

Metodyka identyfikacji mikroorganizmów

Bakterie

Obserwacja makroskopowa

W przypadku identyfikacji bakterii dużą rolę odgrywa wstępne przeanalizowanie charakterystycznych cech wzrostu kolonii. Należy przy tym zwrócić uwagę na jej kolor, wielkość, kształt, umiejscowienie w pożywce (bakterie beztlenowe rosną wewnątrz albo pod pożywką), przejrzystość kolonii oraz jej strukturę po zetknięciu z oczkiem ezy (ziarnista, włóknista, krucha, ciągnąca się). Na tej podstawie można wstępnie stwierdzić czy kolonie należą do tego samego gatunku i ograniczyć liczbę szczepów mikroorganizmów, które po zabezpieczeniu przeszczepia się do dalszych badań (Buchanan & Gibbon, 1974; Drewniak i Drewniak, 1996; Kocwowa, 1979).

Obserwacja mikroskopowa

W tym celu barwi się mikroorganizm metodą Grama, a następnie bada preparat „pod immersją” przy wykorzystaniu mikroskopu świetlnego. Na podstawie kształtu (ziarniaki, pałeczki itp.), wielkości, wzajemnego układu komórek (dwoinki, tetrady, łańcuszki itp.), obecności przetrwalników (i ich usytuowania w komórce) oraz zabarwienia (różowe – Gram-, fioletowe – Gram+), można stwierdzić do jakiej grupy bakterii należy identyfikowany szczep.

Obserwacja mikroskopowa umożliwia wykazanie obecności ruchu mikroorganizmu, w kropli np. płynu Lugola pod powiększeniem 40x. Rozróżnia się ruch rzeczywisty bakterii od ruchów molekularnych, wynikających ze zjawisk fizycznych, określanych „ruchem biernym” (Buchanan & Gibbon, 1974; Drewniak i Drewniak, 1996; Kocwowa, 1979).

Testy biochemiczne

Korzystano z mikrometod metabolicznych wg Kocwy do szybkiego oznaczania właściwości biochemicznych bakterii. Powyższe testy opracowane w latach 1962-65, okazały się tańsze, prostsze i szybsze od dotychczas stosowanych. Kolejną bardzo ważną ich zaletą była możliwość przeprowadzania oznaczeń w warunkach niesterylnych. Mikrometody metaboliczne polegają na stosowaniu podłoży wyłącznie nieodżywczych, hamujących wzrost bakterii, dzięki czemu eliminuje się reakcje wtórne i uniemożliwia rozwój ewentualnych zakażeń. Opierają się one na zasadzie reakcji enzymu zawartego w masie bakteryjnej z substratem obecnym w żelu agarowym. Technika mikrotestów metabolicznych jest bardzo prosta. Zamiast stosować, płynną hodowlę drobnoustrojów w probówkach, co ma miejsce w przypadku makrometod i oczekiwać na wzrost oraz powstanie poszukiwanego związku, używa się masy bakteryjnej, wyhodowanej na agarze skośnym, jako źródła gotowych już enzymów. Nakłada się ją w postaci kolonii na powierzchnię podłoża. Przedmiotami działania enzymów są różne substraty (cukier, alkohol, glikozyd, mocznik, tryptofan, cystyna itp.) zawarte w żelu agarowym (bez substancji odżywczych). W tym celu masę bakteryjną umieszcza się na mikroteście, w wyniku dyfuzji enzymu do substratu i odwrotnie powstaje metabolit, który można wykryć za pomocą uprzednio wprowadzonego do agaru indykatora, lub po dodaniu odczynników, po upływie odpowiedniego czasu. Jeśli wskaźnik znajduje się w żelu agarowym, reakcja występuje w formie okrągłej, zabarwionej strefy naokoło „kolonii” z masy bakteryjnej. Większa ilość produktu reakcji enzymatycznej, powoduje silniejsze przebarwienie.

W przypadku prowadzonych identyfikacji wykorzystywano mikrotest na wykrywanie fermentacji substancji cukrowych. Zastosowano modyfikację indykatora, zastępując CaCO_3 roztworem błękitu bromotymolowego, który zmienia zabarwienie pod wpływem zakwaszenia środowiska z niebieskiej na żółtą (niebieska barwa

przy pH = 7,6, żółta przy pH = 6,0) (Kocwowa,1979).

Pleśnie

Obserwacja makroskopowa

Polega ona na scharakteryzowaniu wyglądu kolonii czystej kultury pleśniowej rosnącej na pożywce brzezkowej. Opis obejmuje barwę kolonii i rewersu, jej wyglądu (spilśniona, meszkowata, watowata), wysokości, oraz innych cech charakterystycznych dla wzrostu badanego szczepu.

Obserwacja mikroskopowa

Przeprowadza się pod powiększeniem obiektywu 40 lub 60x. Fragment grzybni pobrany ezą, umieszcza się w kropli płynu Lugola lub fizjologicznego na szkiełku podstawowym. Po przykryciu szkiełkiem nakrywkowym, przystępuje do badania mikroskopowego, obserwując cechy charakterystyczne szczepu tj. barwę strzępek, obecność septowania grzybni (przyporządkowanie grzyba do odpowiedniej klasy), kształt i wielkość zarodni oraz zarodników, ich umiejscowienie, obecność chwytników (rhizoidów). Na tej podstawie określa się pod względem przynależności badany szczep, przy użyciu odpowiedniego klucza identyfikacyjnego.

Drożdże

Obserwacja makroskopowa

Obserwuje się cechy charakterystyczne rosnącej, czystej kultury do których należą kolor kolonii, jej wygląd, konsystencja, ewentualnie zapach.

Obserwacja mikroskopowa

W tym celu umieszcza się badany szczep w kropli płynu Lugola pod powiększeniem obiektywu 40 lub 60x. Cechami które można ocenić są wielkość komórek, mierzona za pomocą okularu mikrometrycznego lub przeliczana ze wzoru:

Podczas mikroskopowania ważne jest również stwierdzenie kształtu drożdży (kuliste, owalne, cytrynkowate, podłużne), oraz typu rozmnażania bezpłciowego poprzez pączkowanie, albo podział. Pączki mogą tworzyć się w różnych miejscach komórki macierzystej (polarnie, równikowo) i w zmiennej ilości w końcowym etapie organizm potomny odrywa się lub pozostaje dalej połączony z „Matką” tworząc z czasem większe skupisko (kolonię) drożdży. Zdolność ta jest charakterystyczna dla każdego rodzaju drożdżaka. Drugi typ rozmnażania jest charakterystyczny jedynie dla kilku szczepów *Schizosaccharomyces*, i polega na poprzecznym dzieleniu się komórki. Inną cechą możliwą do zaobserwowania podczas obserwacji mikroskopowej jest tworzenie grzybni lub pseudogrzybni, które można zaobserwować jako drobne drzewkowate struktury (Drewniak i Drewniak, 1996).

Zarodnikowanie drożdży

Jednym ze sposobów rozmnażania umożliwiającym niektórym gatunkom, przetrwanie niesprzyjających warunków otoczenia, jest tworzenie zarodników w sposób bezpłciowy lub płciowy. W pierwszym przypadku, następuje po przeszczepieniu silnie rosnącej kultury na specyficzną pożywkę tj. agar Gorodkowa, agar octanowy, agar z ekstraktem słodowym itp. Askospory powstają wówczas wokół dzielącego się jądra. W drugim dochodzi do połączenia dwóch komórek, w wyniku czego powstaje zygota (worek). W jej wnętrzu tworzą się zarodniki. Kształt (od kulistych po kapeluszowate i igiełkowate), liczba (od jednego do 32) i ułożenie zarodników stanowią cechę rozpoznawczą gatunku. Askospory wykazują większą odporność na niekorzystne warunki otoczenia niż komórki wegetatywne, lecz mniejszą niż przetrwalniki bakterii. Niszczy je zabieg pasteryzacji. Drożdże posiadające zdolność wytwarzania zarodników klasyfikuje się do klasy workowców (Ascomycetes) pozostałe do klasy grzybów niedoskonałych (Deuteromycetes) (Barnett, 1983; Praca zbiorowa, 1993).

Testy biochemiczne

Celem jest scharakteryzowanie badanego szczepu pod względem jego zdolności do wzrostu w zmiennych warunkach i wykorzystywania różnych źródeł węgla, azotu i innych składników. Podstawowym testem jest sprawdzanie możliwości utylizowania cukrów beztlenowo tzw. próby fermentacyjne, co polega na szczepieniu drożdżami pożywek płynnych zawierających w swoim składzie różne węglowodany. Przy braku tlenu cukry są przekształcane podczas procesu fermentacji przez niektóre gatunki w różne produkty tj. kwasy organiczne, alkohole itp., a finalnie – dwutlenek węgla, który zbiera się wewnątrz probówek w rurkach Durhama. Ponad połowa wszystkich gatunków drożdży posiada zdolność odfermentowywania przynajmniej D-glukozy, w przypadku fermentacji alkoholowej reakcja zachodzi według schematu:

Kolejnym podstawowym testem służącym do identyfikacji omawianych mikroorganizmów jest grupa testów asymilacyjnych. Wykonywane są w warunkach tlenowych i badają zdolność danego gatunku do wykorzystywania jedyne go źródła węgla lub azotu. W przypadku określania asymilacji składników organicznych jako źródła węgla, stosuje się węglowodany, alkohole jedno- i wielowodorotlenowe, oraz kwasy organiczne. Wszystkie drożdże potrafią wykorzystywać glukozę jako źródło węgla, stąd stanowi ona kontrolę pozytywną, negatywną natomiast jest próbówka zawierająca pożywkę bazową bez źródła węgla. Test może być przeprowadzony jedną z trzech metod: na pożywkach płynnych, auksanogramami (metoda posypowa), lub replikacji płytek. W oznaczeniach do pracy magisterskiej wykorzystywano pierwszą ze wspomnianych wersji analiz.

Drożdże między sobą różnią się zapotrzebowaniem na egzogenne źródło pewnych witamin, co sprawdza się stosując testy określające zdolność wzrostu przy deficycie pojedynczych witamin lub przy całkowitym ich braku. Większość gatunków wymaga do swojego wzrostu obecności przynajmniej dwóch z nich: biotyny i tiaminy.

Niektóre szczepy drożdży (np. z rodzaju *Cryptococcus*)

charakteryzują się wytwarzaniem składników skrobiopodobnych na pożywkach z glukozą i są łatwe do wykrycia ponieważ tworzą barwne, fioletowe kompleksy w obecności płynu Lugola (Barnett,1983).

Dla osób szukających pomocy w pisaniu prac z różnych dziedzin polecamy serwis [pisanie prac](#) z prawa, administracji, zarządzania, marketingu, pedagogiki i wielu innych dziedzin.