



## Ćwiczenie 2

### Temat: Metody badań mikroskopowych Morfologia komórki prokariota (bakterii)

Obserwacje mikroskopowe cech morfologicznych drobnoustrojów wymagają przygotowania preparatu mikrobiologicznego. **Preparat mikroskopowy** jest to szkiełko podstawowe (przedmiotowe) z umieszczonym na jego powierzchni materiałem biologicznym. Preparat można wykonać z hodowli mikroorganizmów albo bezpośrednio z badanego materiału płynnego np. mleka lub stałego np. mięsa (tzw. preparaty odciskowe).

#### Przygotowanie szkiełka podstawowego

Warunkiem uzyskania preparatu dobrej jakości jest oczyszczenie i odtłuszczenie szkiełka podstawowego. Zanieczyszczenia fizyczne usuwa się z powierzchni szkiełka przez potarcie suchą bawełnianą szmatką. Szkiełka odtłuszczamy poprzez 2-3-krotne opalenie nad płomieniem palnika.

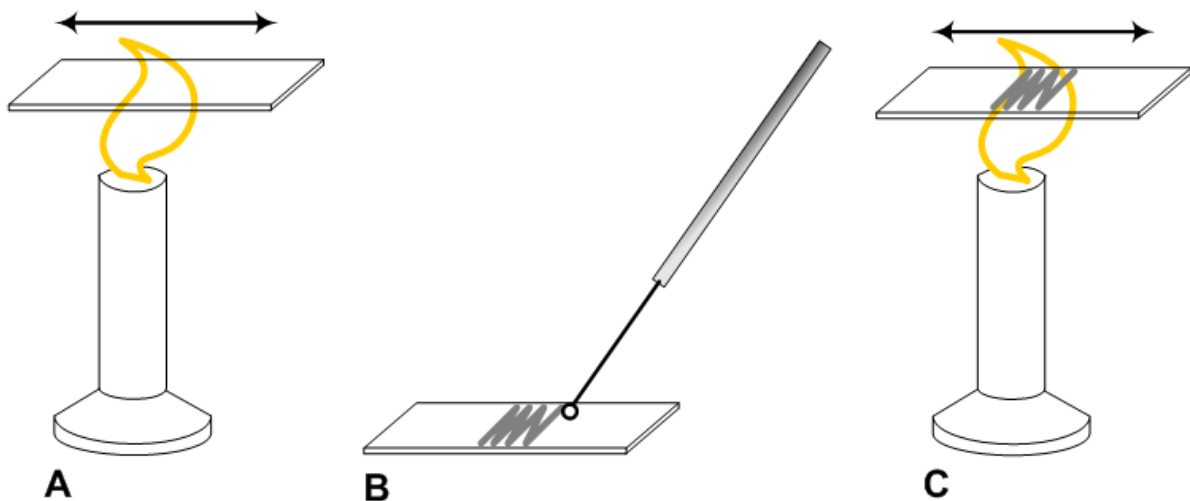
#### Wykonanie rozmazu

Rozmaz sporządza się na odtłuszczonym, wystudzonym szkiełku podstawowym przez naniesienie i rozprowadzenie kropli zawiesiny mikroorganizmów przy użyciu ezy.

Preparaty można mikroskopować bezpośrednio po wykonaniu lub poddać je barwieniu. **Barwienie** jest to proces fizyko-chemiczny polegający na wniknięciu barwnika do wnętrza komórki mikroorganizmu i utworzeniu barwnego kompleksu z cytoplazmą lub wewnątrzkomórkowymi strukturami komórki. Barwienie ma na celu ułatwienie obserwacji cech morfologicznych i diagnostycznych komórek mikroorganizmów np. kształtu, wielkości, ułożenia komórek, septowania strzępek grzybni, zdolności ruchu, występowania i rozmieszczenia wici i rzęsek, obecności otoczek, a także sposobu rozmnażania przez podział, pączkowanie (wytwarzanie i ułożenie pączków), zarodnikowanie (ułożenie zarodników) oraz tworzenia i rozmieszczenia form przetrwanych w komórce. Barwienie może być również zastosowane do liczenia komórek żywych i martwych, czyli do badania przeżywalności mikroorganizmów. Ze względu na sposób wstępnego przygotowania preparatu wyróżniamy barwienie przyżyciowe oraz barwienie preparatów utrwalonych.

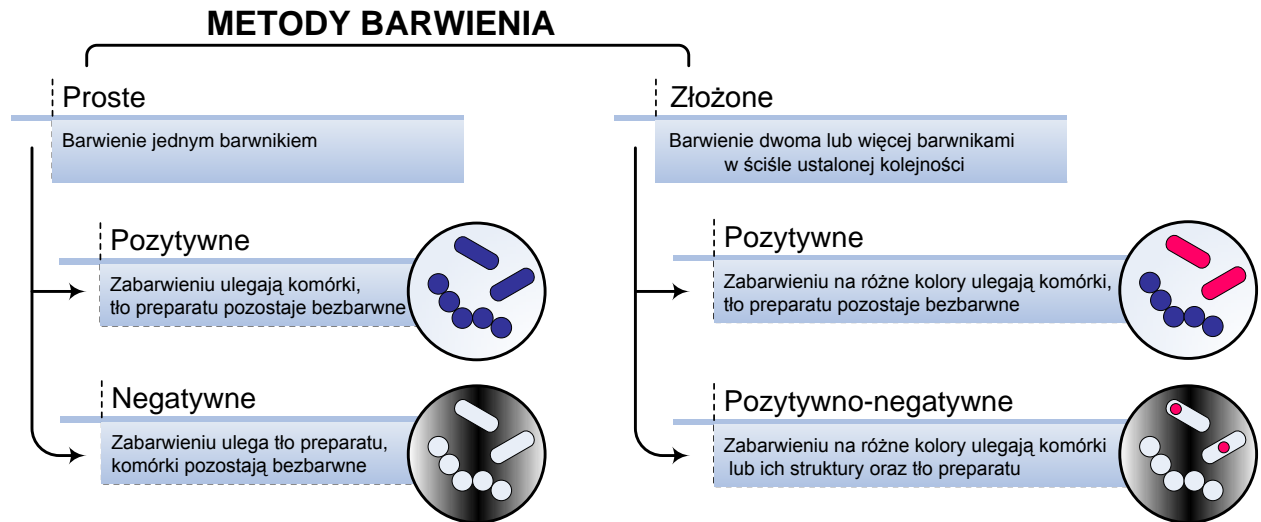
**Barwienie przyżyciowe** – gdy na żywe komórki mikroorganizmów naniesione na szkiełko podstawowe działamy barwnikiem np. oznaczanie przeżywalności drożdży, które polega na barwieniu przyżyciowym komórek drożdży barwnikiem w dużym rozcieńczeniu (błękit metylenowy w rozcieńczeniu 1:10000). Zabarwieniu ulegają jedynie komórki martwe lub będące w stanie subletalnym o zdegenerowanej ścianie komórkowej (barwnik łatwiej przenika przez ścianę). Żywe komórki drożdży pozostają bezbarwne.

**Barwienie preparatów utrwalonych** – gdy barwieniu poddaje się utrwalone (martwe) komórki drobnoustrojów. **Utrwalanie** polega na termicznym lub chemicznym zabiciu mikroorganizmów i przytwierdzeniu ich do powierzchni szkiełka podstawowego. Celem utrwalania jest ułatwienie stosowanym barwnikom penetracji przez ścianę komórkową i ich wniknięcie do wnętrza komórki oraz odsłonięcie w ścianach komórkowych mikroorganizmów związków, z którymi wiążą się barwniki. **Chemiczna metoda utrwalania** polega na naniesieniu na wysuszony rozmaz mikroorganizmów odpowiedniego odczynnika (np. formaliny, alkoholu, eteru). Po kilku minutach preparat wysycha i jest przygotowany do barwienia. **Termiczna metoda utrwalania** polega na 2-3-krotnym przeciągnięciu szkiełka podstawowego z wysuszonym rozmazem mikroorganizmów w płomieniu palnika. Szkiełko podczas utrwalania powinno być zwrócone rozmazem ku górze.



Rysunek 1 – Czynności związane z przygotowywaniem preparatu mikrobiologicznego do barwienia; A) odłuszczenie szkiełka podstawowego; B) wykonywanie rozmazu mikroorganizmów przy użyciu ezy; C) termiczne utrwalenie rozmazu na szkiełku podstawowym

Ze względu na złożoność technik barwienia preparatów dzieli się je na proste i złożone. **Barwienie proste**, czyli monochromatyczne (jednobarwne) polega na zastosowaniu jednego barwnika do wizualizacji komórek mikroorganizmów (barwienie pozytywne) lub zabarwienia tła preparatu (barwienie negatywne). **Barwienie złożone**, czyli polichromatyczne (wielobarwne) polega na zastosowaniu dwóch lub więcej barwników w ściśle określonej kolejności.



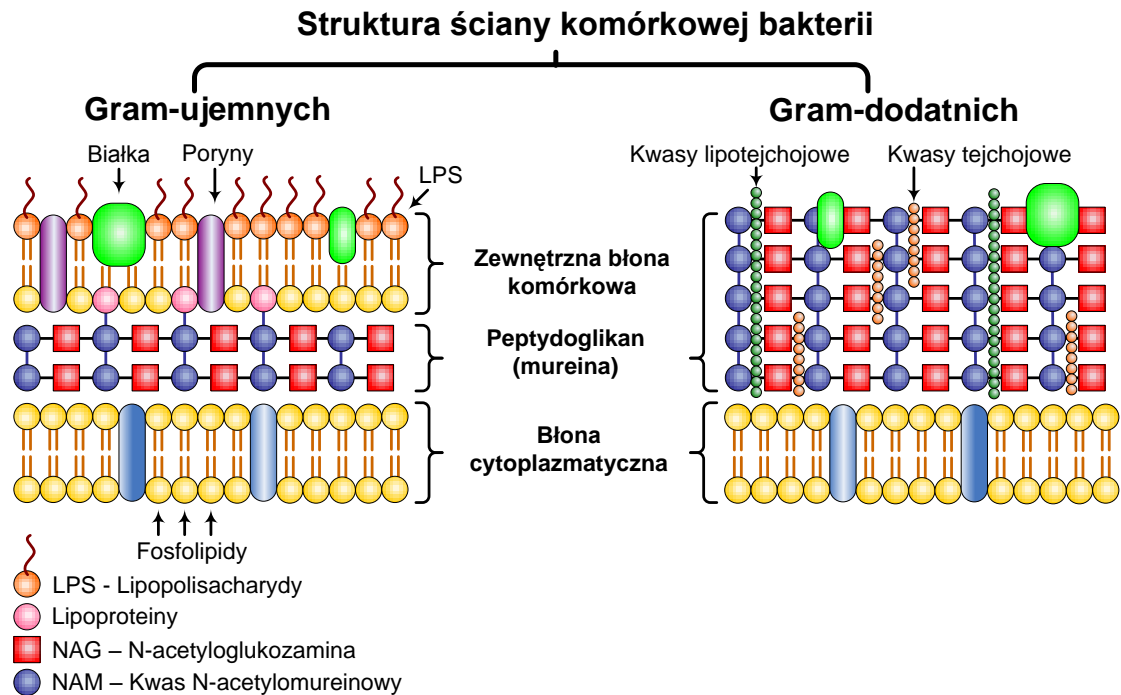
Rysunek 2 – Podział metod barwienia

**Barwienie proste pozytywne** - Polega na zabarwieniu komórek mikroorganizmów w formie utrwalonej z zastosowaniem jednego barwnika. Tło preparatu po barwieniu pozostaje bezbarwne. W tym barwieniu zastosowanie znalazły głównie **zasadowe barwniki** anilinowe (błękit metylenowy, zieleń malachitowa, zieleń brylantowa, fuksyna zasadowa, czerwień obojętna, fiolet krystaliczny, goryczkowy i metylowy). Zasadowe barwniki wykazują silne powinowactwo do kwaśnej cytoplazmy wewnątrzkomórkowej mikroorganizmów tworząc z nią trwałe, barwne kompleksy.

**Barwienie proste negatywne** - Polega na zabarwieniu tła nieutralowanego preparatu z zastosowaniem jednego barwnika i powstaniu kontrastu pomiędzy wybarwionym tłem i bezbarwną komórką. Do barwienia negatywnego zastosowanie znalazły kwaśne lub gruboziarniste barwniki (fuksyna kwaśna, eozyna, erytrozyna, czerwień Kongo, nigrozyna, Kolargol, tusz chiński). Należy pamiętać, że preparat barwiony metodą negatywną nie jest utrwalany tylko suszony w powietrzu atmosferycznym.

**Barwienie złożone pozytywne** – Polega na zastosowaniu minimum dwóch barwników w celu zabarwienia komórek na różne kolory (barwienie Grama) lub zabarwienia struktur wewnątrzkomórkowych np. przetrwalników i całych komórek (barwienie Wirtza/Schaeffer-Fultona).

**Barwienie metodą Grama** – jest barwieniem różnicującym, które pozwala wyodrębnić dwie zasadniczo odmienne grupy bakterii charakteryzujące się inną budową strukturalną ściany komórkowej. Wyróżniamy bakterie Gram-ujemne i Gram-dodatnie. W wyniku barwienia metodą Grama bakterie Gram-ujemne barwią się na kolor różowy, a bakterie Gram-dodatnie na kolor fioletowy. Jednak, żeby dokładnie zrozumieć mechanizm barwienia należy w pierwszej kolejności zapoznać się z budową ściany komórkowej tych grup bakterii.



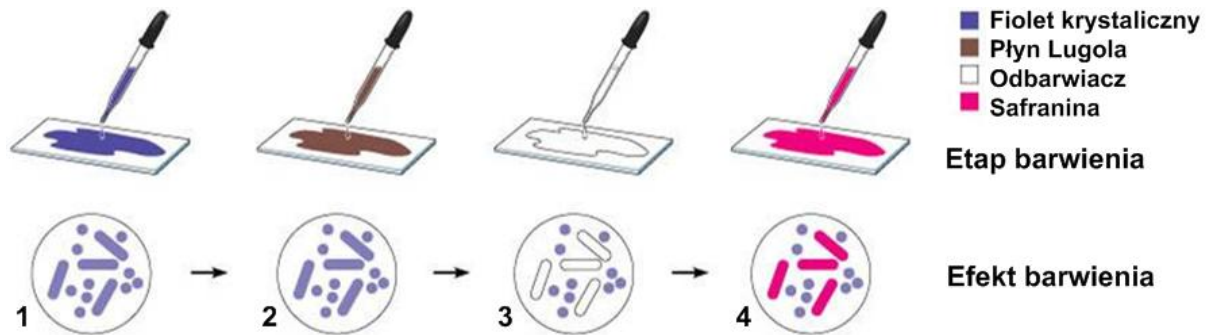
Rysunek 3 – Struktura ściany komórkowej bakterii Gram-ujemnych i Gram-dodatnich.

**Ściana komórkowa bakterii** jest elastyczną strukturą nadającą komórce określony kształt. Stanowi barierę ochronną przed czynnikami zewnętrznymi, jest przepuszczalna dla substancji niskocząsteczkowych i soli mineralnych. Szkielet ściany komórkowej bakterii składa się z polimeru – peptydoglikanu, zwanego **mureiną**. Peptydoglikan składa się z łańcuchów polisacharydowych, usieciowanych przez mostki peptydowe. Każdy łańcuch polisacharydowy zbudowany jest z N-acetyloglukozaminy i kwasu N-acetylomureinowego połączonych wiązaniem  $\beta$ -1,4-glikozydowym. Białka umieszczone w zewnętrznej warstwie ściany komórkowej różnią się w zależności od rodzaju i szczepu bakterii.

**Ściana komórkowa bakterii Gram-dodatnich** jest zbudowana z 40 warstw mureiny. Chemicznie około 30-70% suchej masy ściany stanowi peptydoglikan. W strukturze peptydoglikanu występują kwasy teichojoyowe i lipoteichojoyowe, które wystając nad powierzchnię warstwy mureiny tworzą ciekłą powłokę polisacharydową. Ścianę komórkową bakterii Gram-dodatnich można usunąć za pomocą enzymu – lizozymu, naturalnie występującego w łzach i błonach śluzowych jamy nosowej. Komórkę Gram-dodatnią po usunięciu ściany komórkowej nazywamy protoplastem.

**Ściana komórkowa bakterii Gram-ujemnych** składa się zaledwie z 2-3 warstw mureiny, co stanowi około 10-20%. Otoczona jest zewnętrzną błoną złożoną z lipopolisacharydów, fosfolipidów, lipoproteidów i białek. Fosfolipidy występują głównie w wewnętrznej warstwie zewnętrznej błony, a lipoproteidy łączą zewnętrzną błonę z peptydoglikanem. Warstwa lipopolisacharydowa zawiera duże ilości jonów wapnia, co czyni ją odporną na działanie lizozymu. Komórki bakterii Gram-ujemnych o usuniętej ścianie komórkowej nazywamy sferoplastami.

## Zasada barwienia metodą Grama



Rysunek 4 – Barwienie metodą Grama.

- 1) **Fiolet krystaliczny** jest zasadowym, słabo rozpuszczalnym barwnikiem, który w roztworze tworzy kationy. Łatwo penetruje przez ścianę komórkową i błonę cytoplazmatyczną bakterii Gram-ujemnych i Gram-dodatnich wnikając do wnętrza komórki. Na tym etapie wszystkie komórki wybarwione są na fioletowo.
- 2) Następnie na preparat nanosi się  **płyn Lugola**, który stanowi roztwór jodu w jodku potasu. Jony jodu łatwo przenikają do wnętrza komórki, podobnie jak cząsteczki fioletu krystalicznego. Kationy barwnika reagują z jonami jodu tworząc wielkocząsteczkowe, nierozpuszczalne w wodzie kompleksy. Wszystkie komórki nadal zabarwione są na kolor fioletowy.
- 3) Trzeci etap polega na naniesieniu odbarwiacza (roztworu alkoholu lub mieszaniny acetonu z alkoholem). **Odbarwiacz** wnika w warstwy mureiny bakterii powodując dehydratację. W wyniku usunięcia wody następuje zagęszczenie sieci mureiny, a tym samym zmniejszenie pustych przestrzeni w wielowarstwowych ścianach komórkowych. Ponadto w wyniku działania odbarwiacza u bakterii Gram-ujemnych zniszczeniu ulega zewnętrzna błona lipopolisacharydowa eksponując cienką warstwę mureiny. Kompleks barwnika z jodem zostaje uwięziony pod zwartą i grubą warstwą mureiny w komórkach bakterii Gram-dodatnich, natomiast z komórek bakterii Gram-ujemnych jest on łatwo wmywany odbarwiaczem. Na tym etapie następuje właściwe zróżnicowanie komórek. Komórki Gram-dodatnie z uwięzionym kompleksem barwnika nadal mają zabarwienie fioletowe, podczas gdy komórki Gram-ujemne stają się bezbarwne po wypłukaniu kompleksu.
- 4) Ostatnim etapem jest dodatek barwnika kontrastowego – **safraniny**. Barwnik ten, podobnie jak fiolet krystaliczny, wykazuje charakter zasadowy, słabo rozpuszcza się w wodzie, a w roztworze tworzy kationy, które łatwo penetrują poprzez warstwę mureiny i łączą się z ujemnie naładowanymi cząsteczkami takimi jak kwasy teichojowe, peptydy czy główki fosfolipidów. Ponieważ kolor safraniny jest mniej intensywny niż fioletu krystalicznego komórki Gram-dodatnie pozostają **fioletowe**. Bezbarwne komórki Gram-ujemne zabarwione safraniną przyjmują kolor **różowy**.



Przykłady bakterii:	
Gram-dodatnich	Gram-ujemnych
<i>Actinomyces</i>	<i>Acetobacter</i>
<i>Bacillus</i> *	<i>Acinetobacter</i>
<i>Bifidobacterium</i>	<i>Campylobacter</i>
<i>Clostridium</i> *	<i>Citrobacter</i>
<i>Corynebacterium</i> *	<i>Enterobacter</i>
<i>Enterococcus</i>	<i>Escherichia</i>
<i>Lactobacillus</i>	<i>Flavobacterium</i>
<i>Lactococcus</i>	<i>Helicobacter</i>
<i>Listeria</i>	<i>Klebsiella</i>
<i>Micrococcus</i>	<i>Legionella</i>
<i>Nocardia</i>	<i>Moraxella</i>
<i>Propionibacterium</i> *	<i>Neisseria</i>
<i>Sarcina</i>	<i>Proteus</i>
<i>Staphylococcus</i>	<i>Pseudomonas</i>
<i>Streptococcus</i>	<i>Salmonella</i>
	<i>Serratia</i>
	<i>Shigella</i>
	<i>Vibrio</i>
	<i>Yersinia</i>

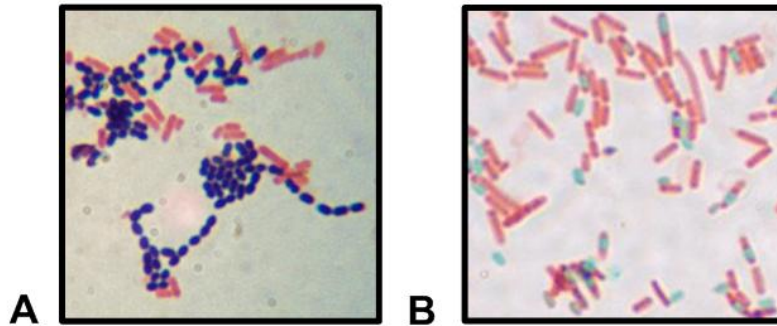
Tabela 1 – Przykłady rodzajów bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych

\*- gwiazdką zaznaczono rodzaje bakterii charakteryzujące się Gram-zmiennością

Zdarza się, że komórki Gram-dodatnie barwią się metodą Grama jak komórki Gram-ujemne. Zjawisko to nazywamy **Gram-zmiennością**. Dotyczy ono głównie bakterii z rodzajów *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium* i *Propionibacterium*. Gram-zmienność może być spowodowana wiekiem hodowli (późne fazy wzrostu), brakiem w podłożu składników odżywczych niezbędnych do syntezy ściany komórkowej (są to dla bakterii warunki stresowe) oraz dotyczyć komórek bakterii będących w fazie podziału. Czasami efekt gram-zmienności mogą wywołać takie czynniki jak: zbyt długie utrwalanie preparatu w płomieniu palnika lub za długi etap odbarwiania.

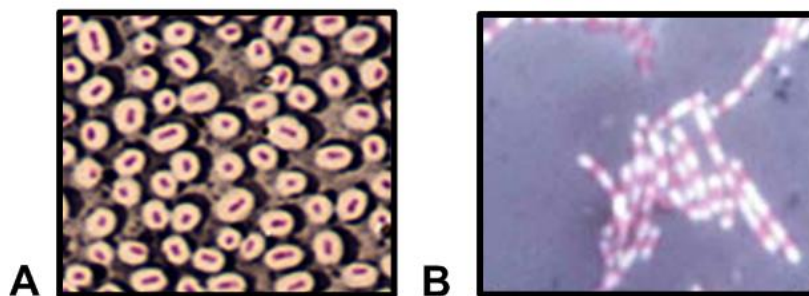
**Barwienie metodą Wirtza (Schaeffer-Fultona)** – jest przykładem barwienia pozytywnego złożonego. Pozwala na zabarwienie przetrwalników wewnątrz komórki bakterii. Polega na naniesieniu na utrwalony preparat mikrobiologiczny wodnego roztworu zieleni malachitowej, a następnie kilkukrotnym podgrzaniu szkiełka podstawowego w płomieniu palnika do zagotowania barwnika. **Zieleń malachitowa** w podwyższonej temperaturze penetruje przez powłoki przetrwalnika zabarwiając go podobnie jak komórkę wegetatywną. Kolejnym etapem jest przemywanie preparatu wodą - dekoloryzacja. Barwnik silnie zaadsorbowany we wnętrzu przetrwalnika nie zostaje z niego wypłukany w przeciwieństwie do komórki bakterii, która się odbarwia. Bezbarwną komórkę wegetatywną zabarwia się zasadowym barwnikiem kontrastowym – **safraniną**. W wyniku barwienia przetrwalniki mają zabarwienie **zielone**, a komórki wegetatywne – **różowe**.





Rysunek 5 – Obraz mikroskopowy po barwieniu: A) metodą Grama; B) metodą Wirtza (Schaeffer-Fultona)

**Barwienie złożone, pozytywno-negatywne** – jest połączeniem barwienia pozytywnego i negatywnego, polega na zastosowaniu co najmniej dwóch barwników w celu zabarwienia komórek wegetatywnych i tła preparatu np. w celu uwidocznienia otoczek bakteryjnych (barwienie Burri-Ginsa) lub zabarwienia struktur wewnątrzkomórkowych np. przetrwalników i tła preparatu (barwienie Dornera).



Rysunek 6 – Obraz mikroskopowy po barwieniu A) metodą Burri-Ginsa; B) metodą Dornera

**Barwienie metodą Burri-Ginsa** – barwienie to ma na celu uwidocznienie bezbarwnej otoczki bakteryjnej pokrywającej na zewnątrz zabarwioną komórkę wegetatywną na tle barwnego tła preparatu. Otoczka zbudowana jest z substancji śluzowych, zwykle polimerów cukrów i białek. Może być łatwo usunięta z powierzchni komórki w wyniku podgrzewania. Dlatego też w barwieniu Burri-Ginsa nie stosuje się termicznego utrwalania preparatu. Zawiesinę komórek miesza się z gruboziarnistym barwnikiem np. **nigrozyną** i pozostawia do wyschnięcia w powietrzu atmosferycznym. Na tym etapie zabarwione zostaje jedynie tło preparatu. Następnie komórki bakteryjne zabarwia się **fuksyną fenolową**. W wyniku barwienia na ciemnym polu preparatu widoczne są nie zabarwione otoczki okalające zabarwione na czerwono komórki.

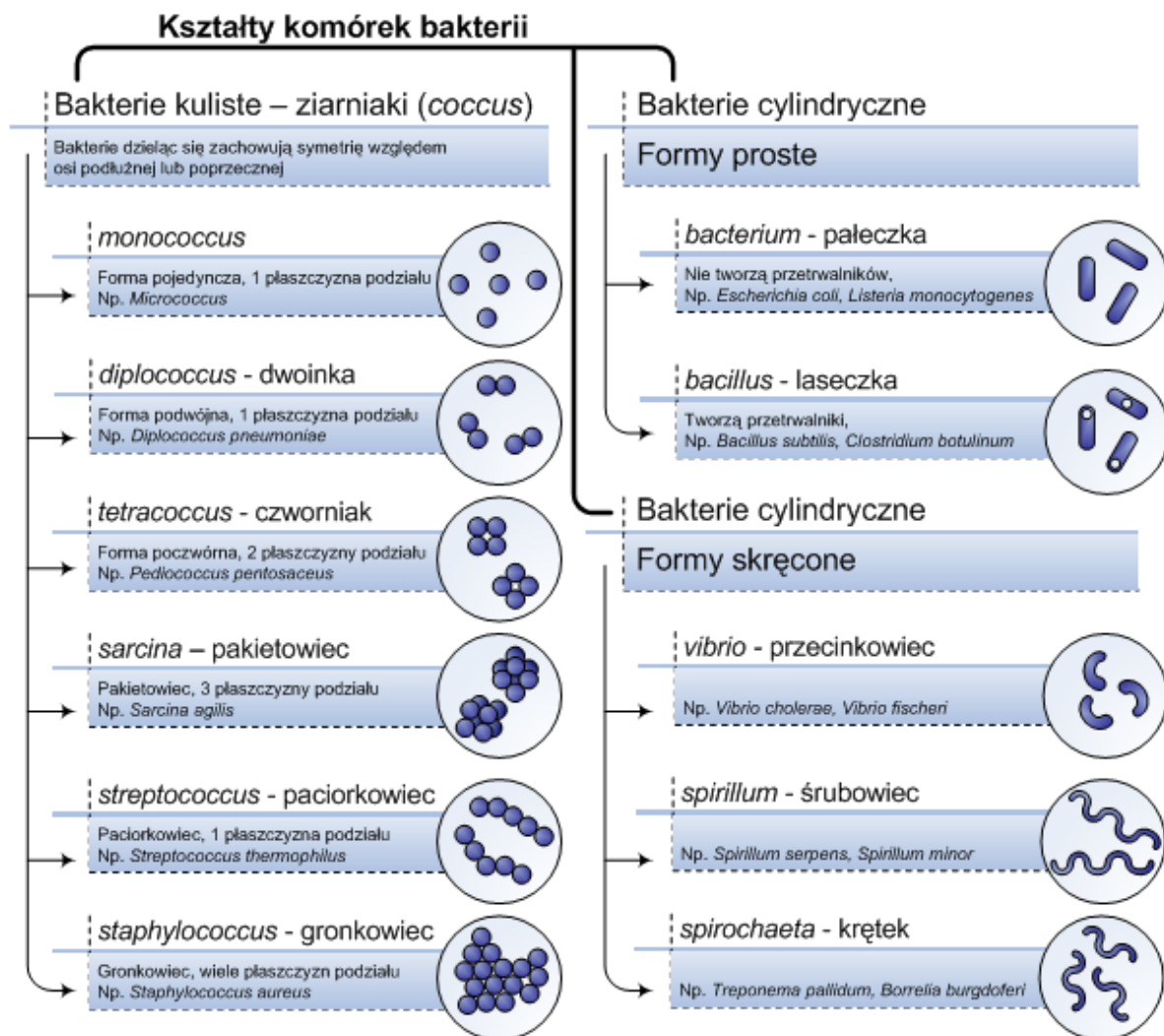
**Barwienie metodą Dornera** – pozwala na obserwację zabarwionych przetrwalników wewnątrz bezbarwnej komórki bakteryjnej na kontrastującym ciemnym tle preparatu. Do próbki zawierającej zawiesinę mikroorganizmów dodaje się **fuksyny karbolowej** i całość umieszcza w gorącej łaźni wodnej. W podwyższonej temperaturze fuksyna penetruje przez warstwy przetrwalnika barwiąc go na czerwono. Następnie kroplę zawiesiny umieszcza się na

szkiełku podstawowym i miesza z barwnikiem negatywnym – **nigrozyną**, wykonując rozmaz. Preparat wysycha w powietrzu atmosferycznym.

### Morfologia komórek bakterii

Bakterie należą do *Prokaryota* (organizmy bezjądrowe). Pod względem kształtu komórki bakterii można wyróżnić dwie grupy: bakterie kuliste – ziarniki oraz bakterie cylindryczne: proste i skręcone.

Bakterie rozmnażają się przez podział prosty. Po podziale bakterie potomne oddzielają się i funkcjonują jako niezależne lub nie rozłączają się, tworząc skupiska.



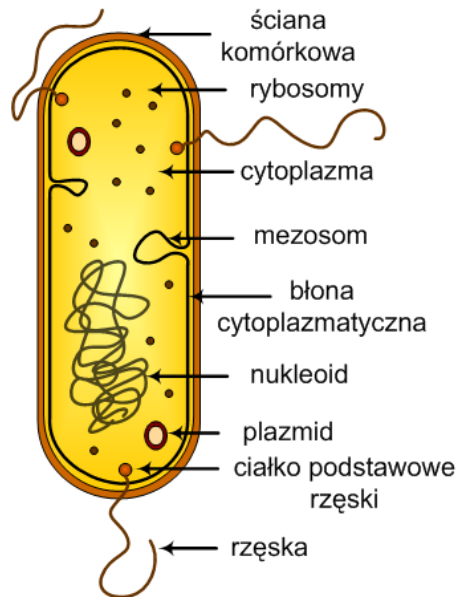
Rysunek 7 – Kształty i naturalne skupiska bakterii

Gdy w populacji bakterii występują komórki o różnych kształtach mówimy o zjawisku zwanym **pleomorfizmem**. Różnokształtność najczęściej powodują czynniki chemiczne lub fizyczne działające na populację bakterii np. antybiotyki. Formy pleomorficzne (o atypowych kształtach) mogą także powstawać po wyczerpaniu substancji odżywczych w środowisku bytowania.





Schemat budowy komórki prokariota przedstawiono na rysunku nr 8. Komórka składa się z: otoczki, ściany komórkowej, błony cytoplazmatycznej, rzęski, fimbrii, cytoplazmy, mezosomów, rybosomów, nukleoidu.

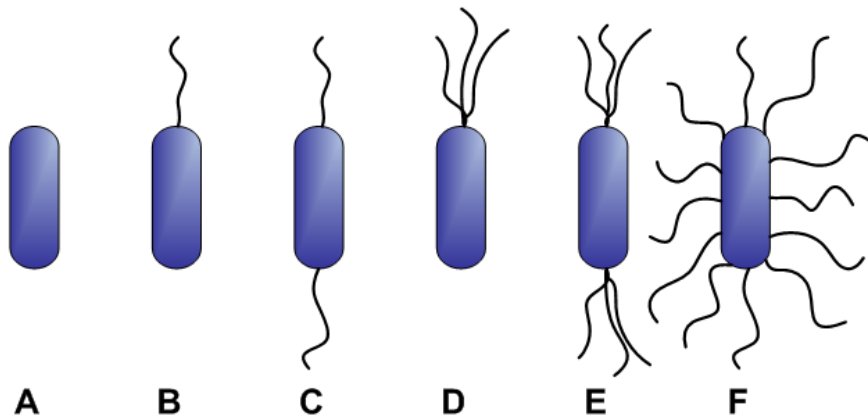


Rysunek 8 – Schemat komórki bakteryjnej.

**Otoczka** – zazwyczaj zbudowana z substancji o charakterze śluzowym. Chroni bakterie przed wysychaniem, umożliwia adhezję oraz zwiększa jej chorobotwórczość.

**Ściana komórkowa** – została szczegółowo omówiona w sekcji „Barwienie metodą Grama”

**Błona cytoplazmatyczna** – jest położona pomiędzy ścianą komórkową a cytoplazmą. Zbudowana jest z białka i fosfolipidów. Błona pełni funkcję transportową przepuszczając substancje odżywcze do wnętrza komórki i wydalając zbędne metabolity. Transport ten może się odbywać na drodze pasywnej, zgodnie z gradientem stężeń lub aktywnej wbrew gradientowi stężeń z wykorzystaniem energii oraz enzymów – permeaz.



Rysunek 9 – Typy urzęsienia bakterii, A) bezzęse, B) monotrichalne, C) amfitrichalne, D,E) lofotrichalne, F) peritrichalne



**Rzęski** – to zewnątrzkomórkowe struktury odpowiadające za ruch bakterii. Najczęściej spotykane są wśród bakterii spiralnych i cylindrycznych. Zbudowane są z białka kurczliwego – flagelliny i zakotwiczone są w cytoplazmie, błonie i ścianie komórkowej za pomocą haczyka i ciała podstawowego (bazalnego). Liczba i rozmieszczenie rzęsek ma znaczenie taksonomiczne (Rys. 9).

**Fimbrie (pile)** – to zewnątrzkomórkowe wypustki cytoplazmatyczne, krótsze niż rzęski. Zbudowane głównie z niekurczliwego białka. Wyróżnia się dwa typy fimbrii – pospolite, umożliwiające adhezję komórki i płciowe (pilusy) biorące udział w procesie koniugacji. Występują głównie u bakterii Gram-ujemnych.

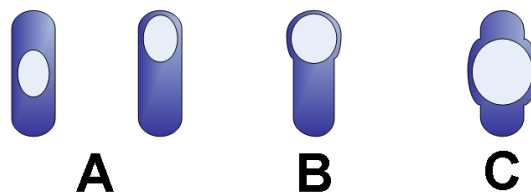
**Cytoplazma** – wypełnienie komórki, w którym zawieszono są organelle wewnątrzkomórkowe. Składa się w 80% z wody i substancji organicznych. Stanowi środowisko reakcji enzymatycznych.

**Mezosomy** – Uwypuklenia błony cytoplazmatycznej które stanowią miejsce zakotwiczenia nukleoidu, biorą udział w syntezie ściany komórkowej i zawierają enzymy oddechowe – cytochromy.

**Rybosomy** – organelle zawieszono w cytoplazmie, biorące udział w syntezie białek. W komórkach prokariotycznych występują rybosomy 70S składające się z dwóch podjednostek 30S i 50S. Zbudowane są głównie z RNA. W cytoplazmie mogą tworzyć skupiska zwane polisomami.

**Nukleoid** – to materiał genetyczny (genom) w postaci DNA, w którym znajduje się informacja genetyczna odnośnie podstawowych funkcji życiowych komórki bakterii. Nukleoid jest zakotwiczony w błonie cytoplazmatycznej, jej uwypukleniu - mezosomie, lub w ścianie komórkowej.

**Przetrwalniki** – zdolność wytwarzania przetrwalników posiadają laseczki czyli bakterie Gram-dodatnie, cylindryczne z rodzajów *Bacillus* i *Clostridium*. Przetrwalniki są to formy przetrwalne bakterii, które tworzą się w niekorzystnych warunkach środowiska w procesie sporulacji wewnątrz komórki bakteryjnej. Typ przetrwalnikowania (Rys. 10) jest cechą diagnostyczną (u laseczek *Bacillus* sp. przetrwalnik nie deformuje komórki, a deformuje u laseczek *Clostridium* sp.). Przetrwalnik zbudowany jest z rdzenia stanowiącego cytoplazmę otoczoną błoną cytoplazmatyczną, ścianą komórkową oraz korteksu (kory).



Rysunek 10 – Typy przetrwalnikowania bakterii:  
A) bacillarny, B) plektridialny, C) klostridialny



## Morfologia kolonii

Koloniją nazywamy zbiór komórek wyrastających na podłożu stałym na płytce Petriego. Przy opisie kolonii najważniejsze są następujące cechy:

- ✓ Wielkość kolonii – duże, średnie, małe, drobne, średnica kolonii podana w milimetrach
- ✓ Kształt kolonii:



- ✓ Brzeg kolonii:



- ✓ Powierzchnia kolonii: gładka, szorstka, pomarszczona, nitkowata, ziarnista, matowa, błyszcząca;
- ✓ Wzniesłość kolonii ponad powierzchnię podłoża:



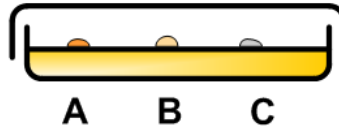
- ✓ Kolor kolonii: barwa samej kolonii np. biała, kremowa, beżowa, żółta; zabarwienie podłoża wokół kolonii, strefa przejaśnienia wokół kolonii itp.
- ✓ Przezroczystość kolonii: przezroczysta, mętna, opalizująca, nieprzezroczysta;
- ✓ Konsystencję kolonii sprawdza się za pomocą ezy i określa jako: suchą, lepłą, śluzowatą;
- ✓ Zapach kolonii - mydlany, kwaśny, piwa, miodu, kasztanów, gnilny;
- ✓ Zawieszalność kolonii w płynie fizjologicznym- zdolność tworzenia jednolitej zawiesiny w roztworze płynu fizjologicznego (0,85% NaCl) - łatwa lub nie, zawiesina grudkowata, niejednorodna.



## Część praktyczna:

### 1. Opis morfologii kolonii.

Opisać morfologię wybranych trzech różnych kolonii wyrosłych na płytkach z ćwiczenia nr 1 (odcisk opuszków palców). Kolonie należy nazwać jako A, B, C i opisać według cech określonych w przewodniku w sekcji „Morfologia kolonii”.



Opisać wybrane kolonie

Cechy kolonii:	Kolonia A	Kolonia B	Kolonia C
Wielkość [mm]			
Kształt			
Brzeg			
Powierzchnia			
Wyniosłość			
Kolor			
Przejrzystość			
Zapach			
Barwienie Grama			
Kształt komórki			

### 2. Barwienie złożone pozytywne - metodą Grama:

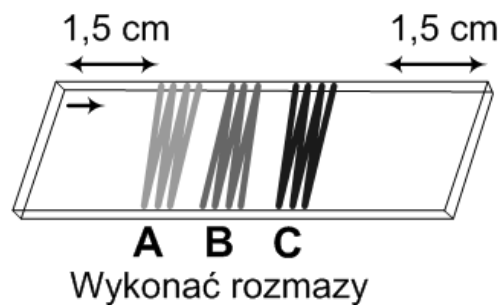
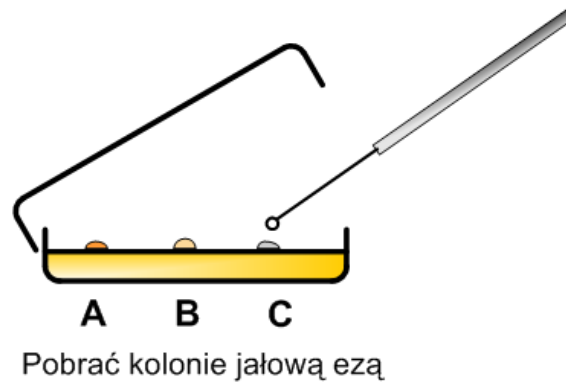
#### a. Barwienie wybranych kolonii bakterii

Przygotować szkiełko podstawowe do barwienia (odtuszczanie). Szkiełko podpisać od spodu np. rysując strzałkę (aby po barwieniu wiedzieć, z której strony nanieśliśmy materiał). Na powierzchnię szkiełka podstawowego nanieść jałową eżą trzy krople płynu fizjologicznego zachowując odstęp od krawędzi szkiełka co najmniej 1,5 cm.. Następnie jałową eżą pobrać kolonie z powierzchni podłoża i wykonać rozmaz na szkiełku podstawowym zawieszając pobraną biomasa bakterii w kropli płynu fizjologicznego (odpowiednio dla kolonii A, B i C).

Wysuszyć preparat w temperaturze pokojowej, a następnie utrwalić termicznie przeprowadzając trzykrotnie przez płomień palnika, rozmazem do góry. Po ostygnięciu preparatu wykonany rozmaz użyć do barwienia.

#### b. Barwienie zawiesiny mikroorganizmów

Jałową eżą pobrać zawiesinę mikroorganizmów i wykonać rozmaz na przygotowanym szkiełku podstawowym zachowując odstęp od krawędzi szkiełka co najmniej 1,5 cm. Wysuszyć preparat w temperaturze pokojowej, a następnie utrwalić termicznie przeprowadzając trzykrotnie przez płomień palnika, rozmazem do góry. Po ostygnięciu preparatu wykonany rozmaz użyć do barwienia.



Procedura barwienia metodą Grama:

- ✓ preparat barwić roztworem fioletu krystalicznego przez 1 minutę
- ✓ spłukać dokładnie wodą
- ✓ zalać preparat płynem Lugola na 1 minutę
- ✓ spłukać dokładnie wodą
- ✓ zalać na 30 sekund mieszaniną alkohol – aceton (odbarwiacz)
- ✓ spłukać dokładnie wodą
- ✓ dobarwić safraniną przez 1 minutę
- ✓ spłukać dokładnie wodą
- ✓ osuszyć delikatnie bibułą

Oglądać preparat w mikroskopie z użyciem olejku immersyjnego (powiększenie obiektywu 100 x)

- ✓ bakterie Gram-dodatnie są zabarwione na fioletowo
- ✓ bakterie Gram-ujemne są zabarwione na różowo
- ✓ Obserwacje mikroskopowe bakterii tworzących kolonie A, B, C zapisać w tabeli (efekt barwienia metodą Grama, kształt/ułożenie komórek w obrazie mikroskopowym).

Zawiesinę mikroorganizmów zabarwić również metodą prostą z użyciem fioletu krystalicznego.

**3. Mikroskopowanie gotowego preparatu zabarwionego metodą Dornera (barwienie złożone pozytywno-negatywne).** Mikroskopować pod olejkiem immersyjnym przy powiększeniu obiektywu 100x.. W preparacie należy zaobserwować, opisać i narysować typy przetrwalnikowania bakterii.





- 4. Barwienie proste negatywne z zastosowaniem nigrozyny.** Na odtłuszczone szkiełko podstawowe nanieść niewielką kroplę barwnika – nigrozyny (w razie potrzeby nadmiar barwnika odsączyć bibułą). Pobrać jałową wykałaczką nalot z płytki nazębnej (biofilm mikroorganizmów), a następnie wykonać rozmaz na powierzchni szkiełka. Preparat suszyć w powietrzu atmosferycznym. Mikroskopować pod olejkiem immersyjnym przy powiększeniu obiektywu 100x.