyjniejszy sposób, a zapisane obrazy wykorzystać w przygotowywanej prezentacji w programie Power Point. Jak wcześniej wspomniano, świat grzybów jest bardzo różnorodny. W tej grupie występują zarówno grzyby jednokomórkowe jak też wielokomórkowe. Najpowszechniej znane są drożdże i pleśnie. Taki podział grzybów ma raczej charakter umowny i tradycyjny niż biologiczny. Warto przyjrzeć się tym drobnoustrojom bliżej.

Drożdże są to organizmy jednokomórkowe, bardzo zróżnicowane pod względem wielkości oraz kształtu. Zwykle komórki drożdży mają od 1 do 8 μm długości i od 1 do 6 μm szerokości. Kształt komórek może być kulisty, elipsoidalny, wyglądu cytryny, butelkowaty, cylindryczny oraz nitkowaty.

Komórki drożdży mają wykształcone jądro, które jest mniejsze niż inne organelle komórkowe jak wakuole czy mitochondria. Może być ono położone centralnie lub peryferycznie. W komórce obecne są także substancje zapasowe jak wolutyna, glikogen i lipidy. Ze względu na wyraźne różnice w kształcie komórek drożdży, należących do różnych rodzajów, ich morfologia, w określonych warunkach hodowlanych, jest istotną cechą pomocną w identyfikacji. Drożdże najczęściej rozmnażają się bezpłciowo, przez pączkowanie. Rozmnażanie płciowe zachodzi np. w warunkach głodu. Gdy podziały następują szybko po sobie, komórki drożdży są mniejsze i lżejsze. W miarę zmniejszania się szybkości rozmnażania, komórki zwiększają swoje rozmiary oraz masę. Opadając, adsorbują na swej powierzchni cząstki koloidalne, tworząc osad na dnie naczynia. W hodowli płytkowej (rozpuszczona pożywka z dodatkiem agaru) komórki drożdży, po kilku dniach inkubacji, tworzą kolonie o różnym kształcie, zależnym od umiejscowienia w zastygłej pożywce. Komórki uwięzione na dnie pożywki tworzą duże, płaskie, okrągłe kolonie. Te na powierzchni są mniejszej średnicy okrągłe lub owalne. Wielka jest też różnorodność typów kolonii. Najczęściej są one gładkie S (ang. smooth), pomarszczone R (ang. rough) i śluzowate M (ang. mucous). Stwierdzono, że rodzaj powierzchni kolonii jest kontrolowaną genetycznie cechą drożdży i może być dziedziczony. Chociaż drożdże różnią się od grzybów strzępkowych kształtem i morfologią, to niektóre z nich mogą przejść z formy owalnej do strzępkowej, w zależności od warunków środowiskowych. Takie grzyby określa się mianem dimorficznych (o dwóch kształtach) np. grzyby z rodzaju *Candida*.

Grzyby strzępkowe, inna ich nazwa to **grzyby pleśniowe**, na podstawie cech fizjologicznych i morfologicznych zostały również zaliczone do królestwa *Fungi* (grzyby właściwe). Plecha grzybów strzępkowych jest utworzona z rozgałęzionych strzępek (*hyphae*), tworzących skupisko – grzybnię (*mycelium*). Strzępka - rurkowata komórka o średnicy 5 – 20 μm , wypełniona cytoplazmą z organellami jest podstawową jednostką komórkową pleśni. Komórki strzępki otacza ściana komórkowa zbudowana z

polisacharydów, głównie glukanu i chityny, białka oraz lipidów. Morfologia strzępek wszystkich grzybów jest podobna a różnice dotyczą ich budowy wewnętrznej. U grzybów wyższych są one podzielone przegrodami poprzecznymi (septami) na jedno-, dwu- lub wielojądrowe komórki. U grzybów niższych natomiast strzępki są niepodzielone i stanowią wielojądrową komórkę, zwaną komórczakiem.

Grzyby strzępkowe charakteryzuje tzw. wzrost szczytowy, polegający na wydłużaniu się strzępki tylko w strefie szczytowej. U większości grzybów każda część ma możliwość rozwoju. Grzyby rozmnażają się na wiele sposobów: bezpłciowo – poprzez tworzenie zarodników i fragmentację grzybni oraz płciowo (w 70%), poprzez kopulację gamet, gametangiów lub niezróżnicowanych strzępek. Rozmnażanie bezpłciowe grzybów polega na tworzeniu zarodników lub komórek o charakterze przetrwalnym bez konieczności zaistnienia procesu płciowego. Zarodniki powstają w zarodniach lub wypączkowują ze szczytów wyspecjalizowanych komórek. Mogą być wytwarzane pojedynczo lub w łańcuszkach. Pleśń dzieli się na trzy klasy: Sprzężniaki, Workowce i Grzyby niedoskonałe.

- Sprzężniaki, mają grzybnię jednokomórkową, wielojądrową niepodzielną lub rzadko podzieloną i rozmnażają się zarówno bezpłciowo jak też płciowo np. rodzaje: *Mucor* i *Rhizopus*.
- Workowce, tworzą grzybnię wielokomórkową, składającą się z rozgałęzionych strzępków rozrastających się w różnych kierunkach i tworzących kolonie o różnym zabarwieniu. Rozmnażają się bezpłciowo i płciowo np. *Aspergillus* (Kropidlak) i *Penicillium* (Pędzlak). *Aspergillus* występuje często w produktach spożywczych, tworząc nalot, który po pewnym czasie przybiera kolor czarny. *Penicillium* to rodzaj grzybów tworzący zwykle zielony nalot (pleśń) np. na owocach. Konidia służą do rozmnażania bezpłciowego.
- Grzyby niedoskonałe to duża grupa pleśni o wielokomórkowej grzybni. Rozmnażają się tylko bezpłciowo np. *Cladosporium* i *Fusarium*.

Surowce, zarówno roślinne jak i zwierzęce oraz gotowe produkty żywnościowe, są dobrym środowiskiem do rozwoju grzybów. Wiele jednak z nich przyspiesza psucie zarówno surowców jak wytworzonej z ich udziałem żywności. Część powodować może nawet groźne zatrucia pokarmowe (wydzielanie mykotoksyn).

Źródłem mikroflory surowców pochodzenia roślinnego jest powierzchnia owoców, warzyw i zbóż, ich uszkodzone tkanki, łuski lub pory w skórce. Mikroflora owoców i warzyw jest zróżnicowana pod względem liczebności i typu drobnoustrojów. Zależy od składu chemicznego surowców, warunków glebowych, stosowanych zabiegów agrotechnicznych, warunków pogodowych (przy deszczowej pogodzie wzrasta liczba pleśni), warunków transportu i przechowywania oraz stanu surowca po zbiorze (uszkodzenia powierzchni intensyfikują rozwój drobnoustrojów). Owoce, które zawierają więcej cukrów prostych i kwasów organicznych a mniej białek, sprzyjają rozwojowi pleśni i drożdży, natomiast warzywa zawierające więcej białek, mniej cukrów prostych, a więcej polisacharydów, są dogodnym środowiskiem pleśni. Psucie świeżych owoców powodowane jest najczęściej przez pleśnie *Rhizopus*, *Penicillium* i in., odpowiedzialne za tzw. kopcową (mokrą) zgniliznę – mięknięcie, będące efektem ich aktywności pektynolitycznej. Należy się też liczyć z możliwością nagromadzenia mykotoksyn, np. patuliny czy aflatoksyn, tworzonych przez gatunki pleśni *Penicillium* i *Aspergillus*.

Powierzchnia warzyw najczęściej atakowana jest przez pleśnie *Sclerotia* (czerwona zgnilizna selerów) i *Alternaria* (ciemnobrunatne i czarne plamy na ziemniakach oraz pomidorach).

Mikroflora pierwotna ziarna zbóż jest reprezentowana przez przedstawicieli wszystkich grup drobnoustrojów. Wśród grzybów strzępkowych występują najczęściej rodzaje: *Alternaria*, *Cladosporium*, *Fusarium*, a drożdże reprezentowane są przez gatunki *Geotrichum sp.* Podczas przechowywania ziarna zbóż, pierwotne układy ilościowe i jakościowe drobnoustrojów na jego powierzchni ulegają zmianie. Do wtórnej (przechowalniczej) mikroflory ziarna, spośród grzybów strzępkowych zalicza się *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor* i *Rhizopus*. Wymienione grzyby biorą także czynny udział w wywoływaniu stęchlizny zbóż w czasie przechowywania, powodując zmiany w barwie, połysku i zapachu oraz obniżają zdolność kiełkowania zbóż. Najgroźniejsze są jednak ze względu na wytwarzanie mykotoksyn, wtórnych metabolitów o działaniu kancerogennym. Konsekwencją silnego skażenia ziarna zbóż chlebowych zarodnikami pleśni jest szybkie pleśnienie pieczywa, z czym wiąże się zagrożenie zatrucia groźnymi mykotoksynami.

Drożdże i pleśnie nie stanowią za to naturalnej mikroflory surowców pochodzenia zwierzęcego a ich pojawienie się może być wynikiem przeniknięcia z zanieczyszczonego powietrza lub wody. Dominującą mikroflorę powietrza stanowią tu zarodniki grzybów: *Cladosporium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhizopus* i *Mucor*.

Powodem psucia się serów, masła, produktów mięsnych, soków owocowych, win i chleba jest pleśń *Monilia*, a gatunek *Botritis cinerea* odpowiada za psucie dojrzałych winogron.

Pleśń *Aspergillus glaucus*, występująca często w produktach żywnościowych powoduje ich psucie się, gdyż fermentuje cukry oraz rozkłada białka, podobnie jak *Aspergillus niger*, czarna pleśń, często pojawiająca się na psujących się owocach.

Gatunek *Penicillium glaucum* występując w produktach żywnościowych, rozkłada liczne cukry oraz tłuszcze.

Pleśń z rodzaju *Cladosporium* – gatunek *Cladosporium herbarum* jest sprawcą psucia się mięsa, przechowywanego w chłodni, a gatunek *Cladosporium butyryi* występujący w maśle, odpowiada za jego psucie.

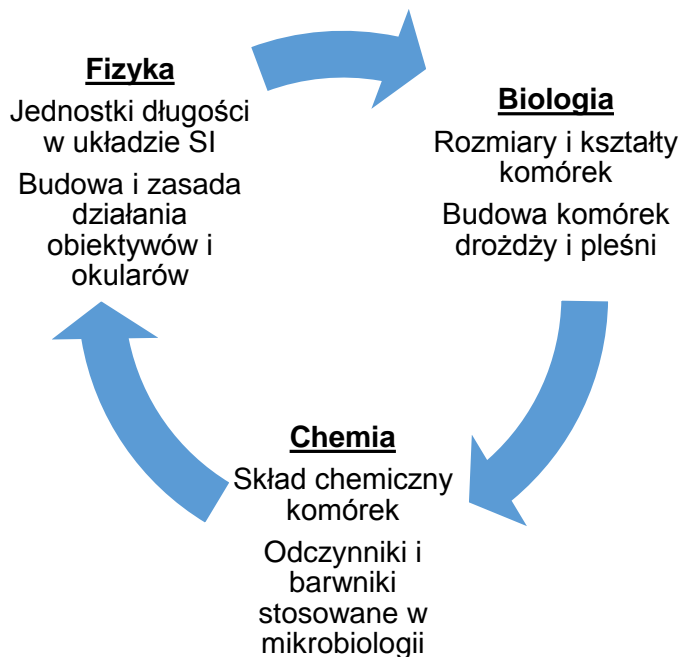
Znane są też niektóre gatunki pleśni z rodzaju *Fusarium*, które wywołują również zatrucia pokarmowe, np. po spożyciu chleba wypieczonego ze zboża porażonego tymi pleśniami.

W żywności są też obecne pożyteczne drobnoustroje. W pewnych sytuacjach stwarzane są warunki do ich rozwoju, aby dzięki ich metabolizmowi uzyskać szereg korzystnych zmian cech sensorycznych surowca, jego wyższą wartość odżywczą i dietetyczną oraz dłuższy okres przydatności do spożycia. Znaczenie gospodarcze mają tutaj głównie drożdże szlachetne. W przemyśle spożywczym najczęściej wykorzystywane są drożdże z rodzaju *Saccharomyces* (otrzymywanie ciasta pszennego, produkcja piwa, wina, spirytusu i kefiru). Drożdże *Saccharomyces cerevisiae* rosną w warunkach aerobowych, a produkują alkohol etylowy w warunkach beztlenowych. Genetycznie modyfikowane drożdże produkują białko, tym cenniejsze, że w przeciwieństwie np. do bakterii, w organizmach eukariotycznych następuje ich modyfikacja. Inne gatunki jak *Saccharomyces pombe* czy *Pichia pastoris* z kolei nie wytwarzają endotoksyn. Znaczenie przemysłowe mają także drożdże paszowe (np. *Candida utilis*) szybko rozmnażające się w warunkach tlenowych i wytwarzające duże ilości masy komórkowej, o znacznej zawartości białka. Pleśnie *Aspergillus niger* są stosowane do otrzymywania kwasu

cytrynowego. Liczne gatunki pleśni z rodzaju *Penicillium* wykorzystuje się w serowarstwie, w dojrzewaniu serów pleśniowych. W serach miękkich z porostem pleśni (brie, camembert) dojrzewanie przebiega przy udziale gatunków *Penicillium candidum* i *Penicillium camembert*, a w serach miękkich z przerostem pleśni (rokol) – z udziałem *Penicillium roqueforti*. Do pleśni pożądaných, ale tylko na początku dojrzewania serów z porostem pleśni, serów maziowych (ser limburski) i pomazankowych (bryndza) należy także pleśń *Geotrichum candidum*, tworząca na powierzchni biały, puszysty nalot. Pleśnie biorą też udział w procesach rozkładu białka i tłuszczu w serach. Są to procesy korzystne, a powstałe związki często decydują o charakterystycznym smaku i zapachu danego sera.

Mikroorganizmy są jak egzotyczne rośliny. Rośnie ich mnóstwo w naturalnych warunkach, ale wiele z nich marnieje po przeniesieniu do laboratorium. Obserwację pod mikroskopem komórek grzybów, wyhodowanych poza ich naturalnym środowiskiem, umożliwiają preparaty mikroskopowe, które będziemy sporządzać na szkiełkach przedmiotowych, pobierając materiał z gotowych hodowli, wyrosłych w płytkach Petriego. Żywe drobnoustroje będą obserwowane w sporządzanych preparatach przyżyciowych, w kropli spłaszczonej. Preparaty te będziemy wykorzystywać do obserwacji komórek drożdży, określenia ich żywotności i wielkości oraz do obserwacji morfologii pleśni *Rhizopus nigricans*, posiadającej niepodzieloną grzybnię. Zastosowanie komory Thoma umożliwi nam liczenie komórek drożdży w przygotowywanych preparatach.

Integracja treści przedmiotowych:



Wykorzystanie matematyki i technologii informacyjnej:

- gromadzenie oraz 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,
- materiał biologiczny (drożdże *Saccharomyces cerevisiae*, pleśń *Rhizopus nigricans*),
- barwniki do barwienia preparatów przyżyciowych drożdży,
- 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 stałego w płytkach Petriego),
- praca z materiałem biologicznym i barwnikami (posiew grzybów na podłoże stałe, przygotowanie prostych i barwionych przyżyciowych preparatów mikroskopowych),
- określanie wielkości komórek drożdży (mikrometry obiektywowe i okularowe),
- dyskusja i porównanie wyników,
- praca z komputerem (obliczenia z wykorzystaniem gotowych formuł matematycznych oraz przygotowanie prezentacji w programie PowerPoint).

Etapy projektu:

etap	działania	czas
Organizacja	<ul style="list-style-type: none"> - ustalenie stanowisk pracy, - poznanie podstawowych urządzeń oraz narzędzi niezbędnych podczas realizacji zadań, - omówienie zasad bezpieczeństwa i higieny pracy z barwnikami stosowanymi w laboratorium mikrobiologicznym, - poznanie podstawowych zasad sporządzania preparatów mikroskopowych drożdży i pleśni, - poznanie zasad posługiwania się hemocytometrem (komora Thoma), - poznanie zasad pomiaru wielkości komórek z wykorzystaniem mikrometrów. 	30 minut

Planowanie	- przedstawienie zadań do realizacji podczas zajęć - ustalenie kolejności i czasu wykonywania poszczególnych zadań	20 minut
Realizacja	1. Posiew drożdży <i>Saccharomyces cerevisiae</i> i pleśni <i>Rhizopus nigricans</i> na podłoże stałe (płytki Petriego) w komorze laminarnej, 2. Oglądanie i opisywanie wzrostu kolonii drożdży <i>Saccharomyces cerevisiae</i> oraz <i>Rhizopus nigricans</i> wyrosłych w płytkach Petriego. 3. Sporządzanie i obserwacja mikroskopowa pleśni <i>Rhizopus nigricans</i> w kropli spłaszczonej z dodatkiem barwnika (fuksyna). 4. Sporządzanie barwionego błękitem metylenowym preparatu przyżyciowego drożdży <i>Saccharomyces cerevisiae</i> w kropli spłaszczonej i badanie żywotności komórek drożdży. 5. Obliczanie ilości komórek drożdży <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , przy użyciu komory Thoma (hemocytometru). 6. Pomiar wielkości komórek drożdży w mikroskopie. 7. Obserwacja preparatów przy użyciu kamery mikroskopowej i rejestracja obrazów w komputerze oraz na przenośnym dysku 8. Przygotowanie prezentacji w programie PowerPoint z wykonanych w ramach zajęć badań i obserwacji oraz z wyciągniętych wniosków.	20 minut 15 minut 15 minut 25 minut 30 minut 30 minut 10 minut 90 minut
Prezentacja	- karty pracy, - prezentacja wykonana w programie PowerPoint.	-
Ocena	- samoocena (uczeń), - ocena opisowa (nauczyciel).	-

Szczegółowy opis zadań na etapie realizacji projektu:

Zadanie 1.

Posiew drożdży *Saccharomyces cerevisiae* i pleśni *Rhizopus nigricans* na podłoża stałe (płytki Petriego) w komorze laminarnej

Opis zadania (co robimy, dlaczego)

Drobnoustroje czerpią niezbędne składniki pokarmowe dla swojego wzrostu i rozwoju z podłoża, wprowadzonego w sposób jałowy do sterylnej szklanej laboratoryjnej (płytek Petriego). Tylko wtedy, gdy zapewnione są też jałowe warunki podczas posiewu można oczekiwać, że pożądane mikroorganizmy wyrosną na danym podłożu. Takie sterylne (jałowe) warunki zapewniają komory laminarne, w których uczniowie będą dokonywali posiewów drożdży *Saccharomyces cerevisiae* i pleśni *Rhizopus nigricans* z gotowych hodowli w płytkach Petriego na przygotowane na stanowisku pracy dla każdego ucznia

gotowe, zestalone podłoże w jałowych płytkach Petriego.

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

Podstawowe trudności, na które uczeń może natknąć się podczas realizacji zadania to przede wszystkim przerwanie powierzchni żelu agarowego (zbyt mocny nacisk ezy na podłoże) oraz zakażenie wtórne podłoża drobnoustrojami z powietrza, w przypadku, gdy uczeń wykonuje posiew zbyt blisko brzegu komory laminarnej.

Te trudności wynikają z braku wprawy i doświadczenia w posługiwaniu się sprzętem laboratoryjnym oraz znajomości przez uczniów podstawowych technik stosowanych podczas posiewu różnych grzybów (za pomocą ezy, pincety i igły).

Najlepszym rozwiązaniem, które będzie skutkowało wyeliminowaniem wymienionych trudności jest przygotowanie się uczniów do zajęć, dokładne postępowanie zgodne z instrukcjami opisującymi realizację zadania, a także skupienie podczas zajęć i współpraca z prowadzącym. Uczeń powinien starać się wykonywać polecenia nauczyciela i nie wahać się prosić o pomoc, gdy ma jakiegokolwiek wątpliwości.

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

Uczniowie pracują w parach i dokonują posiewu na podłoże stałe w płytkach Petriego, w komorze laminarnej. Wszystkie czynności podczas posiewu wykonują 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 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:

❖ **w przypadku drożdży:**

- posiewu należy dokonać w komorze laminarnej, przy włączonym palniku,
- eżę, należy każdorazowo wyzarzyć w płomieniu palnika, zarówno przed, jak i po wykonaniu posiewu,
- po wyzarzeniu ezy poczekać chwilę przed pobraniem materiału biologicznego, ponieważ zbyt gorąca eza może zniszczyć mikroorganizmy,
- oczkiem ezy pobrać z płytki wzorcowej niewielką ilość drożdży delikatnie dotykając 2-3 razy powierzchni wyrosłych kolonii, widocznych gołym okiem,
- nanosić materiał biologiczny na powierzchnię zestalonego podłoża delikatnie, wykonując linię za pomocą ezy (kształtu zygzakowatego, falistego, szachownicy itp.), uważając żeby nie uszkodzić podłoża, nie wbijać oczka ezy w głąb podłoża,
- przed włożeniem płytki do ciepłarki należy pisakiem, na wierzchniej jej części, wpisać datę, S.c. i inicjały (imię, nazwisko) osoby dokonującej posiewu,
- płytki po posiewie inkubować w ciepłarce, w temperaturze 30°C.

❖ **w przypadku pleśni:**

- pracę należy wykonywać w komorze laminarnej przy włączonym palniku gazowym,
- szczypce i igłę, którymi będzie przenoszona pleśń, należy każdorazowo przesunąć w

plamieniu palnika, zarówno przed, jak i po wykonaniu posiewu,

- wprowadzając materiał biologiczny na podłoże hodowlane do płytki należy uchylać wieczko płytki w jak najmniejszym stopniu, aby uniknąć zakażeń z otoczenia,
- materiał biologiczny (strzępki pleśni) pobrać z gotowej hodowli pleśni *Rhizopus nigricans*, znajdującej się we wzorcowej płytce Petriego, wyjąłową pincetą, ucinając je (strzępki) nad podłożem i przy pomocy igły „odkładać” materiał z pincety w kilku miejscach (4-6) na powierzchnię podłoża w przygotowanej swojej płytce, czyniąc to delikatnie, by go nie uszkodzić,
- przed włożeniem płytki do cieplarki należy pisakiem, na wierzchniej jej części, podać datę, *R.n.* i inicjały (imię i nazwisko) osoby dokonującej posiewu.
- płytki po posiewie inkubować w cieplarce, w temperaturze 30°C.

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

W efekcie pracy ucznia, w ramach wykonywania zadania 1, oczekuje się opanowania przez niego techniki wykonywania posiewu drożdży i pleśni na podłoża stałe (płytki Petriego) w komorze laminarnej. Oczekiwany efekt pracy ucznia będzie również wyhodowanie w płytkach Petriego grzybów, które będą podstawą do sporządzania preparatów przyżyciowych i barwionych oraz będą wykorzystywane do charakterystyki kolonii wyrosłych drobnoustrojów.

Oczekiwania wobec nauczyciela opiekuna

Rolą nauczyciela podczas realizacji tego zadania jest nadzorowanie wykonywanych przez ucznia czynności, wspieranie go, motywowanie pytaniami i sugestiami, zachęcanie do cierpliwej oraz 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, kreatywnością, jednocześnie jednak nie powinien się bać czy wstydzić zadawać pytania. Oczekuje się też od nauczyciela współpracy w przydzielaniu gotowych (już po inkubacji) płytek Petriego z wyrosłymi koloniami grzybów.

Rolą nauczyciela jest również zapewnienie optymalnego wykorzystania komór laminarnych tak, aby uczniowie mogli sprawnie wykonywać posiewy drożdży i pleśni. Sprawdzają też poprawność oznakowania płytek Petriego oraz umieszczenia ich we właściwych inkubatorach.

Zadanie 2.

Oglądanie i opisywanie wzrostu kolonii drożdży *Saccharomyces cerevisiae* oraz pleśni *Rhizopus nigricans* wyrosłych w płytkach Petriego

Opis zadania (co robimy, dlaczego)

Drobnoustroje rosnące na podłożach stałych tworzą charakterystyczne skupienia dużych ilości komórek, zwane koloniami, które są widoczne gołym okiem. Podłoża stałe nie umożliwiają drobnoustrojom swobodnego przemieszczania się (jak w pożywkach płynnych), dlatego powstające w wyniku kolejnych podziałów olbrzymie ilości komórek zajmują ograniczoną przestrzeń. W hodowli na podłożu stałym, w zależności od umiejscowienia komórek w koloniach, warunki wzrostu są różne. W strefie obwodowej kolonii istnieje najlepszy dostęp do pożywki i tlenu. Tutaj też jest najmniejsze stężenie substancji toksycznych. Inaczej jest w strefie środkowej i górnej, gdzie dostęp do

składników pokarmowych jest utrudniony. Wewnątrz kolonii występuje także największe stężenie produktów przemiany materii i mniejszy dostęp tlenu. Jak z tego wynika zróżnicowane warunki wzrostu wpływają decydująco na charakterystyczny, dla różnych gatunków, kształt i wygląd kolonii. Jedne tworzą tzw. płaskie, „rozlane” kolonie, inne mają kształt dwuwypukłej soczewki. Cechy kolonii (wielkość, kształt, zarys linii brzegowej, barwa i inne) są wykorzystywane do identyfikacji gatunków, jako pomocnicze cechy diagnostyczne.

Uczniowie, na podstawie obserwacji makroskopowych (gołym okiem) określą cechy morfologiczne posiewanych grzybów - drożdży *Saccharomyces cerevisiae* i pleśni *Rhizopus nigricans* oraz określą łączące je cechy wspólne oraz cechy różnicujące.

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

Trudności podczas realizacji tego zadania mogą wynikać przede wszystkim z niedostatecznego opanowania przez ucznia podstaw teoretycznych, dotyczących znajomości cech morfologicznych kolonii drobnoustrojów i stosowanych określeń.

Najlepszym rozwiązaniem jest przygotowanie się ucznia do zajęć a także skupienie się ucznia podczas ich trwania 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, ...)

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 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 określenie wszystkich możliwych do określenia cech morfologicznych kolonii drożdży i pleśni wyrosłych w płytkach Petriego oraz stosowanie w tym celu prawidłowych określeń, które zostały zawarte w Instrukcji nr 2. Zadanie należy wykonać dokładnie, wnikliwie analizując wyrosłe kolonie drobnoustrojów.

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

Wymiernym efektem pracy ucznia podczas realizacji tego zadania będzie wypełnienie **Karty pracy do zadania 2**

Oczekiwania wobec nauczyciela/opiekuna

Rolą nauczyciela w tym zadaniu jest rozdanie uczniom płytek Petriego z wyrosłymi koloniami grzybów (drożdży i pleśni) oraz rozdanie i nadzorowanie wypełniania przez uczniów Karty pracy do zadania 2.

Nauczyciel powinien służyć uczniowi radą a także i pomocą. Powinien dawać wskazówki i zachęcać do działania, jednak uczeń powinien pracować samodzielnie.

Zadanie 3.

Sporządzanie i obserwacja mikroskopowa pleśni *Rhizopus nigricans* w kropli spłaszczonej z dodatkiem barwnika (fuksyna)

Opis zadania (co robimy, dlaczego)

Obserwacje cech morfologicznych i rozwojowych drobnoustrojów prowadzi się, stosując mikroskopowe preparaty przyżyciowe. Preparatem mikroskopowym jest szkiełko przedmiotowe wraz z umieszczonym na nim materiałem biologicznym. Preparat przyżyciowy to żywe komórki zawieszane w płynie fizjologicznym lub kropli wody. W ramach tego zadania uczniowie przygotowują samodzielnie preparaty barwione pleśni *Rhizopus nigricans* w kropli spłaszczonej, a następnie oglądają preparaty w mikroskopie, stosując obiektywy o różnym stopniu powiększenia. Dzięki temu zadaniu uczniowie będą też mogli utrwalić sobie zasady prawidłowego wykonywania preparatu przyżyciowego w kropli spłaszczonej zwłaszcza, gdy wyjąłowioną za każdym razem pincetą i igłą pobierają strzępki pleśni z hodowli z płytek Petriego.

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

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

- odtłuścić szkiełko przedmiotowe, wykorzystując kawałek suchego mydła,
- włączyć palnik gazowy przy stole laboratoryjnym,
- pobierać pincetą mały fragment strzępków grzybni a jej skupiska rozprowadzić delikatnie igłą w kropli wody z fuksyną,
- brzeg szkiełka przykrywkowego należy oprzeć w pobliżu kropli a następnie opuścić ukośnie na szkiełko przedmiotowe, aby do wnętrza kropli nie dostały się pęcherzyki powietrza,
- zalecana jest cierpliwość w czasie sporządzania preparatu jak też opanowanie ze strony ucznia podczas pracy z mikroskopem i szukaniem obrazu pleśni.

Najlepszym rozwiązaniem niezmiennie pozostaje tutaj właściwe przygotowanie się ucznia do zajęć, 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, ...)

Każdy uczeń pracuje indywidualnie, 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, ...)

Szczególnie podczas wykonywania tego zadania należy zwrócić uwagę na prawidłowe wykonanie preparatu, które zostało opisane w Instrukcji nr 3. Fragment grzybni do badań najlepiej jest pobierać z płytki Petriego przy pomocy pincety. Należy być czujnym, aby pobrać reprezentatywny fragment grzybni, a więc taki, w którym będzie obecna cała grzybnia, ze strzępkami, sporangioforami i sporangiosporami (zarodnikami). Należy też

uważać, żeby nie pobrać zbyt dużo materiału biologicznego, ponieważ na szkiełku przedmiotowym, pod szkiełkiem przykrywkowym, stworzy on zbitą, ciemną masę, która w mikroskopie będzie widoczna jak duża, czarna plama, bez możliwości zaobserwowania elementów budowy grzybni.

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

W trakcie wykonywania zadania uczeń opanowuje zasady prawidłowego wykonywania jednego z podstawowych preparatów wykonywanych w laboratorium mikrobiologicznym, jakim jest preparat przyżyciowy w kropli spłaszczonej. Doskonali przy tym technikę mikroskopowania oraz wypełnia **karte pracy do zadania 3**.

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 oraz zachęcać go do działania, jednak uczeń powinien pracować samodzielnie. Nauczyciel nadzoruje wypełnianie przez uczniów Karty pracy do zadania 3. Rolą nauczyciela jest również rozdanie uczniom, w razie potrzeby, szkiełek przedmiotowych i przykrywkowych a także zabezpieczanie zużytych preparatów mikroskopowych oraz sprzętu po wykonaniu zadania.

Zadanie 4.

Sporządzanie barwionego błękitem metylenowym preparatu przyżyciowego drożdży *Saccharomyces cerevisiae* w kropli spłaszczonej i badanie żywotności komórek drożdży

Opis zadania (co robimy, dlaczego)

Przyżyciowe preparaty barwione drożdży sporządza się przede wszystkim do badania ich żywotności i wykrywania substancji zapasowych w komórkach. Jako materiał badawczy posłużą hodowle drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. Sporządzany będzie, barwiony błękitem metylenowym, preparat drożdży. Barwienie jest to proces fizykochemiczny polegający na wnikięciu 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. W ramach zadania uczniowie przygotowują preparat przyżyciowy drożdży w kropli spłaszczonej z dodatkiem błękitu metylenowego. Będą oglądać preparat w mikroskopie pod odpowiednim powiększeniem obiektywu (40x). Martwe komórki barwią się na niebiesko, natomiast żywe pozostają niezabarwione. Uczniowie obliczą procent komórek żywych w badanej populacji.

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

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

- niedostatecznego opanowania przez ucznia podstaw teoretycznych dotyczących znajomości budowy komórki drożdży i zasady działania mikroskopu,
- braku podstaw teoretycznych dotyczących sposobu przygotowania preparatu przyżyciowego,
- braku cierpliwości i skupienia ze strony ucznia w czasie przygotowania preparatu a

także opanowania podczas pracy z mikroskopem,

- z wydłużania czasu oglądania preparatu, który należy oglądać natychmiast po wykonaniu, ponieważ wraz z upływem czasu barwnik przenika również do żywych komórek, barwiąc je na niebieski kolor.

Należy też pamiętać, że preparat przyżyciowy drożdży mikroskopuje się przy powiększeniu obiektywu 40x (obiektyw suchy). Właściwe przygotowanie się ucznia do zajęć, a także skupienie podczas ich trwania i współpraca z prowadzącym znacznie ułatwią właściwą realizację zadania. 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 też wykonuje preparat i barwienie, 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 prawidłowe wykonanie preparatu, które zostało opisane w Instrukcji nr 4. Materiał biologiczny należy przenieść na szkiełko przedmiotowe przy pomocy pipety, dodać barwnika i przykryć szkiełkiem przykrywkowym.

Należy też pamiętać, aby preparat w mikroskopie był właściwie doświetlony i wyraźny.

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

Wymiernym efektem pracy ucznia w efekcie realizacji zadania 4 będą zdjęcia preparatów mikroskopowych, które uczeń wykona samodzielnie. Zdjęcia te uczeń będzie mógł zapisać na dysku przenośnym, a następnie zamieścić w prezentacji komputerowej wykonanej w programie PowerPoint w ramach kolejnego zadania. Uczeń też wypełnia **Kartę pracy do zadania 4**, zwracając uwagę na różnice w zabarwieniu komórek żywych i martwych drożdży.

Oczekiwania wobec nauczyciela opiekuna

Rolą nauczyciela podczas realizacji tego zadania jest instruowanie ucznia i nadzorowanie jego pracy i unikania wykonywania pracy za niego. Uczeń powinien mieć szansę wykazania się samodzielnością. Nauczyciel powinien służyć uczniowi radą i pomocą, powinien dawać wskazówki pomagające w wykonaniu zadania oraz powinien nadzorować pracę ucznia. Rolą nauczyciela jest również rozdanie uczniom dodatkowych, w razie potrzeby, szkiełek przedmiotowych i przykrywkowych, wykorzystywanych do sporządzania preparatów mikroskopowych z dodatkiem barwnika, a także zabezpieczanie zużytych preparatów oraz sprzętu po wykonaniu zadania.

Zadanie 5.

Obliczanie ilości komórek drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, przy użyciu komory Thoma (hemocytometru)

Opis zadania (co robimy, dlaczego)

Jest wiele metod liczenia komórek drobnoustrojów. Do stosunkowo szybkich należą metody bezpośredniego liczenia drobnoustrojów pod mikroskopem. W tej grupie wyróżnia się mikroskopię fluorescencyjną (DEFT), umożliwiającą oznaczenie komórek martwych i żywych oraz grupę metod wykorzystujących komory do liczenia drobnoustrojów. Komory pod mikroskopem to najczęściej szklane płytki z wyciętym wgłębieniem, podzielonym na kwadraty lub prostokąty o znanej powierzchni. Po naniesieniu rozcieńczenia do komory dokonuje się liczenia komórek widocznych w obrazie mikroskopowym, a następnie przelicza się ich liczbę na 1 cm³ badanego materiału. W laboratorium wykorzystana będzie komora Thoma, ale znane są też komory: Howarda, Börkera, Fuch Rosenthala.

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 techniki mikroskopowania, zwłaszcza, gdy zachodzi potrzeba odszukania siatki komory Thoma, wygrawerowanej na specjalnym szkiełku przedmiotowym,
- braku staranności i dokładności podczas sporządzania preparatu,
- 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 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 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 5 należy zwrócić na prawidłowe wykonanie preparatu, które zostało opisane w Instrukcji nr 5. Materiał biologiczny należy odpowiednio rozcieńczyć płynem fizjologicznym, przenieść na szkiełko przedmiotowe z naniesioną siatką (komorą Thoma) i przykryć szkiełkiem przykrywkowym. Liczy się ilość komórek obecnych w małych kwadratach, dodaje połowę z tych znajdujących się na liniach i przelicza się wynik na liczbę komórek w 1cm³.

Szczególną uwagę podczas wykonywania tego zadania należy zwrócić na to, żeby preparat w mikroskopie był właściwie doświetlony i wyraźny, co ułatwi liczenie komórek drobnoustrojów w 5 dużych i 80 małych kwadracikach komory Thoma.

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

Spodziewanym efektem pracy ucznia podczas realizacji zadania 5 będzie doskonalenie techniki mikroskopowania oraz wypełnienie **Karty pracy do zadania 5**.

Oczekiwania wobec nauczyciela opiekuna

Rolą nauczyciela podczas realizacji tego zadania jest instruowanie ucznia i nadzorowanie jego pracy przy mikroskopie. Nauczyciel powinien nadzorować pracę ucznia, jednak powinien unikać wykonywania pracy za niego. Nauczyciel powinien służyć uczniowi radą i pomocą, powinien dawać wskazówki, ułatwiające wykonanie zadania oraz powinien nadzorować pracę ucznia. Rolą nauczyciela jest również zabezpieczenie zużytych preparatów mikroskopowych oraz sprzętu po wykonaniu zadania.

Zadanie 6.

Pomiar wielkości komórek drożdży pod mikroskopem

Opis zadania (co robimy, dlaczego)

Do pomiaru obiektów pod mikroskopem służą mikrometry: obiektywowy i okularowy. Mikrometr obiektywowy przypomina kształtem szkiełko przedmiotowe. W jego środkowej części, wewnątrz zaznaczonego kółka, znajduje się wygrawerowana skala o długości 1 mm i podzielona na 100 równych odcinków. Długość jednego odcinka wynosi 0,01 mm, czyli 10 μm . Mikrometr okularowy natomiast jest okrągłym szkiełkiem z umieszczoną na nim skalą podzieloną na 50 lub 100 równych odcinków.

Do pomiaru komórek drobnoustrojów służy mikrometr okularowy, którego skalę należy uprzednio wykalibrować za pomocą mikrometru obiektywowego, ustalając w μm wartość jednej działki okularowej.

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:

- niewystarczającej wiedzy na temat przydatności mikrometrów: okularowego i obiektywowego, do pomiaru wielkości komórek drobnoustrojów pod mikroskopem oraz ich konstrukcji,
- niedostatecznego opanowania przez ucznia podstaw teoretycznych dotyczących skalowania mikrometru okularowego,
- braku staranności i dokładności podczas sporządzania preparatu przyżyciowego,
- braku cierpliwości, skupienia i opanowania ze strony ucznia podczas pracy z mikroskopem i jego obsługi.

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, ...)

Przy jednym mikroskopie pracuje jeden uczeń i 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 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, ...)

Szczególne uwagi podczas wykonywania zadania 6 należy zwrócić na dokładne wyskalowanie mikrometru okularowego. Trzeba pamiętać, że pomiary wielkości

komórek drobnoustrojów, w tym drożdży, należy dokonywać przy tym samym powiększeniu obiektów, przy którym skalowano mikrometr okularowy (pow. 40x).

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

Efektami pracy ucznia wykonanej w ramach tego zadania będą obliczenia średnich wymiarów (długości i szerokości) 10 dowolnie wybranych komórek drożdży, wykonane w komputerze przy pomocy arkusza kalkulacyjnego Excel. Wymiernym też efektem pracy będą zdjęcia otrzymanego obrazu mikroskopowego, wykonane przez ucznia oraz wypełniona **Karta pracy do zadania 6**

Oczekiwania wobec nauczyciela opiekuna

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

Rolą nauczyciela jest również przydzielenie uczniom mikrometrów: obiektowego i okularowego oraz materiału biologicznego, niezbędnego do sporządzenia preparatów mikroskopowych, a także zabezpieczenie zużytych preparatów mikroskopowych oraz sprzętu po wykonaniu zadania. Od nauczyciela oczekiwana jest też pomoc podczas robienia zdjęć przez ucznia z wykorzystaniem kamery.

Zadanie 7.

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 z hodowli na podłożu stałym (płytki Petriego) oraz 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, które mogłyby zależeć od ucznia czy też nauczyciela, w trakcie wykonywania tego zadania.

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 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 preparaty w mikroskopie były właściwie doświetlone i wyraźne tak, aby w efekcie użycia kamery uzyskać zdjęcia o wysokiej jakości, pozwalające na obserwację jak największej ilości szczegółów.

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

Wymiernym efektem pracy ucznia w efekcie realizacji zadania 7 będą zdjęcia barwionych preparatów pleśni (*Rhizopus nigricans*) i drożdży (*Saccharomyces cerevisiae*) oraz gotowe zdjęcia różnych grzybów 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. 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 8.

Przygotowanie prezentacji w programie PowerPoint z wykonanych w ramach zajęć, badań, prowadzonych obserwacji oraz wyciągniętych wniosków

Opis zadania (co robimy, dlaczego)

Zadaniem wykonywanym w laboratorium komputerowym, będącym podsumowaniem prowadzonej pracy w laboratorium mikrobiologicznym, jest sporządzenie krótkiej prezentacji w programie PowerPoint, w której uczniowie zamieszczają najistotniejsze informacje związane z tematyką realizowanego projektu. Dołączają do tych opracowań także samodzielnie przez uczniów wykonane w laboratorium mikrobiologicznym zdjęcia obrazów mikroskopowych oraz zamieszczają wnioski wpływające ze zgromadzonego materiału faktograficznego podczas 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 mogą wynikać 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 i dlatego każdy uczeń pracuje indywidualnie, w oparciu o instruktaż, nadzór oraz 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. On sam powinien szukać rozwiązań i pomysłów na zaprezentowanie zgromadzonego materiału oraz 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 w ramach tego zadania będzie opracowanie wykonane w programie PowerPoint zawierające obserwacje, wyniki badań, zdjęcia oraz wnioski wynikające z realizowanych zadań w ramach zajęć 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 posiewu drożdży *Saccharomyces cerevisiae* i pleśni *Rhizopus nigricans* na podłoże stałe w płytkach Petriego, w komorze laminarnej:

❖ w przypadku drożdży:

- opisz pisakiem płytkę Petriego z zestalonym, gotowym podłożem, podając na jej wierzchu: datę posiewu, inicjały wykonującego posiew (imię, nazwisko), nazwę grzyba - S.c.,
- tak opisaną płytkę umieść w komorze laminarnej,
- eżę wyżarz trzymając ją pionowo przez kilka, kilkanaście sekund w płomieniu palnika,
- po wyżarzeniu eży zaczekać chwilę przed pobraniem materiału biologicznego, ponieważ zbyt gorąca eża może zniszczyć mikroorganizmy,
- uchył wierzchnią płytkę z gotową (wyrosłą) hodowlą drożdży, znajdującą się w komorze laminarnej i dotknij eżą delikatnie 2-3 razy powierzchni podłoża z widocznymi gołym okiem koloniami drożdży,
- otwórz następnie swoją opisaną płytkę i nanieś materiał biologiczny na powierzchnię zestalonego podłoża delikatnie, wykonując linię za pomocą eży (kształtu

zygzakowatego, falistego, szachownicy itp.), uważając żeby nie uszkodzić podłoża i nie wbijać oczka eży w głąb podłoża

- zamknij swoją płytkę oraz płytkę wzorcową z wyrosłą hodowlą drożdży,
- wyżarz eżę i odłóż ją do zlewki w komorze laminarnej,
- płytkę z wykonanym posiewem wyjmij z komory laminarnej i wstaw do ciepłarki, celem inkubacji w temperaturze 30°C.

❖ **w przypadku pleśni:**

- opisz pisakiem płytkę Petriego z zestalonym, gotowym podłożem, podając na jej wierzchu: datę posiewu, inicjały wykonującego posiew (imię, nazwisko), nazwę grzyba - R.n.,
- uchyl wierzchnią płytkę z gotową (wyrosłą) hodowlą pleśni, znajdującą się w komorze laminarnej i oprzyj na płytce spodniej, odkrywając ją częściowo, aby uniknąć zakażeń z otoczenia,
- szczypcę i igłę, którymi będzie przenoszona pleśń, należy każdorazowo przesunąć w płomieniu palnika, zarówno przed, jak i po wykonaniu posiewu,
- pobierz (strzępki pleśni *Rhizopus nigricans*) z gotowej hodowli, znajdującej się we wzorcowej płytce Petriego, wyjąłowioną pincetą, ucinając je (strzępki) nad podłożem i przy pomocy igły „odkładaj” materiał z pincety w kilku miejscach (4-6) na powierzchnię podłoża w swojej opisanej płytce, czyniąc to delikatnie, by go nie uszkodzić,
- wyżarz pincetę i igłę oraz odłóż je do zlewki w komorze laminarnej,
- płytkę z wykonanym posiewem wyjmij z komory laminarnej i wstaw do ciepłarki, celem inkubacji w temperaturze 30°C.

Instrukcja nr 2

Instrukcja oglądania i opisywania wzrostu kolonii drożdży *Saccharomyces cerevisiae* oraz pleśni *Rhizopus nigricans* wyrosłych w płytkach Petriego

- przygotuj płytki Petriego z wyrosłymi koloniami drożdży *Saccharomyces cerevisiae* oraz pleśni *Rhizopus nigricans*,
- przyjrzyj się koloniom, które wyrosły na powierzchni podłoży i scharakteryzuj je, osobno drożdże i pleśnie, 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 itp.
- ✓ Wzniosłość kolonii ponad powierzchnię podłoża:



- ✓ Kolor kolonii: barwa samej kolonii np. biała, kremowa, beżowa, żółta; zabarwienie podłoża wokół kolonii, strefa przejaśnienia wokół kolonii itp.,
- ✓ Przezroczystość kolonii: przezroczysta, mętna, opalizująca, nieprzezroczysta,
- ✓ Konsystencję kolonii, którą sprawdza się za pomocą ezy i określa jako: suchą, lepłą, śluzowatą, mazistą,
- ✓ Zapach kolonii – mydlany, kwaśny, piwa, miodu, kasztanów, gnilny itp.,
- ✓ Wygląd i zabarwienie grzybni, zmiany barwy w czasie zarodnikowania, zmiany barwy od spodu grzybni,
- ✓ Obecność stref koncentrycznych,
- ✓ Rodzaj powierzchni kolonii np. welniasta, włóknista, puszysta, zbita, skórzasta itp.

Wypełnij Kartę pracy do zadania 2.

Instrukcja nr 3

Instrukcja sporządzania preparatu i obserwacji mikroskopowej pleśni *Rhizopus nigricans* w kropli spłaszczonej z dodatkiem barwnika (fuksyna)

- odtłuścić szkiełko przedmiotowe kilkakrotnie pocierając mydełkiem po jego powierzchni,
- wytrzeć szmatką szkiełko do sucha,
- włącz palnik gazowy,
- na odtłuszczone szkiełko przedmiotowe nanieś pipetą kroplę wody destylowanej,
- do kropli wody destylowanej dodaj kroplę barwnika – fuksyny,
- opal w płomieniu palnika igłę i pincetę,
- pobierz delikatnie nabierając pincetą, znad podłoża, strzępki pleśni z hodowli w płytce Petriego,
- mały fragment strzępków grzybni, przy pomocy igły, umieść w kropli na szkiełku,
- kroplę z materiałem biologicznym przykryj następnie szkiełkiem przykrywkowym; brzeg szkiełka przykrywkowego należy oprzeć w pobliżu kropli, a następnie opuścić ukośnie na szkiełko przedmiotowe, aby do wnętrza kropli nie dostały się pęcherzyki powietrza,
- ponownie opal w płomieniu palnika igłę i pincetę oraz odłóż je do koszyczka,
- obserwuj strzępki pleśni w mikroskopie pod powiększeniem 5- i 40- krotnym,

Narysuj i opisz obrazy mikroskopowe w Karcie pracy do zadania 3.

Instrukcja nr 4

Instrukcja sporządzania barwionego błękitem metylenowym preparatu przyżyciowego drożdży *Saccharomyces cerevisiae* w kropli spłaszczonej i badanie żywotności komórek drożdży

- odtłuścić szkiełko przedmiotowe poprzez kilkakrotne potarcie mydełkiem jego powierzchni,
- wytrzyj szmatką szkiełko do sucha,
- na odtłuszczone szkiełko przedmiotowe nanieś pipetą kroplę zawiesiny drożdży *Saccharomyces cerevisiae* (zawartość kolbki z zawiesiną dobrze wymieszać przed pobraniem materiału),
- na kroplę badanej hodowli nanieś kroplę barwnika – błękitu metylenowego,
- kroplę z materiałem biologicznym i barwnikiem przykryć szkiełkiem przykrywkowym (brzeg szkiełka przykrywkowego należy oprzeć w pobliżu kropli, a następnie opuścić ukośnie na szkiełko przedmiotowe, aby do wnętrza kropli nie dostały się pęcherzyki powietrza),
- ewentualny nadmiar płynu wypływającego spod szkiełka przykrywkowego usuń kawałkiem papierowego ręcznika,
- oglądać preparat w mikroskopie, pod obiektywem powiększającym 40x,
- komórki martwe barwią się na niebiesko, natomiast żywe pozostają niezabarwione,
- oglądaj preparat natychmiast po wykonaniu, ponieważ wraz z upływem czasu barwnik przenika również do żywych komórek,
- w 10 różnych polach widzenia (pole widzenia w mikroskopie zmieniać, przesuując preparat na stoliku), policzyć ilość komórek żywych oraz martwych,
- obliczyć żywotność drożdży w preparacie, jako iloraz żywych i wszystkich komórek,
- wyniki obserwacji i obliczeń umieścić w tabeli.

Pole widzenia	Liczba komórek ogółem (a)	Liczba komórek martwych (b)
1		
2		
3		
4		
5		
6		
7		
8		
9		
10		
Razem		

Żywotność komórek drożdży (x), wyrażona w %:

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

gdzie:

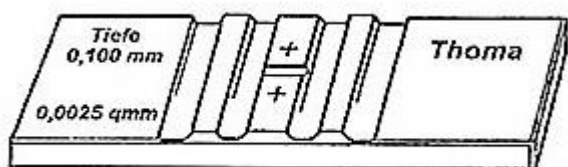
a – średnia liczba (z dziesięciu pomiarów) komórek ogółem, b – średnia liczba (z dziesięciu pomiarów) komórek martwych

Wpisz w karcie pracy do zadania 4 obliczoną żywotność komórek drożdży.

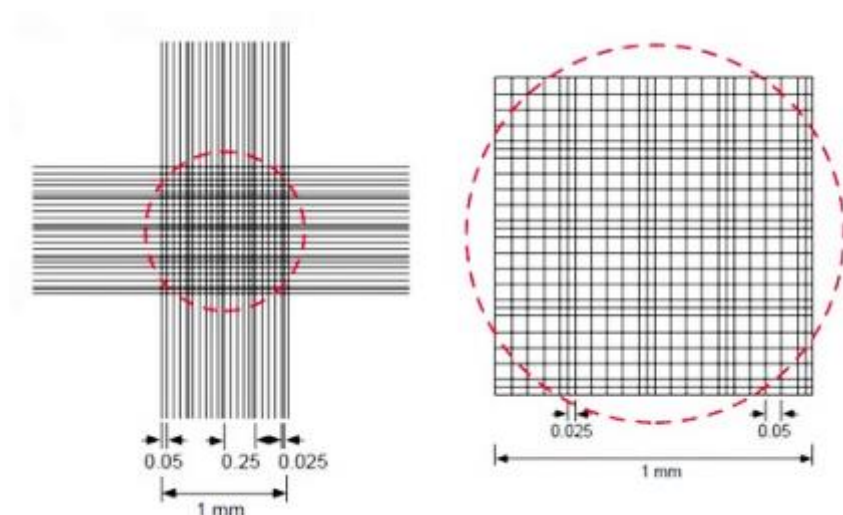
Instrukcja nr 5

Instrukcja obliczania ilości komórek drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, przy użyciu komory Thoma (hemocytometru)

Liczenie komórek w komorze Thoma (hemocytometrze) (rys. 1), odbywa się za pomocą obiektywów powiększających 40x. W miejscach oznaczonych krzyżykami na rysunku 1, znajdują się właściwe komory, stanowiące zespoły po 16 małych wyżłobionych kwadratów o boku 0,05 mm i głębokości 0,1 mm (rys. 2). Powierzchnia jednego, małego kwadratu wynosi $1/400 \text{ mm}^2$ a objętość nad jednym kwadratem $1/4000 \text{ mm}^3$. Na siatkę komory nanosi się kroplę zawiesiny drobnoustrojów i przykrywa szkiełkiem przykrywkowym.



Rys. 1. Widok ogólny komory Thoma



Rys. 2. Schemat siatki 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 cm³ 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.

Liczenie komórek drożdży w komorze Thoma

- znaleźć w mikroskopie siatkę komory Thoma,
- z otrzymanej zawiesiny komórek drożdży sporządzić jedno rozcieńczenie 10⁻¹ (1:10), w następujący sposób:
 - weź probówkę z 9 cm³ wyjałowionego rozcieńczalnika,
 - pobierz jałową pipetą 1 cm³ płynnej hodowli drożdży i wprowadź do probówki z rozcieńczalnikiem,
 - przepłukaj pipetę poprzez kilkakrotne wciąganie pompką i wypuszczanie płynu do probówki po wprowadzeniu próby, co jednocześnie gwarantuje dobre wymieszanie zawartości probówki (rozcieńczenie próby 1:10).
- na szkiełko przedmiotowe z siatką komory Thoma nanieś kroplę rozcieńczonej i wymieszanej zawiesiny drożdży,
- kroplę z materiałem biologicznym przykryj następnie szkiełkiem nakrywkowym; brzeg szkiełka nakrywkowego należy oprzeć w pobliżu kropli, a następnie opuścić ukośnie na szkiełko przedmiotowe, aby do wnętrza kropli nie dostały się pęcherzyki powietrza (preparat w kropli spłaszczonej),
- w mikroskopie ustaw pokrętko potencjometru na najmniejszy wskaźnik jasności,
- włącz mikroskop do gniazda prądu,
- za pomocą śruby makrometrycznej opuść stolik mikroskopu w najniższe położenie,
- umieść gotowy preparat drożdży *Saccharomyces cerevisiae* w urządzeniu krzyżowym na stoliku,
- 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 przy małym powiększeniu (obiektyw 5x), aparat oświetlający Abbego opuść maksymalnie w dół,
- 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 pokrętkła 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,
- za pomocą śruby mikrometrycznej uzyskaj ostry obraz preparatu,
- opuść stolik mikroskopu w dół i za pomocą urządzenia rewolwerowego z obiektywami ustaw obiektyw powiększający 10 - krotnie w osi optycznej mikroskopu,
- powtórz procedury umożliwiające znalezienie obrazu,
- ponownie opuść stolik mikroskopu w dół i za pomocą urządzenia rewolwerowego z obiektywami ustaw obiektyw powiększający 40-krotnie w osi optycznej mikroskopu,
- powtórz procedury umożliwiające znalezienie obrazu,
- po znalezieniu obrazu policz, według wcześniej podanych zasad, ilość komórek w polach np. 5 dużych kwadratów a 80 małych (1 duży kwadrat zawiera 16 małych),

Duże kwadraty	Ilość komórek w dużym kwadracie	Ilość komórek w małym kwadraciku
1		
2		
3		
4		
5		
Średnia ilość komórek w 1 małym kwadraciku	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	

Wyniki z obliczeń wpisz w Karcie pracy do zadania 5.

Instrukcja nr 6

Instrukcja pomiaru wielkości komórek drożdży pod mikroskopem

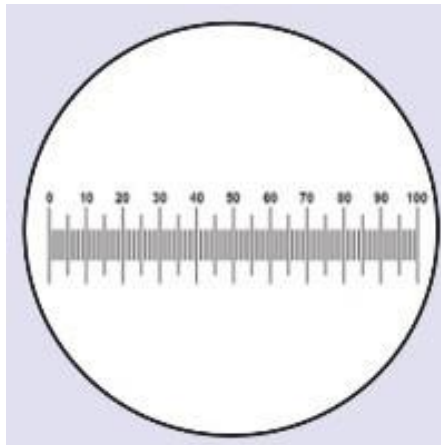
Wygląd mikrometrów podano na rysunkach 1, 2 i 3

- ✓ Pierwszym zadaniem jest skalowanie mikrometru okularowego.
- połóż na stoliku przedmiotowym mikrometr obiektywowy (rys. 1),
- zastosuj właściwy obiektyw, dobrany do wielkości komórek drożdży, (pow. 40x) i znajdź ostry obraz skali obiektywowej,
- umieść mikrometr okularowy ze skalą (rys. 2) na przysłonie wewnątrz okularu, po wykręceniu górnej jego soczewki,
- przez pokręcenie okularem, skalę okularową ustaw równolegle do skali obiektywowej,
- przesuwając stolikiem, doprowadź do pokrycia się dłuższej kreski skali obiektywowej z pierwszą kreską skali okularowej i sprawdź dwie następne pokrywające się kreski (rys. 3),
- policz, ile działek mikrometru okularowego odpowiada ilu działkom mikrometru obiektywowego,

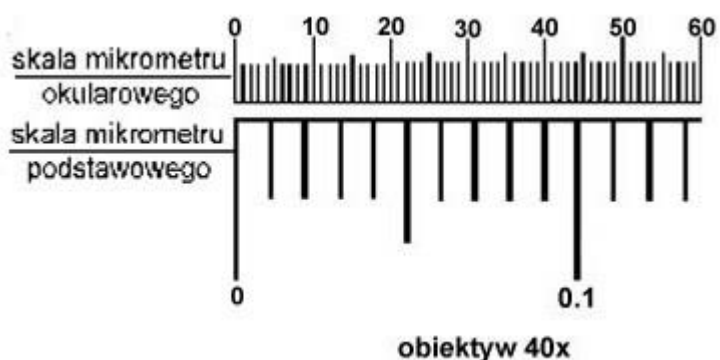
- mnożąc liczbę działek obiektywowych przez 10 i dzieląc wynik przez liczbę działek okularowych otrzymuje się wartość jednej działki okularowej w μm .
- usuń ze stolika mikrometr obiektywowy.



Rys. 1. Szkiełko kalibracyjne zwane szkiełkiem mikrometrycznym lub mikrometrem obiektywowym



Rys. 2. Skala mikrometru okularowego



Rys. 3. Skalowanie mikrometru okularowego mikroskopu

- ✓ Sporządź preparat przyżyciowy drożdży w kropli spłaszczonej.
- na szkiełko przedmiotowe nanieś kroplę zawiesiny drożdży,

- przykryj je następnie szkiełkiem nakrywkowym; brzeg szkiełka nakrywkowego należy oprzeć w pobliżu kropli, a następnie opuścić ukośnie na szkiełko, aby do wnętrza kropli nie dostały się pęcherzyki powietrza,
 - w mikroskopie ustaw pokrętko potencjometru na najmniejszy wskaźnik jasności,
 - za pomocą śruby makrometrycznej opuść stolik mikroskopu w najniższe położenie,
 - umieść gotowy preparat drożdży *Saccharomyces cerevisiae* w urządzeniu krzyżowym na stoliku,
 - pokrętkiem potencjometru zwiększ oświetlenie,
 - za pomocą urządzenia rewolwerowego z obiektywami ustaw obiektyw powiększający 40-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,
 - 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 pokrętła 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,
- ✓ Przeprowadź pomiary wielkości (długości i szerokości) 10 dowolnie wybranych komórek drożdży
- ✓ Wynik odczytaj na skali okularowej i przelicz na wymiary rzeczywiste w μm , korzystając ze wcześniej przeprowadzonej kalibracji mikrometru okularowego.

	Wymiary komórki drożdży			
	długość [liczba działek mikrometru okularowego]	szerokość [liczba działek mikrometru okularowego]	długość [μm]	szerokość [μm]
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				
Wymiary średnie				

Obliczyć wielkość średnią (średnią długość i średnią szerokość) komórki drożdży, wyrażając wynik w μm

Wyniki z obliczeń wpisz w karcie pracy do zadania 6

Instrukcja nr 7.

Instrukcja obserwacji preparatów, przy użyciu kamery mikroskopowej i rejestracja obrazów w komputerze i na przenośnym dysku

- w mikroskopie wyposażonym w kamerę mikroskopową ustaw pokrętko 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,
- pokrętkiem 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 (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 (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 (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 „Świat miniaturowych grzybów”, będącej efektem wykonanych badań, poczynionych obserwacji oraz wyciągniętych wniosków z realizacji poszczególnych zadań 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 uczniów dokonane 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 doświadczeniach, spostrzeżeniach i odczuciach, a nie 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 - załącznik

Karta pracy do zadania 3 - załącznik

Karta pracy do zadania 4 - załącznik

Karta pracy do zadania 5 - załącznik

Karta pracy do zadania 6 - załącznik

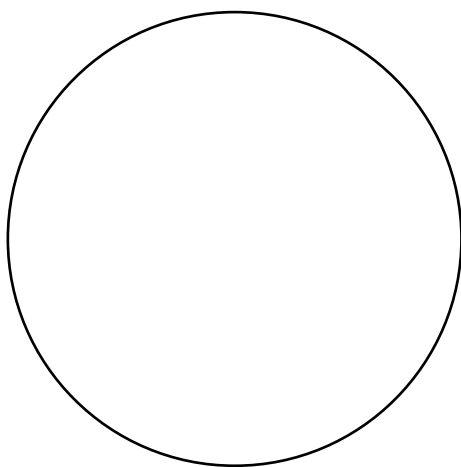
Imię i nazwisko ucznia, klasa

Miejscowość, data

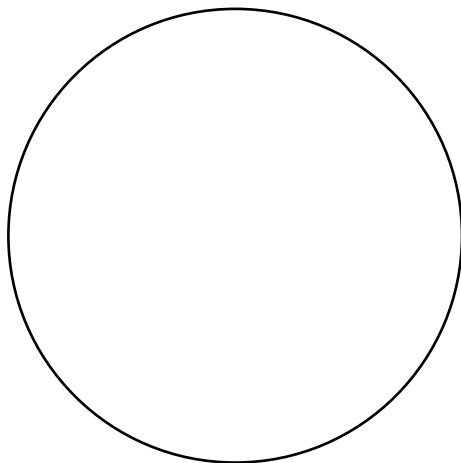
KARTA PRACY DO ZADANIA 3

Sporządzenie i obserwacja mikroskopowa pleśni *Rhizopus nigricans* w kropli spłaszczonej z dodatkiem barwnika - fuksyny

1. Obejrzyj w mikroskopie, pod obiektywem powiększającym 10-krotnie, pleśń *Rhizopus nigricans*. Narysuj widziany w mikroskopie obraz i opisz go (powiększenie mikroskopu, nazwa oglądanego obiektu, co widać na rysunku).



2. Obejrzyj w mikroskopie pod obiektywem powiększającym 40-krotnie pleśń *Rhizopus nigricans*. Narysuj widziany w mikroskopie obraz i opisz go (powiększenie mikroskopu, nazwa oglądanego obiektu, co widać na rysunku).



Imię i nazwisko ucznia, klasa

Miejscowość, data

KARTA PRACY DO ZADANIA 4

Sporządzanie barwionego błękitem metylenowym preparatu przyżyciowego drożdży *Saccharomyces cerevisiae* w kropli spłaszczonej i badanie żywotności komórek drożdży

- ❖ Obejrzyj w mikroskopie, pod obiektywem powiększającym 40-krotnym, preparat drożdży *Saccharomyces cerevisiae* w kropli spłaszczonej z dodatkiem błękitu metylenowego.
- ❖ W 10 różnych polach widzenia (pole widzenia w mikroskopie zmieniać, przesuując preparat na stoliku), policzyć ilość komórek żywych oraz martwych.
- ❖ Obliczyć żywotność drożdży w preparacie, jako iloraz żywych i wszystkich komórek.
- ❖ Wyniki obserwacji i obliczeń umieścić w tabeli.

Żywotność komórek drożdży (x), wyrażona w %:

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

gdzie:

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

Pole widzenia	Liczba komórek ogółem (a)	Liczba komórek martwych (b)
1		
2		
3		
4		
5		
6		
7		
8		
9		
10		
Razem		

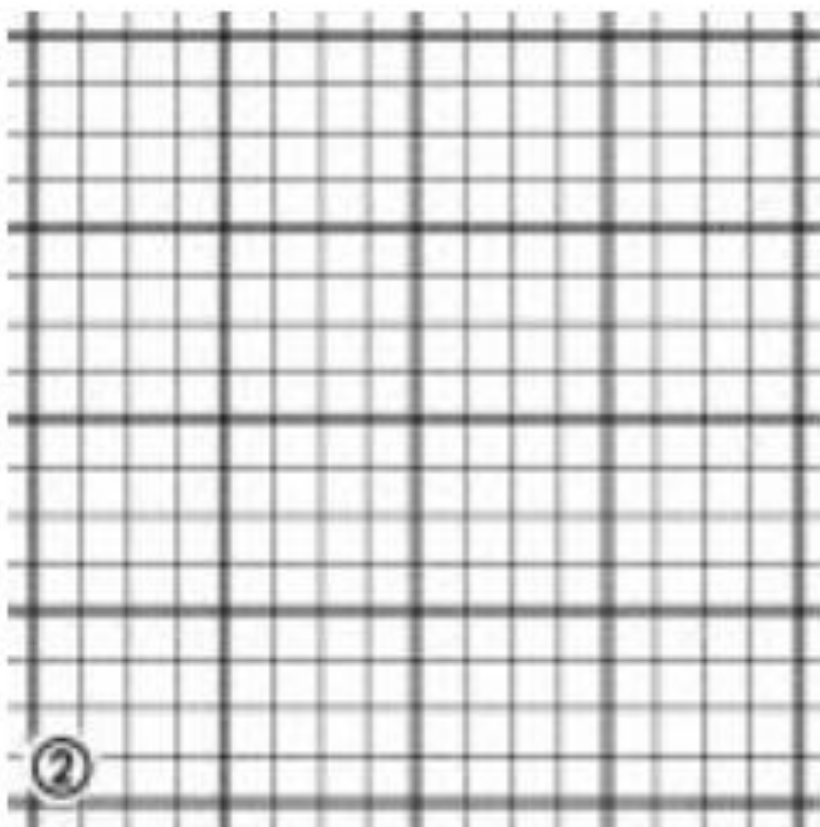
Imię i nazwisko ucznia, klasa

Miejscowość, data

KARTA PRACY DO ZADANIA 5

Obliczanie ilości komórek drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, przy użyciu komory Thoma (hemocytometru)

W mikroskopie, pod obiektywem powiększającym 40-krotnie, liczyć ilość komórek drożdży w 5 dużych a 80 małych kwadratach (1 duży kwadrat zawiera 16 małych), zgodnie z instrukcją nr 5 do tego zadania.



Korzystając ze wzoru obliczyć ilość komórek drożdży (X) w 1 cm^3 badanej zawiesiny

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

gdzie:

c – średnia ilość komórek przypadających na jeden mały kwadrat,

d – rozcieńczenie badanej próby.

Imię i nazwisko ucznia, klasa

Miejscowość, data

KARTA PRACY DO ZADANIA 6

Pomiar wielkości komórek drożdży *Saccharomyces cerevisiae* pod mikroskopem

- ✓ Skalowanie mikrometru okularowego

Obliczanie wartości jednej działki mikrometru okularowego (d) według wzoru:

$$d = \frac{\text{liczba działek skali mikrometru obiektywowego} \cdot 10}{\text{liczba działek skali mikrometru okularowego}} [\mu\text{m}]$$

$$d = \text{---} = [\mu\text{m}]$$

- ✓ Pomiar wielkości komórek drożdży pod mikroskopem

Sporządzić preparat drożdży w kropli spłaszczonej. Wykonać pomiar długości i szerokości 10 komórek i na tej podstawie obliczyć średnią długość i szerokość pojedynczej komórki. Wyniki zapisać w tabeli.

	Wymiary komórki drożdży			
	długość [liczba działek mikrometru okularowego]	szerokość [liczba działek mikrometru okularowego]	długość [μm]	szerokość [μm]
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				
Wymiary średnie				