

ANTONI RÓŻALSKI

ĆWICZENIA Z MIKROBIOLOGII OGÓLNEJ

SKRYPT DLA STUDENTÓW BIOLOGII

WYDANIE V



ANTONI RÓŻALSKI

ĆWICZENIA Z MIKROBIOLOGII OGÓLNEJ

SKRYPT DLA STUDENTÓW BIOLOGII

WYDANIE V



WYDAWNICTWO UNIwersYTETU ŁÓDZKIEGO • ŁÓDŹ 2007

REDAKCJA NAUKOWO-DYDAKTYCZNA
„FOLIA BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA”
Zofia Józwiak, Zofia Szweda-Lewandowska

RECENZENT
Helena Oberman

REDAKTOR WYDAWNICTWA UŁ
Małgorzata Szymańska

REDAKTOR TECHNICZNY
Wiesława Łubiech

KOREKTORZY
Danuta Bąk, Anna Ciach

PROJEKT OKŁADKI
Barbara Grzejszczak

© Copyright by Wydawnictwo Uniwersytetu Łódzkiego, Łódź 2007

Wydane przez Wydawnictwo Uniwersytetu Łódzkiego
Wydanie V (dodruk). W.04182.13.0.S
ISBN (wersja drukowana) 978-83-7171-635-5
ISBN (ebook) 978-83-7969-213-2

Wydawnictwo Uniwersytetu Łódzkiego
90-131 Łódź, ul. Lindleya 8
www.wydawnictwo.uni.lodz.pl
e-mail: ksiegarnia@uni.lodz.pl
tel. (42) 665 58 63, faks (42) 665 58 62

SPIS TREŚCI

Od autorów	9
Wykaz skrótów	10
1. Wprowadzenie	11
1.1. Prokaryota i Eukaryota – cechy wspólne i różnice	14
2. Laboratorium mikrobiologiczne – organizacja, wyposażenie, zaplecze	16
3. Podłoża mikrobiologiczne	18
4. Sterylizacja (wyjaławianie)	23
4.1. Metody fizyczne	23
4.1.1. Sterylizacja cieplna – sucha	23
4.1.1.1. Wyjaławianie przez wyżarzanie	23
4.1.1.2. Wyjaławianie przez opalanie	24
4.1.1.3. Wyjaławianie gorącym suchym powietrzem	24
4.1.2. Sterylizacja cieplna – mokra (parą wodną)	24
4.1.2.1. Dekoktacja – wyjaławianie przez gotowanie	24
4.1.2.2. Pasteryzacja	25
4.1.2.3. Tyndalizacja – sterylizacja w aparacie Kocha	26
4.1.2.4. Wyjaławianie za pomocą pary wodnej pod zwiększonym ciśnieniem	26
4.1.3. Sterylizacja przez sączenie (filtrowanie)	29
4.1.4. Sterylizacja za pomocą promieniowania elektromagnetycznego	30
4.1.4.1. Wyjaławianie za pomocą promieniowania ultrafioletowego (UV) .	30
4.1.4.2. Sterylizacja radiacyjna	31
4.2. Sterylizacja gazowa (metoda chemiczna)	32
4.3. Kontrola sterylizacji	33
5. Dezynfekcja	34
5.1. Chemiczne środki dezynfekcyjne	35
5.1.1. Kwasy i zasady	36
5.1.2. Środki utleniające	37
5.1.3. Alkohole	37
5.1.4. Aldehydy	38
5.1.5. Związki fenolu i ich pochodne	38
5.1.6. Związki powierzchniowo czynne	38
5.1.7. Jodofory	39
5.1.8. Chlorheksydyna	39
5.1.9. Sole metali ciężkich	39
5.2. Metody badania środków dezynfekcyjnych	40
5.3. Kontrola skażenia powierzchni drobnoustrojami	41
5.4. Metody kontroli skażenia bakteryjnego powietrza	42
6. Mikroskopia	44
6.1. Mikroskop świetlny prosty – lupa	44

6.2. Mikroskop świetlny złożony	45
6.2.1. Budowa mikroskopu świetlnego	48
6.3. Mikroskop z ciemnym polem widzenia	49
6.4. Mikroskop kontrastowo-fazowy	51
6.5. Mikroskop ultrafioletowy	51
6.6. Mikroskop fluorescencyjny (luminescencyjny)	52
6.7. Mikroskop polaryzacyjny-interferencyjny	52
6.8. Mikroskop elektronowy – transmisyjny	52
6.9. Mikroskop skaningowy	54
7. Barwienie drobnoustrojów	55
7.1. Barwniki stosowane w barwieniu drobnoustrojów	56
7.2. Przygotowanie preparatów	56
7.3. Barwienie metodą Grama	57
7.4. Barwienie metodą Ziehl-Neelsena (kwasoodporność bakterii)	58
7.5. Barwienie Neissera	59
8. Hodowla drobnoustrojów	60
8.1. Metody otrzymywania czystych kultur	60
8.1.1. Metody bezpośrednie	60
8.1.2. Metody pośrednie	61
8.1.2.1. Metoda posiewu redukcyjnego płytek agarowych	61
8.1.2.2. Metoda posiewu powierzchniowego (płytki „mazane”)	62
8.1.2.3. Metoda posiewu wgłębnego (płytki „lane”)	62
8.1.2.4. Metoda seryjnych rozcieńczeń	64
8.1.2.5. Metoda replik (płytek odciskowych – Lederberga)	64
8.2. Gatunek, klon i szczep w mikrobiologii	64
8.3. Typy hodowli drobnoustrojów	65
8.4. Hodowle tlenowców i beztlenowców	69
8.4.1. Metody hodowli tlenowców	69
8.4.1.1. Hodowle powierzchniowe	69
8.4.1.2. Hodowla wgłębna	70
8.4.2. Hodowla beztlenowców	70
8.4.2.1. Metody fizyczne	70
8.4.2.2. Metody chemiczne	72
8.4.2.3. Metoda biologiczna	72
9. Zasady diagnostyki mikrobiologicznej	73
9.1. Morfologia mikroskopowa	75
9.2. Morfologia kolonii	75
9.3. Wzrost na skosie agarowym	76
9.4. Typy wzrostu na podłożu płynnym	76
10. Drożdże i grzyby strzępkowe	78
10.1. Drożdże	78
10.1.1. Brzeczka	80
10.1.2. Budowa komórki drożdżowej	81
10.1.3. Rozmnażanie się drożdży	83
10.1.4. Metabolizm drożdży i ich zastosowanie praktyczne	85
10.2. Grzyby strzępkowe	86
11. Morfologia mikroskopowa i cytologia bakterii	89
11.1. Morfologia mikroskopowa bakterii	89
11.2. Cytologia bakterii	92
11.2.1. Ściana komórkowa bakterii	94

11.2.1.1.	Peptydoglikan	94
11.2.1.2.	Ściana komórkowa bakterii Gram-dodatnich	97
11.2.1.3.	Ściana komórkowa bakterii Gram-ujemnych	100
11.2.2.	Błona cytoplazmatyczna	107
11.2.3.	Protoplasty, sferoplasty	110
11.2.4.	Otoczki, śluz powierzchniowy, pochwki, glikokaliks	111
11.2.5.	Warstwa S	115
11.2.6.	Rzęski	117
11.2.7.	Fimbrie	120
11.2.8.	Inne struktury zewnątrzkomórkowe bakterii	122
11.2.9.	Cytoplazma komórek bakteryjnych. Materiały zapasowe	123
11.2.10.	Zagadnienie jądra komórkowego u bakterii	124
11.2.11.	Rybosomy	125
11.2.12.	Przetrwalniki (spory) – zjawisko sporulacji	126
12.	Mutacje S → R	130
12.1.	Charakterystyka mutacji S → R	130
12.2.	Genetyczna determinacja biosyntezy LPS	132
12.3.	Testy różnicujące formy S i R	133
13.	Promieniowce	135
13.1.	Rodzaj <i>Actinomyces</i>	137
13.2.	Rodzaj <i>Streptomyces</i>	137
14.	Metabolizm drobnoustrojów	140
14.1.	Podział drobnoustrojów ze względu na sposób odżywiania i zdobywania energii	140
14.2.	Źródła węgla i energii wykorzystywane przez drobnoustroje	142
14.2.1.	Szlaki metaboliczne rozkładu węglowodanów	143
14.3.	Oddychanie tlenowe	146
14.3.1.	Chemoorganotrofy	146
14.3.2.	Chemolitotrofy	149
14.4.	Fermentacja	149
14.5.	Oddychanie beztlenowe	152
14.6.	Tłuszcze jako substraty oddechowe	152
14.7.	Źródła azotu	153
14.7.1.	Azot atmosferyczny	154
14.7.2.	Wykorzystanie azotu mineralnego	154
14.7.3.	Rozkład białek i aminokwasów	154
14.8.	Wykorzystywanie przez drobnoustroje pierwiastków w postaci mikro- i makroelementów	161
14.9.	Czynniki wzrostowe	162
15.	Badanie właściwości biochemicznych drobnoustrojów	163
15.1.	Właściwości glikolityczne	164
15.1.1.	Szereg cukrowy	164
15.1.2.	Rozkład cukrów na podłożu VL	165
15.1.3.	Badanie rozkładu cukrów na podłożach stałych	165
15.1.4.	Technika auksanograficzna	166
15.1.5.	Próba na podłożu Hugh-Leifsona (H-L)	166
15.1.6.	Wzrost bakterii na podłożu Kliglera	166
15.1.7.	Próba Voges-Proskauera (VP) i Metyl Red (MR)	167
15.2.	Właściwości proteolityczne	168
15.2.1.	Hydroliza kazeiny	168
15.2.2.	Upłynnianie żelatyny	168

15.2.3.	Badanie wytwarzania amoniaku	169
15.2.4.	Wytwarzanie siarkowodoru	169
15.2.5.	Rozkład tryptofanu (próba na indol)	170
15.2.6.	Deaminacja feniloalaniny	170
15.2.7.	Dekarboksylacja aminokwasów	170
15.2.8.	Hydroliza mocznika	171
15.3.	Właściwości lipolityczne	171
15.3.1.	Podłoże z margaryną	171
15.3.2.	Podłoże z dodatkiem Tween 80	172
15.4.	Właściwości utleniająco-redukcyjne	172
15.4.1.	Oksydaza cytochromowa	172
15.4.2.	Katalaza	173
15.4.3.	Peroksydaza	173
15.4.4.	Reduktaza azotanowa	173
15.4.5.	Redukcja chlorku 2,3,5-trifenyloetrazoliowego (TTC)	173
15.4.6.	Redukcja błękitu metylenowego	174
15.5.	Inne właściwości biochemiczne drobnoustrojów	174
15.5.1.	Wzrost bakterii na podłożu Simmonsa z cytrynianem	174
15.5.2.	Wykrywanie lecytynazy	175
15.5.3.	Wykrywanie fosfatazy	175
15.5.4.	Zmiany w mleku z lakmusem	175
15.6.	Mikrometody, szybkie testy do badania właściwości biochemicznych drobnoustrojów	176
15.6.1.	Enterotube (Roche)	176
15.6.2.	Enterotest (Lachema – Czechy)	177
15.6.3.	Enteroplast (Plastomed – Polska)	177
15.6.4.	Mikrometoda API	177
15.7.	Inne cechy drobnoustrojów brane pod uwagę w ich identyfikacji	178
15.7.1.	Wytwarzanie barwników przez bakterie	178
15.7.2.	Właściwości hemolityczne	179
16.	Wpływ czynników fizycznych i chemicznych na drobnoustroje	180
16.1.	Woda (wpływ wysychania)	180
16.2.	Temperatura	181
16.2.1.	Psychro-, mezo- i termofile	182
16.2.2.	Bakteriostatyczne i bakteriobójcze działanie ciepła	184
16.3.	Ciśnienie osmotyczne	185
16.4.	Ciśnienie mechaniczne	186
16.5.	Ciśnienie hydrostatyczne	186
16.6.	Wpływ promieniowania elektromagnetycznego na drobnoustroje	187
16.6.1.	Działanie światła widzialnego na drobnoustroje	187
16.6.2.	Promieniowanie ultrafioletowe i jonizujące	187
16.7.	Działanie ultradźwięków	188
16.8.	Napięcie powierzchniowe	188
16.9.	Potencjał red-oks	189
16.10.	Wpływ wartości pH środowiska na drobnoustroje	190
16.11.	Wpływ substancji chemicznych na drobnoustroje	190
16.11.1.	Wpływ barwników na wzrost bakterii	190
16.11.2.	Wpływ kationów i anionów na drobnoustroje	191
17.	Sulfonamidy i związki tuberkulostatyczne	192
18.	Antybiotyki	194

18.1. Antybiotyki β -laktamowe	194
18.2. Antybiotyki aminoglikozydowe (aminocyklitolowe)	196
18.3. Tetracykliny	196
18.4. Makrolidy	197
18.5. Antybiotyki peptydowe	197
18.6. Inne antybiotyki	199
18.7. Oporność drobnoustrojów na działanie antybiotyków	199
18.8. Wpływ fitoncydów na drobnoustroje	201
19. Bakteriocyny	202
20. Bakteriofagi	205
20.1. Budowa bakteriofagów	206
20.2. Namnażanie fagów	207
20.3. Zjawisko lizogenii	209
20.4. Zastosowanie bakteriofagów	210
21. Wzajemne stosunki pomiędzy drobnoustrojami	212
21.1. Oddziaływanie bezpośrednie	212
21.2. Oddziaływania pośrednie pomiędzy drobnoustrojami	213
21.2.1. Symbioza	213
21.2.2. Synergizm	214
21.2.3. Metabioza	216
21.2.4. Antagonizm	217
21.2.4.1. Antybioza	217
22. Bakterie fotosyntetyzujące	219
22.1. Organelle fotosyntezy	219
22.2. Centra reakcji fotosyntezy	220
22.3. Chemizm fotosyntezy u bakterii	223
22.4. Bakterie fotosyntetyzujące – charakterystyka	225
23. Halofile	228
24. Naturalne środowiska drobnoustrojów – gleba, woda i powietrze	233
24.1. Gleba jako środowisko drobnoustrojów	233
24.2. Woda i ścieki – środowisko wzrostu drobnoustrojów	241
24.2.1. Warunki rozwoju drobnoustrojów w środowisku wodnym	241
24.2.2. Drobnoustroje środowisk wodnych	243
24.2.3. Analiza sanitarna wody	245
24.2.4. Ścieki i ich oczyszczanie	246
24.3. Powietrze i jego znaczenie w przenoszeniu drobnoustrojów	249
25. Praktyczne zastosowanie drobnoustrojów – wybrane zagadnienia	252
25.1. Nadprodukcja enzymów	252
25.2. Wytwarzanie kwasu cytrynowego	252
25.3. Biosynteza aminokwasów	253
25.4. Reakcje biokonwersji związków chemicznych	254
25.5. Biotransformacje związków mineralnych	256
25.6. Inżynieria genetyczna	257
25.7. Inne sposoby wykorzystania drobnoustrojów	258
Literatura pomocnicza i uzupełniająca	259

OD AUTORÓW

Mikrobiologia ogólna wykładana jest studentom biologii Uniwersytetu Łódzkiego od kilkunastu już lat. Program ćwiczeń z tego przedmiotu obejmuje szeroki zakres zagadnień, stanowiących wprowadzenie w różne dziedziny wiedzy mikrobiologicznej. Jego realizacja przyniosła nauczycielom akademickim Zakładu Mikrobiologii Ogólnej UŁ wiele doświadczeń, które wykorzystano w opracowaniu niniejszego skryptu. Składa się on z dwóch części – teoretycznej i praktycznej. Część I – teoretyczna – zawiera przegląd zagadnień mikrobiologii ogólnej, łączących się tematycznie z problematyką ćwiczeń odbywanych przez studentów. Część II – praktyczna – jest zbiorem opisów wykonania 25 ćwiczeń laboratoryjnych przewidzianych, w różnym zakresie, programem zajęć z tego przedmiotu dla studentów specjalności: mikrobiologicznej, biochemicznej i biofizycznej, fizjologicznej oraz biologii środowiskowej. Zdając sobie sprawę z tego, iż nie wszystkie tematy poruszane w tym skrypcie zostały opracowane wyczerpująco, zachęcamy studentów do sięgnięcia po literaturę uzupełniającą, która pozwoli rozszerzyć im wiadomości z tej dziedziny wiedzy. Mamy nadzieję, że skrypt ten będzie pomocny studentom nie tylko w przygotowaniu się do egzaminu lub kolokwium, ale przede wszystkim podczas pracy na zajęciach praktycznych.

Autorzy składają serdeczne podziękowania prof. dr hab. Krystynie Kotelko, bez której życzliwości i pomocy skrypt ten nie mógłby powstać. Dziękujemy w szczególności za krytyczne uwagi co do jego treści, jak i formy. Podziękowania składamy także kolegom z Zakładu Mikrobiologii Ogólnej i Instytutu Mikrobiologii i Immunologii UŁ za pomoc w przygotowaniu tego opracowania. Szczególne podziękowania należą się koledze Januszowi Włodarczykowi za przygotowanie manuskryptu i dokumentacji. Dziękujemy również Małgorzacie Różalskiej za wykonanie niektórych rycin oraz za pomoc w opracowaniu całości.

Łódź, kwiecień 1994 r.

WYKAZ SKRÓTÓW

ADP	– adenozynodifosforan
Ala	– alanina
API	– zestaw do badania właściwości biochemicznych bakterii
Atm	– atmosfera
ATP	– adenozynotrifosforan
BCG	– atenuowane prątki bydłce Calmette’a Guerina
BB	– <i>Binding Protein</i> , białko wiążące
cAMP	– cykliczny AMP (adenozynomonofosforan)
$\bar{e}$	– elektrony
ECA	– <i>Enterobacterial Common Antigen</i> (antygen wspólny – Kunina)
EDTA	– kwas etylenodiaminotetraoctowy (kwas wersenowy)
Eh	– potencjał oksydo-redukcyjny
FAD ⁺	– dinukleotyd flawinoadeninowy
Gal	– galaktoza
GalA	– kwas galakturonowy
GalN	– galaktozamina
Glc	– glukoza
GlcA	– kwas glukuronowy
GlcN	– glukozamina
Glu	– glutamina
GluA	– kwas glutaminowy
Gly	– glicyna
Gas-Pak	– zestaw do hodowli beztlenowców
HPa	– hektopaskale
LPS	– lipopolisacharyd (endotoksyna, antygen O)
LTA	– kwas lipoteichojowy
Lys	– lizyna
ManNAc	– N-acetylomannozamina
MDO	– <i>Membrane Derived Oligosaccharides</i> – oligosacharydy błonopochodne
NAD ⁺	– dinukleotyd nikotynamidoadeninowy
NADP ⁺	– fosforan dinukleotydu nikotynamidoadeninowego
Omp	– <i>Outer membrane proteins</i> (białka błony zewnętrznej)
PAL	– <i>Peptidoglican Associated Proteins</i> – białka związane z peptydoglikanem
PS	– polisacharyd
Rha	– ramnoza
UDP	– urydynodifosforan
UV	– ultrafiolet

1. WPROWADZENIE

Mikrobiologia jest nauką o drobnoustrojach (mikroorganizmach). Termin mikrobiologia wywodzi się z języka greckiego: *mikros* – mały, *bios* – życie, *logos* – słowo. Nauka ta zajmuje się cechami morfologicznymi, właściwościami biochemicznymi, rolą w środowisku naturalnym, właściwościami chorobotwórczymi, jak również zastosowaniem drobnoustrojów w przemyśle.

Drobnoustroje stanowią odmienną pod względem przynależności taksonomicznej, wielkości i budowy grupę organizmów. Zaliczamy do nich również wirusy, nie wykazujące zdolności do samodzielnego życia, organizacji komórkowej oraz własnego metabolizmu.

Metody badania drobnoustrojów wykształciły się w ciągu ponad stu lat istnienia tej dziedziny wiedzy. Pomijając szczegółowe i specjalistyczne techniki, ogólny, podstawowy schemat badania obejmuje: wstępną obserwację makroskopową i mikroskopową, wyosobnienie interesującego nas drobnoustroju w postaci czystej hodowli, określenie jego cech morfologicznych, typu wzrostu na podłożach stałych i płynnych, zbadanie jego właściwości biochemicznych i fizjologicznych oraz ustalenie ewentualnej roli wyizolowanego mikroorganizmu w środowisku naturalnym, w przebiegu choroby lub możliwości wykorzystania w procesie przemysłowym. Zwalczanie drobnoustrojów jest także jedną z dziedzin mikrobiologii ogólnej we wszystkich przypadkach, w których obecność niektórych z nich jest nie tylko zbędna, ale wręcz szkodliwa.

Drobnoustroje są praktycznie wszędzie we wszystkich środowiskach naturalnych na Ziemi; ich nosicielami są ludzie i zwierzęta; występują na (w) roślinach, ich obecność można także stwierdzić w większości produktów naturalnych i sztucznych. Źródłem drobnoustrojów do badań, określanym przez mikrobiologów terminem „materiał mikrobiologiczny”, mogą więc być: próbki wody, ścieków, gleby oraz powietrza, materiał pobrany od ludzi lub zwierząt (np. mocz, krew, płyny wysiękowe, wymazy z ran, gardła, skóry), produkty spożywcze (mleko i jego przetwory, soki i koncentraty owocowo-warzywne, piwo, wino, mięso i jego przetwory itp.), a także produkty przemysłowe, które bardzo często podlegają niszczącemu działaniu mikroorganizmów (zjawisko korozji mikrobiologicznej). W każdym z tych, przykładowo wymienionych materiałów do hodowli, można znaleźć wiele,

różniących się pomiędzy sobą drobnoustrojów, których nie sposób badać jednocześnie. Mikrobiolog, przystępując do pracy, najczęściej izoluje i bada je oddzielnie. Zagadnienia te zostaną omówione w podrozdziale 9.1. Ze szczególną metodyką badań drobnoustrojów łączą się również specjalne rygory postępowania – posługiwanie się jałowym sprzętem i pożywkami, praca w warunkach jałowych oraz zapewnienie bezpieczeństwa własnego i osób postronnych przed zakażeniem drobnoustrojami chorobotwórczymi.

Praca z materiałem zakaźnym zawsze wiąże się z ryzykiem zakażenia siebie lub osób z otoczenia. Nawet wykonując wszystkie czynności zgodnie z przyjętymi sposobami postępowania jest się narażonym na nieprzewidziane zdarzenia (pęknięcie probówki w trakcie wirowania, wypadnięcie wacika z pipety, źle zabezpieczony materiał od pacjenta). Biorąc to pod uwagę, wprowadzono pojęcie ryzyka mikrobiologicznego z jakim ma do czynienia osoba stykająca się z racji swojego zawodu (mikrobiolog, lekarz, pielęgniarz) z materiałem mikrobiologicznym. Dotyczy to również uczniów i studentów zapoznających się z metodami pracy z drobnoustrojami. Pod pojęciem ryzyka mikrobiologicznego rozumiemy potencjalne możliwości zakażenia się drobnoustrojami, występującymi w materiale od pacjenta, mikroorganizmami badanymi w laboratoriach naukowych, a także demonstrowanymi np. studentom. Ryzyko zakażenia laboratoryjnego występuje nie tylko w trakcie pracy z już wyosobnionymi drobnoustrojami, ale także przy pobieraniu materiału klinicznego od pacjenta, np. krwi (możliwość zakażenia wirusem żółtaczk, HIV) oraz transportu próbek do badań do laboratorium. W związku z powyższym wprowadza się w laboratoriach mikrobiologicznych niezwykle restrykcyjne przepisy określające sposoby obchodzenia się z materiałem zakaźnym, wykonywaniem posiewów, badań, sterylizacji hodowli i materiałów, utylizacji odpadów oraz dezynfekcji pomieszczeń i dezynfekcji osobistej. Oddzielne przepisy postępowania opracowano dla laboratoriów bakteriologicznych, mykologicznych, wirusologicznych i zajmujących się riketsjami. Specjalne regulacje dotyczą laboratoriów, w których „pracuje się” z wirusem HIV. W przepisach tych znajdują się instrukcje dotyczące wyposażenia laboratoriów, w których prowadzi się badania niosące ze sobą największe ryzyko mikrobiologiczne. Laboratoria mikrobiologiczne zostały podzielone na cztery rodzaje ze względu na tzw. poziom bezpieczeństwa. Najniższy poziom bezpieczeństwa – 1 – reprezentują laboratoria standardowe nie wyposażone w specjalny sprzęt i system zabezpieczeń przed „wydostaniem się” drobnoustrojów na zewnątrz. Najwyższy – 4 – stopień bezpieczeństwa zapewniają laboratoria wyposażone w szafki (kabiny) z jałowym, pionowym przepływem powietrza, w których wykonuje się wszystkie operacje z drobnoustrojami. Laboratoria te zawierają wydzielone boksy (pomieszczenia oddzielone od zewnątrz), do których wchodzi się ze specjalnych pomieszczeń przejściowych (przedsionki), w których dokonuje się zmiany ubrania. W la-

boratoriach tych zainstalowany jest system wentylacji, uniemożliwiający przedostanie się drobnoustrojów wraz z powietrzem na zewnątrz. Pracownicy tych laboratoriów charakteryzują się najwyższymi kwalifikacjami zawodowymi i dużym doświadczeniem, wykonują swoją pracę posługując się wyłącznie sprzętem zmechanizowanym, ponadto korzystają z pełnego zabezpieczenia osobistego (rękawice, okulary ochronne, maski ochronne na twarzy itp.).

Wraz z rozwojem biotechnologii pojawiły się problemy bezpieczeństwa również w tej dziedzinie działalności człowieka. Do najważniejszych zagadnień z tym związanych należą: analiza chorobotwórczości drobnoustrojów stosowanych w procesach biotechnologicznych, toksyczność i właściwości uczulające produktów wytwarzanych przez drobnoustroje, zwiększanie w środowisku naturalnym populacji szczepów opornych na antybiotyki oraz zagrożenia, jakie niesie ze sobą otrzymywanie i stosowanie mikroorganizmów konstruowanych metodami inżynierii genetycznej. Poważne problemy stwarza również coraz większa ilość biomasy wytwarzanej podczas procesów biotechnologicznych oraz oczyszczanie ścieków powstających w tych procesach.

Drobnoustroje stosowane w biotechnologii podzielono na cztery klasy:

- 1) drobnoustroje niechorobotwórcze i nie zagrażające środowisku naturalnemu,
- 2) drobnoustroje chorobotwórcze dla człowieka, ale niezdolne do rozprzestrzeniania w środowisku (znane są efektywne metody profilaktyczne),
- 3) drobnoustroje stanowiące niebezpieczeństwo dla ludzi z nimi pracujących, zagrażające zaś w małym stopniu ludziom z otoczenia (istnieje możliwość zapobiegania),
- 4) drobnoustroje chorobotwórcze zagrażające nie tylko ludziom uczestniczącym bezpośrednio w produkcji, ale i z otoczenia (brak efektywnych metod profilaktycznych).

Biotechnolodzy stosują przede wszystkim gatunki całkowicie bezpieczne dla człowieka i dla środowiska naturalnego. Większe problemy sprawia stosowanie drobnoustrojów otrzymanych na drodze inżynierii genetycznej dla potrzeb rolnictwa, farmacji, utylizacji odpadów i ścieków itp. Budzi to niepokój, gdyż szczepy te zawierają obcy DNA, wprowadzenie ich celowe lub przypadkowe do środowiska wiąże się z następstwami, które obecnie trudno przewidzieć. Biorąc to pod uwagę opracowano zasady bezpieczeństwa pracy oraz wymogi techniczne dotyczące postępowania ze zrekombinowanym DNA. Do manipulacji genetycznych powinno dobierać się szczepy bezpieczne, tj. biologicznie upośledzone, które nie są zdolne do zasiedlenia swego naturalnego środowiska. W pracach tego typu należy posługiwać się wektorami niezdolnymi do przemieszczania się pomiędzy komórkami na drodze naturalnej. Nie wszystko jednak da się przewidzieć, bowiem nie istnieje stabilność genetyczna szczepów. Podlegają one zmianom mutacyjnym, których efekty są trudne do przewidzenia. Ponadto należy się również liczyć z możliwością

rewersji szczepów niewirulentnych, stosowanych w biotechnologii do form wirulentnych. Dlatego problematyka ta została ściśle unormowana przepisami Światowej Organizacji Zdrowia (WHO).

1.1. Prokaryota i Eukaryota – cechy wspólne i różnice

Opierając się na różnicach w organizacji aparatu genetycznego oraz budowie komórki wyróżniamy Prokaryota (bakterie właściwe, mykoplazmy, riketsje i sinice) oraz drobnoustroje eukariotyczne (pierwotniaki, grzyby nitkowate, glony), którym, w odróżnieniu od wirusów, możemy przypisać wszystkie atrybuty życia (organizacja struktury, przemiana materii i energii oraz przepływ informacji). Pro- i Eukaryota reprezentują dwa odmienne typy budowy komórek. Prokaryota charakteryzują się uproszczoną strukturą komórki i nie zawierają lizosomów, mitochondriów i plastydów, których funkcję spełniają mezosomy i chromatofory, będące wytworami błony cytoplazmatycznej. U tych drobnoustrojów nie występuje również siateczka śródplazmatyczna oraz inaczej zbudowana jest ściana komórkowa. Podstawowa różnica pomiędzy tymi organizmami tkwi w budowie aparatu jądrowego. U Eukaryota występuje jądro komórkowe, wyodrębnione w cytoplazmie, z otoczką (błoną) jądrową, chromatyną, jąderkiem i macierzą jądrową. U Prokaryota rolę jądra komórkowego spełnia nukleoid (chromosom bakteryjny), stanowiący podwójną nić DNA zanurzoną w cytoplazmie komórki. W rozwoju komórkowym Prokaryota nie występuje mitoz i mejoza, a zdecydowana większość tych organizmów rozmnaża się przez podział prosty komórek.

Do Eukaryota zaliczamy organizmy zbudowane z jednej lub wielu komórek. Obok wymienionych wyżej drobnoustrojów znajdują się wśród nich również rośliny i zwierzęta. Gatunki zaliczane do pierwotniaków i grzybów charakteryzuje brak organizacji wielotkankowej, natomiast u roślin i zwierząt występuje ona w trakcie cykli rozwojowych. Komórki Eukaryota posiadają złożoną budowę cytoplazmy i jądra komórkowego, w którego wnętrzu znajdują się chromosomy zbudowane z DNA, RNA i białek. Jądro komórkowe Eukaryota charakteryzuje się znacznie większą zawartością DNA w porównaniu do Prokaryota. Podstawę macierzy cytoplazmy u Eukaryota stanowi szkielet komórkowy (cytoszkielet), pełniący funkcje strukturalne (podporowe) oraz funkcjonalne (ruchowo-transportowe). Najważniejszą cechą wspólną komórek eukariotycznych jest rozdział funkcji biologicznych komórki pomiędzy wyodrębnione morfologicznie fragmenty zwane kompartmentami, które najczęściej stanowią odrębne organelle komórkowe. Wspólnymi dla większości komórek Eukaryota organellami są: rybosomy, siateczka śródplazmatyczna (ER), aparat Golgiego, mitochondria, lizosomy i peroksyosomy.

U roślin występują chloroplasty odpowiedzialne za proces fotosyntezy. U niektórych Eukaryota funkcje mitochondriów i chloroplastów pełnią tzw. ksenosomy – wewnątrzkomórkowe symbionty (endosymbionty), którymi mogą być organizmy tak pro- jak i eukariotyczne. Zgodnie z przyjętą definicją ksenosomami nazywamy każdy organizm lub organellum komórkowe występujące w komórce Eukaryota, które zawiera DNA i jest osłonięte błoną komórkową. Najczęściej gospodarzami ksenosomów są pierwotniaki, charakteryzujące się zdolnością do endocytozy, ułatwiającej wnikanie innych mikroorganizmów do wnętrza komórki. Prokaryota nie pełnią roli gospodarzy ksenosomów, co wynika z braku ich zdolności do endocytozy, braku cytoszkieletu w komórce oraz jej małej objętości.

Cechą wspólną Pro- i Eukaryota jest uniwersalny kod genetyczny i synteza białek z udziałem RNA i rybosomów. Większość przedstawicieli Prokaryota charakteryzuje się bardzo wysokim tempem metabolizmu i krótkim czasem generacji, który ponadto zależy od warunków środowiskowych (zawartość substancji odżywczych, temperatura wzrostu). Cechą wyróżniającą Prokarota jest także: miniaturyzacja i uproszczenie budowy komórki, zdolność wykorzystywania różnych substancji odżywczych, również pojawiających się na krótko i występujących w niewielkich ilościach w środowisku, oraz możliwość zmiany w krótkim okresie czasu typu metabolizmu (np. z tlenowego na beztlenowy czy z fotosyntezy tlenowej na beztlenową). Występowanie kolistego nukleoidu oraz niewykształcenie w pełni wartościowych białek histonowych spowodowało, że komórki Prokaryota charakteryzują się ograniczoną zdolnością do gromadzenia informacji genetycznej i jej przetwarzania, co zapewne spowodowało ograniczenie ich ewolucji na poziomie strukturalnym.

2. LABORATORIUM MIKROBIOLOGICZNE – ORGANIZACJA, WYPOSAŻENIE, ZAPLECZE

Współczesna mikrobiologia posługuje się różnorodnymi metodami badań drobnoustrojów. Obok od lat stosowanych technik hodowli drobnoustrojów, metod cytologicznych i serologicznych, wykorzystuje się również metody chemiczne, immunochemiczne, biochemiczne i genetyczne. Z tego też powodu laboratorium mikrobiologiczne powinno składać się z kilku pomieszczeń o różnym przeznaczeniu. Oprócz właściwej pracowni mikrobiologicznej, w której prowadzi się obserwacje i badania drobnoustrojów, w skład takiego laboratorium najczęściej również wchodzi: boks do pracy jałowej, pracownia chemiczna, pokój wagowy oraz z aparaturą precyzyjną, pokój wirówkowy, cieplarka i chłodnia oraz pomieszczenia składające się na zaplecze: zmywalnia, sterylizatornia i pożywkarnia. Duże laboratoria mikrobiologiczne dysponują także zwierzętarniami zlokalizowanymi na zewnątrz budynku głównego.

Z uwagi na szybką potrzebę częstego i długotrwałego korzystania podczas pracy z palnika gazowego, pracownie mikrobiologiczne, o ile to możliwe, powinny być organizowane w pomieszczeniach dobrze oświetlonych, ale z oknami wychodzącymi na północ. Pracownie te muszą mieć zapewnioną możliwość dezynfekcji lampami UV podwieszonymi pod sufitem. Ściany pracowni powinny być pokryte farbą umożliwiającą ich zmywanie, a podłoga powinna być wykonana z tworzywa sztucznego, które łatwo dezynfekować i zmywać. Pracownię mikrobiologiczną należy wyposażać w stoły laboratoryjne z trudno palną, ale łatwo zmywalną powierzchnią. Na standardowym stanowisku pracy mikrobiologa powinny znajdować się palnik gazowy (o ile możliwe z regulowaną wysokością płomienia lub możliwością czasowego zapalenia płomienia), statyw z ezami, naczynie z płynem dezynfekującym na pipety, słój na zużyte szkiełka mikroskopowe oraz zestaw podstawowych barwników i wanienkę do barwienia preparatów (jeżeli warunki lokalowe pozwalają, najlepiej umieszczoną bezpośrednio pod kranem z wodą przyłączoną do zlewu). Na oddzielnym stole umieszcza się, najczęściej na stałe, mikroskop świetlny. W pracowni powinny też znajdować się cieplarka(i), łaźnia wodna, wytrząsarka stołowa, podręczna wirówka laboratoryjna, szafa na szkło laboratoryjne zwykłe, jałowe i chemicznie czyste oraz lodówka i zamrażarka. W osobnym miejscu pracowni umieszcza się wanienki (kubły,

kosze) na wykorzystany materiał mikrobiologiczny, zużyte szkło (osobno zakaźne i niezakaźne), hodowle drobnoustrojów oraz inne materiały i sprzęt wykorzystywany do pracy i przeznaczony do sterylizacji i mycia. Należy również umieścić w dwóch–trzech miejscach na sali waniarki lub zlewki ze środkiem dezynfekującym na ewentualnie rozbite probówki lub płytki z materiałem zakaźnym, szkiełka mikroskopowe, zużyty zakaźny sprzęt mikrobiologiczny itp. W pracowniach borykających się z trudnościami lokalowymi, bardzo często ciepłarni umieszcza się na zewnątrz na korytarzu, a mikroskopy instaluje się jedynie na czas pracy. Nowoczesne pracownie mikrobiologiczne wyposaża się również w komory (szafki) z przepływem jałowego powietrza. Należy pamiętać, iż do pracy z drobnoustrojami należy stosować komory z nawiewem pionowym, a nie poziomym.

Zmywalnia, pomieszczenia do sterylizacji i pożywkarnia powinny być tak zlokalizowane, aby stanowiły ciąg pokoi, których kolejność odpowiada poszczególnym etapom mycia, przygotowania i sterylizacji szkła oraz pożywek mikrobiologicznych. Zmywalnia powinna być wyposażona w autoklaw przeznaczony jedynie do niszczenia (sterylizacji) wykorzystanego materiału zakaźnego oraz hodowli bakteryjnych, a także w zestaw do gotowania, a następnie mycia szkła laboratoryjnego. W zmywalni najczęściej instaluje się dwa stanowiska pracy – jedno do mycia za pomocą detergentów (mycie zwykłe) oraz drugie do mycia chemicznego, w którym stosuje się chromiankę lub Rovonex. Umyte szkło poddaje się intensywnemu płukaniu w wodzie bieżącej, a następnie w destylowanej, po czym suszy się w suszarkach elektrycznych (rzadziej na powietrzu), a następnie przygotowuje do sterylizacji. Sposób przygotowania i wyjaławiania szkła przedstawiono w podrozdziale 4.1.1.3.

Pożywkarnia jest pomieszczeniem służącym do przygotowywania podłoży mikrobiologicznych. Najczęściej składa się z pokoju, w którym sporządza się podłoża, wyposażonego w zestaw do destylacji oraz podwójnej destylacji wody, pH-metr oraz podręczny zwykły i specjalny sprzęt laboratoryjny (wagi zwykłe i analityczne, pipety automatyczne do rozlewania pożywek, urządzenie do przygotowywania skosów, zestawy do sączenia mikrobiologicznego). Do tego pomieszczenia powinien przylegać boks (najlepiej z przedsionkiem), który łatwo wysterylizować, w którym jałowo rozlewa się pożywki płynne i przygotowuje płytki z podłożami. W takich boksach coraz częściej instaluje się w pełni zautomatyzowane zestawy do jałowego rozlewania pożywek do probówek i płytek. Obok głównego pomieszczenia pożywkarni wydziela się specjalny boks, wyposażony w dobrą wentylację, w którym ustawia się autoklawy i aparaty Kocha służące do wyjaławiania podłoży mikrobiologicznych. Metody sterylizacji pożywek opisano w podrozdziale 4.1.2.

3. PODŁOŻA MIKROBIOLOGICZNE

Podłoża mikrobiologiczne to sztucznie stworzone środowisko wzrostu do hodowli drobnoustrojów. Stosuje się je do izolacji, różnicowania, identyfikacji lub namnażania drobnoustrojów, określania ich właściwości fizjologicznych, biochemicznych i hodowlanych, mogą też być wykorzystane do otrzymywania określonych produktów ich metabolizmu. Pożywki do hodowli drobnoustrojów powinny charakteryzować się następującymi cechami:

- 1) muszą zawierać łatwo dostępne źródła pierwiastków biogennych (C, O, H, N, P, S) oraz energii, a także odpowiedni zestaw soli mineralnych,
- 2) powinny wykazywać optymalny dla wzrostu danego rodzaju drobnoustrojów odczyn pH oraz potencjał red-oks,
- 3) muszą być przejrzyste (z wyjątkiem podłoży zawierających związki nierozpuszczalne, np. CaCO_3 , tłuszcze itp.),
- 4) powinny wykazywać odpowiednią wartość ciśnienia osmotycznego,
- 5) muszą być jałowe.

Podłoża mikrobiologiczne (ze względu na zawartość składników odżywczych) dzielimy na minimalne, pełne i wzbogacone. Podłoża minimalne to takie, które zawierają tylko składniki pokarmowe, które są niezbędne do podtrzymania wzrostu drobnoustrojów (np. podłoże minimalne M9 wg Adamsa). Podłoża pełne (np. bulion odżywczy do hodowli bakterii oraz brzczka do hodowli drożdży) zawierają wszystkie niezbędne substancje odżywcze, umożliwiające dobry wzrost drobnoustrojów. Zawierają one źródło węgla, azotu oraz czynniki uzupełniające (sole mineralne, czynniki wzrostowe). Podłoża wzbogacone sporządza się dla drobnoustrojów słabo rosnących *in vitro*, wymagających do wzrostu w tych warunkach dodatkowych substancji odżywczych. Jako czynniki wzbogacające podłoża stosowane są: krew, surowica, płyny wysiękowe, wyciąg wątrobowy, mleko, żółtka jaj, dodawane najczęściej do podłoży dla drobnoustrojów chorobotwórczych (gonokoki, prątki gruźlicy, pałeczki grypy). Najczęściej stosuje się odwłóknioną krew owcy lub ludzką, którą dodaje się w ilości 3–5%. Żółc wołowa, której składnikami są kwasy żółciowe, stosowana jest do przygotowania podłoży różnicujących i wybiórczych (patrz niżej). Podłoża z mlekiem służą do różnicowania bakterii oraz do hodowli drobnoustrojów fermentacji mlekowej, a także oceny procesu proteolizy.

Podłoża bogate w substancje organiczne służą przede wszystkim do hodowli heterotrofów, zwłaszcza auksotrofów. Autotrofy, wykorzystujące jako źródła węgla, najczęściej CO_2 , hoduje się na podłożach minimalnych, nie zawierających związków organicznych lub z dodatkiem prostych związków organicznych (np. kwasów organicznych – podłoże do hodowli bakterii fotosyntetyzujących) oraz czynników wzrostowych.

Jako źródła azotu dla drobnoustrojów w podłożach mikrobiologicznych wykorzystywane są najczęściej związki organiczne – aminokwasy i peptydy. Wiele mikroorganizmów – zwłaszcza żyjących w warunkach naturalnych – ma zdolność przyswajania azotu z soli amonowych, azotanów lub azotynów, a także azotu atmosferycznego; te ostatnie namnaża się na podłożach bezazotowych.

Źródłem siarki dla drobnoustrojów są najczęściej aminokwasy siarkowe, siarczyny, siarczany, H_2S , rzadziej siarka elementarna. Niezbędnymi składnikami podłoży mikrobiologicznych są również sole mineralne, utrzymujące właściwe ciśnienie osmotyczne podłoża, warunkujące optymalne pH środowiska, a niektóre z pierwiastków w nich zawartych (P, Fe, Mg, Cu) odgrywają bardzo ważną rolę w metabolizmie drobnoustrojów np. jako aktywatory enzymów lub składniki związków chemicznych w komórkach (chlorofil). Pierwiastki te występują w wyciągu mięsny, a ich ilość, w razie potrzeby, można zwiększyć przez dodanie do podłoża soli mineralnych. Pierwiastki potrzebne bakteriom w ilościach śladowych występują przeważnie jako zanieczyszczenie głównych składników podłoży.

Wszystkie pierwiastki, których obecność w podłożu jest konieczna dla prawidłowego wzrostu drobnoustrojów dzielimy na makro- i mikroelementy. Do makroelementów zaliczamy: węgiel, wodór, tlen, siarkę, fosfor, potas, sód, wapń, magnez i żelazo. Wśród mikroelementów najważniejsze znaczenie dla mikroorganizmów mają: mangan, molibden, cynk, miedź, kobalt, nikiel, wanad, bor, chlor, selen, krzem i wolfram.

Podłoża dla heterotrofów sporządza się najczęściej z wyciągów tkanek zwierzęcych, głównie mięsa wołowego lub końskiego; stosuje się też wyciągi z serc, wątroby lub mózgu zwierząt. Podstawowym podłożem stosowanym w bakteriologii jest wyciąg mięsny (bulion) obecnie dostępny w postaci gotowej, wysuszonej (zliofilizowanej); przygotowuje się go do hodowli bakterii wg przepisu podanego przez wytwórcę. W hodowli bakterii bardzo często wykorzystuje się pepton, tj. wysuszony hydrolizat białek zwierzęcych (mięso wołowe) lub roślinnych (np. soi). Trawienie tych białek może być przeprowadzone za pomocą kwasów nieorganicznych (np. HCl) lub enzymów (pepsyny, tripsyny, papainy). Kazeinę, również dodawaną do pożywek, otrzymuje się z odtłuszczonego mleka, przez wytrącenie HCl lub podpuszczką, a następnie trawienie na gorąco HCl . Najczęściej stosowane peptony to Proteose, Tryptose, Tryptone (polskie) oraz kwaśny hydrolizat kazeiny

– Casamino Acid B i Casitone – firmy Difco oraz Tripticase firmy BBL. Hydrolizaty zmielonych ziarn sojowych, również stosowane do celów mikrobiologicznych, są dostępne w handlu. Dodatkowe informacje na temat składników podłoży mikrobiologicznych znajdzie czytelnik w podręcznikach specjalistycznych, wydawanych przez firmy zajmujące się ich produkcją, np. Oxoid, Difco, Gibco, Bio Merieux i inne oraz Państwowy Zakład Higieny zainteresowany m. in. tą problematyką.

Pośród heterotrofów tylko nieliczne są prototrofami zdolnymi do wzrostu na podłożu zawierającym prosty związek organiczny (np. glukozę) oraz zestaw soli mineralnych. Aukstotrofy wymagają do wzrostu takich czynników wzrostowych jak aminokwasy, zasady purynowe i pirymidynowe, witaminy, których nie mogą wytworzyć z dostępnych im prekursorów. Jako źródło czynników wzrostowych najczęściej wykorzystuje się wyciąg z drożdży (np. *yeast extract* firmy Difco) lub ziemniaczany oraz przecier pomidorowy. Wyciągi drożdżowe otrzymywane w wyniku autolizy (autolizaty drożdżowe) lub plazmolizy drożdży piekarniczych stanowią mieszaninę aminokwasów lub (i) peptydów, witamin, puryn, pirymidyn, soli mineralnych oraz glukozy (woda drożdżowa).

Podłoża mikrobiologiczne dzielimy na zwykłe (podstawowe) i specjalne. Podłoża podstawowe (bulion odżywczy, woda peptonowa, brzczeźka) służą do hodowli większości drobnoustrojów i są wykorzystywane do przygotowywania podłoży specjalnych, stosowanych do izolacji i identyfikacji drobnoustrojów.

Ze względu na skład chemiczny podłoży dzielimy je na naturalne, półsyntetyczne i syntetyczne. Podłoże naturalne o nie w pełni zdefiniowanym składzie chemicznym to m. in. bulion odżywczy, brzczeźka, mleko odtłuszczone lub pełne. Są one podłożami pełnymi. Podłoża półsyntetyczne są częściowo poznane pod względem składu substancji odżywczych; przykładem może być podłoże M9 wg Adamsa wzbogacone dodatkiem glukozy i autolizatu drożdży, służące m. in. do hodowli drobnoustrojów *Proteus* i *Escherichia*. Skład chemiczny (jakościowy i ilościowy) podłoży syntetycznych jest w pełni określony. Jako przykłady można wymienić podłoża z mannitolem do hodowli *Azotobacter*, do hodowli nitryfikatorów oraz do badania mutantów aukstotroficznych. Podłoża półsyntetyczne i syntetyczne mogą być, w zależności od składu chemicznego, podłożami minimalnymi, pełnymi lub wzbogaconymi.

Podłoża mikrobiologiczne ze względu na konsystencję dzielimy na stałe (zawierające 1,5–2% agaru), półpłynne (z dodatkiem 0,1–0,7% agaru) oraz płynne. Te ostatnie służą przede wszystkim do namnażania drobnoustrojów. Na podłożach półpłynnych badamy np. ruch bakterii. Podłoża stałe mogą służyć do namnażania bakterii, ale przede wszystkim wykorzystywane są do ich różnicowania. Agar jest uniwersalnym, mikrobiologicznym czynnikiem zestalającym pożywki mikrobiologiczne, nie rozkładanym przez większość

bakterii. Otrzymuje się go z morskich krasnorostów *Selidium amansi* oraz *Glacilaria conforroides*, należących do *Rhodophyceae*, gdzie występuje w ścianie komórek. Preparat handlowy agaru (ekstrakt wodny glonów) jest mieszaniną dwóch węglowodanów – agarozy (70%) oraz agaropektyny. Agarozę jest polimerem galaktozy i 3,6 anhydro-L-galaktozy połączonych wiązaniem β 1,4 i 1,3, do których przyłączone są grupy sulfonowe. Agaropektyna jest bardziej złożona pod względem chemicznym i zawiera D-galaktozę, 3,6 anhydro- α -galaktozę, kwasy uronowe i grupy HSO_3 (dwukrotnie więcej niż w agarozie). Agar dostępny w handlu (włóknisty lub sproszkowany) rozpuszcza się w wodzie na gorąco w temperaturze 100°C , krzepnie zaś w temperaturze 45°C (stężenie 2%), w pH obojętnym (w niskim pH traci zdolność krzepnięcia). Drugim często stosowanym czynnikiem zestalającym podłoża jest białko – żelatyna – produkt hydrolizy kolagenu, tj. białka zwierzęcej tkanki łącznej. Otrzymuje się ją w wyniku długotrwałego gotowania skóry, ścięgien i kości zwierzęcych. Żelatyna, nierozpuszczalna na zimno, w wodzie gorącej pęcznieje, a po ochłodzeniu tworzy żel, który jednak upłynnia się już w temperaturze $22\text{--}25^\circ\text{C}$, co stanowi dużą niedogodność w hodowli bakterii. Na podłożu z żelatyną bada się typ wzrostu oraz zdolność wytwarzania przez drobnoustroje żelatynazy – enzymu hydrolizującego żelatynę. Jako zestalacz podłoży mikrobiologicznych rzadko stosowany jest żel krzemionkowy, służący do przygotowywania pożywek stałych bez składników organicznych.

Podłoża mikrobiologiczne, ze względu na przeznaczenie i zastosowanie, dzielimy na namnażające, wybiórcze, namnażająco-wybiórcze, izolacyjne i różnicujące (identyfikacyjne, diagnostyczne). Podłoża namnażające, najczęściej płynne, rzadziej w postaci skosów agarowych lub płytek oraz butli Roux, służą do otrzymywania dużej biomasy drobnoustrojów badanego szczepu. Pożywki wybiórcze zawierają dodatek związku(ów) chemicznych hamujących wzrost konkretnej grupy drobnoustrojów. Podłoża namnażająco-wybiórcze pozwalają na namnożenie się tylko jednemu rodzajowi lub gatunkowi drobnoustrojów lub jednej grupie mikroorganizmów, znajdujących się w posiewanym materiale. Podłoża te zawierają składniki hamujące wzrost jednych i ułatwiające namnażanie drugich drobnoustrojów. Przykładem takiego podłoża może być podłoże bezazotowe z mannitolem do hodowli bakterii wiążących azot atmosferyczny (*Azotobacter* sp.); podłoże z kwaśnym seleninem sodu hamujące wzrost *E. coli* i wykorzystywane do namnażania *Salmonella* sp. z kału lub próbek żywności; podłoże Kauffmana z czterotioanem sodowym i żółcią hamujące wzrost wszystkich bakterii występujących w kale z wyjątkiem *Salmonella* sp. Podłoża izolacyjne to podłoża stałe (płytki), zawierające odpowiedni wskaźnik (identyfikator) pozwalający odróżnić od siebie kolonie bakterii. Przykładem takich podłoży mogą być płytka Endo z laktozą do diagnostyki *Enterobacteriaceae*, podłoże Chapmana z mannitolem do hodowli

gronkowców, podłoże Clauberga z tellurem potasu do hodowli *Corynebacterium* sp. Podłoża identyfikacyjne, na których bada się właściwości biochemiczne bakterii zostaną omówione w rozdziale 15.

Specjalną grupę podłoży stanowią podłoża „transportowe” służące do zabezpieczenia materiału mikrobiologicznego na czas przenoszenia go od pacjenta do laboratorium. Są to najczęściej dobrze zbuforowane podłoża minimalne bez składników odżywczych, zawierające jedynie sole mineralne.

4. STERYLIZACJA (WYJAŁAWIANIE)

Wyjaławianiem nazywamy proces zabijania drobnoustrojów, zarówno ich komórek wegetatywnych, jak również form przetrwalnych. Postępowanie to ma szczególne znaczenie tam, gdzie należy się posługiwać jałowym sprzętem i pracować w jałowym otoczeniu. Sterylne warunki pracy powinny być więc zachowane m. in. w szpitalach, na salach operacyjnych i gabinetach zabiegowych, przy produkcji niektórych leków, płynów infuzyjnych, preparatów krwiopochodnych, środków opatrunkowych oraz sztucznych elementów organów (protez). Praca w warunkach jałowych, posługiwanie się jałowym sprzętem, niszczenie wykorzystanych hodowli i materiałów mikrobiologicznych w laboratorium, to czynności, które przynajmniej w podstawowym zakresie powinny być znane osobom rozpoczynającym doświadczenia z drobnoustrojami.

Steryлизację można przeprowadzić posługując się metodami fizycznymi, chemicznymi lub mechanicznymi.

4.1. Metody fizyczne

Wyróżniamy następujące fizyczne metody sterylizacji:

- wysoką temperaturą (sterylizacja cieplna – sucha i parą wodną),
- promieniami ultrafioletowymi (UV),
- promieniami jonizującymi,
- sączenie.

4.1.1. Sterylizacja cieplna – sucha

4.1.1.1. Wyjaławianie przez wyżarzanie

Sterylizacja przez wyżarzanie w płomieniu palnika gazowego służy do wyjaławiania ezy (drucika z oczkiem wykonanego z platyny lub ze stopu platynopodobnego) i igieł preparacyjnych. Niszczenie drobnoustrojów, polegające na ich spalaniu, jest stosowane przed i po szczepieniu pożywki za

pomocą ezy. Aby sterylizacja ezy była efektywna, należy pamiętać o konieczności ogrzewania drucika ezy do czerwonego żaru.

4.1.1.2. Wyjaławianie przez opalanie

Opalanie w płomieniu palnika brzegów probówek lub kolb (po wyjęciu korka) stosuje się w celu zapobieżenia zakażeniu drobnoustrojami z zewnątrz. W płomieniu opalamy też bagietki, głaszczki szklane oraz szkiełka podstawowe do preparatów mikroskopowych. Przedmioty te, a także skalpele, łopatki metalowe, pensety, grube igły preparacyjne sterylizuje się również przez zanurzenie w alkoholu etylowym i opalenie w płomieniu palnika gazowego.

4.1.1.3. Wyjaławianie gorącym suchym powietrzem

Sterylizacja suchym gorącym powietrzem służy do wyjaławiania szkła laboratoryjnego, a także trwałych materiałów lub przedmiotów stalowych, np. opraw metalowych do filtrów, cylinderek do badania wrażliwości na antybiotyki, kuleczek szklanych oraz materiałów sypkich itp. Steryлизację tą metodą wykonuje się w suszarkach w temperaturze 140°C przez 2,5 godziny, 160°C – 2 godziny lub 180°C – 1 godzinę. Szkło laboratoryjne do sterylizacji przygotowujemy w sposób następujący: probówki zakrywamy korkami z waty, ligniny lub metalowymi, kolby korkami ligninowymi lub „kołderkami” i kawałkami folii aluminiowej. Płytki Petrego oraz pipety zawijamy w papier lub umieszczamy w metalowych puszkach oraz w tubusach. Ustniki pipet zabezpieczamy wacikami.

4.1.2. Sterylizacja cieplna – mokra (parą wodną)

4.1.2.1. Dekoktacja – wyjaławianie przez gotowanie

W przeszłości powszechnie stosowano ogrzewanie w temperaturze wrzenia wody strzykawek, igieł iniekcyjnych, instrumentów chirurgicznych w szczelnie zamkniętych sterylizatorach elektrycznych lub zwykłych, podgrzewanych na maszynkach elektrycznych lub płomieniem palnika gazowego. Obecnie ten sposób sterylizacji powinien być ograniczony jedynie do wyjątkowych sytuacji, gdyż zabieg ten nie niszczy wirusów zapalenia wątroby, a także przetrwalników bakterii. Posługując się tą metodą należy pamiętać o stosowaniu wody destylowanej (w szczególnych warunkach można użyć wody przegotowanej), gdyż gotowanie w wodzie wodociągowej pozostawia nalot na strzykawkach lub wewnątrz igieł.

4.1.2.2. Pasteryzacja

Przyjmuje się, że działanie na drobnoustroje temperaturą do 100°C nazywane jest pasteryzacją, stosowanie zaś temperatury powyżej 100°C określane jest sterylizacją. Pasteryzacja jest to proces zniszczenia form wegetatywnych drobnoustrojów obecnych w środowisku płynnym, np. produktach spożywczych: mleku i jego przetworach, piwie, sokach owocowych itp. Pasteryzacja ma na celu zabicie bakterii chorobotwórczych w produktach spożywczych oraz przedłużenie trwałości tych produktów w wyniku zniszczenia większości drobnoustrojów saprofitycznych nieprzetrwalnikujących. Wyróżniamy pasteryzację niską (długotrwałą), polegającą na ogrzaniu produktu do temperatury 63–65°C przez 30 minut, oraz pasteryzację wysoką (szybką), kiedy pasteryzowany płyn, przepływający cienką warstwą przez specjalny aparat, jest ogrzewany w ciągu 15 sekund do 72°C (lub 90°C – wtedy bez zatrzymywania w aparacie).

Wiele lat temu podjęto również badania nad możliwością użycia do pasteryzacji mleka temperatury wyższej, tzn. takiej, która powodowałaby większą redukcję liczby bakterii w porównaniu z metodami dotychczas stosowanymi. Z chwilą wprowadzenia dynamicznych metod pasteryzacji (przepływowych) stało się możliwe działanie na mleko lub jego przetwory temperatury wyższej od stosowanej w tradycyjnych technologiach. Nową technologię pasteryzacji określono terminem obróbki termicznej UHT (*Ultra High Temperature* – temperatura „ultrawysoka”). Technologia ta pozwala nawet na pełną sterylizację mleka. W metodzie UHT wyróżnia się tzw. pasteryzację szybką (HTST – *High Temperature Short Time* – wysoka temperatura, krótki czas) oraz tzw. ultraszybką, określaną przez niektórych autorów jako rzeczywistą „pasteryzację – UHT”. Obie metody pozwalają uzyskać mleko o przedłużonej trwałości, przede wszystkim dlatego, iż jest ono wolne (poza nielicznymi szczepami) od bakterii psychrotrofowych (zdolnych do wzrostu w niskich temperaturach). W technologii właściwej UHT stosuje się temperaturę 130–150°C przez kilka sekund (dla mleka nie opakowanego). Efektem takiego działania jest otrzymanie mleka w pełni jałowego, ze zainaktywowanymi wirusami pryszczycy. Technologia UHT ma wiele zalet, ale i nie pozbawiona jest wad. Do przetwarzania w tej technologii nadaje się mleko jedynie o bardzo wysokiej czystości mikrobiologicznej i nie zawierające enzymów bakteryjnych. Metoda ta prowadzi również do koagulacji białek mleka, jego gorknienia oraz częściowego rozkładu. Należy dodać, iż warunki pasteryzacji określają przepisy poszczególnych krajów. Każda metoda pasteryzacji kończy się gwałtownym schłodzeniem produktu, tak aby nie stracił swoich wartości odżywczych.