



Živilska mikrobiologija z biotehnologijo – laboratorijske vaje

Nada Petrič

Naslov: Živilska mikrobiologija z biotehnologijo
Izobraževalni program: Živilsko prehranski tehnik
Modul: Živilska mikrobiologija z biotehnologijo
Sklop: Živilska mikrobiologija, Biotehnologija

Avtorica: Nada Petrič, dipl. ing. živ. teh.

Strokovni/-a recenzent/-ka: mag. Irena Štrumbelj Drusany, dipl. ing. živ. teh.

Lektor/-ica: Marjana Mastinšek Šuštar, prof. slo. jezika

CIP – Kataložni zapis o publikaciji
Narodna in univerzitetna knjižnica, Ljubljana

579.67(075.3) (076.5) (0.034.2)

PETRIČ, Nada

Živilska mikrobiologija z biotehnologijo [Elektronski vir] :
laboratorijske vaje / Nada Petrič. – El. knjiga. – Ljubljana :
Biotehniški izobraževalni center, 2010. – (Izobraževalni program
Živilsko-prehranski tehnik. Modul Živilska mikrobiologija z
biotehnologijo. Sklop Živilska mikrobiologija, biotehnologija)

Način dostopa (URL): <http://www.konzorcij-bss.bc-naklo.si/>

ISBN 978-961-92973-5-3 (pdf)

256570368

Ljubljana, 2010

© Avtorske pravice ima Ministrstvo za šolstvo in šport Republike Slovenije.

Gradivo je sofinancirano iz sredstev projekta Biotehniška področja, šole za življenje in razvoj (2008-2012).

Operacijo delno financira Evropska unija iz Evropskega socialnega sklada ter Ministrstvo za šolstvo in šport. Operacija se izvaja v okviru operativnega programa razvoja človeških virov za obdobje 2007 – 2013, razvojne prioritete: Razvoj človeških virov in vseživljenjskega učenja, prednostna usmeritev: Izboljšanje kakovosti in učinkovitosti sistemov izobraževanja in usposabljanja.

Vsebina tega dokumenta v nobenem primeru ne odraža mnenja Evropske unije. Odgovornost za vsebino dokumenta nosi avtor.

KAZALO

KAZALO	2
VARNO DELO V MIKROBIOLOŠKEM LABORATORIJU	5
STERILIZACIJA PRIBORA IN GOJIŠČ	7
AVTOKLAVIRANJE.....	7
SUHA STERILIZACIJA	8
STERILIZACIJA Z OŽIGANJEM.....	9
TINDALIZACIJA.....	9
MIKROSKOP	10
OPTIČNI DELI.....	11
MEHANSKI DELI	11
POT SVETLOBE SKOZI MIKROSKOP	12
UPORABA IN VRSTE MIKROSKOPOV	15
MIKROSKOPIRANJE ČRK.....	16
SKRB ZA MIKROSKOP	16
PRIPRAVA MIKROSKOPSKIH PREPARATOV	19
RAVNANJE S PLINSKIM GORILNIKOM.....	20
SPOZNAVANJE GIBANJA IN OBLIK MIKROORGANIZMOV	23
GLIVE.....	25
UPORABA GLIV	27
IZOLACIJA IN GOJENJE GLIV.....	27
IZOLACIJA GLIV Z UPORABO VLAŽNE KOMORE	28
BARVANJE MIKROBIOLOŠKIH PREPARATOV	30
FIKSIRANJE RAZMAZOV.....	30
BARVANJE.....	30
PRIPRAVA BARVIL.....	32
ENOSTAVNO BARVANJE.....	33
MIKROSKOPIRANJE Z IMERZIJSKIM OBJEKTIVOM	35
SESTAVLJENA BARVANJA	37
Barvanje po Gramu	37
MERJENJE VELIKOSTI MIKROORGANIZMOV	39
PRIPRAVA HRANILNIH PODLAG ALI GOJIŠČ	42
PRIPRAVA HRANILNIH PODLAG	44
PRIPRAVA GOJIŠČA, KADAR GA NIMAMO PRIPRAVLJENEGA	45
VPLIV TEMPERATURE NA RAST MIKROORGANIZMOV	47

DEJAVNIKI, KI VPLIVAJO NA ŽIVLJENJSKE PROCESSE BAKTERIJ	49
IZOLACIJA BAKTERIJ Z RAZLIČNIH POVRŠIN IN GOJENJE BAKTERIJ.....	54
IZOLACIJA BAKTERIJ Z RAZLIČNIH POVRŠIN (BRISI)	56
IZOLACIJA BAKTERIJ IZ TEKOČIH VZORCEV IN RAZREDČEVANJE VZORCEV	59
IZOLACIJA MIKROORGANIZMOV IZ TRDNEGA VZORCA	63
IZOLACIJA ČISTE KULTURE	66
UGOTAVLJANJE VELIKOSTI MIKROBNIH POPULACIJ	70
IZOLACIJA IN UGOTAVLJANJE ŠTEVILA MIKROORGANIZMOV V ZEMLJI.....	71
UGOTAVLJANJE PRISOTNOSTI KOLIFORMNIH MIKROORGANIZMOV V MLEKU	77
UGOTAVLJANJE PRISOTNOSTI KOLIFORMNIH MIKROORGANIZMOV V VODI.....	79
SPREMLJANJE POTEKA ALKOHOLNEGA VRENJA	81
SHRANJEVANJE GLIV V ALGINATNIH KROGLICAH.....	84
BIOPROCES – IZDELAVA KISLEGA TESTA V VELIKIH ČAŠAH	86

KAZALO SLIK

Slika 1: Avtoklav.....	8
Slika 2: Suhi sterilizator.....	8
Slika 3: Svetlobni binokularni mikroskop.....	14
Slika 4: Elektronski mikroskop.....	15
Slika 5: Priprava razmaza, njegovo sušenje in fiksiranje za barvanje po Gramu.....	20
Slika 6: Laboratorijski plinski gorilnik.....	20
Slika 7: Paramecij.....	23
Slika 8: Rodova <i>Rhizopus</i> in <i>Mucor</i>	25
Slika 9: Morfologija rodu <i>Aspergillus</i> Slika 10: Morfologija rodu <i>Penicillium</i>	26
Slika 11: Objektno steklo, imerzijsko olje, imerzijski objektiv.....	35
Slika 12: Gojišča v epruveh.....	43
Slika 13: Rast bakterijske kulture pri različnih temperaturah.....	47
Slika 14: Polavtomatska pipeta.....	51
Slika 15: Tipi kolonij glede na obliko in profil.....	55
Slika 16: Razmaz brisa na plošči.....	57
Slika 17: Spatula.....	59
Slika 18: Izolacija mikroorganizmov iz tekočega vzorca.....	61
Slika 19: Shema izolacije mikroorganizmov iz tekoče kulture.....	64
Slika 20: Sterilno delo z epruvetami in ezo.....	65
Slika 21: Cepljenje čiste kulture.....	67
Slika 22: Ena od tehnik izolacije čiste kulture.....	68
Slika 23: Izolacija čiste kulture na petrijevi plošči.....	68
Slika 24: Kvasne celice v mrežici 16 kvadratkov in pravilno štetje kvasovk.....	74
Slika 25: Burkerturkova komora.....	74
Slika 26: Nacepljene in inkubirane epruvete s tekočim gojiščem, z briljantno zelenim laktoznim žolčnim bujonom z Durhamovimi cevkami.....	78
Slika 27: Naprava za spremljanje alkoholnega vrenja.....	82
Slika 28: Izdelava kislega testa v velikih čašah.....	88

VARNO DELO V MIKROBIOLOŠKEM LABORATORIJU

1. Po vstopu v mikrobiološki laboratorij si oblečemo čisto belo haljo, ki varuje obleko in zmanjša možnost okužbe, in jo zapnemo. Po uporabi haljo operemo. Dolgi lasje morajo biti speti, da si jih pri delu ne ožgemo in da jih ne namakamo v gojišča in mikrobne kulture.
2. V laboratorij jemljemo samo predmete, ki jih pri vajah potrebujemo. Vse drugo odložimo v garderobno omarico.
3. Pred delom in po njem si skrbno umijemo roke z milom in si jih razkužimo z dezinfekcijskim sredstvom.
4. Delovne površine steriliziramo z alkoholom ali drugimi dezinfekcijskimi sredstvi pred uporabo in po njej.
5. Oblačil, knjig, zvezkov in drugih osebnih predmetov ne polagamo na delovne površine v laboratoriju.
6. Mikrobiološke vaje lahko opravljajo le zdravi dijaki in učitelji. Vsako vreznino ali odrgnino moramo prekriti s čistim obližem, ki ne prepušča vode.
7. V laboratoriju ne jemo, ne pijemo, ne žvečimo in ne kadimo in se ne gibljemo po prostoru brez potrebe. Ker se lahko okužimo skozi usta, nos, oči in kožo (obstaja tudi nevarnost zastrupitve in alergičnih reakcij), pri delu ne dajemo ničesar v usta (svinčnika, peresa, steklovine, ne grizemo nohtov idr.).
8. V laboratoriju je prepovedano objestno obnašanje, ravnati moramo previdno, saj malomarnost pripelje do nesreč, ki so lahko zdravju nevarne.
9. Z **živimi mikrobi delamo previdno** (ne odpiramo petrijevk, v katerih so zrasle morda patogene bakterije) in **aseptično** ob plamenu plinskega gorilnika.

Aseptično delo: s kulturami mikroorganizmov ali z materialom, v katerem pričakujemo mikroorganizme, delamo tako, da:

- onemogočimo dostop neželenim mikroorganizmom, ki bi kontaminirali naše kulture in zaradi katerih bi bili rezultati poskusov napačni;
- hkrati pazimo, da mikroorganizmov ne razširjamo, ker s tem ogrožamo sebe in druge.

To zagotovimo tako, da:

- zmeraj delamo ob plamenu plinskega gorilnika v razdalji do 30 cm;
 - so steklovina, predmeti in pripomočki za delo ter gojišča za gojenje mikroorganizmov sterilni. Cepilno zanko, vratove tub in steklenic pred uporabo obžgemo nad plamenom. Pinceto, škarje, kovinske ali steklene žlice, nože, steklene palčke je potrebno potopiti v 70 % alkohol in nato zažgati;
 - po končanem delu previdno zavržemo uporabljeni material, saj je kontaminiran. Posebej odlagamo potrebščine, ki jih lahko ponovno uporabimo, v zanje pripravljene odlagalnike (epruvete, steklene pipete, stekleničke itd.) in material, ki ga bomo zavrgli. Oboje je potrebno sterilizirati, šele nato lahko neuporaben material zavržemo, preostalo pa pripravimo za uporabo.
10. Vsako razlitje kulture in razbitje inventarja je potrebno takoj javiti asistentu ali učitelju. Ob razbitju laboratorijske posode s tekočo ali trdno mikrobiološko kulturo ali ob razlitju lahko pride do okužbe z delci v zraku (aerosoli).

Z rokami se ne dotikamo kolonij ali suspenzij živih mikroorganizmov. Kontaminirano delovno površino prekrijemo s papirnato brisačo, prelijemo z razkužilom in pustimo delovati najmanj 20 minut. Kontaminirano mesto na telesu ali obleki razkužimo in nato speremo z vodo.

Razbite steklovine ne prijemamo z rokami. Uporabljamo rokavice, metlo in posodo za smeti.

11. Ne odlagamo cepilnih zank na delovne površine, ne da bi jih prej razkužili z ožiganjem.
12. Če pridejo naše roke v stik z mikroorganizmi, si jih temeljito umijemo, razkužimo in osušimo.
13. Mikrobioloških kultur ne smemo nositi iz laboratorija.
14. Čaše ali puhalke z alkoholom nimamo v bližini plamena.
15. Tekočine obvezno pipetiramo z žogico za pipetiranje ali s polavtomatsko pipeto.

Z aparaturami ravnamo po navodilih, ki veljajo za vse naprave pod električno napetostjo. Z mokrimi rokami se ne dotikamo električnih aparatov, kajti voda in elektrika ne gresta skupaj. Če opazimo kakršnokoli napako na električni napeljavi, to javimo vodji vaj.

16. Če se nam po nesreči vžge rokav pri delu ob plinskem gorilniku, ga takoj pogasimo s tekočo vodo.
17. Če v laboratoriju zagori manjši ogenj (npr. na delovnem pultu), ga hitro pogasimo z brisačo ali s čim podobnim, nikakor pa ne z roko.
18. Ravnanje z opeklinami: z njimi ravnamo kot z odprtimi ranami. Če se obleka drži opeklino, je ne skušamo odtrgati, ampak jo okrog rane le obrežemo. Manjše opeklino namažemo z mastjo proti opeklinam in sterilno prevezemo, na večje položimo sterilno gazo, rahlo povijemo s povojem in poiščemo zdravniško pomoč.
19. Ravnanje s poškodbami oči: če v oči brizgne jedka tekočina, jih takoj speremo z veliko vode. Drobcev, ki so zadržani v oči, ne odstranjujemo sami. Pri vsaki poškodbi oči poiščemo zdravniško pomoč.
20. Rezultate dela si sproti zapisujemo v delovni zvezek.
21. Po opravljenem delu pospravimo za seboj, pomijemo steklovino, če je potrebno, razkužimo delovne površine. Prepričamo se, da so plinske cevi zaprte.
22. Po končanem delu si skrbno umijemo roke z milom in roke razkužimo. Pustimo, da se posušijo (vsaj 2 minuti), nato slečemo haljo.
23. Za red in čistočo v mikrobiološkem laboratoriju odgovarjata dežurna dijaka.

STERILIZACIJA PRIBORA IN GOJIŠČ

Sterilizacija je proces, pri katerem uničimo vegetativne oblike mikroorganizmov in njihove spore ter viruse.

Poznamo številne sterilizacijske metode, izbor pa je večinoma odvisen od priročnosti postopka in narave materiala, ki ga je potrebno sterilizirati. Najpogosteje uporabljamo sterilizacijo s toploto in tudi filtracijo kot hladno sterilizacijo tekočin, sterilizacijo z obsevanjem in sterilizacijo s kemičnimi snovmi. V mikrobiološkem laboratoriju največ uporabljamo sterilizacijo s toploto oz. avtoklaviranje, tindalizacijo, suho sterilizacijo in sterilizacijo z ožiganjem.

Sterilizacijska moč toplote je odvisna od temperature, časa, prisotnosti vlage ter od števila in stanja prisotnih mikroorganizmov.

AVTOKLAVIRANJE

Avtoklaviranje je sterilizacija z vročo paro pod tlakom. Večinoma poteka pri $T = 121\text{ }^{\circ}\text{C}$, povišanem tlaku 1,3 bara, 15–20 minut. Občutljivejše materiale avtoklaviramo pri $T = 105\text{ }^{\circ}\text{C}$, tlaku 0,5 bara, 30 minut. Uporabljajo pa se še druge kombinacije temperature, pritiska in časa.

Postopek poteka v avtoklavu. To je posoda, v kateri segrejemo vodo pod tlakom nad $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ in deluje po principu lonca na pritisk (pogovorno ekonom lonec). Postopek je primeren za sterilizacijo večine gojišč, vodnih raztopin, steklene in plastične laboratorijske posode, pipetnih nastavkov ipd. V avtoklavu steriliziramo tudi različne trdne materiale, plastične predmete, tekočine (npr. fiziološko raztopino), gume, tkanine in odpadni material (nacepljena gojišča, uporabljene sterilne vatenke idr.).

V avtoklav nalijemo vodo do primerne višine in na nosilno mrežo postavimo material, ki ga želimo sterilizirati. Avtoklav zapremo in vklopimo grelec. Po koncu sterilizacije grelec izklopimo in počakamo, da se avtoklav ohladi. Pri tem pade tudi tlak. Avtoklav smemo odpreti šele, ko je tlak v avtoklavu enak atmosferskemu tlaku.

Pri avtoklaviranju tekočin, pa tudi drugih predmetov, moramo biti posebej pozorni, da ne odpremo avtoklava, dokler se ne ohladi, sicer pride lahko do nesreče (tekočine zavrejo, brizgnejo iz steklenic, steklo poči).



Slika 1: Avtoklav

Vir: http://www.ark.co.ba/lab/parni_sterilizatori.html

SUHA STERILIZACIJA

To je najbolj preprosta metoda, ki poteka v sterilizatorjih, in sicer običajno pri $T = 170\text{ }^{\circ}\text{C}$, 1 uro. Zrak mora znotraj pečice krožiti, da se vsi materiali enakomerno segrevajo. Suha toplota je manj učinkovita od vlažne, zato je potrebno segrevati dalj časa, da uničimo mikroorganizme.

Postopek je primeren za sterilizacijo steklovine, nekaterih kovinskih predmetov ter za nekatere sestavine gojišč, ki bi jih para uničila (npr. rižev škrob). Predmete zložimo v posebne kasete ali pa jih zavijemo v aluminijasto folijo.



Slika 2: Suhi sterilizator

Vir: <http://hr.wikipedia.org/wiki/Sterilizacija>

STERILIZACIJA Z OŽIGANJEM

Je najbolj preprosta metoda.

Kovinske eze razžarimo v plamenu, večje predmete, kot so pincete, spatule ter vratove in kovinske zamaške erlenmajeric, epruвет, bučk idr., počasi vlečemo skozi plamen.

Ožiganje pogosto kombiniramo s pomakanjem v alkohol (etanol); predmet pomočimo v etanol, nato potegnemo skozi plamen in počakamo, da etanol zgori.

Delati je potrebno zelo previdno, ker obstaja možnost požara.

TINDALIZACIJA

To je postopek sterilizacije, kjer material v treh zaporednih dneh po 1-krat na dan za 30 minut izpostavimo temperaturi pare (100 °C). Za to uporabljamo Kochov lonec.

Postopek uporabljamo za sterilizacijo materiala, ki ne prenese avtoklaviranja.

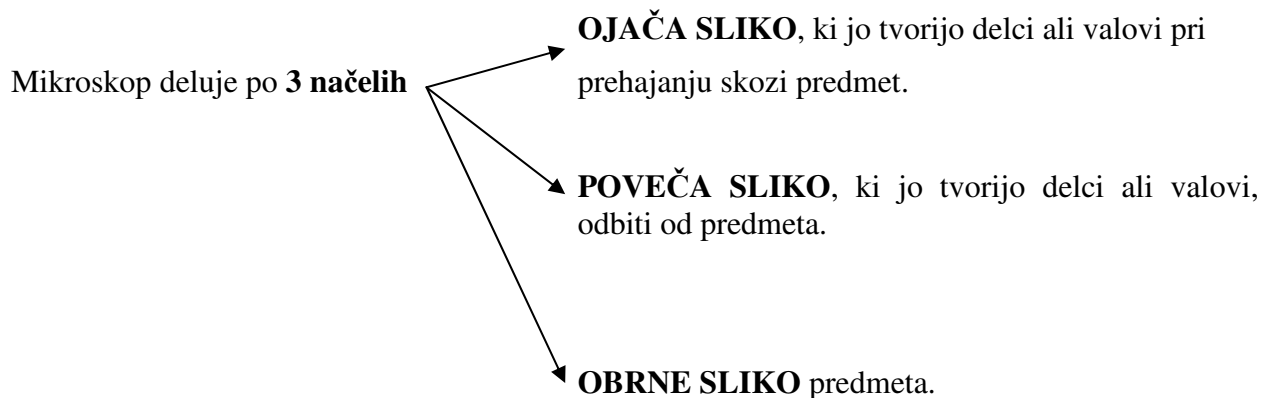
MIKROSKOP

Mikroskop je instrument, namenjen preučevanju tako majhnih predmetov, kot jih s prostim očesom ne vidimo. Človeško oko brez pomoči ne more razločevati predmetov, manjših od 0,1 mm.

Poznamo monookularne mikroskope, ko gledamo sliko samo z enim očesom, in binokularne, ko gledamo sliko z obema očesoma.

Pri laboratorijskih vajah bomo uporabljali svetlobni mikroskop. Slika nastane s prehajanjem svetlobe skozi preparate ali z vzbujanjem fluorescence snovi v preparatih. S sistemom leč (objektiv, okular) mikroskop poveča sliko preparatov, ki so lahko živi ali fiksirani in obarvani z najrazličnejšimi barvili. Uporabljali bomo sestavljeni mikroskop, ki vsebuje večje število leč, razporejenih v skupine, za razliko od lupe ali enostavnega mikroskopa, kjer so leče posamič.

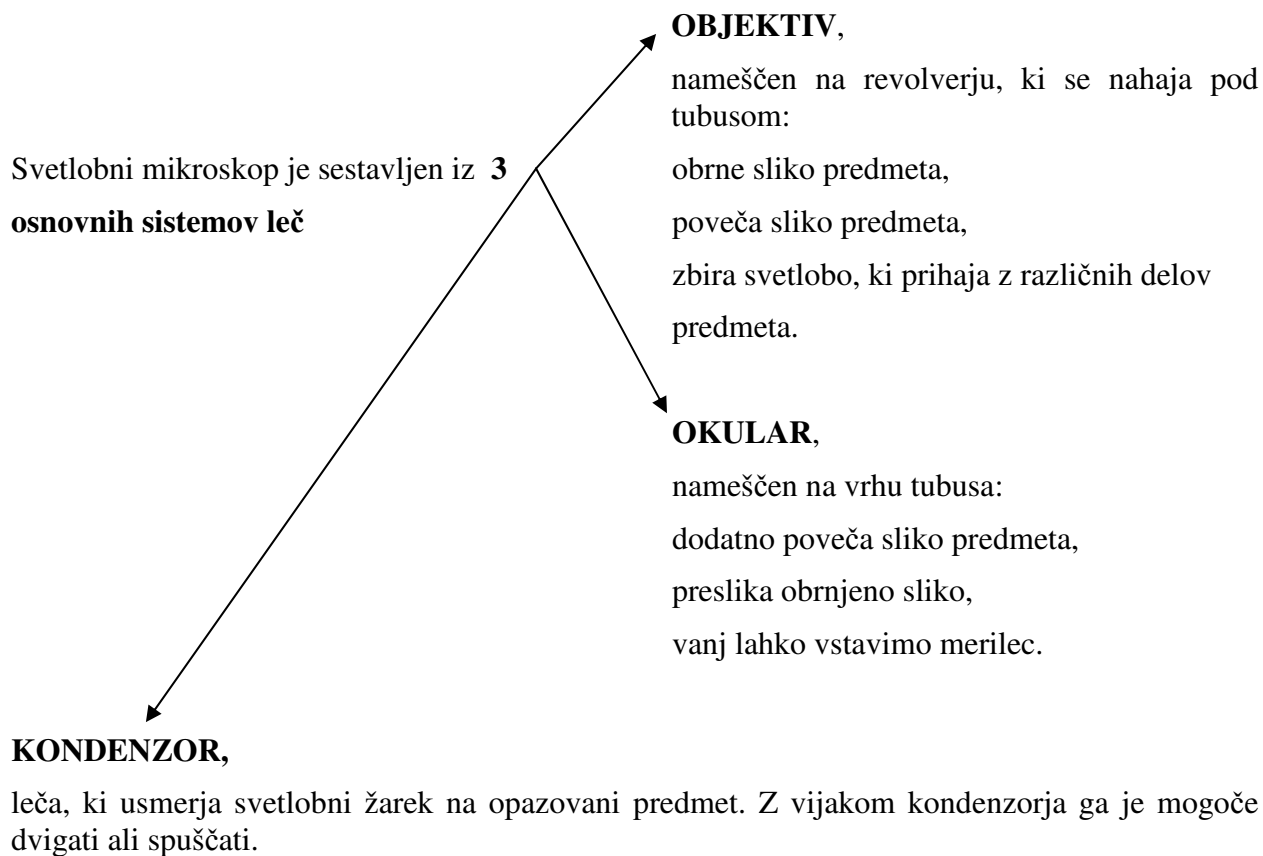
Prvi mikroskop naj bi leta 1590 izdelala danska izdelovalca očal Hans Janssen in njegov sin Zacharias, k razvoju mikroskopa pa je pomembno prispeval tudi Galileo Galilej. Za biološko znanost je pomemben mejnik leto 1665, ko Robert Hooke objavi zbirko mikroskopskih raziskav z naslovom [Micrographia](#) in ob opazovanju plute skuje besedo "celica". Njegov sodobnik Anton van Leeuwenhoek je bil izjemno nadarjen izdelovalec mikroskopov in je omogočil napredek svetlobne mikroskopije, opisal pa je tudi mnogo bioloških vzorcev. Od takrat naprej se je zasnova in kakovost mikroskopov stalno izboljševala. Omejujoč dejavnik pri ločljivosti mikroskopov pa je ostala valovna dolžina svetlobe, vse do leta 1931, ko je Ernst Ruska kot sredstvo za tvorbo slike uporabil elektrone in izdelal prvi transmisijski elektronski mikroskop.



Realna slika predmeta, ki ga opazujemo skozi mikroskop, je obrnjena (zgoraj-spodaj in levo-desno) in povečana.

Mikroskop ima optične in mehanske dele.

OPTIČNI DELI



Leče so konveksne, to pomeni, da je v sredini debelejša kot na robu.

Objektiv vsebuje najpomembnejše leče v mikroskopu, saj morajo dati jasno sliko visoke ločljivosti. Kakovost objektiva je odvisna od **povečave** in **numerične aperture (NA)**. Na vsakem objektivu je vgravirana povečava (npr. 4x), dolžina tubusa, za katero je bil objektiv izdelan (npr. 160 mm) ter debelina krovnega stekelca (npr. 0,17 mm) in numerična aparatura (npr. 0,65).

MEHANSKI DELI

TUBUS je lahko monokularen ali binokularen. Udobnejši je binokularen, saj oči pri tem manj trpijo.

Horizontalno razdaljo med okularjema je mogoče uravnati glede na razdaljo med opazovalčevima zenicama. Na enem od okularjev je nameščen zobat obroč, s katerim okular priredimo dioptriji opazovalčevih oči.

SVETILKA oz. žarnica osvetli objektno steklo od spodaj.

ZASLONKA uravnava količino svetlobe na predmetu. Z ročico na sprednji strani kondenzorja ali z vrtenjem jo lahko odpiramo ali zapiramo. Skupaj s kondenzorjem sta bistvena za dobro osvetljenost predmeta. Če je zaslonka preveč zaprta, ne izkoristimo zmogljivosti objektiva, posledica tega je zmanjšana ločljivost mikroskopa. Nekoliko zaprta zaslonka pa izboljša kontrast na sliki objekta.

MAKROVIJAK je večje kolesce, pritrjeno na stojalo, in služi za iskanje slike in grobe ostrine pri najmanjši povečavi. Vsak preparat najprej poiščemo in pogledamo pri majhni povečavi.

MIKROVIJAK je manjše kolesce, pritrjeno na stojalo, naravna ostrino slike pri srednji, veliki in imerzijski povečavi. Z vrtenjem vijakov predmet približujemo ali oddaljujemo od objektiva.

MIZICA služi premikanju preparata na objektnem steklu in ima odprtino na sredini, skozi katero prehaja svetloba in nadaljuje pot skozi predmet in v objektiv.

PRITRJEVALCI OBJEKTNEGA STEKLA: pripravimo preparat na objektnem steklu in ga pritrdimo na mizico.

REVOLVER se nahaja pod tubusom, na njem so nameščeni objektivi in z obračanjem omogoča njihovo premikanje.

STOJALO ali stativ oz. okvir mikroskopa nosi objektivne na spodnjem koncu tubusa, ki je obrnjen proti predmetu. Mikroskopu zagotavlja trdnost in stabilnost.

PODSTAVEK ali **NOGA MIKROSKOPA** je zaradi zmanjšanja motnje tresljajev težka in toga.

POT SVETLOBE SKOZI MIKROSKOP

svetilka – kondenzor – objektiv – okular

Svetloba iz žarnice potuje skozi kondenzor, pritrjen pod mizico, nato skozi prosojen predmet, ki leži na stekelcu nad odprtino v mizici, nato skozi leče objektiva in v notranjosti cevastega tubusa ustvari realno, povečano in obrnjeno sliko predmeta.

ŽARIŠČE je razdalja med opazovanim predmetom in objektivom. Če želimo, da bi bil predmet pri veliki povečavi v žarišču, mora biti leča objektiva zelo blizu predmeta.

LOČLJIVOST je po definiciji najmanjša razdalja med dvema točkama, ko ju še vidimo kot dve točki in od tega je odvisna kakovost mikroskopa. Če je npr. moč ločljivosti $0,2 \mu\text{m}$, razločimo 2 točki kot predmeta, če sta oddaljeni $0,2 \mu\text{m}$. Če sta točki manj oddaljeni druga od druge, se zlijeta.

Svetlobni mikroskop ima dobro ločljivost do 2000-krat, nato se ločljivost ne izboljšuje kljub močnejšim lečam in slika postane zabrisana.

Objektivi imajo napisano velikost povečave (npr. 100x) in *NA*, ki pomeni numerično odprtino leče (objektiva), in nam pove, koliko svetlobe lahko zbere neka leča.

Določena je z izrazom: $NA = n \sin \alpha$

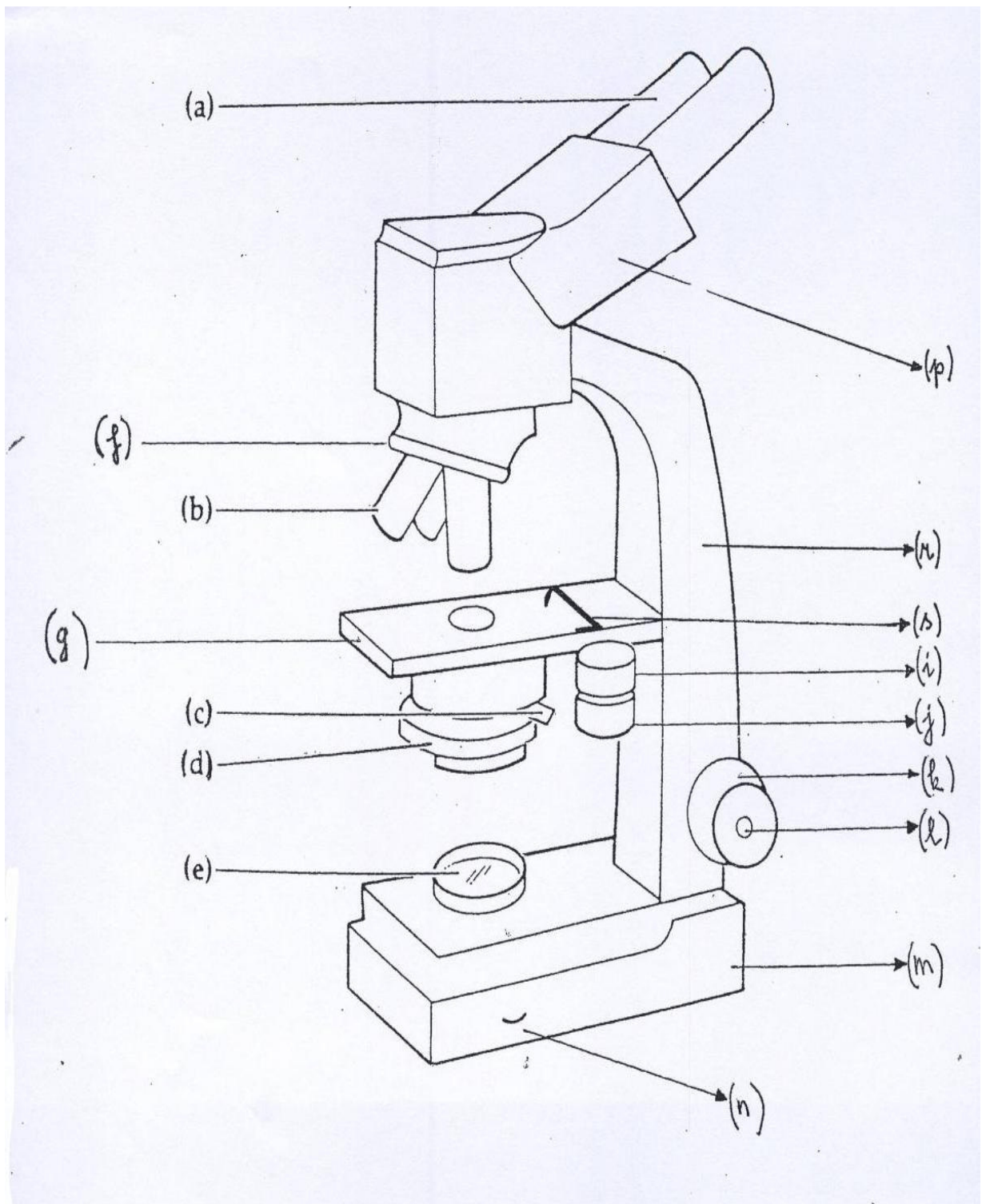
n je lomni količnik sredstva med predmetom in lečo.

α je kot med optično osjo in zveznico, ki povezuje gorišče in rob leče.

Običajno se vzame za valovno dolžino vrednost 550 nm, kar ustreza zeleni svetlobi, lomni količnik pa je od 1 (zrak), 1.3 (voda) do 1.5 za oljno imerzijske objektivne.

Naloge:

1. Na kratko opišite mikroskop pred seboj. Poglejte, kdo je proizvajalec.
2. Na spletu poiščite tri proizvajalce binokularnih mikroskopov in jih zapišite.
3. Napišite imena posameznih delov mikroskopa na označena mesta na sliki.
4. Pobarvajte optične dele mikroskopa.
5. Pojasnite naloge makro- in mikrovijaka.
6. Narišite pot svetlobe skozi mikroskop na sliki.
7. Na sliki označite, kje je žarišče.
8. Pojasnite, kaj je žarišče in kaj pomeni ločljivost mikroskopa.
9. Želeli bi kupiti mikroskop za domačo uporabo. Kratko in jasno opišite postopek.



Slika 3: Svetlobni binokularni mikroskop

UPORABA IN VRSTE MIKROSKOPOV

1. **Svetlobni mikroskop:** uporaba vidne svetlobe (svetloba je valovanje, ki se od predmetov odbija ali pa prehaja skozi) za opazovanje mikroorganizmov, celic in struktur, večjih od 0,2 μm , in štetje mikroorganizmov.
2. **Temnopoljni mikroskop:** uporablja poseben kondenzor, ki prepreči neposreden vstop svetlobe v objektiv. Uporabljamo ga za preučevanje živih mikroorganizmov, ki so pri dnevni svetlobi nevidni.
3. **Fazno-kontrastni mikroskop:** uporaba posebnega kondenzorja, ki omogoča, da je predmet osvetljen in kontrasten. Uporabljamo ga za opazovanje notranjih struktur živih mikroorganizmov.
4. **Fluorescenčni mikroskop:** uporaba UV-svetlobe. Uporabljamo ga za identifikacijo in zaznavanje mikroorganizmov v tkivih ali kliničnih vzorcih.
5. **Elektronski mikroskop:** uporaba elektronov namesto svetlobe za opazovanje virusov in struktur, manjših od 0,2 μm .



Slika 4: Elektronski mikroskop

Vir: <http://www.rtvsl.si/znanost-in-tehnologija/foto-in-video-sprehod-po-institutu-jozef-stefan/98339>

MIKROSKOPIRANJE ČRK

Osnova vaje

S prostim očesom lahko v ugodnih svetlobnih razmerah opazujemo predmete, ki so večji od nekaj desetink milimetra. Spodnja meja ločljivosti človeškega očesa je 0,1 mm.

Mikroskop je optična naprava, ki nam omogoča, da opazujemo predmete pod večjim zornim kotom in z večjo ločljivostjo kot pri opazovanju s prostim očesom. Danes se pretežno uporablja sestavljeni mikroskop s skupinami leč, ki ležijo v isti optični osi in v ustrezni medsebojni razdalji.

Pri gledanju skozi mikroskop je pomembno, kolikokrat je predmet povečan. Stopnjo povečave lahko ugotovimo, če pomnožimo povečavo uporabljenega objektiv s povečavo okularja. Slika predmeta je povečana dvakrat, najprej z objektivom in nato še z okularjem. Objektiv, ki poveča npr. 20-krat, in okular, ki poveča 10-krat, dajeta sliko, ki je povečana 200-krat. Večje ali manjše povečave dosežemo z različnimi kombinacijami objektivov in okularjev. Povečava nam pove, kolikokrat je realna slika večja od predmeta.

Povečava mikroskopa = povečava okularja x povečava objektiv

SKRB ZA MIKROSKOP

Mikroskop je drag in občutljiv instrument, zato je treba z njim zelo previdno ravnati.

1. Mikroskop vedno nosimo z obema rokama, z eno roko ga držimo za nogo, z drugo pa za stativ.
2. Mikroskopa nikoli ne postavimo na rob mize. Če je na instrument pritrjena svetilka, pazimo na žice. Kadar delamo z mikroskopom, je najbolje, da pospravimo z mize vse, česar nujno ne potrebujemo.
3. Vsak mikroskop ima številko, zato vzamemo zvezek z isto številko in vanj vpišemo:
 - če tubus ni privit,
 - če se nad mizico ne nahaja objektiv z najmanjšo povečavo,
 - če svetilka ne deluje,
 - če mizica ni spuščena,
 - ime in imek, razred, datum.
4. Leče predstavljajo najdražji del mikroskopa.
Z razdaljo med gledanim predmetom in objektivom določamo žarišče. Da bi bil predmet v žarišču pri veliki povečavi, mora biti leča veliko bližje predmetu kot pri majhni povečavi. *Ker je leča tako blizu predmeta, je pri veliki povečavi večja nevarnost, da se poškoduje predmet ali leča.*
Leče očistimo samo s čisto bombažno krpico ali s papirjem za čiščenje leč.
5. Kadar z revolverjem premaknemo objektiv in ga nadomestimo z drugim, zaslišimo rahel škrt, ko pride objektiv v svoj položaj.

Naloge:

1. Spoznajte mikroskop in se naučite mikroskopirati.
2. Izpišite povečavo pri vseh štirih objektivih in izpišite povečavo okularja.
3. Izračunajte velikost majhne, srednje in velike povečave na mikroskopu, s katerim delate.
4. Pod majhno, srednjo in veliko povečavo si pogledajte tri različne črke.
5. Ugotovite, kaj se dogaja s sliko predmeta pri različnih povečavah.
6. Pojasnite, ali vidite sliko predmeta enako kot s prostim očesom.
7. Narišite slike vseh treh črk pri različnih povečavah.
8. Opišite, kako se premika mizica in kako preparat na mizici.
9. Razložite nalogo zaslonke.
10. Pojasnite, kako ste izostrili sliko pri različnih povečavah.

Pribor in material:

- mikroskop
- objektno steklo
- krovno steklo
- kapalka
- čaša z vodo
- papir z natisnjenimi črkami

Vzorec: različne črke**Tehnika dela:**

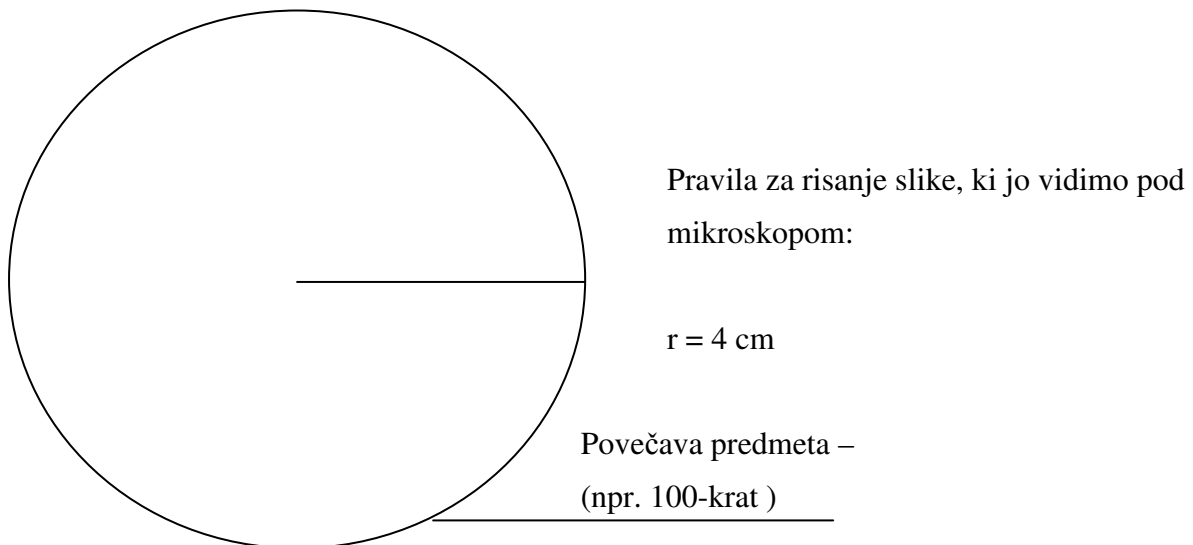
1. Pripravimo mikroskop.
2. Položimo črko na sredino čistega objektnega stekla.
3. S kapalko kanemo na črko kapljico vode.
4. Počakamo, da se papir razmoči, nato ga prekrijemo s krovnim stekelcem tako, da ga počasi spuščamo pod kotom 45° .
5. Pritrdimo objektno steklo na mizico.
6. Premikamo preparat na mizici tako, da bo črka v sredini odprtine.
7. Opazujemo in preverimo, kako se preparat na mizici premika.
8. Približamo mizico k objektivu z najmanjšo povečavo.
9. Pogledamo skozi okular in z makrometrskim vijakom poiščemo sliko.
10. Z mikrometrskim vijakom izostrimo sliko.
11. Izboljšamo sliko s pomočjo zaslonke in moči svetilke. Spreminjamo lego zaslonke in dodajamo ali odvajamo moč svetilke. Narišemo sliko.

12. Premaknemo objektiv na revolverju na srednjo povečavo, izostrimo sliko samo z mikrometrskim vijakom, makrometrskega ne uporabljamo več. To naredimo s premikanjem mizice. Narišemo sliko.
13. Premaknemo objektiv na revolverju na veliko povečavo, izostrimo sliko samo z mikrometrskim vijakom, makrometrskega ne uporabljamo več. Slika predmeta mora biti v sredini. Narišemo sliko.
14. Po končanem mikroskopiranju obrnemo z revolverjem objektivne tako, da se nad sredino nahaja objektiv z najmanjšo povečavo.
15. Ponovimo postopek še z drugima dvema črkama. Narišemo vse slike in zapišemo vse svoje ugotovitve.
16. Nato vzamemo preparat z mizice. Pospravimo mikroskop.

Meritve:

Rezultat: Rezultat je lahko račun, slika, tabela, graf itd.

Slika: Opiši, kaj je na sliki (npr. slika črke A) in označi posamezne dele, če je potrebno. Slike vedno rišemo s svinčnikom.



Ugotovitve:

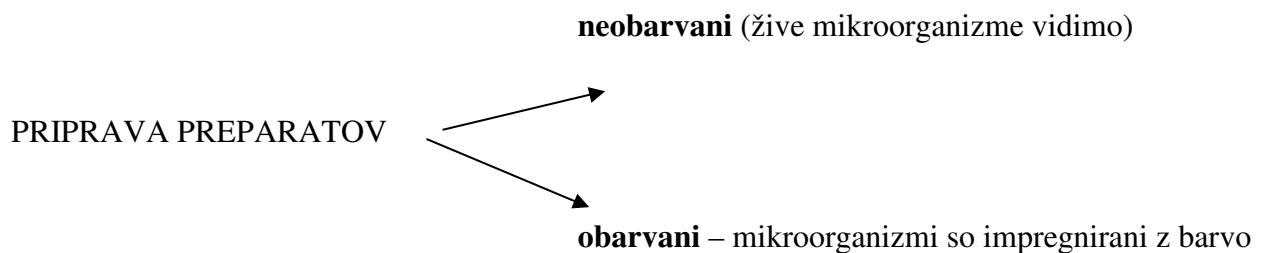
PRIPRAVA MIKROSKOPSKIH PREPARATOV

Osnova vaje

Za opazovanje bakterij, kvasovk, plesni in drugih mikroorganizmov moramo pripraviti mikroskopski preparat.

Mikroskopski preparati služijo za opazovanje oblik, strukture, barvalnih in nekaterih drugih lastnosti mikroorganizmov. Pripravimo ga na objektnem steklu. To je steklena ploščica iz nevtralnega in popolnoma prosojnega stekla, brez mehurčkov in nečistoč. Pred uporabo jih razmastimo v etanolu in osušimo.

Pripravljamo nativne (neobarvane) in obarvane mikroskopske preparate.

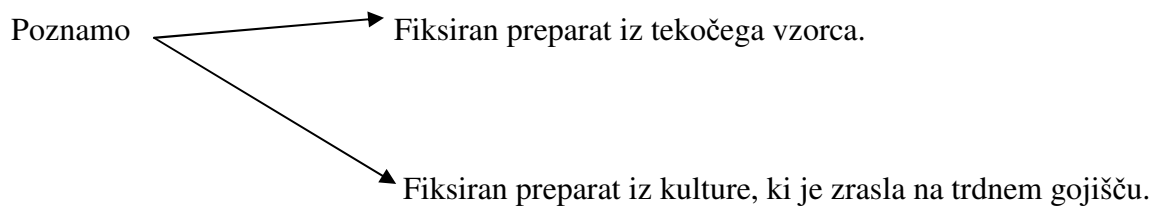


NATIVNI PREPARAT

V nativnih mikroskopskih preparatih opazujemo mikroorganizme žive in neobarvane. Namenjeni so za opazovanje živih in neobarvanih mikroorganizmov ter njihove gibljivosti. Primerni so za opazovanje večjih mikroorganizmov, kot so: kvasovke, plesni in praživali.

Nativni mikroskopski preparat lahko pripravimo na dva načina: kot pokrito kapljico ali kot visečo kapljico.

FIKSIRANI PREPARAT

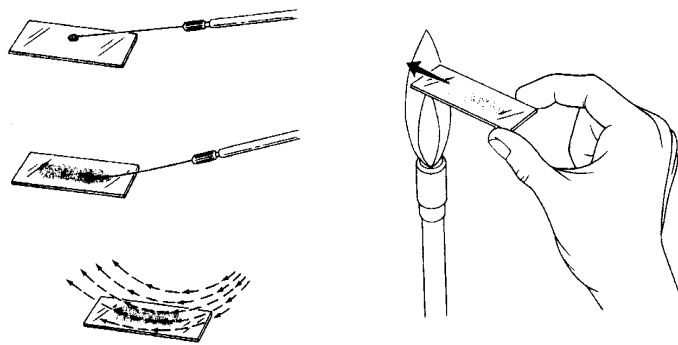


Namenjeni so večinoma za opazovanje bakterij.

Pripravljen preparat prilepimo na steklo, da se med barvanjem ne spere. Najpogosteje jih fiksiramo s segrevanjem, lahko pa tudi s kemijskimi sredstvi.

Razmaz bakterij iz tekočega vzorca pripravimo tako, da kanemo kapljico gojišča z mikrobi na objektno steklo in jo nato s sterilno ezo na tanko razmažemo. Razmaz z mikrobi iz trdnih gojišč pa pripravimo tako, da na objektno steklo najprej kanemo kapljico fiziološke raztopine in v njej suspendiramo kolonijo bakterij z gojišča. S sterilno ezo potem napravimo čim tanjši razmaz.

Pripravljene razmaze posušimo na zraku.



Slika 5: Priprava razmaza, njegovo sušenje in fiksiranje za barvanje po Gramu

Vir: www.bfro.uni-lj.si/zoo/studij/dodipl/mikro/momik/.../vaja5.doc

RAVNANJE S PLINSKIM GORILNIKOM

Prižiganje gorilnika

Najprej odpremo plinsko ročico. Gorilniku zapremo dovod zraka, tako da postavimo ventil na gorilniku v položaj, da sta luknji zaprti, in odpremo ventil za dovod plina (butan). Obrnemo ga za en obrat. Nad mestom, kjer bo gorel plamen, prislonimo ogenj (vžigalnik ali vžigalico), glavo pa odmaknemo, da plamen ne puhne v nas, nato stisnemo gumb, ki požene plin, in malo počakamo. Gumb počasi spustimo in dovajamo določeno količino zraka, da je plamen bolj usmerjen.

Ko končamo z uporabo gorilnika, moramo na gorilniku zapreti ventil za dovod plina, nato še plinsko ročico.



Slika 6: Laboratorijski plinski gorilnik

Vir: http://www.wolflabs.co.uk/Bunsen_Burners_&_Lab_Jacks.htm

Naloge:

1. Naučite se pripraviti različne preparate.
2. Spoznajte ali obnovite delo z gorilnikom in na sliko vpišite najpomembnejše sestavne dele.
3. Narišite objektno in krovno steklo ter pojasnite razlike med njima.
4. Poiščite slike preparatov pod mikroskopom in jih narišite.
5. V ugotovitvi napišite, ali se mikroorganizmi premikajo, kakšne oblike so, ali so enakomerne velikosti, ali se nahajajo posamezno ali v skupkih.
6. Poiščite razlike v pripravi preparatov in jih prikažite v tabeli.

Pribor in material:

- objektno steklo
- krovno steklo
- krovno steklo z vdolbino
- Pasteurjeva pipeta
- sterilna kapalka
- eza (cepilna zanka)
- plinski gorilnik
- fiziološka raztopina (0,9 % raztopina NaCl)
- vazelin
- mikrobiološka igla

Vzorec: pekovska kvasovka (*Saccharomyces cerevisiae*), paramecij

Tehnika dela:

1. Objektno steklo operemo, do suhega zbrišemo in obrišemo z alkoholom.
2. Prižgemo gorilnik.

Običajni vlažni preparat ali pokrita kapljica:

3. Kapljico vzorca s sterilno kapalko kanemo na objektno steklo.
4. Prekrijemo s krovnim steklom, ki je ob robovih premazan z vazelinom (preprečimo izsušitev).
5. Preparat pogledamo pod mikroskopom in narišemo sliko.

Viseča kapljica:

3. Na krovno steklo, katerega robovi so premazani z vazelinom, kanemo kapljico vzorca.
4. Prekrijemo z vdolbino v objektne steklu in skupaj obrnemo. Kapljica visi v vdolbini.
5. Pogledamo pod mikroskopom in narišemo sliko.

Fiksiran preparat iz tekočega vzorca:

1. Prižgemo gorilnik.
2. Na objektno steklo prenesemo s cepilno zanko ali kapalko kapljico tekočega vzorca.
3. Razžarimo ezo in jo ob ognju ohladimo.
4. S krožnimi ali horizontalnimi gibi razmažemo v čim tanjši plasti.
5. Ponovno razžarimo ezo in jo ob ognju ohladimo.
6. Nato preparat posušimo na zraku ali ob ognju tako, da objektno steklo držimo z oprijemalnimi škarjami ob ognju.
7. Ko je preparat posušen, ga 3-krat hitro potegnemo skozi ogenj.
8. Pogledamo pod mikroskopom in narišemo sliko.

Fiksiran preparat iz kulture, ki je zrasla na trdni podlagi:

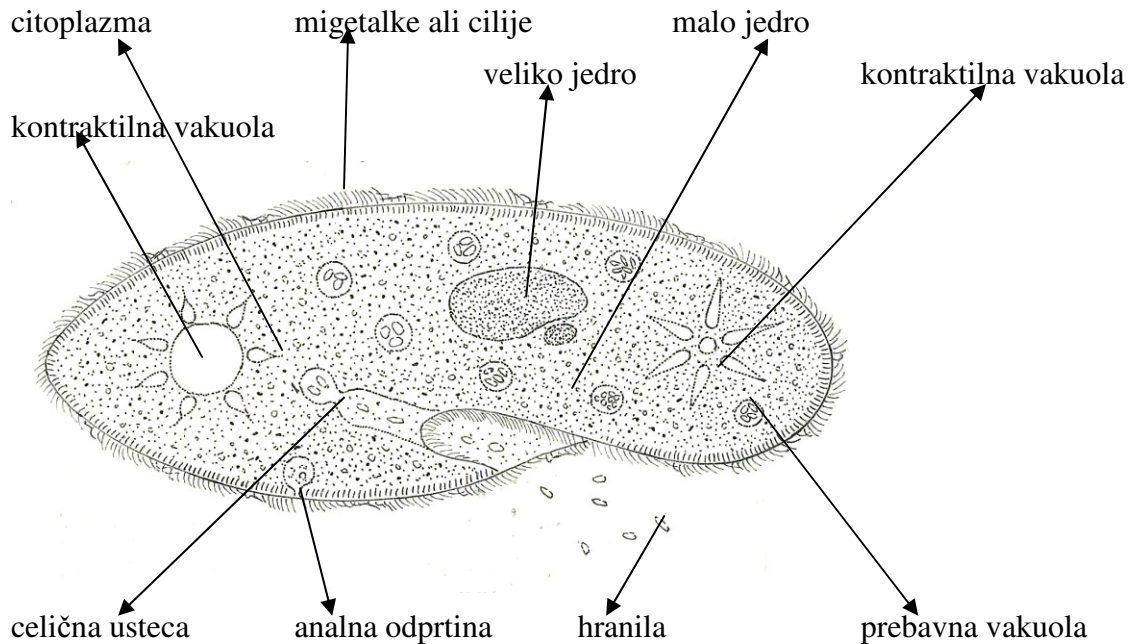
1. Prižgemo gorilnik.
2. Na objektno steklo kanemo kapljico sterilne fiziološke raztopine (0,9 % raztopina NaCl).
3. Razžarimo ezo in jo ob ognju ohladimo.
4. Z ezo potegnemo po izbrani koloniji mikroorganizmov na gojišču in pazimo, da ne vzamemo preveč vzorca.
5. Nato s sterilno ezo malo kulture suspendiramo v fiziološki raztopini.
6. Razmažemo suspenzijo tanko po objektnem steklu in posušimo na zraku ali ob ognju in 3-krat potegnemo skozi plamen.
7. Pogledamo pod mikroskopom in narišemo sliko.

Rezultati:**Ugotovitve:**

SPOZNAVANJE GIBANJA IN OBLIK MIKROORGANIZMOV

Osnova vaje

Paramecij spada med pražival iz rodu migetalkarjev. V dolžino meri 50–350 μm , odvisno od vrste. Zanj sta značilni dve jedri v citoplazmi; eno je namenjeno razmnoževanju, drugo pa življenjskim potrebam. Hrani se z bakterijami in drugimi mikroorganizmi. Razmnožuje se nespolno z delitvijo ali spolno s konjugacijo. Premika se s pomočjo migetalk.



Slika 7: Paramecij

Vir: <http://www.biology-resources.com/amoeba.html>

Naloge:

1. Pripravite preparat paramecija v viseči kapljici.
2. Poiščite sliko paramecija pod najmanjšo povečavo mikroskopa, nato še pri srednji povečavi.
3. Narišite sliko paramecija, kot ga vidite pri srednji povečavi in označite posamezne dele.
4. Pojasnite gibanje paramecija in ga primerjajte z gibanjem kvasovk, ki smo jih opazovali pri prejšnji vaji.

Pribor in material:

- objektno steklo z vdolbino
- krovno steklo
- sterilna kapalka
- mikroskop
- mikrobiološka igla
- vazelin

Vzorec: paramecij iz ribnika

Tehnika dela:

1. Pripravimo preparat visečo kapljico.
2. Poiščemo sliko paramecija pri najmanjši povečavi mikroskopa.
3. Poiščemo sliko paramecija pri srednji povečavi mikroskopa.
4. Narišemo sliko.

Rezultati:**Ugotovitve:**

GLIVE

Glive so evkariontski organizmi. Zanje je značilno: enocelična (kvasna) ali filamentozna rast (v obliki hif – micelija) in specifična zgradba celične stene (iz hitina in beta-glukana) ter spolno in nespolno razmnoževanje.

Pri identifikaciji in razvrščanju znanih gliv upoštevamo njihove morfološke, fiziološke, biokemijske in genetske lastnosti.

Kraljestvo gliv delimo na štiri debla po načinu produkcije spolnih spor.

OOMYCOTA ali »jajčaste« glive. Njihova značilnost je produkcija jajčastih spor, ki jih imenujemo *oospore*. Značilna je filamentozna rast (v obliki hif). Razmnožujejo se tudi nespolno s posebnimi gibljivimi običkanimi sporami (*zoosporami*).

Okolje: naseljujejo sladke (predvsem z organskimi odpadki onesnažene reke, jezera, ribnike, potoke) in slane vode ter kopno. Prehranjujejo se z ostanki odmrlih rastlin in živali ali pa se prehranjujejo kot paraziti. Nekatere povzročajo bolezni rib in dvoživk.

Izolacija: z uporabo vab (konopljina semena v vodi).

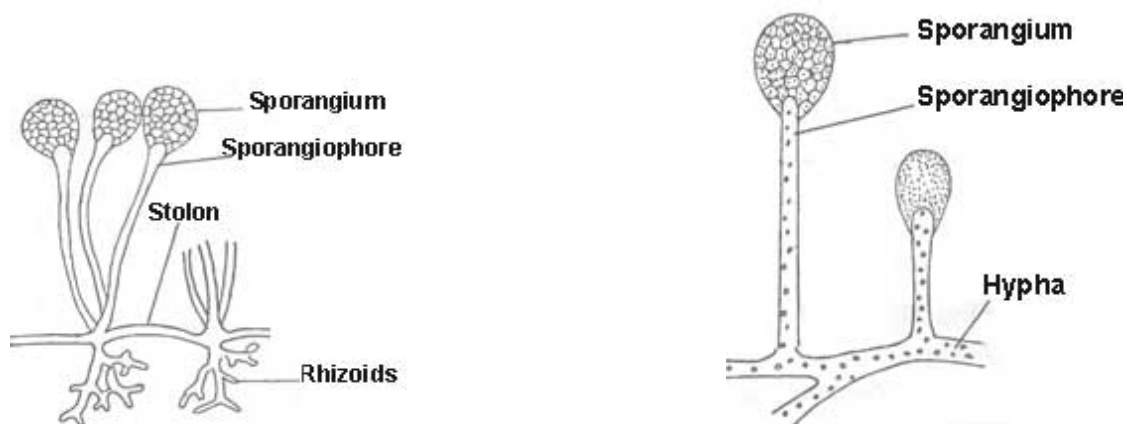
Vabe: številne glive imajo specifično potrebo po hranilih ali pa so specializirane za razgradnjo določenih snovi, ki jih druge glive ne morejo razgraditi. Določeno substanco (koščke lesa, insekte, plastiko, pelod, celofan, rezine korenja itd.) namestimo v okolje (običajno vodno okolje), ki ga naseljuje iskana gliva.

ZYGOMYCOTA. Značilna je produkcija debelostenske počivajoče spore – *zigospore* (spolno razmnoževanje). Razmnožujejo se tudi nespolno z negibljivimi *sporangiosporami* v večceličnih *sporangijih*.

Okolje: izoliramo jih lahko iz različnih substratov, kot so: tla, iztrebki, sadje, cvetovi, kruh itd. Nekateri so tudi patogeni za ljudi in živali.

Izolacija: z uporabo vlažne komore.

Predstavniki: rodova *Mucor*, *Rhizopus*.



Slika 8: Rodova *Rhizopus* in *Mucor*

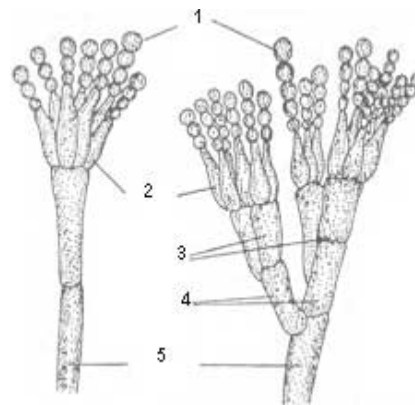
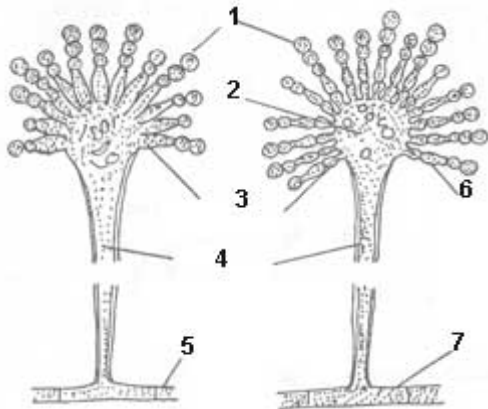
Vir: <http://www.studentsguide.in/microbiology/eukarya-eukaryotic-microorganisms/images/mucor.jpg>

ASCOMYCOTA. Značilno za glive, ki se spolno razmnožujejo v posebnih organih, *askusih* ali *vrečkah*. V vrečastih strukturah nastajajo *askospore*. Za to skupino gliv je značilno, da se večinoma razmnožujejo nespolno, saj je večina izgubila sposobnost spolnega razmnoževanja, ki je energetsko zahtevnejše (konidiospore).

Okolje: najdemo jih v tleh, sadju, siru, zraku.

Izolacija: uporaba vlažne komore, direktna izolacija.

Predstavniki: *Aspergillus*, *Penicillium* (*P. chrysogenum* za proizvodnjo penicilina), *Saccharomyces*, *Fusarium*, *Claviceps* (*C. purpurea* – rženi rožički).



Slika 9: Morfologija rodu *Aspergillus*

Slika 10: Morfologija rodu *Penicillium*

Vir: <http://www.studentsguide.in/microbiology/eukarya-eukaryotic-microorganisms/images/a-monoverticillate-b-biverticillate-condiophores.jpg>

Legenda:

- | | |
|---------------------|-----------------|
| 1. konidiospora | 1. konidiospora |
| 2. vezikel | 2. konidij |
| 3. konidij | 5. konidiofor |
| 4. konidiofor | |
| 5. vegetativna hifa | |

BAZIDIOMYCOTA. Za te glive je značilno, da tvorijo *bazidiospore* na posebnih organih, ki jih imenujemo *bazidiji*. Sem spadajo večinoma gobe, rje itd.

Okolje: gozd.

UPORABA GLIV

Sacharomyces cerevisiae: proizvodnja izdelkov iz kvašenega testa, za izdelavo vina, piva, kefirja.

Plesni: v živilski industriji za proizvodnjo encimov.

Za fermentacijo hrane:

- fermentacijo sira (*Penicillium camamberti*, *Penicillium roqueforti*),
- fermentacijo suhih salam (*Penicillium nalgoviense*),
- fermentacijo soje za proizvodnjo sojine omake (*Aspergillus oryzae*),
- fermentacijo soje za izdelavo sojine pogače – tempeh (*Rhizopus oligosporus*),
- fermentacijo grozdne jagode za izdelavo vina jagodni izbor (*Botrytis cinerea* – plemenita plesen, ki okuži zrele jagode s sladkorno stopnjo 60–75 Oe stopinj in z manjšo kislostjo, predvsem v lepem in sončnem vremenu).

IZOLACIJA IN GOJENJE GLIV

Glive se nahajajo povsod okoli nas in jih lahko izoliramo z uporabo številnih bolj ali manj zahtevnih tehnik. Osnovna lastnost gojišč za izolacijo gliv je uporaba antibiotika, ki zavre rast najrazličnejših bakterij v vzorcu. Pri delu z glivami se moramo predvsem zavedati produkcije prašnih spor, ki se z lahkoto prenašajo po zraku. Zato posode, v katerih jih gojimo, odpiramo skrajno previdno.

Za gojenje kvasovk je najprimernejša uporaba krompirjevega dekstroznega agarja. Inkubiramo pri temperaturi 30 °C. Za gojenje plesni pa uporabimo maltozni agar (MEA) z dodatkom antibiotika, in sicer 0,05 g/l kloramfenicola. Inkubiramo pri sobni temperaturi.

Načini izolacije:

a) **direktna** (prenos spor ali micelija na gojišče):

- uporaba vlažne komore
- uporaba vab
- direktno gojenje (vzorec namestimo neposredno na agarno gojišče)

b) **indirektna** (vzorec po potrebi suspendiramo, redčimo in nato nanašamo na trdna gojišča):

- izolacija gliv iz zemlje
- izolacija gliv iz zraka

IZOLACIJA GLIV Z UPORABO VLAŽNE KOMORE

Osnova vaje

Direktna izolacija gliv je bolj učinkovita, če je naravni material določen čas izpostavljen vlagi, tako da lahko gliva raste in sporulira.

Najpreprostejša je uporaba vlažne komore. Naredimo jo lahko iz plastičnih ali steklenih posod, tako da na dno namestimo omočeno sterilno vato, papir, gazo, sterilno zemljo ali pesek, šoto; torej material, ki nekaj časa zadržuje vlago. Na to namestimo vlažen filter papir, na katerega končno namestimo vzorec in komoro rahlo zapremo. Vzorec lahko predhodno omočimo. Inkubiramo v prostoru s stalno temperaturo. Glive pričnejo iz vzorca rasti čez nekaj dni.

Vlažne komore lahko uporabimo za razne vzorce: iztrebke, les, listje, lubje, mrtve insekte, sadje, zelenjavo, kruh in pekovsko pecivo, slaščičarsko pecivo, sir, maslo, semena itd.

Naloge:

1. Izolirajte glive iz živil s pomočjo vlažne komore. Inkubirajte en teden pri sobni temperaturi.
2. Pod veliko povečavo mikroskopa poiščite sliko plesni, jo narišite, označite posamezne dele in jo uvrstite v ustrezno deblo.
3. Oglejte si izolirane plesni tudi pod stereoskopom in napišite, kaj je stereoskop.
4. Ugotovite, na katerih živilih se je pojavila plesen in rezultate podajte v tabeli. Poskušajte pojasniti.

Pribor in material:

- steklena petrijeva posoda
- sterilna gaza, vata, papir ali zemlja
- filter papir
- kozarec z vodo
- stereoskop

Vzorci: sadje, pekovsko in slaščičarsko pecivo, marmelada, kompot, mlečni izdelki, semena, žita, keksi idr.

Tehnika dela:

1. Pripravimo material, iz katerega želimo izolirati glive.
2. V petrijevo posodo namestimo omočen sterilni material. Na vrh namestimo filter papir, s katerim ločimo vzorec od vira vlage.
3. Petrijevo posodo pokrijemo tako, da je možna izmenjava zraka.
4. Inkubiramo en teden pri sobni temperaturi.
5. Po tednu dni opazujemo zrasle kolonije pod stereoskopom.

Rezultat:

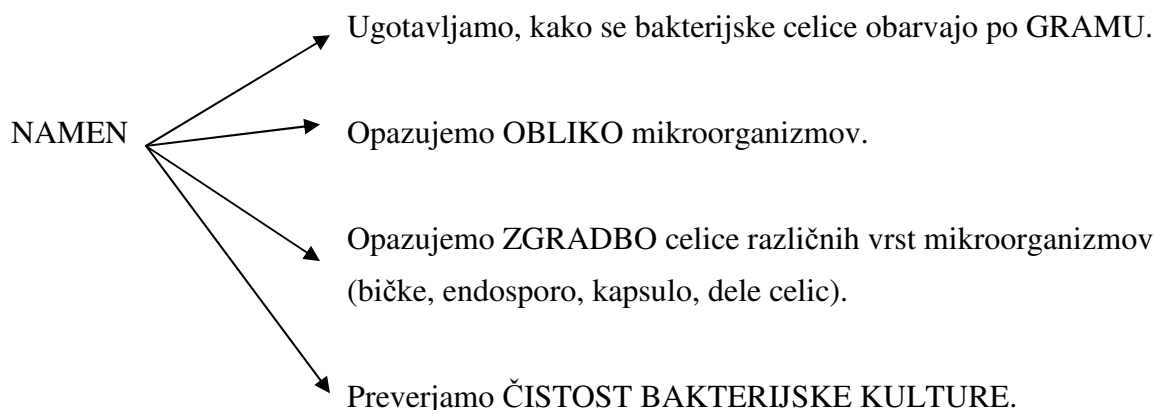
Tabela:

Ugotovitve:

BARVANJE MIKROBIOLOŠKIH PREPARATOV

Osnova vaje

Neobarvani preparati so nekontrastni ali slabo kontrastni, zato je njihovo sliko težko opazovati. Mikrobove torej obarvamo zato, da lažje opazujemo predvsem njihovo obliko (morfologijo), strukturo ali da vidimo kemijske lastnosti posameznih mikrobov ali delov celic. Tako lahko razlikujemo eno skupino mikroorganizmov od druge, žive celice od mrtvih ipd. Vse to nam pomaga pri diferenciaciji in identifikaciji mikroorganizmov.



FIKSIRANJE RAZMAZOV

Suh razmaz fiksiramo. Cilj fiksiranja je, da se mikrobi primejo na steklo, da jih pozneje pri barvanju ne speremo.

Najpogosteje fiksiramo s segrevanjem, lahko pa tudi s kemijskimi sredstvi. S segrevanjem fiksiramo tako, da predmetnico z razmazom trikrat potegnemo nad plamenom gorilnika, pri čemer se predmetnica ne sme preveč segreti (roka mora zdržati temperaturo). Od kemičnih sredstev običajno uporabljamo metanol (npr. pri krvnem razmazu).

Med barvanjem uporabljamo snovi, ki fiksirajo barvila na bakterijsko celico. Kot fiksir uporabljamo: fenol, taninske kisline, amonijev oksalat, soli Fe, Pb, Zn, Cu, Cr.

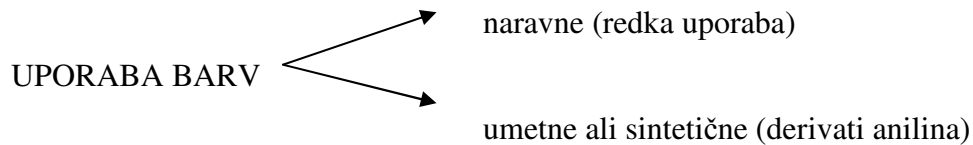
BARVANJE

Najpogosteje uporabljamo sintetična alkalna anilinska barvila (metilensko modrilo, gencijansko vijolično, kristalno vijolično, metil vijolično, fuksin idr.).

Alkalna pH reakcija barvila je pomembna, ker zagotavlja močno afiniteto barvila do bakterij, ki imajo zaradi vsebnosti kislin kislo pH reakcijo. Bazična anilinska barvila lahko hitro prodrejo v bakterijsko protoplazmo in obarvajo celice.

Barvila so običajno v obliki kristalov ali praškov, raztopimo jih v alkoholu ali v destilirani vodi. Najprej pripravimo nasičene raztopine in šele nato jih redčimo do ustrezne koncentracije. Raztopine barvil, ki se uporabljajo za barvanje mikroskopskih preparatov, morajo biti popolnoma bistre; če niso, jih je potrebno filtrirati skozi filterni papir.

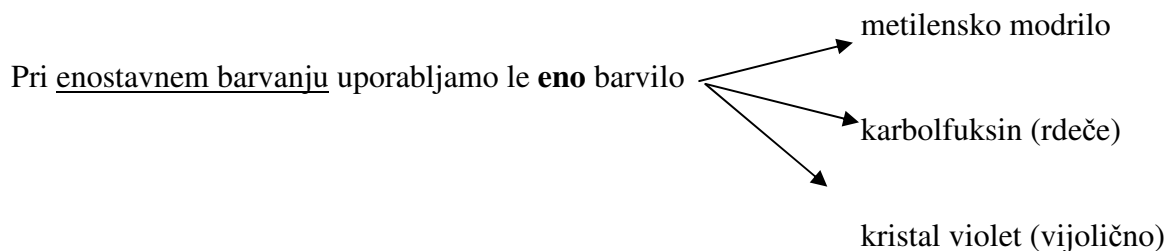
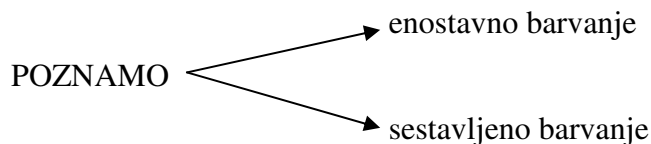
Večinoma so barvila občutljiva na svetlobo, zato jih je potrebno hraniti v temnih steklenicah. Temperaturno so raztopine barvil zelo obstojne, izjema je le metilensko modrilo. Njihovo barvalno sposobnost in intenziteto barvanja je včasih mogoče povečati z dodatkom alkalij, s segrevanjem ali s pripravo sveže raztopine barvila.



Za barvanje uporabljamo raztopine barvil:

1. najprej raztapljamo barvila v alkoholu,
2. nato dodamo destilirano vodo za pripravo želene koncentracije.

V končni raztopini je okoli 1 % barvila.



Uporabljamo ga, kadar želimo jasno videti oblike mikroorganizmov.

Sestavljeno barvanje (2 ali več barvil) uporabljamo takrat, ko se celice ali sestavni deli različno obarvajo. Tak način imenujemo diferencialno barvanje. Barvila lahko pri sestavljenem barvanju nanašamo **sukcesivno** (drugo za drugim) ali **simultano** (vse hkrati).

Od sestavljenih sukcesivnih barvanj se največ uporablja barvanje po Gramu, po Kozlovskem, po Ziehl-Neelsonu. Ti načini barvanj so dobili imena po iznajditeljih.

Barvanje po Ziehl-Neelsonu uporabljajo za bakterije, ki so acidorezistentne (v kislem okolju se ne razbarvajo, npr. *Mycobacterium*), in sicer uporabljamo rdeče barvilo karbolfuksin; ali pa za bakterije, ki se v kislem okolju razbarvajo (*Nocardia*, *Rhodococcus*), in sicer zeleno barvilo – malahit zeleno.

Sestavljeno simultano barvanje je metoda barvanja po Gimzi.

PRIPRAVA BARVIL

1. Barvanje s karbolfuksinom. Priprava barvila: v 5 % raztopino fenola (fiksir) dodamo 0,3 % raztopine fuksina. Raztopino razredčimo z destilirano vodo v razmerju 1:10. Pripravljen razmaz prelijemo z raztopino barvila in čez 1 minuto speremo z vodo in osušimo s filter papirjem. Bakterije se obarvajo **rdeče**.
2. Barvanje s kristal violetom. Barvilo je podobno metil violetu in gencian violetu. Pripravljamo ga skupaj s karbolno kislino, in sicer tako, da damo v terilnico 1 g barvila in 2 g karbolne kisline ter počasi zmešamo z 10 ml 96 % etanola. Ko je barvilo raztopljeno, dodamo še 100 ml destilirane vode. Pripravljeni raztopino barvila filtriramo skozi filter papir. Za barvanje bakterij uporabljamo raztopino, razredčeno z destilirano vodo v razmerju 1:5. Po fiksiranem preparatu polijemo raztopino barvila in po 2–3 min speremo z vodo. Bakterije se obarvajo **modro vijolično**.
3. Barvanje z metilenskim modrilom. Je način barvanja, ki ga v mikrobiologiji zelo pogosto uporabljajo. Raztopino barvila pripravimo tako, da 30 ml koncentrirane raztopine barvila dodamo 100 ml destilirane vode in 1 ml 1 % raztopine KOH. Bakterije se obarvajo **modro**.

ENOSTAVNO BARVANJE

Naloge:

1. Pripravite fiksni preparat čiste ali mešane kulture mikroorganizmov in ga enostavno pobarvajte.
2. Oglejte si preparat pod imerzijsko povečavo in narišite sliko.
3. Ugotovite, ali se vsi mikroorganizmi enakomerno obarvajo in kakšna je njihova oblika.
4. Razložite, kako prepoznamo čisto in kako mešano kulturo mikroorganizmov.
5. Kateri mikroorganizmi so bili v mikrobiološki kulturi?

Pribor in material:

- objektno steklo
- eza
- plinski gorilnik
- barvilo
- papirnata brisača, vata
- odlagalnik za objektna stekelca
- kadička za spiranje
- puhalka z destilirano vodo
- rokavice
- mikroskop
- imerzijsko olje
- ksilol

Vzorec:

Tehnika dela:

1. Pripravimo fiksni preparat tekoče kulture.
2. Pripravimo fiksni preparat trdne kulture. (PAZITE! Bakterije morajo biti na preparatu dovolj redke, da lahko opazujemo posamezne celice.)
3. Ko je preparat posušen, ga tri- do štirikrat povlečemo skozi plamen. Na ta način bakterije fiksiramo, tako da jih kasneje z barvilom ne speremo.
4. Nadenemo si rokavice.
5. Fiksiran preparat polijemo z barvilom, pustimo, da deluje 60 sekund.
6. Barvilo odlijemo, preparat pa previdno splaknemo s šibkim vodnim curkom (z destilirano vodo). Poiščemo sliko pri majhni in veliki povečavi.
7. Dodamo kapljico imerzijskega olja neposredno na barvni razmaz in poiščemo sliko pri imerzijski povečavi.

Rezultati:

Ugotovitve:

MIKROSKOPIRANJE Z IMERZIJSKIM OBJEKTIVOM

Osnova vaje

Imerzijski objektiv nam skupaj z okularjem omogoča največjo povečavo pri opazovanju mikroskopskega preparata.

Pri delu z imerzijskim objektivom moramo biti zelo previdni, da ga ne poškodujemo.

Uporabljamo ga za opazovanje:

- bakterij
- oblike bakterij
- razporeditve bakterij
- drugih mikroorganizmov

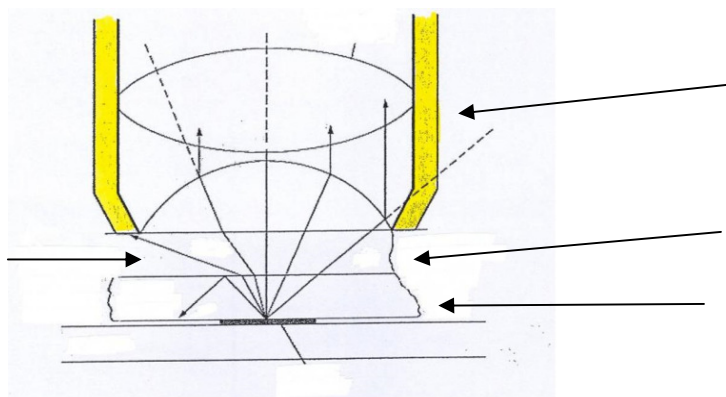
Delo. Na objektno steklo kanemo imerzijsko olje in potopimo imerzijski objektiv v olje. Po končanem delu je potrebno imerzijsko olje odstraniti s papirjem za čiščenje leč, saj strjeno in posušeno ostane na leči, zato slike ob naslednji uporabi ne moremo izostriti. Takrat moramo uporabiti ksilol, ki topi imerzijsko olje. Ksilol kasneje odstranimo s papirjem, namočenim v 95 % alkohol.

POZOR! Pri pretirani uporabi ksilol raztopi lepilo, s katerim je leča pritrjena v ohišje.

Namen. Povečamo kot loma svetlobe (indeks refrakcije) oz. zmanjšamo lomni količnik med lečo in zrakom.

Pri potovanju svetlobe skozi različne snovi, skozi zrak in steklo, se svetlobni žarek prelomi, ker imata ti snovi različen lomni količnik. Ker se svetloba različnih valovnih dolžin lomi pod različnimi koti, dobimo pri opazovanju predmetov s svetlobnim mikroskopom pod velikimi povečavami vedno manj ostro sliko. Zmanjšanje ločljivosti je še zlasti veliko pri povečavah nad 400-krat.

Težavi z zmanjševanjem ločljivosti se izognemo tako, da med objektno ali krovno stekelce in lečo objektiva kanemo kapljico imerzijskega olja, ki ima enak lomni količnik kot steklo. S tem se izognemo dvema različnima lomnima površinama.



Slika 11: Objektno steklo, imerzijsko olje, imerzijski objektiv

Na meji med steklom in imerzijsko tekočino žarki ne menjajo smeri, ampak prehajajo naravnost v lečo imerzijskega objektiva in s tem se poveča količina svetlobe, ki prehaja v objektiv. Žarki med steklom in imerzijskim oljem se zaradi podobnih indeksov refrakcije dodatno ne lomijo.

Naloge:

1. Izračunajte imerzijsko povečavo mikroskopa.
2. Pripravite fiksiran preparat tekočega vzorca.
3. Poiščite sliki preparata pri veliki in imerzijski povečavi ter sliki narišite.
4. Opišite razlike med slikama.
5. Pojasnite glavne značilnosti dela z imerzijskim objektivom.

Pribor in material:

- objektno steklo
- krovno steklo
- eza
- plinski gorilnik
- fiziološka raztopina
- vazelin
- mikroskop
- imerzijsko olje
- vata
- ksilol
- papir za čiščenje leč

Vzorec:**Tehnika dela:**

1. Pripravimo fiksiran preparat.
2. Najprej poiščemo sliko na mali, srednji in veliki povečavi objektivna.
3. Nato premaknemo objektiv z veliko povečavo tako, da je nad preparatom prazen prostor.
4. *Fiksiran preparat*: kapljico imerzijskega olja kanemo neposredno na preparat.
5. Obrnemo imerzijski objektiv tako, da je potopljen v olje.
6. Če je imerzijski objektiv preblizu mizice in bi ga z obračanjem lahko poškodovali, prenehamo z delom in ponovimo postopek.
7. Sliko izostrimo z mikrometrskim vijakom, vendar previdno, da ne poškodujemo objektivna.
8. Po končanem delu imerzijski objektiv obrišemo s papirjem za čiščenje leč ali z vato, namočeno v ksilen (ksilol) ali drugo topilo.

Rezultati:**Ugotovitve:**

SESTAVLJENA BARVANJA

Barvanje po Gramu

Kristian Gram (1884) je ugotovil, da če tkivni preparat obarva z gencian violetom in ga prelije z raztopino joda, se celice tkiva z alkoholom razbarvajo, celice bakterij v tkivu pa ostanejo obarvane. Iz te ugotovitve se je razvila metoda diferencialnega barvanja. Uporabljamo jo za razlikovanje bakterij.

Barvanje po Gramu je najpomembnejša metoda diferencialnega barvanja, ki jo uporabljamo v bakteriologiji. Po Gramu barvamo zaradi sistematike mikroorganizmov, pokaže pa osnovno razliko v strukturi celičnih mikroorganizmov. Grampozitivne bakterije imajo 90 % celične stene zgrajene iz peptidoglikana. Pri gramnegativnih bakterijah je peptidoglikanska plast tanjša (5–20 %). Na zunanji strani je namesto tega plast lipopolisaharidov. Za barvanje uporabljamo drugo za drugo dve kontrastni barvi, **modro** in **rdečo**.

Ena vrsta bakterij med barvanjem obdrži **modro vijolično barvo** prvega barvila (**grampozitivne bakterije**), druga vrsta bakterij pa se **z alkoholom razbarva** in se obarva z drugim barvilom **rdeče** (**gramnegativne bakterije**).

Opazili so, da se v bakterijskem preparatu vse celice ne obarvajo enako intenzivno. To je posledica različnih vrst mikroorganizmov, vpliva okolja in starosti celice.

Kvasovke in plesni se vedno obarvajo modro vijolično.

Naloge:

1. Pripravite fiksni preparat čiste ali mešane kulture mikroorganizmov in ga sestavljeno pobarvajte.
2. Oglejte si preparat pod imerzijsko povečavo in narišite sliko.
3. Ugotovite, kako so se pobarvali mikroorganizmi. V katero skupino bi uvrstili bakterije?
4. Ugotovite, ali drži trditev o kvasovkah.

Pribor in material:

- objektno steklo
- eza
- plinski gorilnik
- komplet barvil za barvanje po Gramu
- papirnata brisača, vata
- odlagalnik za objektna stekelca
- kadička za spiranje
- kadička za etanol
- puhalka z destilirano vodo
- rokavice
- mikroskop
- imerzijsko olje
- papir za čiščenje leč

Vzorec: kvasna suspenzija, zobne obloge, kislo mleko

Tehnika dela:

1. Pripravimo in fiksiramo preparat.
2. Z **raztopino kristal vijoličnega** (lahko tudi gencian vijoličnega) prelijemo preparat in pustimo delovati 30–60 sekund.
3. Barvilo odlijemo (rahlo speremo z destilirano vodo).
4. Prelijemo z lugolovo (jodova raztopina) raztopino in pustimo delovati 30 sekund, da nastane netopni kompleks barvila z jodom, ki se pri grampozitivnih bakterijah ne spere.
5. Speremo z destilirano vodo.
6. Razbarvamo z etanolom (prodre v gramnegativne celice in jih razbarva), tako da ga za 20–60 sekund potopimo v etanol, dokler se barvilo ne odstrani.
7. Prelijemo z **raztopino safranina** in pustimo delovati 30 sekund.
8. Speremo z destilirano vodo, posušimo in pogledamo pod mikroskopom.

Uporabljamo rokavice, ker so barvila strupena. Barvila spiramo v kadičke in odpadna barvila zbiramo v zabojnikih.

Rezultati:

Ugotovitve:

MERJENJE VELIKOSTI MIKROORGANIZMOV

Osnova vaje

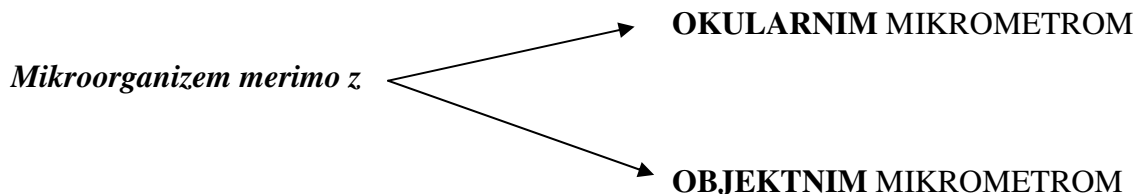
Pri različnih mikrobioloških analizah je potrebno izmeriti velikost mikroorganizmov, ki jih opazujemo pod mikroskopom. Mikroorganizmi so manjši od 0,1 mm in jih merimo v mikrometrih (μm), virusi pa še manjši, saj jih merimo v nanometrih (**nm**), in sicer 275–430 **nm**.

Velikost	<u>bakterij:</u>	koki (0,5–2 μm) bacili (1–4 μm)
	<u>kvasovk:</u>	okroglaste (4–6 μm) elipsoidaste (6–10 μm) podolgovate (> 10 μm)
	<u>plesni:</u>	2r = 5–10 μm za hife, dolge tudi več cm
	<u>alge:</u>	10–100 μm

Velikost oz. majhnost mikroorganizmov merimo z enotama mikrometer in nanometer.

1 mikrometer meri tisočinko milimetra ali 1 milijoninko metra.

1 nanometer meri tisočinko mikrometra.



Okularni mikrometer ima pogosto vrezano lestvico dolžine 5 mm. Razdeljena je na 50 delov in 1 razdelek (delček med dvema črticama) meri 0,1 mm ali 100 μm . Velikost razdelka na okularnem mikrometru se spreminja s povečavo. Velikost razdelka označimo s **k**.

Objektni mikrometer je steklena ploščica, velika kot objektno steklo. Na sredini je vrezana mikrometerska lestvica. Razdeljena je na 100 razdelkov, dolžine 1 mm, tako da 1 razdelek meri 0,01 mm ali 10 μm . Objektni mikrometer potrebujemo, da izmerimo velikost razdelka na okularnem mikrometru pri posamezni povečavi.

Naloge:

1. Spoznajte objektno in okularno merilo.
2. Narišite sliko okularnega in objektnega merila pri najmanjši in veliki povečavi.
3. Ugotovite, kaj se dogaja s sliko obeh mikrometrov.
4. Pripravite fiksiran preparat čiste kulture.
5. S pomočjo okularnega in objektnega merila izračunajte velikost razdelka. Izračunajte velikost mikrobne celice pri veliki povečavi, tako da preštete razdelke in jih pomnožite s k.
6. Zapišite meritve 10 mikrobnih celic in izračunajte povprečno velikost.
7. Narišite sliko merjenja mikrobne celice pri veliki povečavi.

Pribor in material:

- mikroskop
- objektni mikrometer
- objektno steklo
- eza
- plinski gorilnik

Vzorec:**Tehnika dela:**

1. V okular vstavimo okularni mikrometer.
2. Na mizico mikroskopa vstavimo objektni mikrometer.
3. Izostrimo sliko pri 400-kratni povečavi in s premikanjem mizice poravnamo okularni in objektni mikrometer tako, da se začetni črtici (začetek skale) ujemata, merili pa sta vzporedni.
4. Poiščemo naslednjo črtico, kjer se objektno in okularno merilo spet ujemata.
5. Preštejemo število razdelkov v objektnem merilu, kjer se črtici prekrivata med dvema mestoma.
6. Preštejemo število razdelkov v okularnem merilu, kjer se črtici prekrivata med dvema mestoma.
7. Izračunamo, kakšno razdaljo v objektnem steklu predstavlja razdelek okularnega merila.

$$\text{koeficient (k)} = \frac{\text{število razdelkov objektnega merila} \times 10 \mu\text{m}}{\text{število razdelkov okularnega merila}} \quad [\mu\text{m}]$$

Izračunamo, kolikšno razdaljo v objektnem steklu predstavlja razdelek okularnega merila, tako da število razdelkov na objektnem merilu množimo z 10 μm (širina enega razdelka mikrometra).

Umerjanje lestvice okularnega mikrometra je potrebno, da lahko določimo vrednost okularnega mikrometra oz. velikost razmika med črticama na okularnem mikrometru glede na uporabljeni objektivi.

Meritve:

Najmanjša povečava:

- število razdelkov v objektnem merilu =
- število razdelkov v okularnem merilu =

Velika povečava:

- število razdelkov v objektnem merilu =
- število razdelkov v okularnem merilu =

Meritve velikosti mikrobnih celic:

Rezultati:

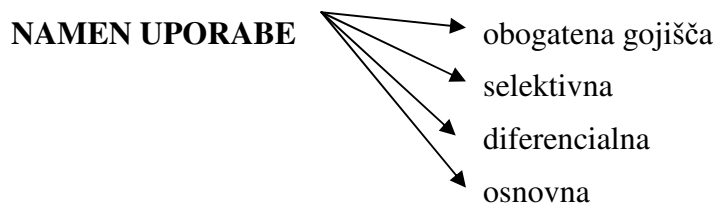
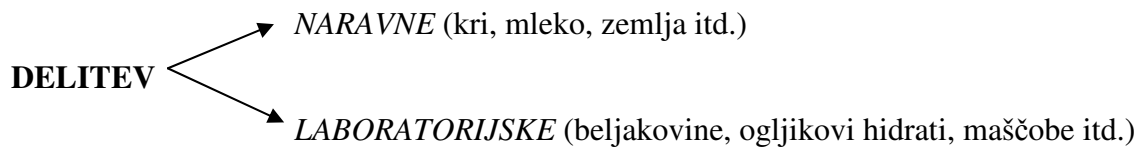
Ugotovitve:

PRIPRAVA HRANILNIH PODLAG ALI GOJIŠČ

Osnova vaje

Za gojenje mikroorganizmov v laboratorijih potrebujemo hranilne podlage ali substrate, iz katerih mikroorganizmi črpajo hranilne snovi in vodo. Gojišča lahko uporabimo tudi za shranjevanje in transport. Pred uporabo morajo biti sterilna, ne smejo vsebovati živih mikroorganizmov.

Za gojenje bakterij uporabljamo zelo različne hranilne podlage, sestava je odvisna od vrste mikroorganizmov in namena gojenja.



Osnovna gojišča. Sestavine zadoščajo za rast večine prehransko nezahtevnih heterotrofov. Znana osnovna gojišča so:

- peptonska voda (1 % pepton, 0,5 % NaCl)
- hranilni agar
- hranilni bujon

Pepton je encimski (pepsin, tripsin) hidrolizat mišičnine ali notranjih organov, lahko je tudi mlečni kazein ali rastlinski proteinski vir. Je vir proteinov, peptidov, aminokislin.

Obogatena gojišča so primerna za preučevanje mikroorganizmov in so zelo prilagojena naravnemu okolju. Mikroorganizmi potrebujejo za rast dodatne naravne sestavine, npr. krvni agar.

Diferencialna gojišča uporabljajo za razlikovanje različnih vrst bakterij po obliki ali barvi kolonij ali po drugih razlikah. Vsebujejo enega ali več ogljikovih hidratov in indikator, ki je barvilo (fenolftalein, lakmus, fenolrdeče). Npr. Mac Conkey agar vsebuje laktozo. *E. coli* jo razgradi in se obarva rdeče, ker se spremeni pH gojišča, druge enterobakterije pa imajo neobarvane kolonije.

Selektivna gojišča omogočajo rast le določenim mikroorganizmom, vse druge pa zavirajo. Na gojišču Wilson-Blair rastejo samo *Sallmonele*, zato spada med selektivne.

**KONSISTENCA
GOJIŠČ**

- *TEKOČE* – za razmnoževanje mikrobnih kultur (v epruveh)
- *POLTRDNO* – za prelive pri študiju bakteriofagov
- *TRDNO* – pripravljamo kot plošče v **petrijevih posodah** (splošna uporaba)

- **vbodna in poševna gojišča v epruveh** za shranjevanje bakterij, ugotavljanje potreb po kisiku in druge biokemijske teste



trdno gojišče



tekoče gojišče



vbodno gojišče



poševno gojišče

Slika 12: Gojišča v epruveh

SESTAVA GOJIŠČ. Gojišča so vodne raztopine snovi, ki jih določen mikroorganizem potrebuje za rast. Poznamo:

- a) **kompleksna** – njihova sestava ni natančno znana (aminokislina, sladkorji, soli, kvasni ekstrakt peptidi),
- b) **definirana** – vsebujejo točno določene koncentracije sestavin; uporabljajo jih za proučevanje mikrobnega metabolizma.

AGARAGAR:

- količina določa konsistenco hranilne podlage,
- pridobljen z ekstrakcijo iz rdečih morskih alg,
- bakterije (razen izjem) agaragarja ne morejo uporabljati kot hrano,
- je tekoč pri 95–98 °C, strdi se pri 40 °C in nastane gel,
- je brezbarven,
- za trdo hranilno podlago dodajo 1–2 % agaragarja,
- za tekočo hranilno podlago dodajo 0,1–0,5 % agaragarja,
- je polisaharid (galaktan).

PRIPRAVA HRANILNIH PODLAG

V laboratoriju uporabljamo že pripravljene dehidrirane hranilne podlage, ki jim pred uporabo dodamo destilirano vodo, jih raztopimo pri 100 °C in steriliziramo.

Naloge:

1. Oglejte si plastenko z že pripravljeno hranilno podlago in zapišite proizvajalca, sestavine in pripravo, uporabo, obstojnost ter način shranjevanja in prikažite v tabeli.
2. Pojasnite razlike v konsistenci in uporabi gojišč.
3. Pojasnite delovanje agargarja in poiščite s pomočjo spleta, kako ga pridobivajo.
4. S sošolcem/sošolko pripravite 150 ml hranljivega agarja in ga razlijete v 15 petrijevke.
5. Izračunajte potrebno količino hranljivega agarja, če za 1000 ml potrebujete 23 g hranljivega agarja.
6. Narišite shemo priprave gojišča v zaporednih fazah.
7. Napišite, katerim napakam se morate izogibati pri pripravi hranilnih podlag.

Pribor in material:

- erlenmajerica
- merilni valj
- avtomatska tehtnica
- steklena palčka za mešanje
- termometer
- plinski gorilnik, mrežica
- bombažne krpice
- petrijevke (Petri plošče)
- hranljivi agar
- destilirana voda
- oprijemalne škarje

Tehnika dela:

1. Pripravimo petrijevke in jih opremimo z napisi na pokrovu (ime, razred, datum, vzorec).
2. Natančno zatehtamo določeno količino dehidriranega gojišča v erlenmajerico.
3. Dodamo določeno količino destilirane vode z merilnim valjem.
4. Ob stalnem mešanju segrevamo nad plamenom do vrenja. Nato zmanjšamo temperaturo in pustimo še nekaj minut rahlo vreti. Steriliziramo v avtoklavu.
5. Raztopljeno in vroče gojišče razlijemo na petrijevke, v vsako po 10–15 ml. Preden zlijemo gojišče, potegnemo rob grla steklenice hitro skozi ogenj in pri tem ne govorimo, ne kihamo, ne kašljamo ipd.
Petrijevko rahlo odpremo pod kotom 45°C, izlijemo gojišče s primerne višine, tako da ne

nastajajo mehurčki, zapremo in rahlo premikamo v krogih, da se gojišče enakomerno porazdeli. Z drugo roko držimo erlenmajerico ob ognju.

6. Ko se strdi in ohladi, petrijevke obrnemo in shranimo v hladilnik za 14 dni.

PRIPRAVA GOJIŠČA, KADAR GA NIMAMO PRIPRAVLJENEGA

1. Najprej dodamo soli, nato druge topne sestavine in nazadnje agar v pripravljeno količino hladne vode. Pri raztapljanju agarja uporabljamo vedno kopel, ne pa odprtega plamena.
2. Uravnamo pH z dodatkom 1 M ali 0,1 M NaOH ali HCl. Določamo ga z indikatorskim papirjem ali s pH-metrom (obarvano gojišče).
3. Gojišče filtriramo skozi filtrirni papir.
4. Razlivanje v epruvete: 10 ml za trdna gojišča in 5 ml za tekoča gojišča.
5. Epruvete zamašimo z vatnimi ali kovinskimi zamaški, erlenmajerice zamašimo z vato in prekrijemo z oljnatim papirjem.
6. Gojišča steriliziramo v avtoklavu. Polnimo jih v petrijevke po sterilizaciji/raztapljanju pri 45/55 °C, da se izognemo kondenzu.

Rezultati:

Račun:

Ugotovitve:

Tabela 1:

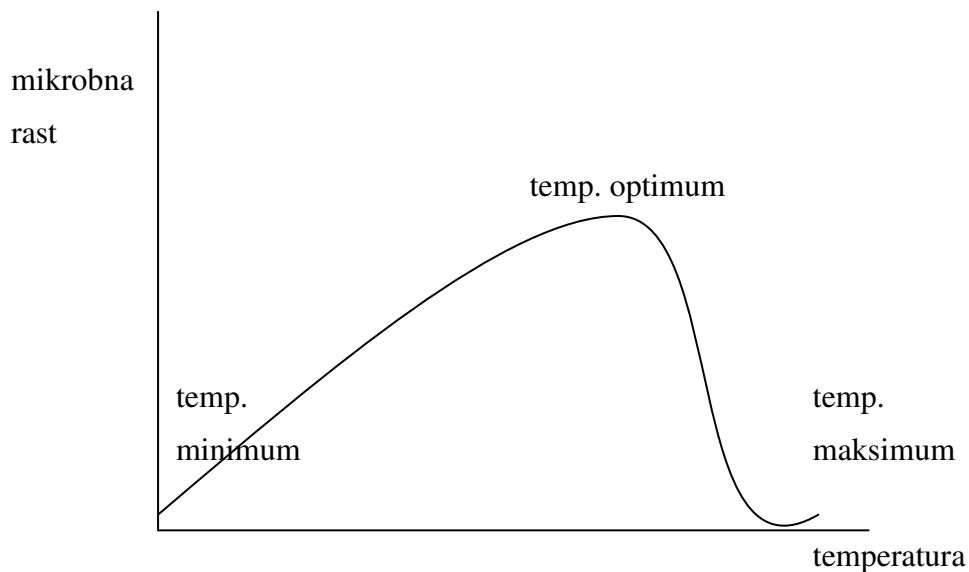
Ime proizvajalca	
Sestavine gojišča	

VPLIV TEMPERATURE NA RAST MIKROORGANIZMOV

Osnova vaje

Vsak mikroorganizem ima optimalno, minimalno in maksimalno rastno temperaturo (glej sliko). Temperaturni optimum je temperatura, pri kateri je mikrobna rast najhitrejša. Maksimum je najvišja in minimum najnižja temperatura, pri kateri še opazimo rast mikroorganizma.

Večina znanih bakterij najbolje raste pri temperaturah 28–38 °C. To so mezofilne bakterije. Druge vrste, psihrofili, najbolje rastejo pri precej nižji temperaturi, pri 16 °C ali manj. Termofilne bakterije najhitreje rastejo pri temperaturah okoli 60 °C.



Slika 13: Rast bakterijske kulture pri različnih temperaturah

Naloge:

1. Ugotovite, pri kateri temperaturi preiskovane čiste kulture mikroorganizmov najbolje uspevajo, tako da na posamezni petrijevki preštete kolonije in jih uvrstite glede na temperaturo, pri kateri najhitreje rastejo.
2. Rezultate prikažite v tabeli in grafično.

Pribor in material:

- petrijevke s hranljivim agarjem
- inkubatorja s temperaturo 37 in 60 °C
- polavtomatske pipete
- tipsi
- spatula
- gorilnik
- čaša z alkoholom

Vzorec:

-
-

Tehnika dela:

1. Spoznajmo delo s spatulo in se naučimo razmazati mikrobiološko kulturo po gojišču.
2. Pripravimo petrijevke s hranljivim agarjem (6).
3. Označimo petrijevke.
4. Cepimo 0,1 ml vzorca.
5. Razmažemo s spatulo.
6. Pravilno označene petrijevke postavimo za 48 ur v:
 - a) hladilnik
 - b) inkubator (60 °C)
 - c) inkubator (37 °C)

Rezultati:

Rezultate vpišite v tabelo. Pri tem upoštevajte, da:

Močno rast označimo: ++

Slabo rast: +

Če ni rasti: 0

Tabela 2:

Temperatura	Kultura mikroorganizmov	Kultura mikroorganizmov
4 °C		
37 °C		
60 °C		
Tip mikroorganizma glede na rast pri določeni temperaturi		

Ugotovitev:

DEJAVNIKI, KI VPLIVAJO NA ŽIVLJENJSKE PROCESSE BAKTERIJ

Osnova vaje

Človek že od nekdaj ve, da je s spremembo življenjskih razmer mogoče nadaljnjo rast bakterij upočasniti, preprečiti (bakteriostaza) ali jih popolnoma uničiti. Toplota, mraz, kisline, soli, sladkor, sušenje, prekajevanje so možnosti, ki preprečujejo razmnoževanje bakterij. Tako živila obvarujemo, da se ne pokvarijo.

V živilski industriji uporabljajo različne fizikalne, kemijske ali biološke postopke za podaljšanje obstojnosti živil. Večinoma uporabljajo kombinirane postopke, kjer delujejo različni dejavniki.

Naloge:

1. Ugotovite, kako različne življenjske razmere vplivajo na življenjske procese bakterij in rezultate predstavite v tabeli.
2. Pripravite fiksni preparat mikroorganizmov v mesu, ga enostavno pobarvajte in pod mikroskopom pogledajte mikroorganizme. Narišite sliko.
3. Ugotovite, kakšne vrste mikroorganizmov najdemo v mesu in kakšna je njihova oblika.

Laboratorijska vaja poteka v več delih.

Pribor in reagenti:

- 7 nesterilnih epruвет
- NaCl
- sladkor
- limonin sok
- etanol
- eza
- gorilnik z mrežico
- kapalka
- vata
- merilni valj
- pipeta
- urno steklo

Vzorec: mleto goveje meso

Tehnika dela:

1. Pripravimo stojalo z epruvetami in jih označimo.
2. Nekaj mletega mesa pregnetemo s prsti, da ga oskrbimo z mnogo bakterijami in oblikujemo v kroglico, veliko kot grahovo zrno.
3. V vsako epruveto položimo kroglico mesa in dodamo 5 ml vode v 1., 2., 5., in 6. epruveto.
4. Nato dodamo v:
 1. epruveto 1 kavno žličko (4g) kuhinjske soli,
 2. epruveto 1 kavno žličko (4g) sladkorja,
 3. epruveto 5 ml limoninega soka,
 4. epruveto 5 ml etanola,
 5. epruveto kuhamo v vodni kopeli 20 minut,
 6. epruveta ostane brez dodatkov.
5. Vse epruvete zamašimo z vatnimi zamaški in postavimo v inkubator za 24 ur pri temperaturi 37 °C.

Naslednjič bomo po stopnji motnosti ugotovili rast bakterij. Poskušali bomo tudi odgovoriti na vprašanje, ali so bakterije uničene ali samo zatrte v rasti. Ocena motnosti je praktičen način spremljanja rasti mikroorganizmov. Predvidevamo, da motnost v vzorcu povzročijo razmnoženi mikroorganizmi.

Rezultati: Zapišite stopnjo motnosti v posamezni epruveti in jo poduhajte. Duh po gnilobi kaže na razkroj mesa.

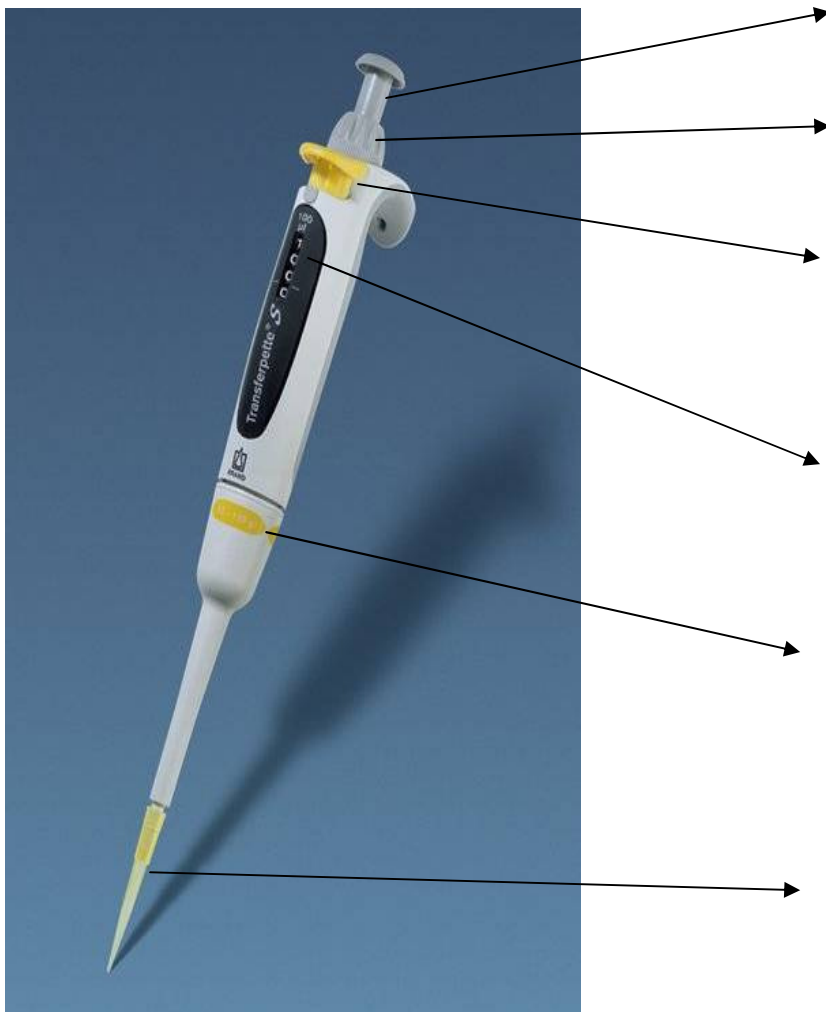
Tabela 3:

Št. epruvete	Stopnja motnosti in vonj

Ugotovitve:

Naloge:

1. Spoznajte polavtomatsko pipeto in se naučite delati z njo. Na sliki označite posamezne dele. Zapiši tudi namen uporabe.
2. Pripravite hranljivi agar.
3. Cepite mikrobiološke kulturo iz vzorcev v epruveh na hranljivi agar.
4. Opazujte rast kolonij na petrijevkah in jih preštajte.
5. Ugotovite, kateri dejavniki pospešujejo oz. zavirajo rast mikroorganizmov.



Slika 14: Polavtomatska pipeta

Vir:

http://catalog.brand.de/index.php?encrypt=0&ID_O_TREE_GROUP=1902&chapter=1902&ID_O_PRODUCT=19781&begin=0&sLanguage=English&start_infoblock=1

Pribor in material:

- 6 petrijevok s hranljivim agarjem
- gorilnik
- flomaster
- polavtomatska pipeta
- tipsi
- spatula
- alkohol

Tehnika dela:

1. Naučite se dela s polavtomatsko pipeto.
2. Pripravimo 6 petrijevok s hranljivim agarjem in jih označimo.
3. Iz vsake epruvete cepimo 0,1 ml vzorca na petrijevo ploščo.
4. Razmažemo s spatulo.
5. Petrijevke inkubiramo 48 ur v inkubatorju.

Naslednjič bomo opazovali rast kolonij na petrijevkah in preučili vplive na življenjske procese bakterij. Pod mikroskopom si bomo ogledali mikroorganizme v mesu in jih enostavno pobarvali.

Rezultati:

Dobra rast mikroorganizmov: ++
Slaba rast mikroorganizmov: +
Ni rasti mikroorganizmov: 0

Tabela 4:

Vzorec z dodatkom	Rast

Ugotovitve:

Naloge:

1. Naučite se pripraviti fiksni preparat trdne kulture.
2. Izberite petrijevo ploščo, kjer je zraslo veliko ločenih kolonij.
3. Izberite si eno ločeno kolonijo in pripravite fiksni preparat mikroorganizmov v mesu. Enostavno ga pobarvajte in pod mikroskopom pogledajte mikroorganizme. Narišite sliko.
4. Ugotovi, kakšne vrste mikroorganizmov najdemo v mesu in kakšna je njihova oblika.

Zapišite ves potreben pribor in material:

Tehnika dela:

1. Pripravimo fiksni preparat (glejte pripravo fiksne preparata iz trdne kulture).
2. Preparat enostavno pobarvamo.
3. Poiščemo sliko mikroorganizmov pod imerzijsko povečavo in jo narišemo.

Rezultati:**Ugotovitve:**

IZOLACIJA BAKTERIJ Z RAZLIČNIH POVRŠIN IN GOJENJE BAKTERIJ

Osnova vaje

Bakterije lahko izoliramo iz različnih okolij in vzorcev. Metode izolacije so različne glede na vrsto materiala:

- **bris** (različne površine),
- **redčenje in cepljenje na gojišče** (za tekoče vzorce, kadar pričakujemo veliko bakterij),
- **resuspendiranje materiala in cepljenje na gojišča** (kadar želimo izolirati bakterije iz trdnega vzorca, ga moramo resuspendirati v fiziološki raztopini).

Dve metodi, da dobimo osamljene kolonije:

1. metoda izčrpavanja: s cepilno zanko vlečemo po hranilni podlagi v različnih smereh. Tam, kjer smo vlekli nazadnje, zrastejo redke kolonije. Tam, kjer smo začeli, so kolonije zelo goste;
2. metoda razredčevanja: pripravimo suspenzijo iz 1 g vzorca in jo razredčimo 10-, 100-, 1000-krat itd. Nato cepimo po 1 ml ali 0,1 ml razredčitve na hranilne podlage.

CEPLJENJE (zasejevanje, inokulacija) pomeni prenos mikroorganizmov z vzorca ali površine na gojišče.

INKUBACIJA MIKROORGANIZMOV: plošče ali epruvete z vzorcem inkubiramo v inkubatorju, ki vzdržuje temperaturo. Temperatura in čas inkubacije sta odvisna od vrste mikroorganizmov. Večina se dobro razvija že pri sobni temperaturi, vendar ostanejo vzgojene kolonije majhne in rastejo zelo počasi. Zato priporočajo gojenje bakterij pri 37 °C. Čas inkubacije je navadno 24 ur, po želji ga lahko tudi podaljšamo. Če želimo določene bakterijske rodove shraniti, jih moramo hraniti v hladilniku. Naprava, v kateri se odvija inkubacija, se imenuje inkubator.

Cepljene plošče vlagamo v inkubator obrnjene vedno na pokrov, da preprečimo stekanje kondenza na površino gojišča. V inkubatorju naj bo naloženih največ 6 plošč druga na drugo.

IZOLACIJA: ločevanje mikroorganizmov iz trdnega ali tekočega vzorca na gojišču, dokler ne dobimo posameznih mikroorganizmov.

KOLONIJE: kadar kulturo mikroorganizmov cepimo na gojišče, se bo vsaka bakterijska celica namnožila in nastala bo kolonija, ki jo v večini primerov dobro razločimo tudi s prostim očesom. Kulture na ploščah pregledamo in če opazimo le eno vrsto kolonij, lahko sklepamo, da je kultura čista.

Kolonije različnih vrst bakterij se med seboj ločijo po:

- velikosti (premer < 1 mm, 1 mm, > 1 mm)
- barvi (prozorne, sivobebe, bele, rumene, oranžne, zelene, vijolične itd.)
- obliki (okrogle, nepravilne, nitaste, rizoidne, vretenaste)
- površini (gladka, mokra, suha, nagubana itd.)
- profilu (raven, dvignjen, izbočen, dvignjena ali ugreznjena sredina)

OBLIKA KOLONIJ



rizoidna

filamentozna
(nitasta)

nepravilna

okrogla

vretenasta

.....
točkasta

PROFIL KOLONIJ



ploska



dvignjena



konveksna



dvignjena sredina



vbočena sredina



konkavna

Slika 15: Tipi kolonij glede na obliko in profil

IZOLACIJA BAKTERIJ Z RAZLIČNIH POVRŠIN (BRISI)

Osnova vaje

V živilski industriji je pomembno, da vladajo na površinah, opremi in v prostorih takšne higienske razmere, da preprečujejo kontaminacijo, ki bi lahko privedla do higienske oporečnosti živil. Človek, ki sodeluje v proizvodnji in prometu z živili, je še vedno vir ali vzrok kontaminacije živil z bakterijami, zato je njegova osebna higiena in ustrezno ravnanje nujno pri zagotavljanju varnih živil.

Vzorčenje z brisi uporabljamo za ugotavljanje higienskega stanja v proizvodnih obratih, gostinskih obratih. Z brisi vzorčimo delovne površine, opremo, jedilni in kuhinjski pribor, posodo, roke itd. Pri tem uporabljamo sterilne epruvete z določenim volumnom sterilne fiziološke raztopine (5 ali 10 ml). Na notranji strani pokrovčka epruvete je pritrjena palčka, ki je na koncu ovita z vato. Pri vzorčenju površin z brisom pobrišemo površino določene velikosti (20 cm²) tako, da bris med vzorčenjem obračamo in da smer brisanja vsaj dvakrat zamenjamo.

Naloge:

1. Izolirajte bakterije z različnih površin.
2. Naslednjič preglejte petrijevke in rezultate zapišite v tabeli.
3. V tabeli predstavite značilnosti kolonij, ki so zrasle na različnih površinah.
4. Ugotovite, kako ločimo kolonije med seboj in katere značilnosti kolonij prevladujejo.
5. Ugotovite, kakšne mikrobiološke kulture rastejo na površinah in ugotovitev utemeljite.
6. Pojasnite, katere površine so higiensko najbolj ustrezne in rezultate predstavite tudi v grafu.
7. Ugotovite, kakšni so brisi neumitih in umitih rok ter ugotovitev utemeljite.

Vzorci:

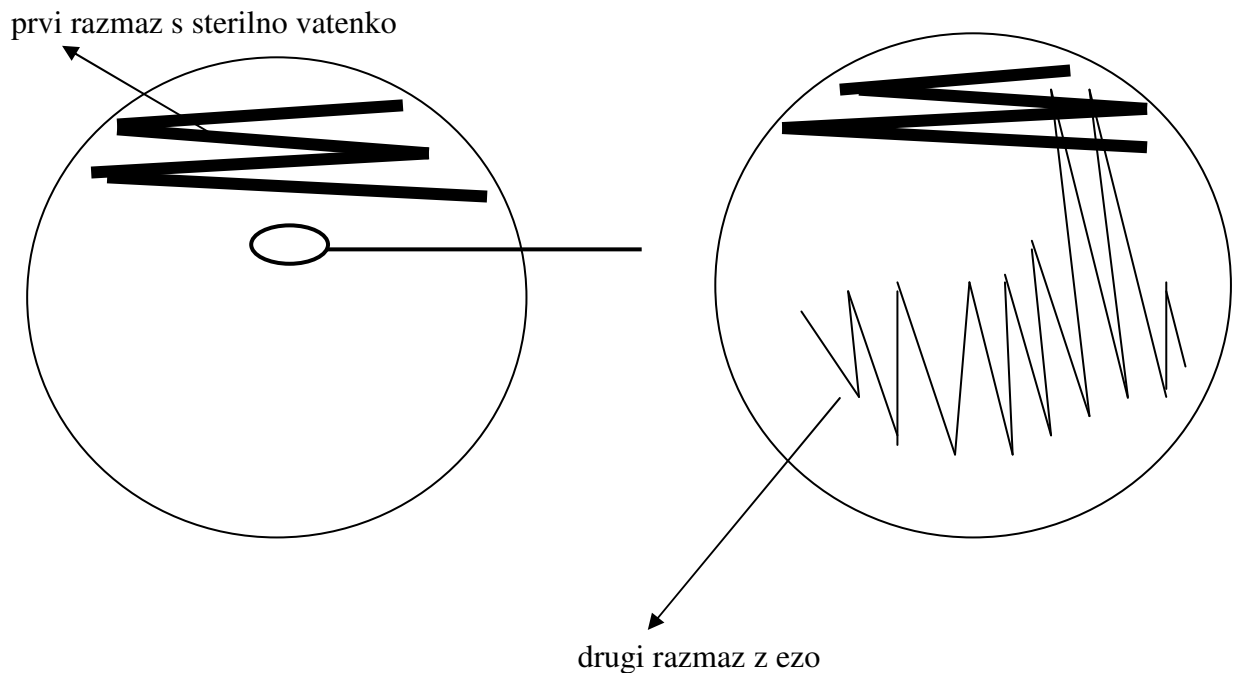
- delovna površina
- koža (neumite in umite roke)
- tla
- usta
- halja
- delovni prostor
- voda
- destilirana voda

Pribor in material:

- sterilne vatenke
- stekleničke s fiziološko raztopino
- plošče hranljivega agarja (lahko tudi krvni agar)
- cepilna zanka
- gorilnik

Tehnika dela:

1. Pripravimo in označimo petrijevke.
2. Sterilno vatenko namočimo v fiziološki raztopini.
3. Dobro podrgnemo po izbrani površini, in sicer velikosti (20 cm²), sterilno vatenko med vzorčenjem obračamo in smer brisanja vsaj dvakrat zamenjamo.
4. Kužnino razmažemo po delu plošče hranljivega agarja, kot kaže slika. S cepilno zanko naredimo nato nekaj pravokotnih (2–3) potez čez prvi razmaz, nato nadaljujemo v isti smeri cepljenja, ne da bi se dotikali prvega razmaza.



Slika 16: Razmaz brisa na plošči

5. Vsako ploščo označimo in inkubiramo do 2 dni pri 37 °C.
6. Nato shranimo v hladilniku do naslednjih vaj.

Rezultati:

Dobra rast ++

Slaba rast +

Ni rasti 0

Tabela 5:

Površina	Rast

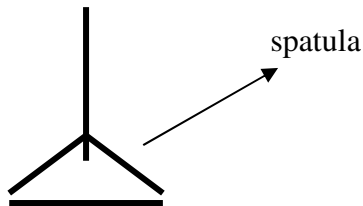
Tabela 6:

Površina	Oblika kolonij	Barva kolonij	Profil kolonij	Velikost kolonij	Čistost kulture

Ugotovitve:

IZOLACIJA BAKTERIJ IZ TEKOČIH VZORCEV IN RAZREDČEVANJE VZORCEV

Bakterije iz tekočih vzorcev lahko cepimo neposredno na gojišče, kadar pričakujemo, da v vzorcu ni veliko mikroorganizmov. Cepimo lahko z ezo, 1 ml pipeto ali s polavtomatsko pipeto. Tekoči vzorec v petrijevki prelijemo z gojiščem, ohlajenim na 50 °C ali pa ga razmažemo s spatulo.



Slika 17: Spatula

Kadar v vzorcu pričakujemo veliko število bakterij, ga je potrebno razredčiti. Za razredčevanje potrebujemo fiziološko raztopino (0,9 % NaCl), ki jo je potrebno sterilizirati v avtoklavu 15 min pri 120 °C.

Vzorec lahko razredčimo 1:10 (10^{-1}), 1:100 (10^{-2}), 1:1000 (10^{-3}), 1:10000 (10^{-4}), 1:100000 (10^{-5}), 1:1000000 (10^{-6}) itd.

Mleko je eno izmed najpomembnejših živil, saj vsebuje koristne, lahko pa tudi patogene mikroorganizme. Zaradi pomanjkljive higiene in nezadostnega čiščenja in ali razkuževanja, nezadostnega hlajenja po molži ali mešanja mleka dobre in slabe kakovosti se mleko prične kvariti že pred sprejemom v mlekarno. Mikroorganizmi pridejo vanj iz notranjosti in zunanosti vimena, opreme za molžo, človeka, lahko pa tudi od insektov, vode, zraka.

Higiensko ustrezno mleko vsebuje malo mikroorganizmov. Kakovost surovega mleka se določa s skupnim številom mikroorganizmov in številom somatskih celic (to so odmrle celice vimena in obrambne celice organizma – bele krvničke ali levkociti), ki so v mleku v določenem številu vedno prisotne. Kakovost mleka vpliva tudi na izhodiščno ceno. Višji kakovostni razred ceno mleka še dodatno zviša, četrti kakovostni razred pa jo zniža.

Termoduri so mikroorganizmi, ki preživijo pasterizacijo mleka. Najpogosteje so zastopani rodovi *Bacillus*, *Clostridium*, *Micrococcus*. Sterilizacija uniči vse mikroorganizme, tudi endosporogene.

SŠMO v 1ml surovega mleka se ugotavlja s štetjem kolonij na petrijevih ploščah. Za štetje mikroorganizmov uporabljamo PCA agar.

Mleko se glede na skupno število mikroorganizmov (SŠMO) razvrsti takole:

Kakovostni razred	SŠMO
– E ekstra kakovostni razred	do 50.000 mo/ml
– 1. kakovostni razred	50.001–100.000 mo/ml
– 2. kakovostni razred	100.001–300.000 mo/ml
– 3. kakovostni razred	300.001–800.000 mo/ml
– 4. kakovostni razred	800.001–3,000.000 mo/ml

Naloge:

1. Naučite se pravilne tehnike razredčevanja vzorcev.
2. Pojasnite, kako bomo menjavali tipse.
3. Pripravite ustrezno gojišče – PCA agar.
4. Razredčite vzorec surovega mleka.
5. Naslednjič ugotovite, kako razredčitev vpliva na rast mikroorganizmov in rezultate prikažite v tabeli.
6. Naslednjič ugotovite, v katerem mleku se nahaja več mikroorganizmov, tako da preštete kolonije na gojiščih. Ugotovitve utemeljite.
7. Poskušajte pojasniti, kako bi izračunali število mikroorganizmov v 1 ml surovega mleka in v kateri kakovostni razred bi ga uvrstili.
8. Utemeljite uvrstitev vzorca surovega mleka v kakovostni razred.

Pribor in reagenti:

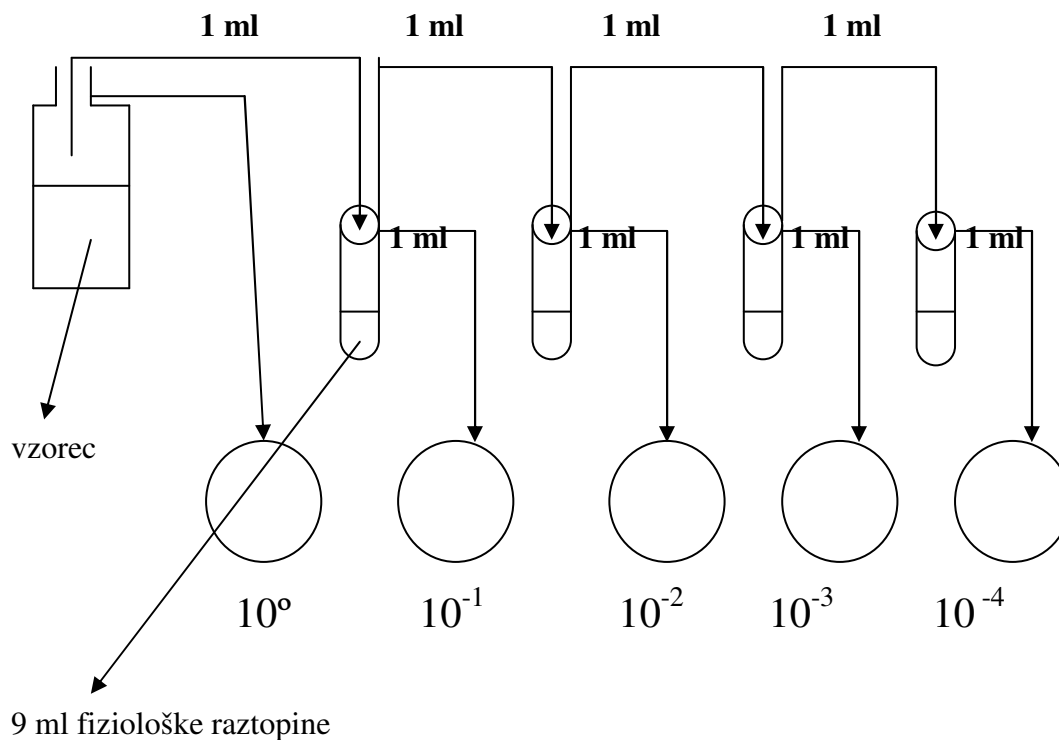
- stojalo za epruvete
- epruvete
- PCA agar
- 10 ml in 1 ml pipete ali polavtomatske pipete z ustreznimi tipsi
- fiziološka raztopina
- odlagalnik za pipete ali tipse
- alufolija
- gorilnik
- mešalnik

Vzorec: surovo mleko

Tehnika dela:

1. Pripravimo stojala s 5 epruvetami.
2. Označimo epruvete z razredčitvami.
3. Prižgemo gorilnik.

4. V vsako epruveto odpipetiramo po 9 ml fiziološke raztopine.
5. V 1. epruveto odpipetiramo 1 ml mleka, jo zapremo in **premešamo**.
6. Zamenjamo pipeto ali tips. V 2. epruveto odpipetiramo 1 ml raztopine iz 1. epruvete, jo zapremo in premešamo.
7. Zamenjamo pipeto ali tips. V 3. epruveto odpipetiramo 1 ml raztopine iz 2. epruvete in premešamo. Ponavljamo postopek do končne razredčitve.



Slika 18: Izolacija mikroorganizmov iz tekočega vzorca

8. Vzamemo 1 ml pipeto ali polavtomatsko pipeto z ustreznim tipsom in odpipetiramo iz največje razredčitve vzorca (10^{-4}) 1 ml v prazno petrijevko in jo takoj zapremo. Z isto pipeto ali tipsom odpipetiramo 1 ml iz (10^{-3}) razredčitve vzorca v prazno petrijevko in jo takoj zapremo. Nato z isto pipeto ali tipsom odpipetiramo 1 ml iz (10^{-2}) v prazno petrijevko in jo takoj zapremo.
9. Pripravimo PCA agar po navodilih proizvajalca in ga po sterilizaciji ohladimo na 45–50 °C ter prelijemo vzorce v vseh petrijevih ploščah.
10. Spatulo previdno potopimo v etanol in potegnemo čez plamen ter ohladimo ob ognju.
11. S spatulo v krožnih gibih razmažemo vzorec v petrijevki in pazimo, da ne pritiskamo preveč. Spatulo vsakič potopimo v alkohol in potegnemo čez plamen.
12. Petrijevke inkubiramo 72 ur pri $T = 32\text{ °C}$, nato preštejemo kolonije.

Začetna suspenzija ali **osnovna razredčitev** je suspenzija vzorca, ki jo dobimo, če vzorec prelijemo z 9-kratno količino fiziološke raztopine in homogeniziramo ali premešamo.

Nadaljnje razredčitve dobimo, ko osnovno razredčitev zamešamo z 9-kratno količino FR. S ponavljanjem te operacije dobimo želeno število razredčitev, ki nam ustreza za preiskavo.

Rezultati:

Tabela:

Ugotovitve:

IZOLACIJA MIKROORGANIZMOV IZ TRDNEGA VZORCA

Kadar želimo izolirati bakterije iz trdnega vzorca (npr. zemlja, meso itd.), ga moramo resuspendirati v fiziološki raztopini. Tako preide večina mikroorganizmov v tekočino, to pa nato cepimo na gojišča. BHI agar se uporablja kot priporočeno gojišče za gojenje in izolacijo različnih mikroorganizmov, vključujoč bakterije, kvasovke in plesni.

Naloge:

1. Ponovite metodo redčenja vzorcev in v shemo na sliki pravilno vpišite razredčitve.
2. Izolirajte mikroorganizme iz zemlje ali mletega mesa.
3. Preštejte kolonije mikroorganizmov in rezultate prikažite v tabeli.
4. Opišite kolonije in napišite svoje ugotovitve ter poskušajte prepoznati kolonije bakterij, kvasovk in plesni.
5. Razložite, kakšne kulture mikroorganizmov so se pojavile na gojiščih.
6. Ugotovi, ali stopnja razredčenosti vpliva na rast mikroorganizmov in razložite.
7. Pojasnite, kako ugotavljamo prisotnost mikroorganizmov v trdnih živilih.

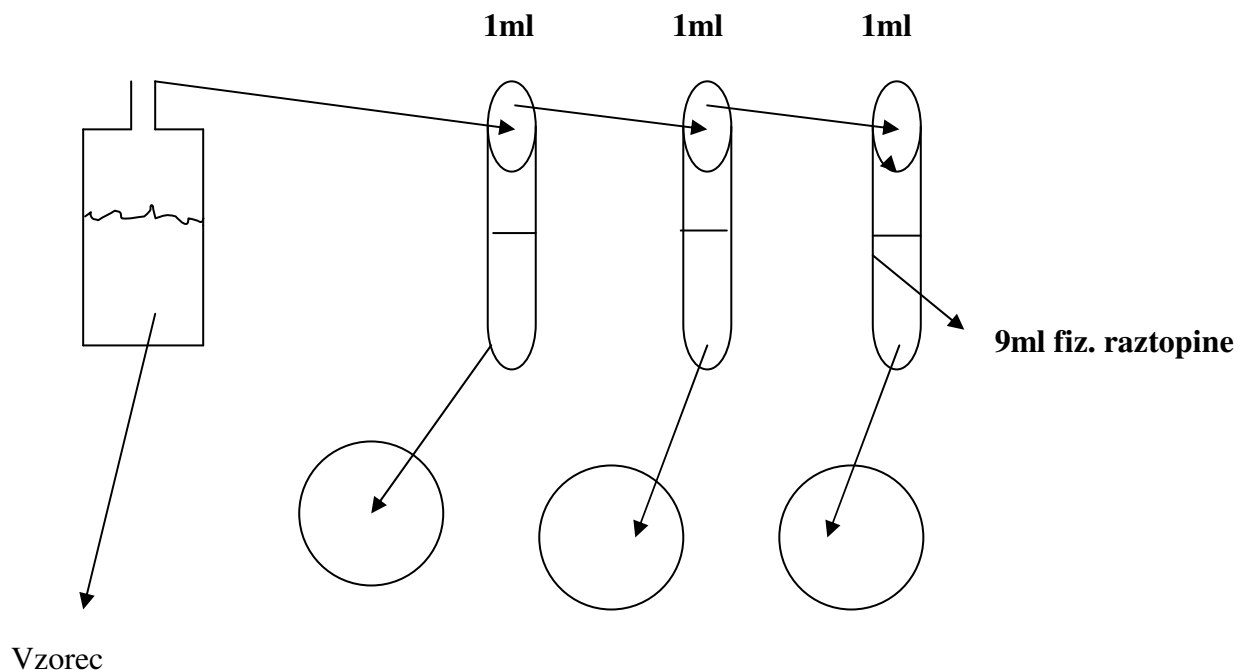
Pribor in material:

- Petrijeve plošče s pripravljenim gojiščem (BHI – *brain heart infusion*, krvni agar, hranljivi agar)
- erlenmajerica
- fiziološka raztopina
- sterilne epruvete
- mešalnik
- spatula
- čaša z etanolom
- 0,1, 1, 10 ml pipete ali polavtomatske pipete z ustreznimi tipsi
- žličke
- odlagalnik za pipete ali tipse
- kapalka

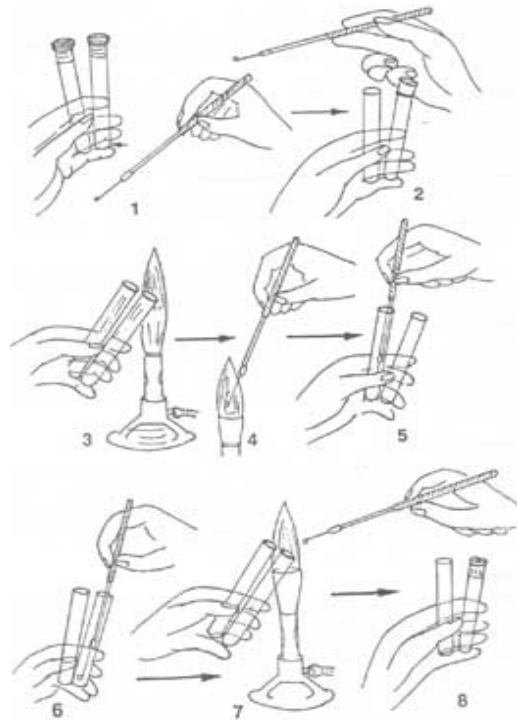
Tehnika dela:

1. Majhno žličko mletega mesa ali zemlje damo v erlenmajerico ali stekleničko z 20 ml sterilne fiziološke raztopine.
2. Dobro premešamo.
3. Pripravimo 3 epruvete z 9 ml fiziološke raztopine.
4. Redčimo suspenzijo, pripravljeno z mletim mesom ali zemljo. Pazimo, da prenašamo čim manj trdnih delcev.
5. V 1. epruveto prenesemo 1 ml suspenzije in dobro premešamo na mešalniku.

6. Iz 1. epruvete prenesemo z novo sterilno pipeto ali novim tipsom 1 ml suspenzije v 2. epruveto in dobro premešamo.
7. Iz 2. epruvete prenesemo z novo sterilno pipeto ali novim tipsom 1 ml suspenzije v 3. epruveto in dobro premešamo.
8. V sredino gojišča naneseemo 0,1 ml ali kapljico razredčene suspenzije.
9. Razmažemo s spatulo, ki jo najprej pomočimo v alkohol in nato hitro potegnemo skozi plamen in počakamo, da alkohol zgori. Nato spatulo ohladimo ob robu gojišča in v krogih razmažemo po gojišču.
10. Gojišča inkubiramo pri 37 °C, in sicer 24–48 h, gojišče BHI pri 35 °C, 24–72 h in naslednjič pregledamo nacepljene petrijevke.



Slika 19: Shema izolacije mikroorganizmov iz tekoče kulture



Slika 20: Sterilno delo z epruветami in ezo

Vir: <http://www.studentsguide.in/microbiology/microbiology-tools-techniques/images/inoculation-procedure.jpg>

Rezultati:

Tabela:

Ugotovitve:

IZOLACIJA ČISTE KULTURE

Večino okolij naseljujejo bakterije različnih vrst in vsaka od njih ima določene fiziološke in morfološke lastnosti ter proizvaja določene metabolite (toksine, antibiotike itd.). Le z osamitvijo vsake bakterijske vrste posebej v čisti kulturi je mogoče posamezne vrste preučevati, spoznati, jim dati imena in morda tudi uporabljati.

Kultura mikroorganizmov so mikroorganizmi, ki rastejo v gojišču ali na njem. Lahko je čista ali mešana. V čisti kulturi je samo ena vrsta mikroorganizmov, v mešani kulturi pa je več kot ena vrsta. V mikrobiologiji nas običajno zanima delovanje mešanih kultur, kakršne so večinoma v naravi, vendar običajno delamo s čistimi kulturami mikroorganizmov, saj je le tako mogoče preučevati vsako vrsto posebej.

Čisto kulturo izoliramo iz materiala, kjer pričakujemo to vrsto bakterij (npr. iz vode, zemlje, zraka, živila, brisa itd.). Pri vseh postopkih, od odvzema materiala do identifikacije izoliranih kultur, je potrebno delati aseptično.

Mešano kulturo najprej redko cepimo na gojišče, tako da iz mikroorganizmov zrastejo posamezne kolonije. Vsaka kolonija se sestoji iz milijonov celic, ki so nastale iz ene starševske celice. Če želimo zagotoviti res čisto kulturo, postopek večkrat ponovimo.

Če je bakterij, ki jih želimo izolirati, v vzorcu malo, uporabimo selektivno gojišče, ki zavira rast večine bakterij, ali pa želeno vrsto bakterij najprej namnožimo v obogatitvenem gojišču.

Naloge:

1. Pripravite gojišče s hranljivim agarjem.
2. Oglejte si animacijo priprave čiste kulture na spletnem naslovu:
<http://www.sumanasinc.com/webcontent/animations/microbiology.html>
3. Izolirajte čisto kulturo mikroorganizmov z gojišča, kamor ste cepili mešano kulturo.
4. Ponovite cepljenje še 4-krat.
5. Naslednjič v ugotovitvi napišite, ali ste res cepili čisto kulturo in kako ste to ugotovili.
6. Napišite, ali ste izolirali čisto kulturo na vseh petih petrijevkah in opišite napake, ki ste jih zaznali.
7. Kaj je metoda izčrpavanja? Pojasnite na sliki.

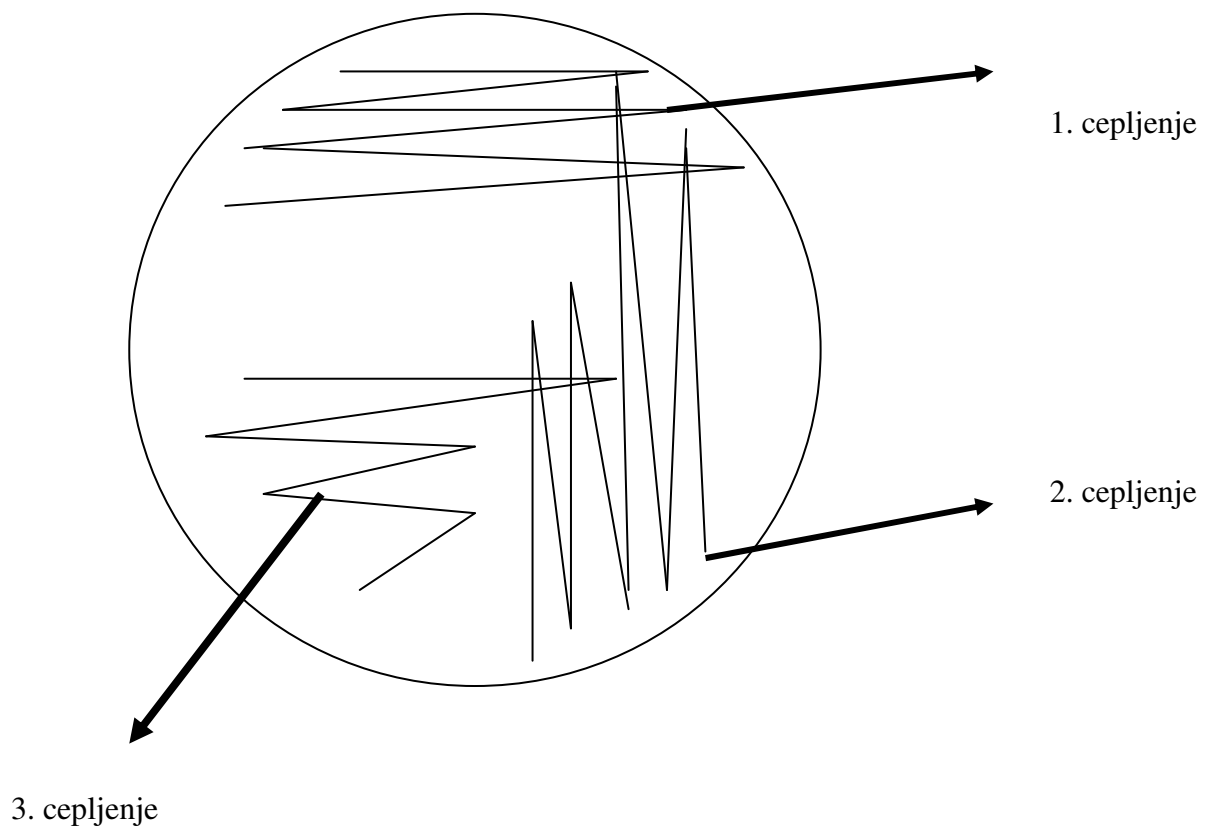
Pribor in material:

- plinski gorilnik
- eza
- petrijevka z mešano kulturo
- 5 petrijev s hranljivim agarjem

Vzorec:

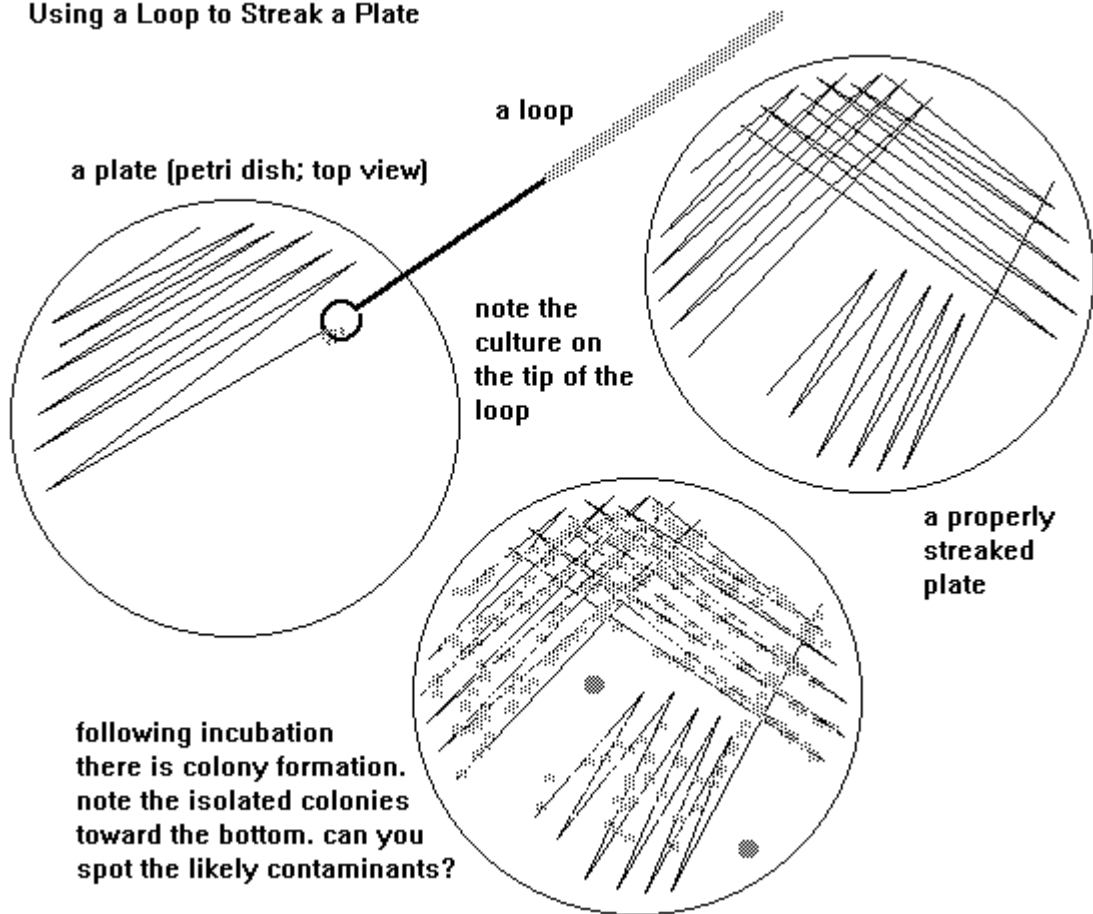
Tehnika dela:

1. Izberemo eno izmed kolonij in jo izoliramo kot čisto kulturo tako, da jo cepimo na svežo ploščo do posameznih kolonij:
 - z razžarjeno in ohlajeno ezo potegnemo po eni koloniji (pazimo, da ni vzorca preveč) in razmažemo, kot kaže slika pri 1. cepljenju;
 - z razžarjeno in ohlajeno ezo 2-krat potegnemo čez 1. razmaz, kot kaže slika pri 2. cepljenju;
 - z razžarjeno in ohlajeno ezo potegnemo čez 2. razmaz in razmažemo, kot kaže slika pri 3. cepljenju.
2. Ponovimo postopek še 4-krat in ne pozabimo označiti petrijevka.
3. Inkubiramo pri 37 °C od 24 do 48 ur.



Slika 21: Cepljenje čiste kulture

Using a Loop to Streak a Plate



Slika 22: Ena od tehnik izolacije čiste kulture

Vir: <http://www.mansfield.ohio-state.edu/~sabedon/biol4035.htm>



Slika 23: Izolacija čiste kulture na petrijevi plošči

Vir: <http://a-s.clayton.edu/furlong/BIOL3250/lab/Review/page/asepticanswer.htm>

Rezultati:

Ugotovitve:

UGOTAVLJANJE VELIKOSTI MIKROBNIH POPULACIJ

Osnova vaje

Poznamo:

- a) indirektne metode
- b) direktne metode

Indirektne ali gojitvene metode:

1. Štetje na trdnih gojiščih: metodo uporabljajo večinoma za ugotavljanje števila mikroorganizmov v:
 - tekočinah, kot so voda, mleko,
 - materialu, ki ga je mogoče po homogenizaciji suspendirati v tekočini.

Metodo rutinsko uporabljajo v sanitarni mikrobiologiji. V preiskovanem materialu ali bujonski kulturi je navadno preveč bakterij, da bi jih lahko šteli, zato je potrebno material ali kulturo primerno redčiti v fiziološki raztopini, v peptonski vodi itd. ter primerne razredčitve cepiti na plošče. Na plošče cepimo tista redčenja, kjer je mogoče pričakovati, da bo mogoče kolonije prešteti (do 300 kolonij/ploščo). Temperatura in čas inkubacije ter uporabljena gojišča so odvisni od bakterij, na katere se material preiskuje. Po 24- do 48-urni inkubaciji pri 30 ali 37 °C kolonije preštejemo.

Pri raziskovalnem delu je treba delati v več paralelkah, pri rutinskih preiskavah pa ne. Mehanski ali elektronski števci kolonij olajšajo delo v rutinskih laboratorijih.

Pri tem načinu štetja predvidevamo, da iz vsake žive celice zraste ena kolonija mikroorganizmov.

Petrijeva plošča ni števna, če na njej zraste:

- > 300 kolonij, ker obstaja velika možnost napake pri štetju,
- < 30 kolonij, ker je vprašljiva natančnost pri izvajanju poskusa.

Preiskovani material ali tekočino lahko redčimo: 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10 000, 1:100000 itd., pri štetju upoštevamo razredčitev. Npr. na plošči, kamor smo cepili 10000-krat razredčen vzorec, je zraslo 44 kolonij.

Število mikroorganizmov v 1 ml vzorca = $44 \times 10.000 = 440.000$.

Na ploščo naneseemo 0,1 ml kulture in jo s spatulo razmažemo.

2. Ugotavljanje najverjetnejšega števila (most probable number, MPN): to je metoda, pri kateri kulturo ali preiskovani vzorec cepimo v serijo tekočih gojišč in glede na število gojišč, v katerih ugotavljamo bakterijsko rast, ugotavljamo približek za število bakterij v vzorcu.

Metodo rutinsko uporabljajo pri ugotavljanju števila koliformnih bakterij v vodi.

IZOLACIJA IN UGOTAVLJANJE ŠTEVILA MIKROORGANIZMOV V ZEMLJI

Osnova vaje

V zemlji najdemo na bilijone mikroorganizmov, katerih glavna naloga je razkroj organskih snovi. Tam najdemo tudi mnogo patogenih mikroorganizmov, ki lahko preidejo v živila.

V povprečju najdemo v 1 g zemlje na milijone bakterij, največ v nekaj centimetrih zgornje plasti prsti, z globino pa njihovo število bistveno upade. Bakterije so najštevilčnejši organizmi v zemlji. Izoliramo in določamo jih na hranljivem agarju, čeprav nobeno gojišče ne zagotavlja vseh hranilnih potreb mikroorganizmov v prsti.

Iz zemlje lahko izoliramo tudi le kvasovke in plesni. Zato uporabljamo YGC gojišče, ki vsebuje kvasni ekstrakt, glukozo in antibiotik kloramfenikol, ki preprečuje rast bakterij. Kot selektivno gojišče se uporablja največ v mlečni industriji.

Naloga:

1. Vzorec bomo redčili 10.000-krat ali 10^{-4} , zato narišite shemo redčenja.
2. Rezultate podajte v tabeli.
3. Ugotovite število mikroorganizmov v 1 ml vzorca zemlje.
4. Ugotovite, ali vzorec zemlje vsebuje tudi kvasovke in plesni ter utemeljite.

Vzorec: vrtna zemlja

Pribor in material:

- fiziološka raztopina
- plošče hranilnega agarja in YGC agarja
- sterilne epruvete
- mešalec za epruvete
- spatula
- etanol
- polavtomatske pipete in tipsi
- odlagalnik za tipse

Tehnika dela:

1. Označimo petrijevke z razredčitvami.
2. V 4 epruvete odpipetiramo po 9 ml fiziološke raztopine.
3. V 1. epruveto dodamo 1 ml vzorca. Epruveto na mešalcu za epruvete dobro premešamo. **Z novo pipeto** prenesemo 1 ml suspenzije v naslednjo epruveto.
4. Postopek ponovimo še 3-krat in vsakič zamenjamo pipeto.

5. Redčeno kulturo iz zadnjih dveh (lahko tudi treh, če je razredčitev več) cepimo na hranilni agar. Vsako razredčino cepimo na dve plošči. Na ploščo naneseemo 0,1 ml kulture in jo čim bolj enakomerno razmažemo s spatulo. Na plošči označimo končno redčenje.
6. Inkubiramo pri temperaturi 37 °C.
7. Naslednjič bomo prešteli kolonije in izračunali velikost mikrobne populacije.
8. Na pripravljene petrijeve plošče z YGC gojiščem cepimo 1ml vzorca in ga nato razmažemo s spatulo.
9. Inkubiramo 5 dni pri temperaturi 25 °C.
10. Naslednjič pregledamo petrijeve plošče in zapišemo rezultate.

Rezultati:

Shema redčenja

Tabela 7:

Število mikroorganizmov			
Vzorec	100-krat	1000-krat	10000-krat

Ugotovitve:

Direktne metode:

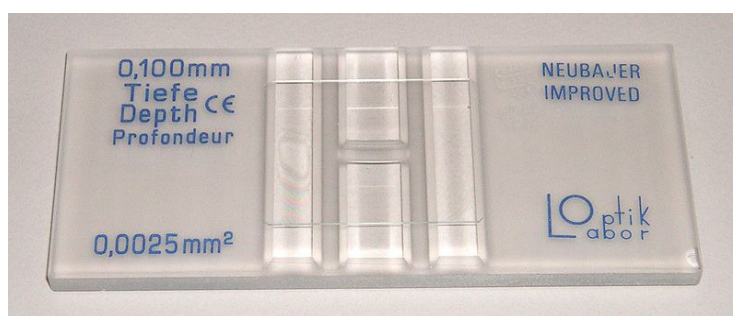
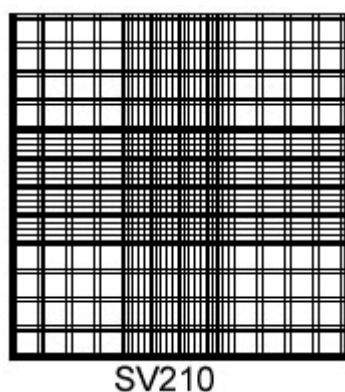
Pri teh metodah štejemo celice mikroorganizmov v vzorcu, kar lahko delamo na mikroskopskih preparatih ali s posebnimi napravami, npr. s Coulterjevim števcem delcev, ki meri razporeditev, velikost in število delcev v suspenziji. Napaka pri teh metodah je precejšnja, ker štejemo žive in mrtve celice.

1. Štetje v komori po Bürkertürku: to je posebno objektno stekelce z vrisano mrežo. Omogoča štetje mikroorganizmov v točno določenem volumnu.



Slika 24: Kvasne celice v mrežici 16 kvadratkov in pravilno štetje kvasovk

Vir: <http://www.cellvision.nl/>



Slika 25: Burkerturkova komora

Vir: <http://www.proscitech.com.au/catalogue/online.asp?page=s6>,

http://en.wikipedia.org/wiki/File:Neubauer_improved_counting_chamber.jpg

2. V mikrobiologiji uporabljamo tudi Breedovo metodo in metodo štetja v komori po Petroff-Hauserju.

Naloge:

1. Spoznajte delo z Burkerturkovo komoro.
2. Na sliki mreže s kvasnimi celicami pobarvajte tiste, ki jih ne štejemo.
3. Preštajte kvasne celice v 12 kvadratih.
4. Izračunajte povprečno število kvasovk v enem kvadratu.
5. Izračunajte število kvasnih celic v 1 ml kvasne suspenzije.
6. Ugotovite, v katerem vzorcu je večje število kvasovk.

Pribor in material:

- Bürkertürkova komora
- kapalka
- krovno steklo
- mikroskop

Vzorec: *Saccharomyces cerevisiae* v kvasni suspenziji

Tehnika dela:

1. Pripravimo mikroskopski preparat: na Bürkertürkovo komoro kanemo v nekoliko ugreznjen srednji del suspenzijo kvasovk.
2. Vzorec prekrijemo z nekoliko debelejším krovnim steklom, ki s svojo težo odrine vso odvečno suspenzijo v osrednji in stranske jarke. S tem je zagotovljena višina stolpca suspenzije, ki jo opazujemo pod mikroskopom pri majhni povečavi.
3. Poiščemo sliko pri majhni povečavi. V sredini mrežice so s 3 črtami omejeni kvadrati, od katerih je vsak razdeljen v 16 malih kvadratkov. Vsakega od teh kvadratkov omejuje dvojna gravirana črta. Poiščemo sliko pri srednji povečavi.
4. Preštejemo kvasne celice; drobne okrogle celice, ki jih poleg graviranih črt opazimo pod mikroskopom, so kvasovke. Preštejemo jih v več (vsaj 8) malih kvadratih. Štetje začnemo v zgornjem levem malem kvadratu (glejte sliko) in nadaljujemo od leve proti desni.
5. Izračunamo povprečno število kvasovk na kvadratek.
6. Izračunamo število kvasovk v 1 ml suspenzije:

$$\text{Št. kvasovk} = N \cdot 400 \cdot 10 \cdot 1000$$

N = povprečno število kvasov na kvadratek

400 = površina malega kvadrata je 1/400 mm ali 0,0025 mm

10 = višina stolpca suspenzije 0,1 mm

1000 = preračunano za 1 cm ali 1 ml

Če smo razredčili, pomnožimo še s faktorjem razredčitve. Rezultat podamo kot npr. $2,5 \times 10^3$.

Meritve:

Tabela 8:

Kvadrat	Število kvasovk

Rezultat:

Ugotovitev:

UGOTAVLJANJE MIKROORGANIZMOV V MLEKU

PRISOTNOSTI

KOLIFORMNIH

Osnova vaje

Pod koliformnimi mikroorganizmi razumemo gramnegativne črevesne nesporogene bakterije, ki fermentirajo laktozo v 48 urah pri 37 °C in pri tem tvorijo pline in kislino. Najbolj znani rodovi koliformnih mikroorganizmov so *Escherichia*, *Citrobacter* in *Enterobacter*. Pasterizacije ne preživijo. V mlekarstvu so nezaželeni. Kadar se pojavijo v mleku, kaže to na nepravilnosti pri pridobivanju mleka v hlevu ali predelavi mleka v mlekarini.

Pasterizirano mleko in mlečni izdelki ob prodaji ne smejo vsebovati *Escherichiae coli* v 0,1 ml oz. v razredčitvi 10^{-1} .

Za gojišče uporabljamo različna tekoča in trdna gojišča, ki ustrezajo koliformnim bakterijam. Če tekočemu gojišču dodamo znano količino mleka, v katerem so koliformni mikroorganizmi, se po določenem času inkubacije pojavijo znaki, ki kažejo na njihovo prisotnost. Glede na vrsto metode opazujemo tvorbo plina in spremembo barve gojišča.

Uporabljamo standardno tekoče gojišče: briljantno zeleni laktozni žolčni bujon z Durhamovimi cevkami, kjer žolč deluje kot inhibitor vseh mikroorganizmov, razen koliformnih. Durhamove cevke so epruvetke, ki jih obrnjene potopimo v gojišče v epruvetah. Ko gojišče steriliziramo, se cevka napolni z gojiščem in pade na dno. Po cepitvi vzorca se plin, če nastaja, nabira v cevki zgoraj in izpodrine gojišče iz cevke.

Koliformni mikroorganizmi s svojo prisotnostjo povzročijo spremembo barve tekočega gojišča in pojav plina v Durhamovih cevkah. Takrat pravimo, da je kolititer pozitiven. Če se barva ne spremeni in se plin ne pojavi, je kolititer negativen. Več kot 10 % plina v Durhamovi cevki in sprememba barve gojišča pomenita, da je test pozitiven. Manj kot 10 % plina v Durhamovi cevki in nespremenjena barva gojišča kažeta manjšo okužbo ali druge proizvajalce plina.

Naloge:

1. Spoznajte tekoče gojišče v epruveti, in sicer briljantno zeleni laktozni žolčni bujon z Durhamovimi cevkami, ki je bister in zelene barve.
2. Ugotovite, ali so v vzorcu prisotni koliformni mikroorganizmi. Kako jih prepoznamo?
3. Pojasnite, ali vzorec pasteriziranega mleka vsebuje koliformne mikroorganizme.
4. Kateri vzorec mleka je primeren za prodajo?

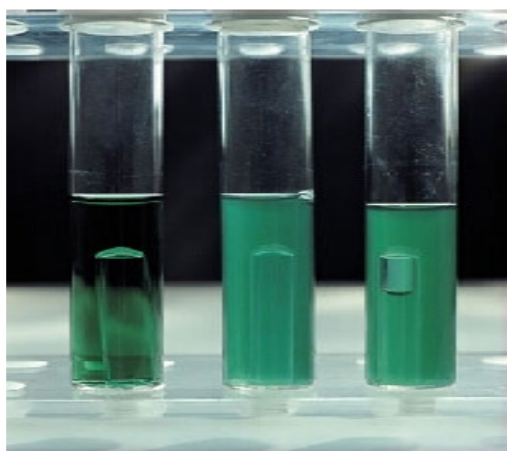
Pribor in material:

- stojalo z epruvetami
- polavtomatske pipete s tipsi
- odlagalnik za tipe
- fiziološka raztopina
- pripravljene epruvete s tekočim gojiščem, z briljantno zelenim laktoznim žolčnim bujonom z Durhamovimi cevkami
- inkubator

Vzorec: surovo in pasteurizirano mleko

Tehnika dela:

1. Označimo epruvete.
2. Eno epruveto označimo kot slepi vzorec za primerjavo in je ne cepimo.
3. Cepimo 1 ml vzorca surovega mleka v 2 epruveti z gojiščem.
4. Cepimo 1 ml vzorca pasteuriziranega mleka v epruveto z gojiščem.
5. Premešamo epruvete tako, da zrak ne pride v Durhamove cevke.
6. Inkubiramo pri 30 °C 24–48 ur.
7. Naslednjič pregledamo epruvete in opazujemo pojav plina v Durhamovih cevkah.



Slika 26: Nacepljene in inkubirane epruvete s tekočim gojiščem, z briljantno zelenim laktoznim žolčnim bujonom z Durhamovimi cevkami

Vir: http://85.238.144.18/analytics/Micro_Manual/TEDISdata/prods/1_05454_0500_5000.html

Rezultati:

Tabela 9:

Vzorec	Pojav plina	Sprememba barve gojišča
Epruveta 1 (surovo mleko)		
Epruveta 2 (surovo mleko)		
Epruveta 3 (pasteurizirano mleko)		
Epruveta 4 (pasteurizirano mleko)		
Epruveta 5 (slepi vzorec)		

Ugotovitve:

Osnova vaje

Po pravilniku o pitni vodi je to voda, ki je namenjena pitju, kuhanju, pripravi hrane ali za druge gospodinjske namene ne glede na njeno poreklo in ne glede na to, ali se dobavlja iz vodovodnega omrežja sistema za oskrbo s pitno vodo, cistern ali kot predpakirana voda, ter vsa voda, ki se uporablja za proizvodnjo in promet živil.

Pitna voda je zdravstveno ustrezna, kadar:

1. ne vsebuje mikroorganizmov, parazitov in njihovih razvojnih oblik v številu, ki lahko predstavlja nevarnost za zdravje ljudi;
2. ne vsebuje snovi v koncentracijah, ki same ali skupaj z drugimi snovmi lahko predstavljajo nevarnost za zdravje ljudi.

V 100 ml pitne vode koliformni mikroorganizmi (*Escherichia coli*, *Enterococcus*) ne smejo biti prisotni. Za določanje koliformnih mikroorganizmov lahko uporabljamo tudi trdna gojišča, in sicer VRB agar, Slanetz-Bartley agar ali Endo agar.

Slanetz-Bartley agar je selektivno gojišče za ugotavljanje enterokokov v pitni vodi in pijačah s pomočjo metode membranske filtracije. Premešan vzorec vode (100 ml) moramo najprej aseptično filtrirati z membransko filtracijo, nato pa s sterilno pinceto filter papir namestimo na petrijevo ploščo z gojiščem ter inkubiramo 48 ur pri temperaturi 37 °C. Po inkubaciji pregledamo gojišče in enterokoke prepoznamo po rdeče-rjavih, rdečih ali rožnatih kolonijah, ki so svetleče in konveksne.

Endo agar je gojišče, ki se obarva brezbarvno ali rahlo rožnato. Kolonije koliformnih mikroorganizmov prepoznamo po svetlo do temnordeči barvi z zelenkasto metaličnim sijajem (*E. coli*). Aldehidi, ki se pojavijo pri presnovi (mikroorganizmi razgradijo mlečni sladkor v kisline in aldehide), obarvajo kolonije in njihovo okolje rdeče. Pri zelo močni tvorbi aldehida se lahko gojišče obarva rdeče.

VRB agar ali vijolično rdeči žolčni agar vedno sveže pripravljamo. Koliformne mikroorganizme (laktoza pozitivne *Enterobacteriaceae*: koliformne bakterije, *Escherichia. coli*) prepoznamo po škrlatno rdečih in okroglih kolonijah, ki so obkrožene z rdečkasto cono oborjenega žolča in imajo premer najmanj 1–2 mm.

Naloge:

1. Pripravite VRB agar po navodilu proizvajalca.
2. Cepite vzorce vode na gojišča.
3. Opazujte membransko filtracijo vode in prenos filtra na gojišče Slanetz-Bartley.
4. Rezultate prikažite v tabeli.
5. Pojasnite, kaj so koliformni mikroorganizmi in kakšen pomen imajo v živilstvu.
6. Ugotovite, kateri vzorci vode vsebujejo koliformne mikroorganizme in utemeljite.
7. Kako prepoznate kolonije koliformnih mikroorganizmov na uporabljenih gojiščih?
8. Utemeljite, kateri vzorci vode ustrezajo pravilniku za pitno vodo.

9. Pojasnite na podlagi zahtev pravilnika, ali je voda iz vodovoda pitna.

Pribor in material:

- petrijevke
- VRBL agar
- ENDO agar
- Slanetz-Bartley agar
- vodna vakuumska črpalka
- polavtomatske pipete in tipsi
- odlagalnik za tipse
- inkubator
- spatula
- alkohol

Vzorec: različni vzorci vode iz rek, jezer, vodnjakov, potokov, kanalov, vodovoda

Tehnika dela:

1. Označimo petrijeve plošče.
2. Pripravimo VRB gojišče.
3. Cepimo 1 ml vzorca na gojišče.
4. Prelijemo z VRB gojiščem in počakamo, da se strdi.
5. Inkubiramo 24 ur pri 30 °C.
6. Opazujemo membransko filtracijo vode s pomočjo vodne črpalke in prenos filtra na gojišče.
7. Naslednjič pregledamo gojišča, zapišemo rezultate in ugotovitve.

Rezultati:

Ugotovitve:

SPREMLJANJE POTEKA ALKOHOLNEGA VRENJA

Osnova vaje

Kvasovke so enocelični evkariontski fakultativno anaerobni organizmi. To pomeni, da kadar imajo na voljo kisik, presnavljajo sladkor (glukoza) z aerobnim celičnim dihanjem. Ko jim kisika zmanjka, sladkor presnavljajo anaerobno z alkoholnim vrenjem.

Alkoholno vrenje je proces, pri katerem kvasne celice prevrevajo glukozo v alkohol in ogljikov dioksid. Vino, pivo, kruh, potica, krofi so živila, ki jih pridobivajo s pomočjo kvasnih celic, ki se hranijo s sladkorjem, prisotnim v surovini ali nastalim z razgradnjo škroba.

Plin CO_2 povzroča vzhajanje testa. Tudi če opazujemo mošt v kozarcu ali steklenici, vidimo izhajajoče mehurčke CO_2 .

Naloge:

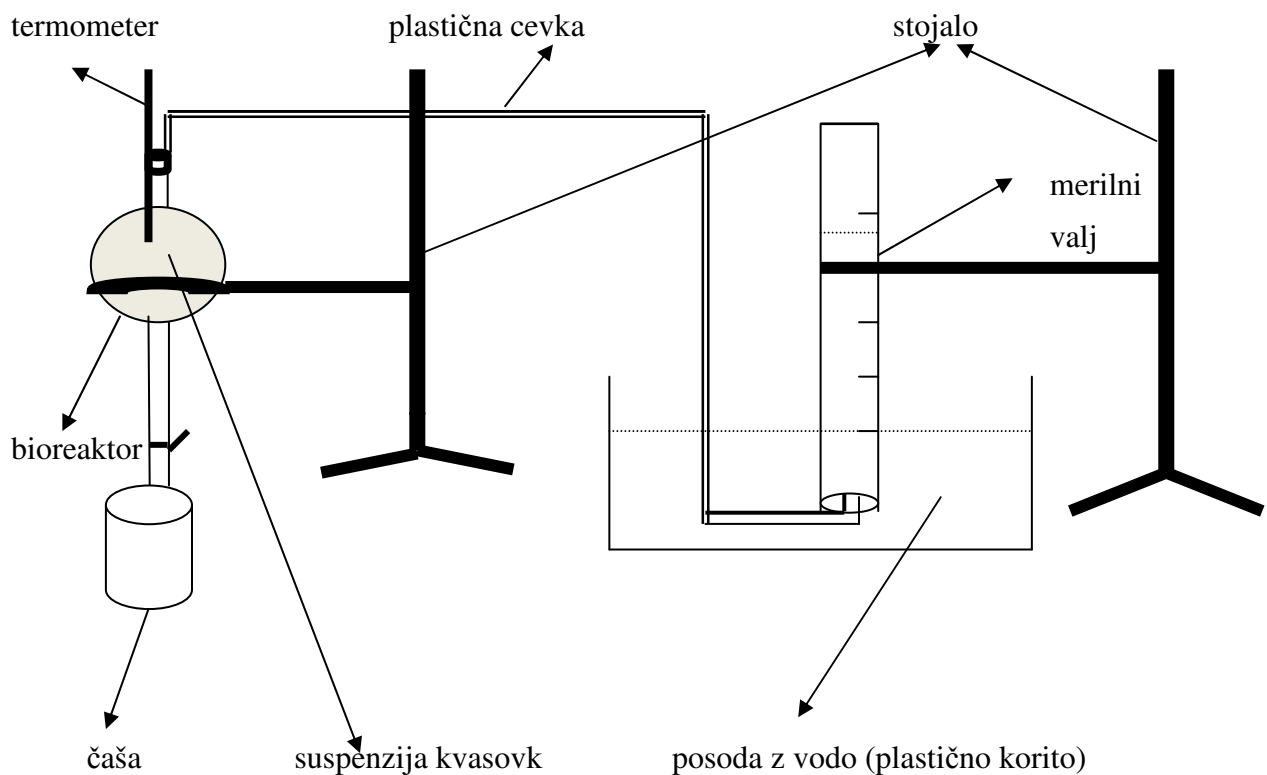
1. Spremljajte in regulirajte bioproces.
2. Kaj predstavlja bioreaktor in čemu služi v našem laboratorijskem poizkusu?
3. Uporabite znanje iz teorije in ugotovite, kateri bioproces se odvija, katere dejavnike spremljamo, kaj je naša biokultura in kaj je naša biomasa.
4. Ugotovite, kaj se dogaja pri alkoholnem vrenju.
5. Spremljajte: število kvasovk, količino glukoze, volumen nastalega CO_2 z merjenjem volumna izpodrinjene vode v merilnem valju v 80 minutah. Merite tudi temperaturo.
6. Zapišite vse meritve in narišite grafe ter zapišite svoje ugotovitve.

Pribor in material:

- termometer
- merilni valj
- lij ločnik
- plastično korito in plastična cevka
- voda, glukoza ali sintetično kompleksno gojišče za kvasovke
- glukoza
- Burkerturkova komora
- mikroskop
- refraktometer
- kvasna suspenzija
- čaše
- 1 ml pipeta ali polavtomatska pipeta s tipsi
- bioreaktor

Tehnika dela:

1. Pripravimo kvasno suspenzijo s sladkorjem, tako da v 300 ml tople vode s $T = 35\text{ }^{\circ}\text{C}$ raztopimo 15 g glukoze in 10 g kvasa.
2. Vsebino zlijemo v bioreaktor.
3. Lij ločnik vstavimo v obroč in ga zapremo z zamaškom, ki ima 2 odprtini: eno za termometer in eno za plastično cevko, ki je napeljana v merilni valj.
4. Pripravimo plastično kadičko, v katero nalijemo vodo.
5. Izmerimo temperaturo. Pripravimo in označimo čaše.
6. Na merilnem valju označimo raven vode.
7. Na začetku poizkusa v čašo izlijemo 20 ml kvasne suspenzije. Po 20 minutah v sterilno čašo ponovno izlijemo 20 ml kvasne suspenzije, nato postopek ponavljamo vsakih 20 minut. Vzorce do naslednjč zamrznemo.
8. V tabelo zapisujemo meritve volumna vode v merilnem valju in temperaturo na začetku, po 20 min, 40 min, 60 min, 80 min itd. Vsakih 5 minut premešamo bioreaktor.
9. Naslednjč vzorce odmrznemo in z Burkerturkovo komoro ugotovimo število kvasovk v 1 ml suspenzije in če je suspenzija pregosta, jo razredčimo (1 ml suspenzije prenesemo v 100 ml bučko in dopolnimo do oznake s fiziološko raztopino – razredčitev 100-krat).
10. Vzorec prefiltriramo in z refraktometrom izmerimo koncentracijo sladkorja v kvasni suspenziji na začetku, po 20 min, 40 min, 60 min, 80 min.
11. Narišemo grafe in zapišemo svoje ugotovitve.



Slika 27: Naprava za spremljanje alkoholnega vrenja

Tabela 10: Merjenje temperature, števila kvasovk in koncentracije glukoze v kvasni suspenziji ter merjenje volumna v merilnem valju

Čas	Temperatura	Število kvasovk	Volumen vode	Koncentracija glukoze
Začetek				
20 min				
40 min				
60 min				
80 min				

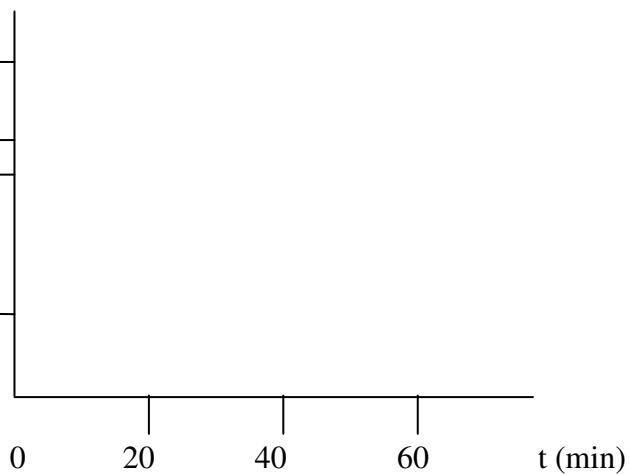
Rezultati:

Rezultate podajte v obliki grafov (glejte spodnji primer). Ne pozabite napisati, kaj graf predstavlja.

Graf 1: Spreminjanje števila kvasovk s časom

skupno število kvasovk

(celice/ml)



Ugotovitve:

SHRANJEVANJE GLIV V ALGINATNIH KROGLICAH

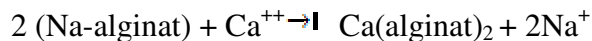
Osnova vaje

Mikroorganizme shranjujemo, ker so lastnosti določenih sevov pomembne za industrijsko uporabo in ker mikrobne kulture potrebujemo v šolskih in raziskovalnih laboratorijih.

Mikroorganizme shranjujemo kot sveže kulture na hranljivih podlagah ali kot trajne kulture, pridobljene z različnimi metodami sušenja, z liofilizacijo, zamrzovanjem, s shranjevanjem na steklenih kroglicah pri $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ in shranjevanjem v tekočem dušiku. Pri tem upoštevamo, da pričnejo mikrobne celice že takoj odmirati, do dodatnih izgub pa pride še kasneje, med samim shranjevanjem. Če želimo čim dlje (lahko več desetletij) ohraniti mikrobne celice, moramo zelo paziti pri pripravi kultur in shranjevanju, pomembno je tudi, da ohranimo kulture čiste.

Pri vaji bomo pripravili svežo in trajno kulturo pekovskih kvasovk in primerjali učinkovitost rasti kvasovk na gojišču po enem mesecu.

Na-alginat je polisaharid, ki ga pridobivajo iz morskih rjavih in zelenih alg. Proces želatinizacije lahko izvajamo s preprosto izmenjavo Na-ionov s Ca-ioni pri sorazmerno enostavnih pogojih:



Ionsko povezana želatinozna struktura je termostabilna pri $0\text{--}100\text{ }^{\circ}\text{C}$. Gel utekočinimo tako, da ga potopimo v raztopino z visoko koncentracijo Na-, K-, ali Mg-soli.

Alginat se uporablja v prehrani, farmacevtskih izdelkih, tekstilni in papirni industriji. V produktih je zgoščevalec, stabilizira, tvori gel in filmske prevleke.

Naloge:

1. Po navodilu pripravite gojišče MEA in nacepite kvasovke.
2. Shranite kvasovke na alginatnih kroglicah.
3. Pojasnite, katero svežo in katero trajno kulturo ste pripravili.
4. Po enem mesecu primerjajte obe kulturi na gojišču v petrijevkah in glede na rast na gojišču ugotovite, katera se je bolje ohranila.
5. S pomočjo literature ali svetovnega spleta pojasnite eno izmed tehnik shranjevanja mikroorganizmov.

Pribor in material:

- kultura kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* (pekovski kvas v suspenziji)
- kolonije pekovskih kvasovk na gojišču
- raztopina 5 % natrijevega alginata z 0,5 % M saharozo
- raztopina 100 mM kalcijevega klorida
- raztopina 0,75 M saharoze
- trdno gojišče MEA (*malt extract agar* ali gojišče z ekstraktom ječmenovega sladu)
- filter papir v petrijevki
- petrijevke
- Pasteurjeve pipete z odrezano konico
- steklenice

- erlenmajerice, čaše
- žličke
- 96 % alkohol za obžiganje

Tehnika dela:

1. Po navodilu pripravite MEA agar in ga po sterilizaciji razlijte v epruvete ter položite na pult tako, da se agar v epruveti strdi poševno.
2. V 2 epruveti s poševnim gojiščem razmažite po eno kolonijo kvasovk.
3. Inkubirajte 48 do 76 ur pri 30 °C.
4. Naslednjič stik med zamaškom in epruveto oblepite s parafilmom, da zmanjšate izsuševanje in shranite v hladilnik (pri 4 °C) za 1 mesec.
5. Celice iz kvasne suspenzije vmešate z ezo v 5 % natrijev alginat z 0,5 M saharozo.
6. Suspenzijo celic kanite v obliki posameznih kapljic (s plastično Pasteurjevo pipeto, ki ima odrezano konico) v čašo s 100 mM CaCl₂ ter oblikovane kroglice inkubirajte v isti raztopini 5 minut.
7. Kroglice prenesite z žličko v infuzijsko steklenico z 0,75 M saharozo in jih inkubirajte 48 ur.
8. Kroglice prenesite z žličko na suh filter papir v petrijevki.
9. Kroglice sušite do 30 % originalne teže na čistem filter papirju v laminariju (hitrost pretoka zraka 0,5 m/s).
10. Izsušene kroglice shranite v petrijevkah pri 5 °C.
11. Po navodilu pripravite MEA agar in po sterilizaciji razlijte v 4 petrijevke.
12. Po enem mesecu revitalizirajte kulturo tako, da kroglice namestite neposredno na trdo gojišče z ječmenovim sladom in kulturo kvasovk s poševnega gojišča nacepite na trdo gojišče z ječmenovim sladom.
13. Kroglice s kulturo *Saccharomyces cerevisiae* inkubirajte 3 dni pri 28 °C, prav tako tudi nacepljena gojišča.
14. Naslednjič pregledajte petrijevke in ugotovite uspešnost metode.

Rezultati:

Ugotovitve:

BIOPROCES – IZDELAVA KISLEGA TESTA V VELIKIH ČAŠAH

Osnova vaje

Pred približno 3.500 leti so stari Egipčani izumili kislo testo. Opazili so, da je testo iz ržene moke vzhajalo in so ga uporabili za peko rahlo pikantnega kruha. Lahko so zamesili veliko testa z uporabo majhne količine kislega testa, zato so ga nekaj vedno shranili za naslednjič.

»Kisanje« ržene moke povzročajo pri fermentaciji dve skupini mikroorganizmov: mlečnokislinske bakterije iz rodov *Lactobacillus* in *Lactococcus*, skupaj s kvasovkami iz rodov *Saccharomyces* in *Kluyveromyces*, ki se nahajajo že na zrnu in tako preidejo v moko.

Kislo testo pripravimo iz ržene moke z dodatkom vode. Mikroorganizmi se pričnejo razmnoževati in uporabljati testo (sestavine) kot hrano. Ponavljajoče dodajanje (nacepljanje) svežega testa s kulturo najprej spodbudi delovanje kvasovk, kasneje pa se pričnejo razmnoževati še mlečnokislinske bakterije. V času razmnoževanja kvasovk narašča volumen in vohamo alkohol. Po tretjem cepljenju že lahko izmerimo pH 4,5. Sedaj testo vsebuje večinoma le mlečnokislinske bakterije.

Naloge:

1. Izdelajte kislo testo iz ržene moke v velikih čašah.
2. Vsak dan izmerite pH testa in rezultate prikažite v tabeli ter utemeljite.
3. Opišite bioproces, ki se je odvijal. Utemeljite pojme biokultura in biomasa v povezavi z izdelavo kislega testa.
4. Pojasnite, ali je testo postalo kislo in kako ste to ugotovili.

Pribor in material:

- alufolija
- 100 ml merilni valj
- 6 velikih čaš 400 ml
- plitka plastična skleda
- lesena žlica
- termometer do 50 °C
- ržena moka tipa 1250
- topla voda 40 °C
- pH lističi 3,5–5,5 pH
- mešanje testa 15 min
- cepljenje 2 x 5minut
- počivanje 3 x 24 ur

Vzorec: ržena moka

Tehnika dela:

1. Prvi dan zmešamo 100 g ržene moka in 100 ml tople vode (40 °C) z žlico. Testo postavimo v čašo in jo prekrijemo z alufolijo. Čašo postavimo na varno mesto pri sobni temperaturi.

Spontana rast bakterij, ki jih vsebuje moka, zahteva dodatek določene količine vode s primerno temperaturo (40 °C) in stalen čas. Stalna vlažnost in temperatura sta prav tako pomembni. Mlečnokislinske bakterije lahko posebej dobro razvijejo svojo aktivnost, ker ržena moka vsebuje zelo malo lepka v primerjavi s pšenično moko. Testo iz pšenične moka fermentira samo, če mu dodamo kvasovke.

2. Drugi dan pripravimo testo po recepturi kot prvi dan in ga postavimo v čašo (testo 2). Zmešamo četrtno testa od prvega dne (testo 1) s 75 g ržene moka in dodamo 75 ml tople vode (40 °C). Postavimo ga v čašo (testo 3). Z alufolijo prekrijemo čaši s testom 2 in 3 ter postavimo na varno mesto.

Testa 1 ne potrebujemo več, zato ga odvržemo v posodo z organskimi odpadki. Izmerimo pH testa.

3. Tretji dan potrebujemo 3 čaše. Po recepturi prvega dne pripravimo sveže testo v čašo (testo 4). Zmešamo 75 g ržene moka, 75 ml tople vode (40 °C) in 50 g testa 2. To testo postavimo v tretjo čašo (testo 6). Vse tri čaše pokrijemo z alufolijo in postavimo na varno mesto.

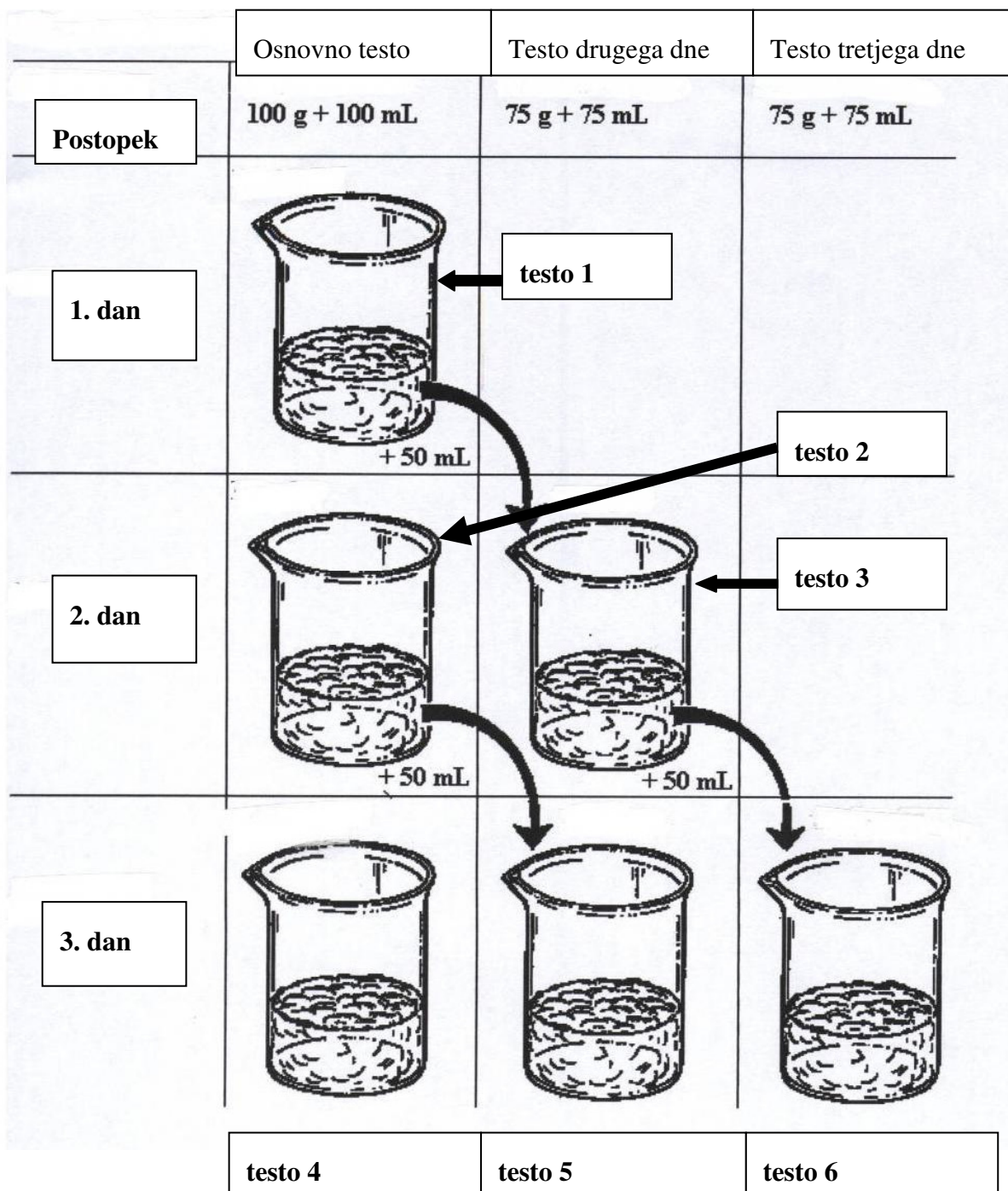
Testa 2 in 3 ne potrebujemo več, zato ju odvržemo v posodo za organske odpadke. Izmerimo pH testa.

4. Sveže testo se stalno pripravlja zato, da je lahko kislo testo različne starosti na voljo za primerjavo tretjega dne.

Voda mora imeti pravo temperaturo, ker testo, ki se pripravlja, zahteva specifično temperaturo za rast kvasovk in mlečnokislinskih bakterij. Testo 5 potrebuje več prostora kot testo 4 in 6, ko pH stalno narašča od testa 4 k testu 6 zaradi aktivnosti kvasovk, ki izločajo CO₂. Rast kvasovk se zmanjša, ko postaja testo bolj kislo. Mlečnokislinske bakterije se hitreje razmnožujejo, ko večkrat cepimo (dodamo staro testo). Izmerimo pH testa.

5. Po treh urah izmerimo volumen testa 4, 5 in 6, ocenimo okus in izmerimo pH s pH lističi.

Meritve:



Slika 28: Izdelava kislega testa v velikih čašah

Vir: <http://www.uq.edu.au/~xxjelfic/UNBiology4.html>

Rezultati:

Ugotovitve:

VIRI IN LITERATURA

Tortora, G. J. in drugi (2007): *Microbiology, an introduction*. 9th edition. San Francisco: Pearson Benjamin Cummings.

Garbutt, J. (1997): *Essentials of Food Microbiology*. London: Arnold.

Eley, A. R. (1996): *Microbial Food Poisoning*. London: Chapman & Hall.

Bem, Z. in drugi (2004): *Mikrobiologija živil živalskega izvora*. Ljubljana: Biotehniška fakulteta.

Orožen Adamič, A., Serneč, K. (2005): *Mikrobiologija – učbenik za farmacevtske in kozmetične tehnike*. Ljubljana: DZS

Kapun-Dolinar, A. (2001): *Mikrobiologija*. Ljubljana: Zavod Republike Slovenije za šolstvo

Torkar, K. (2007): *Živilska mikrobiologija in biotehnologija – vaje*. Ljubljana: Biotehniški izobraževalni center.

UREDBA KOMISIJE (ES) št. 2073/2005 z dne 15. novembra 2005 o mikrobioloških merilih za živila (Besedilo velja za EGP). UL L 338, 22.12.2005, str. 1-26

Janc, M., Rupnik, M.: *Splošna mikrobiologija – Navodila za vaje*. Ljubljana: BTF, interna skripta.

Rupnik, M. in drugi (2001): *Mikrobiologija v srednješolskem laboratoriju*. Tečaj v okviru stalnega strokovnega spopolnjevanja. Ljubljana: BTF, Oddelek za biologijo.

Rupnik, M. in drugi (2002): *Mikrobiološke tehnike*. Tečaj v okviru stalnega strokovnega spopolnjevanja. Ljubljana: BTF, Oddelek za biologijo.

<http://web.bf.uni-lj.si/ag/botanika/gradiva/Mikroskop.pdf>

<http://www.rtv slo.si/znanost-in-tehnologija/foto-in-video-sprehod-po-institutu-jozef-stefan/98339>

www.bfro.uni-lj.si/zoo/studij/dodipl/mikro/momik/.../vaja5.doc

http://www.wolflabs.co.uk/Bunsen_Burners_&_Lab_Jacks.htm

<http://www.studentsguide.in/microbiology/eukarya-eukaryotic-microorganisms/microbiologically-important-moulds.html>

http://www.revija-vino.si/vinoportal/index.php?option=com_content&task=view&id=88&Itemid=110

http://hardydiagnostics.com/catalog2/hugo/BHIAgar_wOther.html

<http://a-s.clayton.edu/furlong/BIOL3250/lab/Review/page/asepticanswer.htm>

<http://www.sumanasinc.com/webcontent/animations/microbiology.html>

<http://www.mansfield.ohio-state.edu/~sabedon/biol4035.htm>

<http://www.cellvision.nl/>

http://85.238.144.18/analytics/Micro_Manual/TEDISdata/prods/1_05454_0500_5000.html

http://www.bf.uni-lj.si/fileadmin/groups/2752/Praktikum_osnove_biotehnologij.pdf

http://www.bf.uni-lj.si/fileadmin/groups/2752/Higiiena_zivil.pdf

<http://www.uq.edu.au/~xxjelfic/UNBiology4.html>