

SPIS TREŚCI

ROZDZIAŁ PIERWSZY: LABORATORIUM MIKROBIOLOGICZNE I PODSTAWY ASEPTYKI	13
WSTĘP TEORETYCZNY	13
1.1. Zasady BHP	13
1.1.1. Ogólne zasady BHP dotyczące pracy w laboratorium	13
1.1.2. Dodatkowe zasady BHP dotyczące pracy w laboratorium mikrobiologicznym	15
1.2. Wyposażenie laboratorium mikrobiologicznego.....	16
1.3. Podstawy aseptyki	19
1.3.1. Sterylizacja (wyjaławianie).....	19
1.3.1.1. Metody fizyczne	19
1.3.1.1.1. Metody temperaturowe	20
1.3.1.1.2. Promieniowanie elektromagnetyczne	23
1.3.1.2. Metody mechaniczne (sączenie)	25
1.3.1.3. Metody chemiczne	27
1.3.1.4. Kontrola sterylizacji	27
1.3.2. Dezynfekcja	28
1.3.2.1. Metody temperaturowe	28
1.3.2.1.1. Dekoktacja (gotowanie)	28
1.3.2.1.2. Pasteryzacja	28
1.3.2.2. Chemiczne środki dezynfekcyjne	29
1.3.2.2.1. Kwasy i zasady	30
1.3.2.2.2. Środki utleniające	30
1.3.2.2.3. Alkohole	31
1.3.2.2.4. Aldehydy	31
1.3.2.2.5. Związki fenolu i ich pochodne	31
1.3.2.2.6. Detergenty.....	32
1.3.2.2.7. Jodofory	32
1.3.2.2.8. Chlorheksydyna	33
1.3.2.2.9. Sole metali ciężkich.....	33
1.4. Antybiotyki jako antyseptyki	34

CZĘŚĆ PRAKTYCZNA	39
1.5. Przygotowywanie szkła laboratoryjnego do sterylizacji	39
1.6. Przygotowywanie korków z waty	40
1.7. Jałowe rozlewanie pożywek	41
1.8. Kontrola sterylności podłoża wylewanych w sposób jałowy i niejałowy	42
1.9. Testowanie skuteczności różnych środków dezynfekcyjnych	43
1.10. Wpływ antybiotyków i chemioterapeutyków na wzrost mikroorganizmów	44

ROZDZIAŁ DRUGI:

PODŁOŻA I HODOWLE MIKROBIOLOGICZNE	45
WSTĘP TEORETYCZNY	45
2.1. Wymagania odżywcze i środowiskowe drobnoustrojów	45
2.1.1. Odżywianie i pozyskiwanie energii	45
2.1.2. Zapotrzebowanie na tlen	46
2.1.3. Optymalna temperatura wzrostu	46
2.1.4. Odczyn środowiska	47
2.2. Wzajemne oddziaływania pomiędzy drobnoustrojami	48
2.2.1. Komensalizm	48
2.2.2. Mutualizm	48
2.2.3. Antagonizm	50
2.2.4. Drapieżnictwo	50
2.2.5. Pasożytnictwo	50
2.3. Podłoża mikrobiologiczne	51
2.3.1. Definicja i cel stosowania pożywek	51
2.3.2. Warunki stawiane pożywkom	52
2.3.2.1. Wartość odżywcza	52
2.3.2.2. Odczyn	53
2.3.2.3. Izotoniczność	53
2.3.2.4. Sterylność	55
2.3.2.5. Przejrzystość	55
2.3.3. Podział pożywek	56
2.3.3.1. Podział pożywek według charakteru składników	56
2.3.3.2. Podział pożywek według wymagań odżywczych drobnoustrojów i zastosowań	56
2.3.3.2.1. Pożywki minimalne	56
2.3.3.2.2. Pożywki pełne proste	56
2.3.3.2.3. Pożywki złożone	57
2.3.3.2.4. Pożywki specjalne	57
2.3.3.2.5. Pożywki namnażające	58
2.3.3.2.6. Pożywki wybiórcze	58
2.3.3.2.7. Pożywki wybiórczo-namnażające	59
2.3.3.2.8. Pożywki różnicujące	59
2.3.3.2.9. Pożywki różnicująco-wybiórcze	60

2.3.3.2.10. Pożywki transportowe	63
2.3.3.3. Podział pożywek według konsystencji	63
2.3.4. Sporządzanie podstawowych pożywek	65
2.3.4.1. Bulion odżywczy	65
2.3.4.2. Agar odżywczy	66
2.4. Hodowle mikrobiologiczne	66
2.4.1. Gatunek, klon i szczep w mikrobiologii	66
2.4.2. Metody otrzymywania czystych kultur	69
2.4.2.1. Metody bezpośrednie	69
2.4.2.2. Metody pośrednie	69
2.4.2.2.1. Metody posiewowe	69
2.4.2.2.2. Metoda replik (płytek odciskowych)	73
2.4.3. Typy hodowli drobnoustrojów	74
2.4.3.1. Hodowla zamknięta	74
2.4.3.2. Hodowla otwarta	76
2.4.3.3. Hodowle tlenowców i beztlenowców	77
2.4.3.3.1. Metody hodowli tlenowców	77
2.4.3.3.2. Metody hodowli beztlenowców	77
2.4.4. Przechowywanie mikroorganizmów	79
CZĘŚĆ PRAKTYCZNA	80
2.5. Test właściwości różnicująco-wybiórczych agaru Endo	80
2.6. Test właściwości różnicująco-wybiórczych agaru Chapmana	81
2.7. Test zapotrzebowania grzyba <i>Aspergillus niger</i> na pierwiastki biogenne i makroelementy	81
2.8. Test na wykorzystywanie przez <i>Aspergillus niger</i> różnych źródeł węgla	83
2.9. Izolacja czystych kultur z materiału mieszanego	84

ROZDZIAŁ TRZECI:

MIKROFLORA CZŁOWIEKA	87
WSTĘP TEORETYCZNY	87
3.1. Mikroflora jelita	88
3.2. Mikroflora skóry	90
3.3. Mikroorganizmy chorobotwórcze	91
CZĘŚĆ PRAKTYCZNA	98
3.4. Badanie mikroflory skóry metodą odciskową	98
3.5. Badanie mikroflory skóry, jamy ustnej i jamy nosowo-gardłowej metodą wymazów	98

ROZDZIAŁ CZWARTY:

BADANIA MIKROBIOLOGICZNE WÓD	101
WSTĘP TEORETYCZNY	101
4.1. Mikroflora autochtoniczna	101
4.2. Mikroflora allochtoniczna	107

4.3.	Mikroorganizmy wskaźnikowe w badaniach wód	109
4.3.1.	Laseczki beztlenowe redukujące siarczany(IV)	112
4.3.2.	Paciorkowce kałowe	113
4.3.3.	Bakterie grupy <i>coli</i> typu ogólnego oraz bakterie grupy <i>coli</i> typu kałowego.....	113
4.3.4.	Pozostałe mikroorganizmy wskaźnikowe.....	115
4.3.5.	Inne oznaczenia mikrobiologiczne wykorzystywane w analizie wód.....	118
CZĘŚĆ PRAKTYCZNA		120
4.4.	Pobieranie próbek wody do badań mikrobiologicznych.....	120
4.5.	Transport próbek	120
4.6.	Pojęcie miana, wskaźnika (indeksu) oraz NPL w badaniach mikrobiologicznych wód.....	121
4.7.	Pojęcie i metodyka systemu posiewów w badaniach mikrobiologicznych wód oraz określanie liczebności drobnoustrojów	121
4.7.1.	Posiewy na podłoża płynne: wyznaczenie miana i NPL.....	121
4.7.2.	Posiewy na podłoża stałe: wyznaczenie liczebności mikroorganizmów	123
4.7.3.	Metoda filtrów membranowych: wyznaczenie liczebności mikroorganizmów w postaci wskaźnika	124
4.8.	Oznaczenie liczebności bakterii psychrofilnych i mezofilnych metodą płytkową.....	125
4.9.	Oznaczenie liczebności bakterii grupy <i>coli</i> typu ogólnego metodą próbówkową.....	126
4.9.1.	Badania wstępne	127
4.9.2.	Badania potwierdzające	129
4.9.3.	Badania uzupełniające	130
4.9.3.1.	Badanie wtórnej fermentacji laktozy	131
4.9.3.2.	Barwienie metodą Grama	131
4.9.3.3.	Test na obecność oksydazy cytochromowej	133
4.10.	Oznaczenie liczebności bakterii grupy <i>coli</i> typu kałowego metodą próbówkową.....	134
4.10.1.	Badania wstępne	135
4.10.2.	Badania potwierdzające	135
4.10.3.	Badania identyfikacyjne.....	136
4.10.4.	Test szybki.....	137
4.11.	Oznaczenie liczebności bakterii grupy <i>coli</i> typu kałowego metodą filtracji membranowej	137
4.12.	Oznaczenie liczebności beztlenowych przetrwalników redukujących siarczany(IV) (<i>Clostridium perfringens</i>) metodą próbówkową.....	138
4.13.	Oznaczenie liczebności beztlenowych przetrwalników redukujących siarczany(IV) (<i>Clostridium perfringens</i>) metodą filtracji membranowej	139

4.14. Oznaczanie liczebności paciorkowców kałowych metodą próbówką	140
4.14.1. Badania wstępne	141
4.14.2. Badania potwierdzające	142
4.15. Oznaczanie liczebności paciorkowców kałowych metodą filtracji membranowej	142
4.15.1. Badania wstępne	142
4.15.2. Badania potwierdzające	143
4.16. Oznaczanie liczebności <i>Pseudomonas aeruginosa</i> metodą próbówką	143
4.16.1. Badania wstępne	144
4.16.2. Badania potwierdzające	145
4.16.2.1. Badanie zdolności wzrostu w temperaturze 41,5°C	145
4.16.2.2. Test na zdolność wykorzystywania acetamidu	146
4.16.2.3. Barwienie metodą Grama	146
4.16.2.4. Test na obecność oksydazy cytochromowej	146
4.17. Oznaczanie liczebności <i>Pseudomonas aeruginosa</i> metodą filtracji membranowej	147
4.17.1. Badania wstępne	148
4.17.2. Badania potwierdzające	149
4.18. Oznaczanie obecności bakterii z rodzaju <i>Beggiatoa</i>	149
4.18.1. Badania wstępne	150
4.18.2. Badania potwierdzające	150
4.18.2.1. Ekstrakcja siarki	150
4.18.2.2. Zdolność pełzania na agarze	151
4.19. Oznaczanie liczebności <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> metodą próbówką	151
4.20. Oznaczanie liczebności heterotroficznych bakterii wytrącających żelazo metodą próbówką	152
4.21. Oznaczanie liczebności <i>Thiobacillus thioparus</i> metodą próbówką	153
4.22. Oznaczanie liczebności <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> metodą próbówką	154
4.23. Oznaczanie obecności <i>Desulfotomaculum nigrificans</i>	154
4.24. Oznaczanie liczebności promieniowców metodą płytkową	155
4.25. Oznaczanie liczebności bakterii amonifikacyjnych metodą próbówką	157
4.26. Oznaczanie liczebności autotroficznych bakterii nitryfikacyjnych metodą próbówką	158
4.27. Oznaczanie liczebności bakterii denitryfikacyjnych metodą próbówką	160

ROZDZIAŁ PIĄTY:

BADANIA MIKROBIOLOGICZNE GLEB	171
WSTĘP TEORETYCZNY	171

5.1.	Gleba jako środowiska życia mikroorganizmów	171
5.1.1.	Związki mineralne gleby	171
5.1.2.	Substancja organiczna.....	172
5.1.3.	Powietrze glebowe	174
5.1.4.	Roztwory glebowe.....	175
5.1.5.	Organizmy glebowe.....	175
5.2.	Proces samooczyszczania gleby	182
5.3.	Wskaźniki sanitarne w badaniach gleb	184
	CZĘŚĆ PRAKTYCZNA	186
5.4.	Pobieranie próbek gleby do badań mikrobiologicznych.....	186
5.5.	Przygotowanie próbek gleby do badań	186
5.6.	Pojęcie miana oraz NPL w badaniach mikrobiologicznych gleb ..	187
5.7.	Pojęcie i metodyka posiewów w oznaczeniach mikrobiologicznych gleb oraz wyznaczanie liczebności drobnoustrojów.....	188
5.7.1.	Posiewy na podłoża płynne: określanie miana i NPL	188
5.7.2.	Posiewy na podłoża stałe: określanie liczebności mikroorganizmów	190
5.7.3.	Oznaczanie suchej masy próbki i obliczanie ostatecznej liczebności mikroorganizmów	192
5.8.	Oznaczanie liczebności bakterii mezofilnych i termofilnych metodą płytkową.....	192
5.9.	Oznaczanie liczebności bakterii przetrwalnikujących metodą płytkową	193
5.10.	Oznaczanie liczebności bakterii grupy <i>coli</i> typu ogólnego i kałowego metodą próbówkową	194
5.10.1.	Badania wstępne	194
5.10.2.	Badania potwierdzające	195
5.10.3.	Badania uzupełniające	197
5.10.3.1.	Barwienie metodą Grama	197
5.10.3.2.	Identyfikacja biochemiczna.....	197
5.11.	Oznaczanie liczebności beztlenowych bakterii przetrwalnikujących redukujących siarczany(IV) (<i>Clostridium perfringens</i>) metodą próbówkową.....	198
5.11.1.	Badania wstępne	199
5.11.2.	Badania potwierdzające	199
5.11.3.	Badania uzupełniające	200
5.12.	Oznaczanie obecności bakterii z rodzaju <i>Salmonella</i>	201
5.13.	Oznaczanie liczebności paciorkowców kałowych metodą płytkową	202
5.14.	Izolowanie z gleby bakterii wiążących wolny azot oraz przeprowadzających fermentację masłową	203
5.15.	Oznaczanie liczebności bakterii amonifikacyjnych, nityfikacyjnych i denityfikacyjnych	205
5.16.	Izolowanie z gleby bakterii z rodzaju <i>Bacillus</i>	206

ROZDZIAŁ SZÓSTY:

BADANIA MIKROBIOLOGICZNE POWIETRZA..... 209

WSTĘP TEORETYCZNY 209

6.1. Mikroflora powietrza.....209

6.2. Mikroorganizmy wskaźnikowe w badaniach powietrza214

6.3. Metody mikrobiologicznego badania powietrza217

6.3.1. Metody mikroskopowe217

6.3.2. Metody hodowlane218

6.3.2.1. Metoda sedymentacyjna Kocha218

6.3.2.2. Metoda uderzeniowa219

6.3.2.3. Metoda membranowa.....219

6.3.2.4. Metoda płuczkowa219

6.3.3. Inne oznaczenia220

CZĘŚĆ PRAKTYCZNA 220

6.4. Badanie czystości powietrza metodą sedymentacyjną220

ROZDZIAŁ SIÓDMY:

METABOLIZM MIKROORGANIZMÓW..... 223

WSTĘP TEORETYCZNY 223

7.1. Odżywianie i pozyskiwanie energii.....223

7.2. Obieg węgla230

7.3. Obieg azotu231

7.3.1. Wiązanie azotu cząsteczkowego233

7.3.1.1. Wiązanie azotu przez bakterie symbiotyczne234

7.3.1.2. Wiązanie azotu przez bakterie wolno żyjące i sinice.....234

7.3.2. Rozkład białek (proteoliza i amonifikacja).....235

7.3.3. Rozkład mocznika236

7.3.4. Nitryfikacja: utlenianie amonu i soli amonowych237

7.3.5. Denitryfikacja.....238

7.4. Obieg siarki239

7.4.1. Asymilacja związków siarki.....239

7.4.2. Desulfuryzacja materii organicznej oraz redukcja siarczanów(VI)240

7.4.3. Utlenianie zredukowanych związków siarki240

7.5. Obieg fosforu242

7.6. Utlenianie żelaza244

7.7. Utlenianie wodoru cząsteczkowego oraz tlenku węgla244

7.8. Bakterie fototroficzne245

7.8.1. Purpurowe bakterie siarkowe, purpurowe bakterie beziarkowe i zielone bakterie siarkowe oraz heliobakterie245

7.8.2. Sinice.....246

7.9. Rozkład wybranych substancji naturalnych247

7.9.1. Glukoza247

7.9.2. Celuloza248

7.9.3. Ksylan.....	249
7.9.4. Skrobia oraz inne glukany i fruktany.....	250
7.9.5. Pektyny	250
7.9.6. Agar	251
7.9.7. Chityna	251
7.9.8. Lignina.....	251
7.9.9. Tłuszcze	253
7.9.10. Węglowodory	253
7.9.10.1. Metan, etan, propan i butan.....	253
7.9.10.2. Alkany długołańcuchowe	254
7.9.10.3. Węglowodory aromatyczne	254
7.9.11. Ksenobiotyki	255
7.10. Wykorzystanie w praktyce zdolności metabolicznych mikroorganizmów	255
7.11. Testy do szybkiej identyfikacji biochemicznej mikroorganizmów (API).....	256
CZĘŚĆ PRAKTYCZNA	261
7.12. Charakterystyka morfologiczna kolonii.....	261
7.13. Procesy oddechowe mikroorganizmów i próby fermentacyjne...263	263
7.13.1. Określenie stosunku do tlenu.....	263
7.13.2. Oddychanie azotanowe.....	266
7.13.3. Próba na redukcję błękitu metylenowego	268
7.13.4. Próby fermentacyjne	269
7.13.5. Próba na podłożu trójcukrowym (TSI).....	270
7.13.6. Próba na podłożu Hughha i Leifsona (OF).....	273
7.13.7. Próba na podłożu mlecznym z lakmusem	276
7.13.8. Próba na wytwarzanie katalazy.....	280
7.13.9. Próba na wytwarzanie oksydazy cytochromowej (test Kovácsa).....	281
7.14. Obieg azotu	283
7.14.1. Wiązanie azotu cząsteczkowego	283
7.14.2. Rozkład białek (proteoliza)	284
7.14.3. Dekarboksylacja aminokwasów w warunkach beztlenowych ...285	285
7.14.4. Deaminacja aminokwasów	286
7.14.5. Amonifikacja	286
7.14.6. Rozkład mocznika	287
7.14.7. Nitryfikacja	289
7.14.8. Denitryfikacja: redukcja azotanów(V)	290
7.15. Obieg siarki	292
7.15.1. Redukcja siarczanów(VI).....	292
7.15.2. Wytwarzanie siarkowodoru w wyniku rozkładu aminokwasów zawierających siarkę	292
7.16. Obieg fosforu	294
7.16.1. Rozkład organicznych połączeń fosforu	294
7.16.2. Rozpuszczanie mineralnych fosforanów	294

7.17. Rozkład celulozy	295
7.17.1. Test z użyciem pasków bibułowych	295
7.17.2. Test na rozkład karboksymetylocelulozy	296
7.18. Rozkład skrobi	297
7.19. Rozkład tłuszczów	298
7.20. Rozkład eskuliny	299
7.20.1. Test na podłożu z eskuliną i żółcią	299
7.20.2. Szybki test na rozkład eskuliny	300
7.21. Próba na wytwarzanie indolu (I)	300
7.22. Próba z czerwienią metylową (M, MR)	302
7.23. Próba na wytwarzanie acetoiny (V, VP)	303
7.24. Badanie zdolności wzrostu na cytrynianie (C)	305
7.25. Badanie zdolności hemolitycznych	305
7.26. Badanie zdolności wzrostu przy podwyższonej zawartości chlorku sodu	306
7.27. Próba na wytwarzanie koagulazy	307
7.28. Test wrażliwości na antybiotyki	308
7.29. Test na ruchliwość	310
7.30. Badanie zdolności tworzenia wgłębień w pożywce agarowej	311

ROZDZIAŁ ÓSMY:

MIKROSKOPIA

I BARWIENIE DROBNOUSTROJÓW

WSTĘP TEORETYCZNY

8.1. Mikroskopia	313
8.1.1. Lupa	314
8.1.2. Złożone mikroskopy świetlne	314
8.1.2.1. Mikroskop świetlny zwykły	314
8.1.2.1.1. Budowa mikroskopu świetlnego zwykłego	314
8.1.2.1.2. Powiększenie mikroskopu	316
8.1.2.1.3. Zdolność rozdzielcza mikroskopu i immersja	317
8.1.2.1.4. Powstawanie obrazu w mikroskopie zwykłym	320
8.1.2.2. Mikroskop ultrafioletowy	321
8.1.2.3. Mikroskop ciemnego pola (ultramikroskop)	321
8.1.2.4. Mikroskop fluorescencyjny (luminescencyjny)	323
8.1.2.5. Mikroskop kontrastowo-fazowy	324
8.1.2.6. Mikroskop interferencyjny	326
8.1.3. Mikroskopy elektronowe	327
8.1.3.1. Elektronowy mikroskop transmisyjny (TEM)	329
8.1.3.2. Elektronowy mikroskop skaningowy (SEM)	330
8.2. Barwienie drobnoustrojów	330
8.2.1. Preparaty żywe i martwe	333
8.2.2. Barwienie przyżyciowe	333
8.2.3. Barwienie proste i złożone	334

8.2.4. Barwienie pozytywne, negatywne i negatywno-pozytywne.....	334
8.2.5. Przykłady różnych typów barwienia w mikrobiologii	334
8.2.5.1. Barwienie metodą Grama	334
8.2.5.2. Barwienie negatywno-pozytywne.....	339
8.2.5.3. Barwienie przetrwalników	339
8.2.5.4. Barwienie bakterii kwasoopornych	340
CZĘŚĆ PRAKTYCZNA	341
8.3. Przygotowanie preparatu	341
8.4. Oglądanie preparatów pod immersją	342
8.5. Proste barwienie bakterii: pozytywne i negatywne.....	343
8.6. Barwienie bakterii metodą Grama	344
8.7. Test z użyciem KOH	344
8.8. Barwienie przetrwalników metodą Schaeffer i Fultona	345
8.9. Barwienie otoczek metodą Burriego i Ginsa	346
8.10. Barwienie bakterii kwasoopornych metodą Ziehla i Neelsena....	346
8.11. Obserwacja ruchów bakterii w kropli wiszącej.....	347
8.12. Barwienie przyżyciowe drożdży	347
8.13. Barwienie substancji zapasowych (glikogenu)	348
LITERATURA	349
SPIS RYSUNKÓW.....	353
SPIS TABEL	359