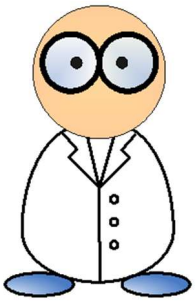
# Ćwiczenie 1

## Temat: Wprowadzenie do ćwiczeń laboratoryjnych z mikrobiologii

### Bezpieczeństwo i higiena pracy w laboratorium mikrobiologicznym

W ramach ćwiczeń laboratoryjnych mamy do czynienia z metodami mikrobiologicznymi mającymi na celu wykrywanie i badanie różnych grup mikroorganizmów zarówno pożądanych jak i szkodliwych, które występują w halach produkcyjnych, magazynach, na opakowaniach, a także w surowcach i produktach rolno-spożywczych. Aby zapobiec przypadkowemu zakażeniu oraz uniknąć zranień lub oparzeń w trakcie wykonywania poszczególnych czynności w laboratorium wymaga się stosowania właściwych warunków pracy. W tym celu przed rozpoczęciem ćwiczeń studenci są zobowiązani do zapoznania się z następującymi zasadami bezpiecznej i prawidłowo wykonywanej pracy:



- ✓ W laboratorium mikrobiologicznym należy przebywać w **fartuchu ochronnym** z długimi rękawami uszytym z naturalnego materiału. Spod fartucha nie mogą wystawać elementy odzieży codziennej (np. golfy, kaptury, kołnierzyki, mankiety). Ubrania wierzchnie (płaszcze) należy zostawiać w szatni uczelni. Ponadto wymagane są umyte dłonie, związane włosy oraz posiadanie zeszytu do mikrobiologii, zapałek lub zapalniczki, markera do szkła, ołówka do rysunków oraz kilku gumek recepturek. Zabronione jest posiadanie: malowanych lub sztucznych paznokci, biżuterii oraz mocnego makijażu. Torby i torebki należy schować pod stół laboratoryjny przed przystąpieniem do zajęć. Nie wolno używać telefonów komórkowych ani innych urządzeń elektronicznych. Wszystkie czynności w laboratorium mikrobiologicznym wykonuje się w pozycji siedzącej.
- ✓ Na sali ćwiczeń nie wolno pić, jeść, palić, a także żuć gumy. W przypadku potrzeby krótkotrwałego opuszczenia sali ćwiczeń należy przed wyjściem umyć ręce i zawiadomić prowadzącego.
- ✓ Przed przystąpieniem do ćwiczeń należy zapoznać się z metodyką ćwiczeń oraz przestrzegać wskazówek dotyczących ich wykonania. Procedura postępowania będzie zawsze omówiona przez prowadzącego.
- ✓ W czasie wykonywania ćwiczeń przestrzegać zasad **jałowej pracy**, ostrożnie obchodzić się z materiałem badanym, wszelkie czynności związane z posiewami wykonywać przy zapalonym palniku, założone hodowle dokładnie opisywać (nr grupy, inicjały osoby wykonującej oznaczenie, nazwa posiewanego drobnoustroju). Na czas wykonywania posiewów odłożyć materiały i zeszyty.

Copyright©2026 KMŻ,TiChM

- ✓ Z sali ćwiczeń nie wolno wynosić na zewnątrz hodowli mikroorganizmów, preparatów, odczynników i szkła laboratoryjnego.
- ✓ Drobny sprzęt (skalpele, szczypce, pincety) należy zarówno przed jak i po użyciu opalić w płomieniu palnika w celu zniszczenia drobnoustrojów. Płytki Petriego, probówki z hodowlami powinny być zamknięte. Otwieramy je tylko na czas pobrania materiału i natychmiast zamykamy, lub wykonujemy to na wyraźne polecenie prowadzącego.
- ✓ Każde rozbicie szkła z hodowlami oraz wszelkie skaleczenia, oparzenia powstałe w trakcie zajęć należy niezwłocznie zgłosić prowadzącemu. Nie dotykać rozbitego szkła gołymi rękami.
- ✓ Używane szkło, szkiełka, pipety oraz założone hodowle odkładać do wyznaczonych przez prowadzącego pojemników. Niczego nie wylewać i nie zmywać.
- ✓ Po zakończeniu zajęć uporządkować stoły, sprawdzić czy zostały zgaszone palniki gazowe. Schować używane przedmioty do szafek (np. mikroskopy). Przemyć stoły środkiem, umyć ręce stosując środki dezynfekcyjne.

**Zasady zaliczania ćwiczeń laboratoryjnych z przedmiotu Mikrobiologia Żywności**

Warunkiem zaliczenia ćwiczeń z przedmiotu Mikrobiologia Żywności jest obecność na zajęciach, bezwzględnie przestrzeganie zasad BHP w laboratorium mikrobiologicznym, przygotowanie do zajęć (znajomość przewodnika obowiązującego na danym ćwiczeniu), praktyczne wykonanie ćwiczeń oraz pozytywna ocena ze wszystkich kolokwiów.
Terminarz kolokwiów zostanie podany przez prowadzącego lub wywieszony na tablicy ogłoszeń Katedry. Teoretyczny zakres kolokwiów obejmuje treść wykładów poszerzoną o notatki z ćwiczeń laboratoryjnych oraz wiedzę literaturową. Literatura tematu jest podana na tablicy ogłoszeń Katedry.

**Organizacja pracy laboratorium mikrobiologicznego**

Warunkiem sprawnej pracy mikrobiologa jest właściwa organizacja całej pracowni, na które składa się szereg pomieszczeń:

**Zmywalnia** – pomieszczenie przeznaczone do zmywania szkła laboratoryjnego i przygotowywania go do sterylizacji termicznej suchej w suszarkach laboratoryjnych.

**Pożywkarnia** – pomieszczenie, w którym przygotowywane są podłoża mikrobiologiczne, rozcieńczalniki, odczynniki chemiczne, barwniki.

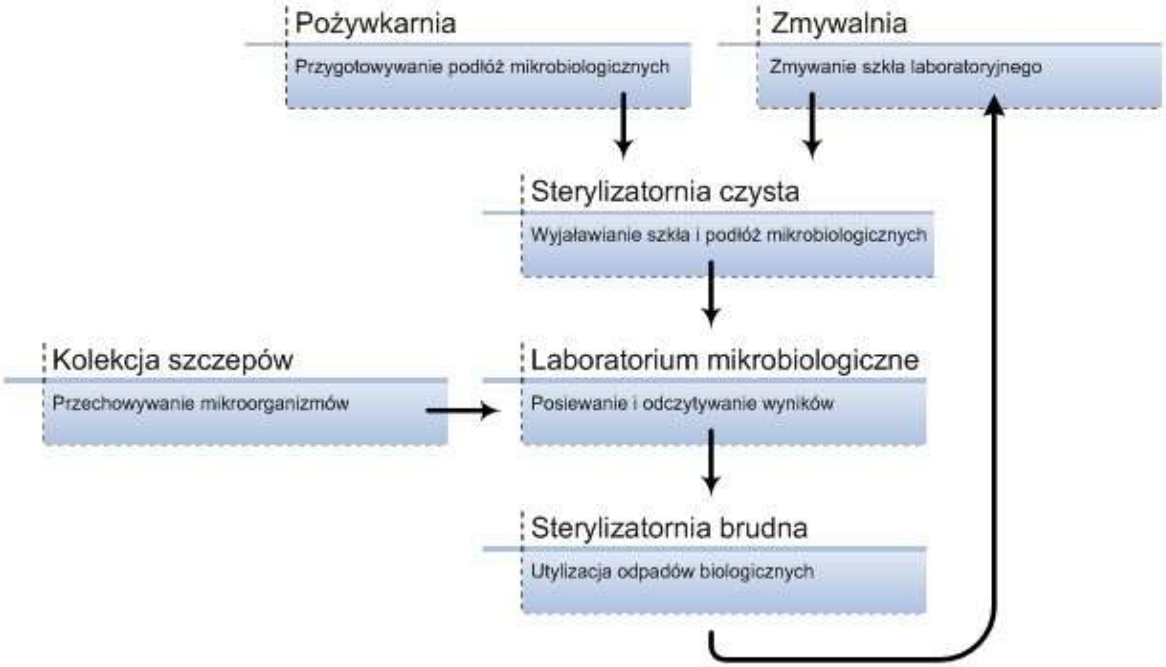
Copyright©**2026 KMŻ,TiChM**

**Sterylizatornia czysta** – pomieszczenie wyposażone najczęściej w autoklaw - do termicznego wyjaławiania podłóż mikrobiologicznych, suszarkę laboratoryjną – do sterylizacji szkła laboratoryjnego oraz aparat Kocha – do pasteryzacji.

**Sterylizatornia brudna** – pomieszczenie wyposażone w autoklaw przeznaczony do utylizacji posiewów i hodowli mikrobiologicznych.

**Laboratorium mikrobiologiczne posiewów i odczytów** – pomieszczenie możliwie odizolowane, jasne, umeblowane w sposób prosty, łatwy do mycia i dezynfekcji. W laboratorium powinien znajdować się specjalistyczny sprzęt oraz urządzenia takie jak komory laminarne do wykonywania posiewów, lampy UV służące do wyjaławiania pomieszczenia, cieplarki do hodowli drobnoustrojów tlenowych, anaerostaty do hodowli mikroorganizmów beztlenowych, homogenizator, Stomacher do ujednolicania prób, vortexy, mikroskopy, łaźnie wodne, ultra-termostaty, szafy chłodnicze i zamrażarki

**Kolekcja szczepów** – pomieszczenie wyposażone w szafy chłodnicze i zamrażarki do przechowywania szczepów na skosach agarowych, w formie liofilizatów lub zamrożonych.




Rysunek 1 – Organizacja pracy w pracowni mikrobiologicznej

**Metody wyjaławiania**

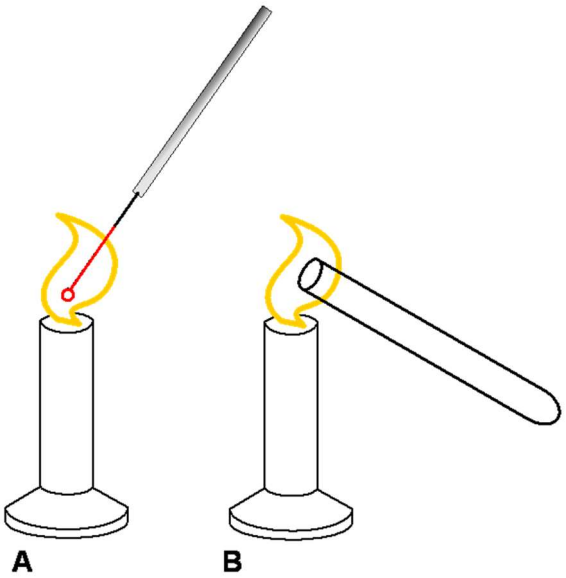
Podstawą pracy w laboratorium mikrobiologicznym jest stworzenie warunków jałowych, a więc pozbawienie szkła, podłóż, narzędzi i przyrządów mikroflory. Oznacza to, że drobnoustroje (zarówno formy wegetatywne jak i przetrwalne) występujące na ich powierzchni

lub w objętości powinny zostać zabite w procesie wyjaławiania metodami fizycznymi, chemicznymi lub mechanicznymi przez filtrację albo promieniowanie.

**Fizyczne metody wyjaławiania**

**Sterylizacja termiczna sucha**

Wyjaławianie w **suszarkach** przeprowadza się za pomocą **gorącego suchego powietrza**, które powoduje denaturację białek i kwasów nukleinowych drobnoustrojów. W procesie sterylizacji giną **formy wegetatywne i przetrwalne mikroorganizmów**. W suszarce wyjaławia się naczynia szklane (kolby, probówki, pipety, płytki Petriego). Do wyjaławiania szkło należy odpowiednio przygotować np. probówki i kolby zakorkować korkiem metalowym lub z waty, bagietki i pipety owinąć papierem. Pipety i płytki sterylizujemy w specjalnych pojemnikach zwanych tubusami. Tubusy na czas wyjaławiania zamyka się tak, aby otwory w pokrywach nakładały się umożliwiając swobodny przepływ gorącego powietrza. Po sterylizacji otwory zamyka się uniemożliwiając wtórne zakażenie. Parametry wyjaławiania szkła to: 140ºC przez 2,5 godziny, 160ºC przez 2 godziny lub 180ºC przez 1 godzinę. Czas wyjaławiania odlicza się od momentu osiągnięcia zadanej temperatury. Szkło z suszarki wyjmuje się dopiero po jego wystygnięciu.




Rysunek 1 – Termiczne wyjaławianie na sucho przez wyżarzanie (A) i opalanie wylotów np. probówek w celu zapobieżenia reinfekcji (B)

**Wyżarzanie** – polega na rozgrzaniu w płomieniu palnika ezy lub igły bakteriologicznej (do rozżarzenia metalu)

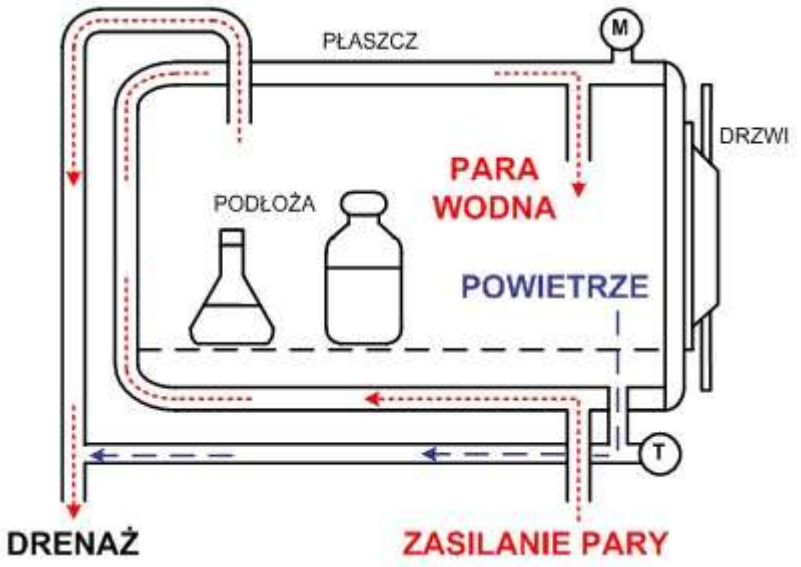
**Opalanie** – to krótkotrwały kontakt płomienia z brzegiem naczynia lub narzędziem.
Przedmioty metalowe (pęseta, skalpel) często są uprzednio zanurzane w denaturacie i zapalane w płomieniu palnika. Można ich używać dopiero po wypaleniu się denaturatu. Opalanie nie jest metodą sterylizacji.

**Sterylizacja termiczna mokra**

Wyjaławianie tą metodą prowadzi się w **autoklawach**. Autoklaw jest to hermetycznie zamknięty zbiornik stalowy zaopatrzony w płaszcz grzejny, termometr manometr i elektryczny system grzewczy. Czynnikiem wyjaławiającym w autoklawie jest **przegrzana nasycona para wodna** pod zwiększonym ciśnieniem, która umożliwia osiągnięcie temperatury powyżej 100ºC. W aparacie gotująca woda doprowadza do nadciśnienia parę wodną, która ulega nasyceniu po zupełnym wyparciu powietrza. Manometr (M) znajdujący się w obudowie wskazuje wzrost ciśnienia po zamknięciu zaworu odpowietrzającego. W autoklawach przeprowadza się wyjaławianie: podłoży mikrobiologicznych w temperaturze 121°C przez 20 – 30 min, pożywek zawierających cukry, żelatynę i inne składniki termolabilne - 117°C, a materiał zawierający drobnoustroje chorobotwórcze w temperaturze 134°C. Na skuteczność sterylizacji ma wpływ czas – im wyższa temperatura tym krótszy czas działania oraz objętość wyjaławianych podłoży – im mniejsza tym krótszy czas działania czynnika sterylizującego. W wyniku działania przegrzanej pary wodnej w komórkach drobnoustrojów następuje denaturacja białek i kwasów nukleinowych oraz zerwanie wiązań wodorowych.

Proces sterylizacji prowadzony w autoklawach i suszarkach podlega kontroli z zastosowaniem metod:

a) fizycznych (odczyty z termometru i manometru),
b) chemicznych (wskaźniki zmieniające barwę po właściwym przebiegu procesu sterylizacji)
c) biologicznych (tzw. sporotesty zawierające przetrwalniki: *Bacillus stearothermophilus* – sporal A (autoklaw), *Bacillus subtilis* – sporal S (suszarka), które wkłada się do urządzenia na czas wyjaławiania, po czym umieszcza w kolbie z bulionem odżywczym i inkubuje w temperaturze 55ºC przez 48 godzin. Wzrost mikroorganizmów świadczy o nieprawidłowo przeprowadzonym procesie sterylizacji.



Rysunek 2 – Autoklaw – zasada działania, M – manometr, T - termometr

**Pasteryzacja**

**Pasteryzacja nie jest metodą wyjaławiania!** W procesie pasteryzacji **giną jedynie formy wegetatywne drobnoustrojów, a przeżywają przetrwalniki bakterii.**
W laboratorium mikrobiologicznym proces pasteryzacji wykorzystywany jest do oznaczania:

1) bakterii ciepłoopornych, których formy wegetatywne mają zdolność przeżywania pasteryzacji w temperaturze 63,5ºC przez 30 minut
2) obecności i liczby przetrwalników z zastosowaniem pasteryzacji w temperaturze 80ºC przez 10 minut

Proces pasteryzacji dla celów analitycznych przeprowadza się w ultra-termostatach.

**Aparat Kocha** jest przeznaczony do **pasteryzacji** substancji w parze bieżącej o temperaturze do 100ºC przy ciśnieniu atmosferycznym. Aparat składa się z metalowego kotła parowego z perforowanym dnem, pod którym znajduje się zbiornik z wodą i system grzałek. Grzałki doprowadzają wodę do wrzenia, a powstająca para wodna znajduje ujście w nieszczelnej porywie aparatu. Kocioł wyposażony jest we wskaźnik poziomu wody oraz termometr.
W dolnej części kotła wmontowane są grzałki.
Aparat Kocha służy do upłynniania pożywek mikrobiologicznych i przygotowywania podłóż zawierających termolabilne składniki. Czas pasteryzacji zależy od objętości i rodzaju materiału i wynosi od 15-60 min.

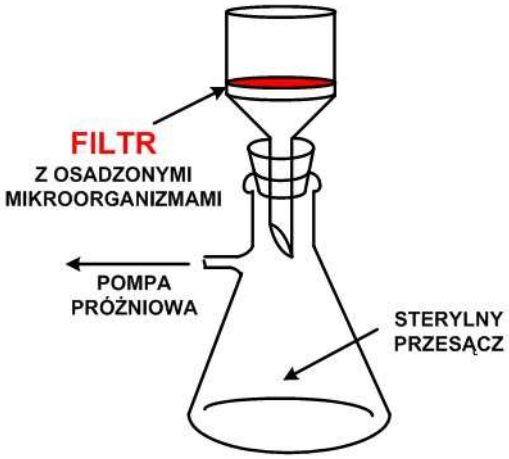
Rysunek 3 – Aparat Kocha – zasada działania

## Mechaniczne metody wyjaławiania

### Wyjaławianie przez filtrację

Przez filtrację wyjaławia się najczęściej podłoża płynne lub ich składniki, które pod wpływem temperatury zmieniają właściwości fizyko-chemiczne np. surowica, krew, roztwór mocznika, witaminy, aminokwasy, niektóre cukry. Metoda ta polega na mechanicznym zatrzymaniu mikroorganizmów na powierzchni filtra o porowatości mniejszej od średnicy drobnoustrojów, czyli około 0,22-0,45 µm. Skuteczność filtracji zależy od wielkości mikroorganizmów, ich ładunku oraz od budowy samego filtra. Istotną rolę odgrywa również zjawisko adsorpcji składników podłoża na powierzchni filtra. Z tego powodu często stosuje się filtrację tylko termolabilnego składnika i dodanie go do reszty sterylnego podłoża mikrobiologicznego. Zestawy do filtracji najczęściej wyposażone są w pompę próżniową wymuszającą filtrację przez małe pory lub filtry strzykawkowe. Najczęściej stosowane filtry to: porcelanowe świece Chamberlanda, krzemionkowe świece Berkefelda, azbestowe filtry Seitza, filtry Schotta oraz filtry membranowe z estrów celulozy.

Rysunek 4 – Filtracja przez filtr strzykawkowy




Rysunek 5 – Zestaw do filtracji próżniowej – filtr Schotta

**Chemiczne metody wyjaławiania**

Polegają na zastosowaniu związków chemicznych do niszczenia drobnoustrojów chorobotwórczych i saprofitycznych tzw. **dezynfekcja**. Środki dezynfekcyjne stosuje się do sterylizacji podłóg, ścian i powierzchni roboczych, linii technologicznych, czy też maszyn lub ich części. Różnią się one aktywnością biologiczną i mechanizmami działania. Aktywność środków dezynfekcyjnych zależy od rodzaju związku chemicznego, gatunku mikroorganizmów, ich wieku i liczebności populacji, czynników środowiskowych - temperatura, kwasowość podłoża i obecność w nim innych związków chemicznych, zwłaszcza organicznych.

Aby dezynfekcja była skuteczna, środek odkażający powinien:

- ✓ być nieszkodliwy dla ludzi i zwierząt
- ✓ wykazywać wysoką skuteczność w niskich stężeniach w szerokim zakresie pH i dobrą rozpuszczalność w wodzie
- ✓ stykać się bezpośrednio z całą masą lub powierzchnią odkażanych przedmiotów,
- ✓ działać przez określony czas i w odpowiedniej temperaturze
- ✓ być bezwonny
- ✓ nie niszczyć dezynfekowanych powierzchni

Do dezynfekcji najczęściej stosuje się kwasy i zasady, środki utleniające, sole metali ciężkich, alkohole, fenole, krezole, aldehydy i czwartorzędowe związki amonowe. Mechanizm działania środków dezynfekcyjnych polega na:

- ✓ uszkodzeniu ściany i błony komórkowej - np. przez detergenty, czwartorzędowe związki amoniowe, kwasy, fenole, zasady;
- ✓ denaturacji białek, głównie enzymów, których dezaktywacja prowadzi do śmierci komórki np. alkohole, aldehydy, fenole, czwartorzędowe związki amonowe
- ✓ blokowaniu wolnych grup sulfhydrylowych - enzymy zawierające tę grupę mogą działać tylko w wolnej, zredukowanej formie. Zredukowanie grupy –SH przez czynnik utleniający powoduje uszkodzenie lub śmierć komórki. Podobne działanie wykazują również preparaty jodowe i preparaty zawierające metale ciężkie
- ✓ uszkodzeniu kwasów nukleinowych - barwniki zasadowe jak fiolet krystaliczny, zieleń brylantowa tworzą sole z kwasami nukleinowymi mikroorganizmów.

**Kwasy i zasady** - efekt ich działania wiąże sie z aktywnością jonów wodorowych lub wodorotlenowych; rzadko stosowane – niszczą nie tylko drobnoustroje, ale też przedmioty i materiały poddawane dezynfekcji. Generalnie kwasy wykazują silniejszy wpływ niż zasady. Węglan sodu, wodorotlenek sodu i wapnia mają zdolność zmydlania i rozpuszczania tłuszczów. Stosuje się zazwyczaj 10% roztwory zasad, 20% zawiesinę wodorotlenku wapnia (mleko wapienne). Najpowszechniej stosowany rozcieńczony kwas nadoctowy jest aktywny w stosunku do form wegetatywnych i przetrwalnych bakterii. Ponieważ związek ten nie

wykazuje właściwości korozyjnych i łatwo ulega rozkładowi na produkty nieszkodliwe (woda, tlen, kwas octowy) dla produktów spożywczych, może być stosowany do dezynfekcji systemów zamkniętych (np. w browarnictwie i winiarstwie) bez konieczności przepłukiwania ich wodą. Taka procedura zapobiega powtórnemu skażeniu systemu, gdy jakość mikrobiologiczna będącej do dyspozycji wody nie jest najlepsza. Ponadto związek ten może być użyty do sterylizacji przedmiotów termowrażliwych i dezynfekcji rąk. W niższych stężeniach 2-5% stosuje się również kwas siarkowy do dezynfekcji rur i kranów wodociągowych oraz roztwór fenolu do dezynfekcji sit i worków.

**Środki utleniające** – głównie związki chloru; w wyniku reakcji chloru z wodą powstaje silnie bakteriobójczy kwas podchlorawy. Zaledwie 0,006% stężenie chloru w wodzie niszczy formy wegetatywne i przetrwalne drobnoustrojów. W praktyce używa się chloramin organicznych (S, B, T) i podchloryn (sodu lub wapnia). Chloramina T zawiera 12,5% czynnego chloru i działa najsilniej w środowisku kwaśnym. Do dezynfekcji rąk stosuje się chloraminy w stężeniu 1%, a do odkażania pomieszczeń w stężeniu 5%. Podchloryny natomiast działają najlepiej w pH obojętnym lub kwaśnym i w niskich temperaturach. Stosuje się je zazwyczaj do dezynfekcji pomieszczeń.
Silnym utleniaczem jest również ozon stosowany do dezynfekcji wody (w stężeniu 0,3 mg/litr do dezynfekcji wody wodociągowej). Do środków utleniających zaliczamy również: nadmanganian potasu i 3% roztwór $H_2O_2$ (znany jako woda utleniona).

**Sole metali ciężkich** – silne działanie bakteriobójcze wykazują sole rtęci i srebra; najbardziej rozpowszechnione są organiczne związki rtęci np. chlorek rtęci tzw. sublimat. Stosowany jest do dezynfekcji skór, futer, naczyń porcelanowych i szklanych. Nie może być stosowany natomiast do dezynfekcji sprzętu mającego kontakt z żywnością.

**Alkohole** - (etanol, n-propanol, izopropanol). Charakteryzuje je szerokie działanie bakteriobójcze szczególnie względem form wegetatywnych bakterii, które uwarunkowane jest obecnością wody. Najskuteczniejsze stężenie alkohole wykazują jako 50-70% roztwór wodny. Wyższe stężenia, wskutek silnego odwodnienia bakterii, wykazują wolniejsze działanie. Skuteczność przeciwwirusowa alkoholi jest wyraźnie mniejsza niż przeciwbakteryjna. Aktywność alkoholi wzrasta wraz ze wzrostem liczby molowej i liczby atomów węgla w łańcuchu, a maleje w obecności substancji organicznej. Są wykorzystywane do dezynfekcji systemów zamkniętych bez konieczności płukania wodą, powierzchni roboczych, sprzętu i rąk.

**Aldehydy** – wykazują szeroki zakres działania, obejmujący bakterie, prawie wszystkie wirusy, grzyby oraz w określonych warunkach przetrwalniki bakteryjne, również w obecności zanieczyszczeń organicznych. Aldehydy wykorzystuje się często w formie preparatów mieszanych np. z detergentami - związkami powierzchniowo czynnymi, które umożliwiają penetrację aldehydu przez zanieczyszczenia organiczne bezpośrednio do mikroorganizmów.

W tej grupie związków największe znaczenie ma formaldehyd, czyli mieszanina 37% aldehydu mrówkowego z 10-15% aldehydem metylowym. Wodny lub alkoholowy roztwór formaliny w stężeniu 1-5% stosowany jest do dezynfekcji stołów, płyt i homogenizatorów. Silne działanie antybakteryjne wykazuje również aldehyd glutarowy, glioksal i aldehyd bursztynianowy.

**Związki fenolu i ich pochodne** – działają silnie bakteriobójczo (słabo antywirusowo) w środowisku kwaśnym. Preparaty handlowe tych związków to: lizol (roztwór krezolu i kwasów tłuszczowych, stosowany w stężeniu 2-8%), septyl (mieszanina amylofenolu i fenylofenolu, stosowany w stężeniu 1-2%) i desson (roztwór chloro-ksylenol-terpineolu i soli potasowej kwasu rycynowego, stosowany w stężeniu 2-5%).

**Czwartorzędowe związki amonowe** – Są to związki powierzchniowo czynne. Charakteryzuje je szerokie spektrum działania (bakterie, grzyby strzępkowe - pleśnie, drożdże, wirusy), długotrwały efekt i przyjemny zapach. Ujemną stroną jest możliwość uodpornienia się bakterii szczególnie Gram-ujemnych (np. *Proteus vulgaris* i *Serratia marcescens*), co wymusza konieczność przemiennego ich stosowania z preparatami o odmiennych mechanizmach działania (związkami nadtlenowymi, podchlorynem). Ich aktywność ulega osłabieniu w obecności związków organicznych i mydła.

Wykorzystanie aldehydów, związków fenolowych i pochodnych fenoli, związków chloru, metali ciężkich jako środków dezynfekujących jest często ograniczone jedynie do wyjaławiania powierzchni roboczych nie mających kontaktu z żywnością, a w niektórych krajach zakazane. Wynika to z ich toksyczności, wywoływania podrażnień skóry i błon śluzowych, słabej biodegradacji, przykrego zapachu, działania korozyjnego, możliwości wykształcenia się form odpornych oraz uwarunkowania ich aktywności od czynników środowiskowych.

**Wyjaławianie przez promieniowanie**

Promieniowanie elektromagnetyczne obejmuje zakres od ultrakrótkich promieni kosmicznych, poprzez promienie X, UV, widzialną część światła słonecznego
do podczerwieni i długich fal radiowych. W mikrobiologii wykorzystywane jest najczęściej promieniowanie o długości fali 230-270 nm (promieniowanie ultrafioletowe) i promieniowanie jonizujące (promienie X i gamma - $\gamma$). Promieniowanie jonizujące penetruje przez struktury komórek drobnoustrojów wywołując efekt mutagenny lub letalny.

**Promieniowanie UV**

W praktyce mikrobiologicznej wykorzystuje się najczęściej hamujące lub zabójcze działanie na mikroorganizmy nadfioletowej części widma słonecznego o długości fali 250-260 nm, a

więc tą część widma, która jest najsilniej absorbowane przez kwasy nukleinowe. Źródłem promieniowania są lampy kwarcowe, wypełnione oparami rtęci, emitujące w 95% promieniowanie o długości fali 258 nm. Promieniowanie UV jest wykorzystywane do niszczenia mikroorganizmów występujących w powietrzu i na odkrytych powierzchniach zamkniętych pomieszczeń o niewielkim zapyleniu (silosów, magazynów i chłodni, laboratoriów). Ponieważ charakteryzuje się słabą przenikliwością – nie przenika przez zwykłe szkło, stąd promieniowanie UV nie jest wykorzystywane do wyjaławiania szkła i podłoży agarowych w szklanych naczyniach. Najbardziej efektywnie działa promieniowanie o długości fali 260 nm, które jest pochłaniane przez zasady purynowe i pirymidynowe oraz promieniowanie o długości fali 280 nm - pochłaniane przez aminokwasy aromatyczne (tryptofan, tyrozyna, fenyloalanina). Następuje również unieczynnienie enzymów, surowic i toksyn. Efekt bakteriobójczy promieniowania zależy między innymi od objętości napromienianego powietrza, wielkości powierzchni, odległości i ustawienia lamp UV. Czas emisji promieniowania nie powinien być krótszy niż 30 min, odległość lampy od sterylizowanej powierzchni nie może przekraczać 3 m, a lampy winny być ustawione prostopadle do powierzchni. W laboratorium mikrobiologicznym promieniowanie UV znalazło zastosowanie głównie do wyjaławiania powietrza w pomieszczeniach laboratoryjnych.

**Promieniowanie jonizujące (gamma – γ, promienie X)**

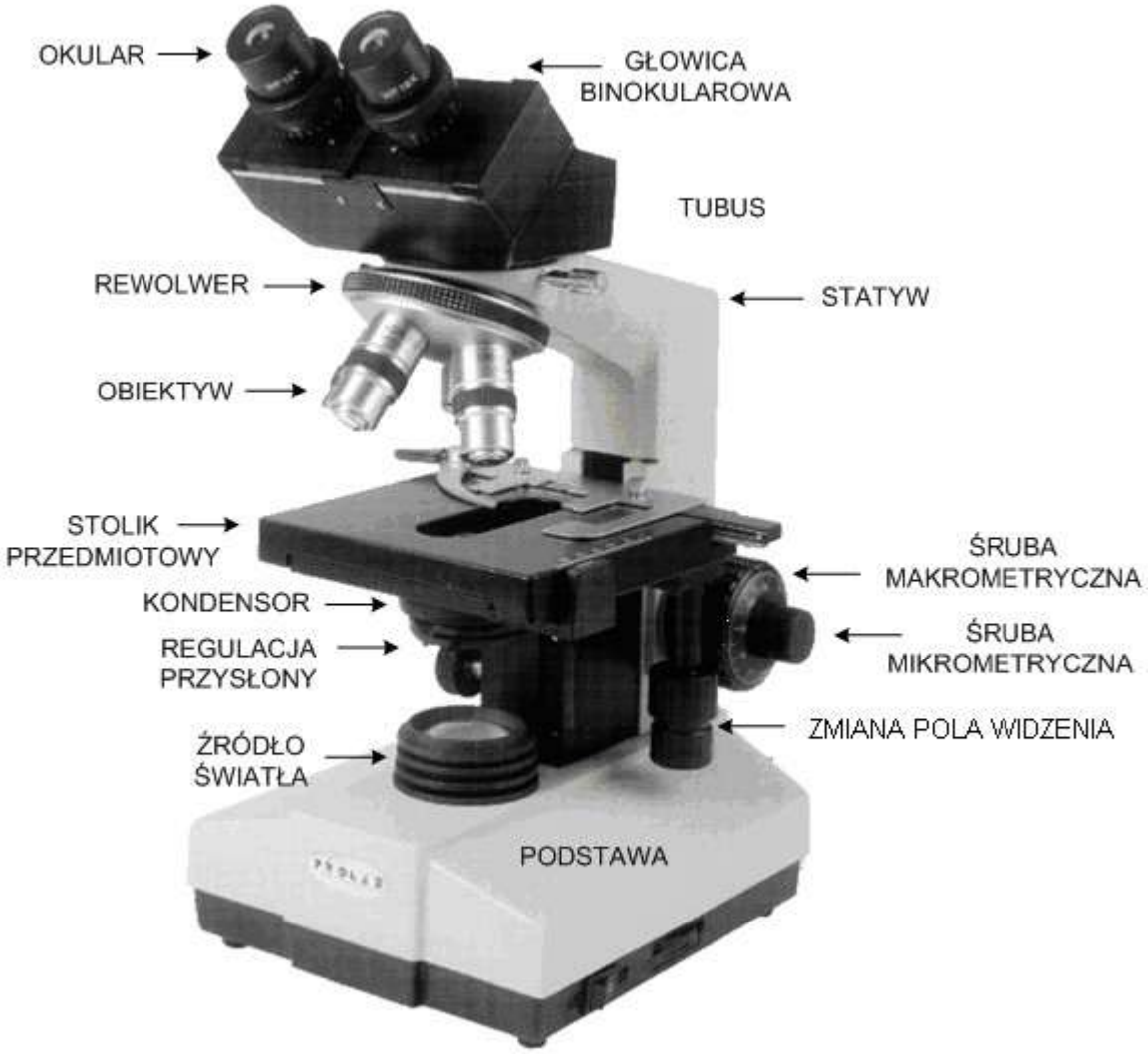
Sterylizacja promieniowaniem jonizującym przebiega zarówno w sposób bezpośredni, jak i pośredni, przez produkty radiolizy wody. Źródłem tego promieniowania mogą być na przykład izotopy emitujące promieniowanie γ - zwykle izotopy kobaltu $^{60}Co$. Sterylizacja radiacyjna może też być prowadzona z wykorzystaniem wiązki elektronów lub promieniowania X (wytwarzanego w procesie konwersji e/X), uzyskiwanych w elektrycznym źródle promieniowania jakim jest akcelerator elektronów. Do sterylizacji sprzętu medycznego jednorazowego użytku, surowców i preparatów farmaceutycznych wykorzystuje się niekiedy promieniowanie jonizujące (X, gamma), które charakteryzuje się bardzo dużą przenikliwością, energią i aktywnością biologiczną.

**Mikroskop i technika mikroskopowania**

**Budowa i działanie mikroskopu**

Jednym z podstawowych urządzeń w laboratorium mikrobiologicznym jest mikroskop. Służy on do obserwacji drobnoustrojów, ich wielkości, kształtu, naturalnego ułożenia komórek, zdolności ruchu czy sposobu ich rozmnażania. W konstrukcji mikroskopu są połączone dwa układy: optyczny i mechaniczny. Układ optyczny składa się z dwóch połączonych ze sobą części: oświetleniowej i powiększającej. Pierwsza służy do optymalnego oświetlenia obserwowanego obiektu (preparatu), natomiast druga do dwustopniowego powiększenia jego

obrazu. Układ mechaniczny zapewnia właściwe położenie poszczególnych elementów układu optycznego. W mikroskopie powstający obraz jest prosty, powiększony i pozorny.




Rysunek 6 – Budowa mikroskopu optycznego binokularowego

**Do elementów optycznych mikroskopu zaliczamy:**

**Źródło światła** - w prostych mikroskopach element ten stanowiło lusterko, współcześnie jest to wbudowana żarówka z reflektorem. Oświetlenie należy dostosować do powiększenia, przy małych powiększeniach stosuje się słabe natężenie światła, przy dużych – silne.

**Kondensor** – jest to zespół 2–3 soczewek silnie koncentrujących światło formując stożek wystarczający do oświetlenia pola przedmiotowego preparatu. **Przysłona** – reguluje ilość światła wpadającego do kondensora.

**Obiektywy** - elementy powiększające obraz. Zbierają światło wychodzące z przedmiotu i tworzą jego powiększony obraz pośredni, oglądany przez okular(y) mikroskopu. Wyróżniamy obiektywy suche (powietrzne) i mokre (immersyjne, zanurzeniowe). Obiektywy suche powiększają do 60 razy, immersyjne 90 do 150 razy.

Uwaga! Obiektyw immersyjny jest oznaczony jako OIL lub IMMERSION OIL.

**Imersja** polega na wypełnieniu cieczą (olejkiem immersyjnym) przestrzeni pomiędzy szkiełkiem podstawowym (preparatem) a obiektywem. W przypadku obiektywów suchych we wspomnianej przestrzeni, na drodze światła znajduje się powietrze.

**Okulary** – są zbudowane z szeregu soczewek i powiększają obraz na zasadzie lupy. Zwykle powiększają od 2-30 razy. Powiększenie okularu podane jest na oprawce.

**Powiększenie mikroskopu** równe jest iloczynowi powiększenia obiektywu i powiększenia okularu.

**Do elementów mechanicznych mikroskopu zaliczamy:**

**Podstawa i statyw** – zapewniają sztywność konstrukcji

**Stolik przedmiotowy** - służy do umocowania preparatu i jego przesuwu w poziomie w osiach X, Y, przez co następuje zmiana pola widzenia

**Śruba makrometryczna** – służy do ustalania odległości preparat – obiektyw. W zależności od konstrukcji śruba podnosi/opuszcza stolik przedmiotowy lub tubus z obiektywami.

**Śruba mikrometryczna** – służy do nastawiania ostrości, ogniskowania.

**Rewolwer –** jest to obrotowa tarcza mikroskopu, w której umieszczone są obiektywy. Jego obracanie umożliwia prostą zmianę obiektywu, a tym samym używanego powiększenia.

**Tubus** – jest to przestrzeń pomiędzy obiektywem a okularem, w której następuje formowanie się obrazu.

**Układ mechaniczny kondensora** - pozwala na regulację położenia kondensora w pionie.

**Technika mikroskopowania przy użyciu obiektywów suchych**

1) Ustawić mikroskop 10-15 cm od krawędzi stołu, sprawdzić czystość mikroskopu, optyczne części (obiektyw, okular) przetrzeć miękka, sucha ściereczką.
2) Włączyć źródło światła (z tyłu obudowy), otworzyć przysłonę kondensora znajdującą sie pod stolikiem.
3) Przekręcając śrubą makrometryczną podnieść tubus tak, aby obiektywy znalazły się do 5 cm nad stolikiem.
4) Włączyć w oś optyczną mikroskopu obiektyw o wybranym powiększeniu (poprzez obrót rewolweru).
5) Przygotowany preparat umieścić na stoliku i docisnąć zaciskami.
6) Patrząc z boku zbliżyć maksymalnie stolik z preparatem do soczewki obiektywu.
7) Następnie patrząc w okular, przy użyciu **śruby makrometrycznej**, bardzo wolno opuszczać stolik aż do ujrzenia konturu badanego obiektu. Ostrość obrazu nastawić za pomocą **śruby mikrometrycznej.**

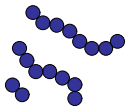
8) Przeprowadzić korektę oświetlenia. W przypadku zbyt silnego oświetlenia należy obniżyć położenie zespołu oświetlającego. Regulować kontrast i ostrość obrazu za pomocą przysłony.
9) Szukać nowych obrazów mikroskopowych przy użyciu śruby do przesuwania preparatu w osi X/Y
10) **Po zakończeniu mikroskopowania usunąć preparat ze stolika, a obiektyw przetrzeć miękką ściereczką.**
11) Zostawić mikroskop z obiektywem o najmniejszym powiększeniu w osi optycznej.

**Technika mikroskopowania przy użyciu obiektywów immersyjnych**

1) Ustawić mikroskop 10-15 cm od krawędzi stołu, sprawdzić czystość mikroskopu, optyczne części (obiektyw, okular) przetrzeć miękka, sucha ściereczką.
2) Włączyć źródło światła (z tyłu obudowy), otworzyć przysłonę kondensora znajdującą się pod stolikiem.
3) Przekręcając śrubą makrometryczną podnieść tubus tak, aby obiektywy znalazły się do 5 cm nad stolikiem.
4) Włączyć w oś optyczną mikroskopu obiektyw immersyjny o powiększeniu 100x (poprzez obrót rewolweru).
5) Na preparat **nanieść kroplę olejku immersyjnego**. Przygotowany preparat umieścić na stoliku i docisnąć zaciskami.
6) Patrząc z boku zbliżyć maksymalnie stolik z preparatem do soczewki obiektywu tak, aby koniec soczewki zanurzył się w naniesionej kropli olejku immersyjnego.
7) Następnie patrząc w okular, przy użyciu **śruby makrometrycznej**, bardzo wolno opuszczać stolik aż do ujrzenia konturu badanego obiektu. Ostrość obrazu nastawić za pomocą **śruby mikrometrycznej.**
8) Przeprowadzić korektę oświetlenia. W przypadku zbyt słabego oświetlenia należy podwyższyć położenie zespołu oświetlającego (kondensora). Regulować kontrast i ostrość obrazu za pomocą przysłony.
9) Szukać nowych obrazów mikroskopowych przy użyciu śruby do przesuwania preparatu w osi X/Y pamiętając, aby soczewka była zawsze zanurzona w olejku immersyjnym.
10) **Po zakończeniu mikroskopowania usunąć preparat ze stolika, a obiektyw przemyć ściereczką namoczoną alkoholem do mikroskopu.**
11) Zostawić mikroskop z obiektywem o najmniejszym powiększeniu w osi optycznej.

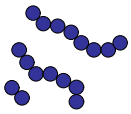
**Część praktyczna:**

1. **Nauka mikroskopowania przy użyciu obiektywów immersyjnych gotowych preparatów bakterii.**
   Należy narysować w naturalnych wielkościach bakterie zaobserwowane w obrazach mikroskopowych z trzech wybranych preparatów, np.



| | |
|---|---|
| **Preparat** | Paciorkowce |
| **Powiększenie** | 1000x |
| **Kształt / ułożenie komórek** | Kulisty, łańcuszki |

2. **Porównanie grubości włosa i wielkości bakterii na preparatach gotowych.**
   Do doświadczenia należy przygotować jedno szkiełko podstawowe i jedno szkiełko nakrywkowe. Pipetą Pasteura należy nanieść kroplę wody destylowanej na środek szkiełka podstawowego. Przygotuj kawałek włosa i umieść w kropli wody. Całość nakryj szkiełkiem nakrywkowym. Na szkiełko nakrywkowe nanieś kroplę olejku immersyjnego. Należy narysować włos zaobserwowany w obrazie mikroskopowym i porównać go z wielkością komórek bakterii obserwowanych na dowolnym preparacie gotowym.



| | | |
|---|---|---|
| **Preparat** | Paciorkowce | Włos |
| **Powiększenie** | 1000x | 1000x |
| **Wielkość** | 1 µm | 57-90 µm (Europejczycy) |

3. **Wykonanie preparatu odciskowego z opuszków palców na podłożu stałym – agar odżywczy.**
   Bierzemy jedną płytkę Petriego na osobę z wylanym i zestalonym podłożem. Podpisujemy płytkę na „denku" markerem permanentnym dzieląc płytkę na dwie połowy „L" na odcisk lewej ręki i „P" na odcisk prawej ręki. Odciskamy delikatnie kolejno wszystkie opuszki palców obydwu rąk. Odkładamy płytkę do inkubacji w temperaturze 30ºC przez 72godziny (rys.7).

Rysunek 7 – Płytka Petriego ze stałym podłożem mikrobiologicznym, pozycja płytki po posiewie przeznaczonej do inkubacji

4. **Obserwacja przygotowanych posiewów z naniesionymi krążkami bibułowymi nasączonymi wybranymi środkami dezynfekcyjnymi celem stwierdzenia ich hamującego oddziaływania.** Odczyt strefy zahamowania wzrostu.

| Badany szczep | Zastosowany środek dezynfekcyjny | Stężenie środka dezynfekcyjnego | Wielkość strefy zahamowania wzrostu [mm] |
|---|---|---|---|
| *Escherichia coli* | Incidur | | |
| | Chloramina T | | |
| | Alkohol etylowy | | |
| *Bacillus subtilis* | Incidur | | |
| | Chloramina T | | |
| | Alkohol etylowy | | |
| *Saccharomyces cerevisiae* | Incidur | | |
| | Chloramina T | | |
| | Alkohol etylowy | | |
| *Enterococcus faecalis* | Incidur | | |
| | Chloramina T | | |
| | Alkohol etylowy | | |

Copyright©**2026 KMŻ,TiChM**