

**Univerza v Mariboru**  
**Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo**

**Maja Habulin, Mateja Primožič, Željko Knez**

***Surovine za bio in prehrambeno industrijo***  
***Navodila za laboratorijske vaje (zbrano gradivo)***

Maribor, 2006

## Navodila za delo v mikrobiološkem laboratoriju

1. V laboratorij vstopamo v zaščitnih haljah. Pri delu uporabljamo zaščitne rokavice.
2. **V laboratoriju ne jemo in ne pijemo!!!** Ker se lahko inficiramo skozi usta, nos, oči in kožo, pri delu ne dajemo ničesar v usta (svinčnik, peresa, steklovina itd.).
3. Z živimi mikrobi delamo previdno in **aseptično** ob plamenu plinskega gorilnika.
4. Pri delu z gorilnikom pazimo, da nam plamen ne ožge kože, las ali halje.
5. Med delom z mikrobi in kužnino so vrata in okna zaprta, da zračni tok ne nosi mikrobov po laboratoriju.
6. Pri delu pazimo, da mikrobni kultur ne polivamo po mizi, po tleh in obleki. Z rokami se ne dotikamo kolonij in suspenzij živih mikrobov. **Če pride kužnina v stik s kožo ali delavno površino, obvestimo asistenta ali tehničnega sodelavca.** Kontaminirano delovno površino pokrijemo s staničevino in jo prelijemo z razkužilom. Razkužilo pustimo delovati najmanj 20 minut. Kontaminirano mesto na telesu ali obleki razkužimo in nato speremo z vodo.
7. Kontaminiran material odlagamo v odlagalnike ali na označeno mesto in ga nato avtoklaviramo.
8. Kovinske predmete, ki pridejo v stik s kužnino (pincete, bakteriološke zanke itd.) sproti ožigamo v plamenu. Ožigamo tudi vratove epruвет, erlenmajeric in steklenic z mikrobi, preden jih odpremo in po uporabi.
9. Po opravljenem delu pospravimo za seboj in razkužimo delovne površine. Prepričamo se, da so dovodi plina do gorilnikov zaprti.
10. Pred in po začetku izvajanja vaj si skrbno umijemo roke z milom. Če je potrebno roke tudi razkužimo.

## Bakterije v mleku

Mleko je zaradi svoje visoke hranilne vrednosti (vsebuje proteine, ogljikove hidrate, maščobe, vitamine, minerale itd.) odlično gojišče, v katerem lahko hitro zrastejo številne bakterije. Mleko se lahko okuži, če so molzne živali bolne. Vzrok za okužbe mleka so lahko tudi ljudje ali oprema, ki ni dovolj čista.

Mleko je lahko vzrok za številne bolezni, če je okuženo s patogenimi mikroorganizmi. Z mlekom se lahko prenašajo različne bolezni, kot so: tuberkuloza, bruceloza, tifus, davica, mrzlica Q ... Mleko takoj po molži, brez vsake zunanje okužbe, ni sterilno, ampak ima svojo naravno mikrofloro, ki vsebuje tudi različne patogene in nepatogene mikroorganizme;

- iz rodu *Staphylococcus*,
- iz rodu *Streptococcus*,
- iz rodu *Lactobacillus*,
- iz rodu *Clostridium*,
- *Bacillus cereus*,
- *E. coli*,
- *Corynebacteria* ...

Mikroorganizmi, ki to naravno mikrofloro sestavljajo, ne preživijo toplotne obdelave (pasterizacije). Zato je vzrok za slabe mikrobiološke slike mleka (veliko prisotnih mikroorganizmov) v okužbi mleka po končani pasterizaciji. Temperatura in čas inkubacije sta izbrana tako, da uničita tudi temperaturno najbolj odporno bakterijo, ki je lahko prisotna v mleku – *Coxiella burnettii* – povzročiteljico mrzlice Q.

## Ugotavljanje velikosti mikrobnih populacij

Poznamo več načinov za določanje števila mikrobnih celic. Pri nekaterih metodah merimo število živih celic, pri drugih pa težo celotne populacije, ki je neposrdno sorazmerna s številom celic. Število celic običajno izražamo kot število celic v 1 ml tekočega vzorca ali v 1 g živila. Večina metod štetja temelji na neposrednem ali posrednem štetju majhnih vzorcev. Velikost celotne bakterijske populacije se nato izračuna.

### 1. Indirektne ali gojitvene metode

a) Štetje na trdnih gojiščih je najpogosteje uporabljena metoda štetja celic. Ta metoda se uporablja predvsem za ugotavljanje števila mikroorganizmov v tekočinah (voda, mleko, itd.) in v materialih, ki jih je mogoče suspendirati v tekočini. Pri tej metodi štejemo žive celice. V preiskovanem materialu je navadno preveč bakterij, da bi jih lahko šteli in je zato treba material ali kulturo najprej redčiti ter primerne razredčine cepiti na plošče hranilnega agarja. Gojitveni pogoji (temperatura, čas inkubacije ter uporabljena gojišča) so odvisni od bakterij, na katere se material preiskuje. Po 24 – 48-urni inkubaciji pri določeni temperaturi (najpogosteje pri 30 °C ali 37 °C) kolonije preštejemo. Običajno štejemo na ploščah, ki imajo od 25 do 300 kolonij.

Število kolonij, ki zrastejo na plošči hranilnega agarja ni zmeraj enako številu bakterij v kulturi. Zato pravimo, da na plošči preštejemo enote, ki tvorijo kolonije (colony forming units, CFU).

*Primer ugotavljanja števila bakterij s štetjem na ploščah:*

Iz vsake od treh epruвет z razredčinami  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  in  $10^{-9}$  smo cepili po 1 ml na vsako od treh plošč. Po inkubaciji smo prešteli naslednje število kolonij:

končna redčenja na ploščah	število kolonij
$10^{-7}$	201, 187, 223
$10^{-8}$	17, 25, 19
$10^{-9}$	3, 2, 1
	$\Sigma = 678$

Izračun povprečnega števila kolonij:

1. način:

Potrebno je izračunati povprečje za vsako razredčino posebej in nato še povprečje vseh razredčin.

$$\text{Za razredčino } 10^{-7}: \frac{\sum \text{kolonij}}{\sum \text{paralelk}} = \frac{620}{3} = 206,66 \cdot 10^7 / \text{ml}$$

$$\text{Za razredčino } 10^{-8}: \frac{\sum \text{kolonij}}{\sum \text{paralelk}} = \frac{61}{3} = 20,33 \cdot 10^8 = 203,33 \cdot 10^7 / \text{ml}$$

$$\text{Za razredčino } 10^{-9}: \frac{\sum \text{kolonij}}{\sum \text{paralelk}} = \frac{6}{3} = 2 \cdot 10^9 = 200 \cdot 10^7 / \text{ml}$$

$$\frac{\sum \text{vseh pop. posamezne razred.}}{\text{št. razred.}} = \frac{206,66 \cdot 10^7 + 203,33 \cdot 10^7 + 200 \cdot 10^7}{3} = 203,32 \cdot 10^7 / \text{ml}$$

2. način:

Če predpostavimo, da so vsa redčenja enakovredna, lahko dodamo številu prešteti kolonij drugega redčenja eno ničlo, številu kolonij tretjega pa dve ničli. Dobljeno vsoto vseh kolonij delimo s številom meritev in dobimo povprečno število kolonij.

Za razredčino  $10^{-7}$ : 201, 187, 223

Za razredčino  $10^{-8}$ : 170, 250, 190

Za razredčino  $10^{-9}$ : 300, 200, 100

$$\frac{\sum \text{vseh kolonij}}{\sum \text{vseh paralelk}} = \frac{(201+187+223) \cdot 10^7 + (170+250+190) \cdot 10^7 + (300+200+100) \cdot 10^7}{9} =$$

$$\frac{\sum \text{vseh kolonij}}{\sum \text{vseh paralelk}} = 192,33 \cdot 10^7 / \text{ml}$$

3. način:

Če predpostavimo, da vsa redčenja niso enakovredna, saj se napaka z vsakim višjim redčenjem veča, pa lahko število CFU ugotavljamo tudi tako, da najbolj razredčenemu vzorcu pripišemo največjo težo. Sešteti je potrebno vse kolonije, ki smo jih prešteli na ploščah agarja in vsoto deliti s številom, ki je odvisno od števila razredčitev in števila paralelk npr. tri

različne razredčine s po dvema paralelkama; N=222 oz. za naš primer; tri redčenja, vsako s tremi paralelkami N=333.

$$\frac{\sum \text{vseh kolonij}}{N} = \frac{678}{333} \cdot 10^9 = 203,6 \cdot 10^7 / \text{ml}$$

b) Metoda najverjetnejšega števila («Most probable number» (MPN))

Ta metoda temelji na opazovanju rasti mikroorganizmov (kot motnosti) in opazovanju metabolne dejavnosti mikroorganizmov (preko indikatorjev v tekočih gojiščih). To je metoda, pri kateri kulturo ali preiskovani vzorec cepimo v serijo tekočih gojišč in glede na število gojišč, v katerih ugotovimo bakterijsko rast z verjetnostnim računom, ugotavljamo približek za število bakterij v vzorcu. Ta metoda se rutinsko uporablja pri ugotavljanju števila koliformnih bakterij v vodi.

## **2. Direktne ali števne metode**

Pri teh metodah štejemo bakterijske celice v vzorcu, kar lahko delamo na mikroskopskih preparatih ali s posebnimi napravami (npr. Coulterjev števec delcev). Za takšno štetje uporabljamo objektne ploščice s števnimi komorami. Na označen kvadrat razmažemo vzorec in ga pokrijemo s krovnim stekelcem. S pomočjo mikroskopa preštujemo število bakterij v kvadratih in izračunamo poprečno število mikroorganizmov v vzorcu.

## **3. Fizikalne in kemijske metode**

- *Turbidimetrija* – merjenje motnosti suspenzije – optična gostota (optical density, OD) s spektrofotometrom. Določena optična gostota ustreza določeni gostoti celic in zato se lahko optična gostota odčita z umeritvene krivulje kot število bakterij na ml.
- *Ugotavljanje suhe ali mokre teže bakterij.*
- *Ugotavljanje skupnega dušika.*
- *Membranska filtracija* – se uporablja za štetje bakterij v bistrih tekočih vzorcih (vodovodna voda, bistri sokovi, vino itd.) ter za štetje koliformnih bakterij, ki so kazalci fekalnih okužb živil in vode.

## **VAJA 1: Ugotavljanje števila bakterij v svežem, pasteriziranem in UHT mleku**

### Material:

- sveže nepasterizirano mleko
- UHT mleko
- 30 plošč hranilnega agarja
- sterilne epruvete
- epruvete z 9 ml fiziološke raztopine
- pipete
- vodna kopel (63 °C)

### Potek vaje:

- V epruveto odpipetirajte 2 – 3 ml svežega mleka. Preostalo mleko postavite v vodno kopel (63 °C) in ga inkubirajte 35 minut.
- Pripravite  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  in  $10^{-6}$  razredčine svežega mleka.
- Na prvih 8 plošč hranilnega agarja napišite temperaturo 37 °C in razredčine  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  in  $10^{-6}$ . Za vsako razredčino pripravite po dve paralelki.
- Na naslednjih 8 plošč napišite enake razredčine in temperaturo 55 °C. Za vsako razredčino pripravite po dve paralelki.
- Na vsako ploščo cepite po 1 ml primerne razredčine mleka.
- Gojišča inkubirajte pri 37 °C ali pri 55 °C.
- Pripravite še  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  in  $10^{-3}$  razredčine pasteriziranega in UHT mleka in cepite po 1 ml ustrezne razredčine na plošče na katere ste predhodno napisali določeno temperaturo in razredčino. Za vsako razredčino pripravite po dve paralelki. Prav tako jih inkubirajte pri določeni temperaturi (pri 37 °C ali pri 55 °C).

### Rezultati in diskusija:

Opišite namen vaje. Po končani inkubaciji preštejte kolonije, ki so zrasle na ploščah in primerjajte število bakterij, ki zrastejo pri eni ali drugi temperaturi ter število bakterij v

surovem, pasteriziranim in UHT mleku. Rezultate prikažite tabelarično. Kakšna je razlika med pasteriziranim in nepasteriziranim mlekom? Zakaj inkubiramo plošče pri dveh različnih temperaturah? Izračunajte velikost bakterijske populacije na ml posameznega mleka na vse tri načine!



---

## Literatura:

- Brzin, B., Budič, S., Gubina, M., Kozak, M., Likar, M., Stropnik, Z., Vozelj, M., Zajc-Satler, J. *Praktikum iz mikrobiologije in parazitologije*. Likar, M. (ur.). Ljubljana : Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo medicinske fakultete v Ljubljani, Ljubljana : Univerza v Ljubljani, 1972.
- Janc, M., Rupnik, M. *Splošna mikrobiologija : navodila za vaje*, (Knjižna zbirka Scripta, Mikrobiologija). Ljubljana : ŠOU, Študentska založba, 1998.
- Süssmuth, R., Eberspächer, J., Haag, R., Springer, W. *Mikrobiologisch-Biochemisches Praktikum*. 2. Auflage, Georg Thieme Verlag : Stuttgart · New York, 1999.
- Bole-Hribovšek, V., Hostnik, P. *Osnove dela v mikrobiološkem laboratoriju, Priročnik za vaje iz mikrobiologije za veterinarje*. Ljubljana : Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta, 1996.
- Kapun-Dolinar, A. *Mikrobiologija*. Kurnik, U. (ur.), Lorenčič, A. (ur.). 1. natis, Zavod RS za šolstvo, Ljubljana, 2001.
- Likar, M. *Mikrobiologija*. 2. izdaja, Dopolna delavska univerza Univerzum Ljubljana, 1979.