

10 RAST MIKROORGANIZMOV IN SPREMLJANJE RASTI

10.1 RAST MIKROORGANIZMOV

Po celični delitvi vsaka hčerinska celica nadaljuje s celično rastjo. Ko doseže ustrezno velikost se ponovno deli in tako se pri ugodnih pogojih rasti na trdnem ali v tekočem gojišču kmalu oblikuje populacija celic.

10.1.1 Rast na trdnem gojišču

Nasledstvo ene same celice, ki je rasla in se delila na trdnem gojišču imenujemo **kolonija** (gruča celic, s prostim očesom viden kupček celic, naselek). Več kolonij na gojišču tvori **kulturo** in če je kultura sestavljena iz kolonij iste vrste mikroorganizmov, je to čista kultura. Pri določenih pogojih rasti je za vsako mikrobovno vrsto značilna morfolologija kolonij. Neprekinjen sloj bakterij, ki enakomerno prerastejo celotno površino trdnega gojišča, imenujemo **konfluentna rast**. Konfluentno rast imajo običajno tiste vrste bakterij, ki se lahko gibljejo po površini agarske plošče.

10.1.2 Rast v tekočem gojišču

V tekočem gojišču se mikrobovne celice običajno enakomerno porazdelijo v gojišču, kot posledica difuzije ali aktivnega gibanja mikrobov. S povečevanjem koncentracije celic se povečuje motnost oz. turbidnost gojišča. Povečevanje celične mase lahko zasledujemo s turbidimetrijo, metodo, ki izkorišča lastnost bakterijske kulture, da deluje kot koloidna raztopina. V spektrofotometru obsevamo kulturo s svetlobo izbrane valovne dolžine (običajno 654 nm) in merimo količino absorbirane svetlobe. Nefelometrija je sorodna metoda pri kateri merimo količino sipane svetlobe. Obe metodi sta zelo enostavni, hitri in neinvazivni, vendar jih ne moremo uporabljati pri kulturah bakterij, ki tvorijo pelet ali imajo izkosmičeno rast.

10.1.2.1 Saržna kultura (batch culture)

Če po inokulaciji tekočega gojišča zasledujemo povečevanje števila celic oz. povečevanje celične mase v določenih časovnih intervalih dobimo v takem zaprtem sistemu **rastno krivuljo**. Rastna krivulja je značilna za določen sev in za določene pogoje kultivacije. Če npr. spremenimo gojišče ali temperaturo inkubacije, dobimo drugačno rastno krivuljo. Rastna krivulja je razdeljena na štiri faze: adaptivna, logaritemska, stacionarna in faza odmiranja.

Takoj po inokulaciji bakterij v gojišče se običajno celična delitev ne prične takoj - to začetno obdobje, kjer ni nobene celične delitve ali pa so te zelo redke, imenujemo **lag faza (adaptivna faza, faza prilagajanja)**. Med lag fazo se celice prilagajajo na novo okolje (npr. s sintezo encimov za uporabo na novo razpoložljivih hranil). Dolžina lag faze je največkrat odvisna od pogojev, v katerih so bile celice pred vnosom v sveže gojišče in če bili ti zelo podobni je običajno skoraj neopazna. Med lag fazo sicer teče sinteza celičnih komponent, vendar vzporedno s povečevanjem skupne celične mase ne prihaja do delitve celic (neuravnotežena rast).

Ko se celice prilagodijo na nove pogoje, začno rasti in se vse hitreje deliti, pri čemer določajo hitrost rastni pogoji. To je **logaritemska (log) ali eksponencialna faza** rasti. V tej fazi se celično število in masa populacije podvajata s konstantno hitrostjo (uravnotežena rast). Na diagramu rasti v preprosti aritmetični skali v tej fazi dobimo strmo vzpenjajočo se krivuljo. Lahko pa porast števila celic vnašamo v skalo kot dvojiški ali desetiški logaritem. V grafu z

nanešenimi dvojiškimi logaritmi števila celic vsaka enota na \log_2 skali predstavlja **podvojevalni čas ali generacijski čas** (čas, ki je potreben za podvojitev števila celic). Če na absciso nanašamo število celic, običajno uporabljamo skalo \log_{10} .

Z rastjo celice porabljajo hranila in izločajo odpadne snovi v gojišče. Zato se rast upočasni in preide v fazo, ko se število živih celic ne povečuje - **stacionarna faza**. Ta faza lahko traja tudi več dni. V tej fazi se celične funkcije nadaljujejo, tvorijo se sekundarni metaboliti (antibiotiki, toksini) in sproži se sporulacija. V tem času nastopi lahko fenomen prikrite rasti, ko se nekatere celice sicer delijo, vendar jih enako število odmr. Običajno stacionarni fazi sledi **faza odmiranja**, kjer se število živih celic v populaciji progresivno zmanjšuje.

Med različnimi fazami rasti so mikrobne celice lahko podvržene velikim spremembam njihove osnovne biologije in metabolizma. Na primer mikrobne celice, ki jih penicilin običajno "ubije" med rastjo, so rezistentne na ta antibiotik, ko rast preneha.

10.1.2.2 Kontinuirna kultura

Če bakterije rastejo v omejenem volumnu tekočega medija (saržna kultura), se sestava medija kontinuirano spreminja - hranila se porabljajo, odpadni produkti pa kopičijo. V kontinuirni kulturi mikrobi rastejo v konstantnih, kontroliranih in definiranih pogojih. Mikrobi v tem primeru rastejo v tekočem mediju znotraj naprave, ki jo imenujemo **kemostat**. Pri tem v posodo kemostata kontinuirno dodajamo sveže, sterilno gojišče in odvezemamo istočasno enak volumen (pri isti hitrosti) kulture (gojišče + celice). Kulturo stalno mešamo, da se sveže gojišče hitro vmeša vanjo in skrbimo, da se število celic v posodi ne spreminja. Hitrost rasti kontroliramo s koncentracijo nekega esencialnega hranila v gojišču, ki priteka v kemostat. V takih pogojih celice kažejo kontinuirano logaritemsko rast (uravnovežena rast). Celice v kemostatu rastejo s submaksimalno hitrostjo, pri maksimalni hitrosti namreč pride do nestabilnosti sistema. Za stanje, ko je rast števila celic natančno izravnano z izplavljanjem celic iz kemostata pravimo da je uravnoveženo (steady state). Masa celic v kemostatu (**biomasa**) torej ostaja konstantna. Tak način gojenja mikroorganizmov je npr. primeren za študij bakterijskega metabolizma.

10.1.3 Diauksična rast

Če je določeni vrsti bakterij na razpolago mešanica dveh različnih ogljikovih virov, uporabljajo en vir ogljika preferenčno pred drugim. Drugega začno uporabljati šele, ko prvega izčrpajo. *Escherichia coli*, ki ima na razpolago glukozo in laktozo, bo laktozo začela uporabljati šele, ko bo glukozo porabila. Med prehodom iz enega hranila na drugo se rast lahko upočasni ali celo ustavi. Ta način rasti imenujemo **diauksična rast** in je na grafikonu razpoznavna po lomljenem ali dvostopenjskem poteku krivulje. Diauksično rast imajo samo nekatere vrste bakterij.

10.2 MERJENJE IN SPREMLJANJE RASTI MIKROORGANIZMOV

Metode za merjenje in spremljanje rasti razdelimo na tri skupine:

1. Indirektne ali gojitvene metode:

- na razliti plošči (spread plate)
- v razliti plošči (pour plate)
- nakapljana ploščica (drop plate)

2. Direktne ali števne metode

- določitev skupnega števila celic
- določitev deleža viabilnosti

3. Fizikalne in kemijske metode:

- turbidimetrija in nefelometrija
- določanje povečanja suhe ali organske snovi
- spremljanje porabe (npr. substrata) ali sproščanja določene snovi (nekega značilnega produkta)
- merjenje količine izbrane radioaktivne snovi, ki se je vgradila v biomaso v določenem času
- merjenje količine DNA ali RNA
- merjenje količine proteinov ali dušika
- merjenje skupnega ogljika

10.2.1 Štetje mikroorganizmov

Število mikroorganizmov, ki jih preštujemo v vzorcu (živečih in mrtvih) preprosto imenujemo skupno število mikroorganizmov. S posebnimi metodami vitalnega barvanja lahko določimo število živih mikroorganizmov v vzorcu. Število mikroorganizmov običajno izrazimo kot število celic na mililiter vzorca.

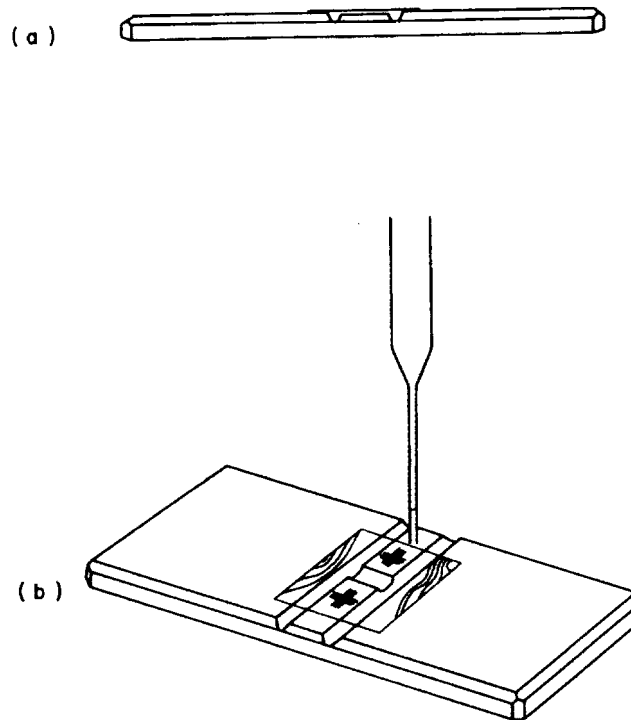
10.2.1.1 Določanje skupnega števila mikroorganizmov

Skupno število mikroorganizmov v tekočem vzorcu (npr. v mikrobnii kulturi) lahko ocenimo z direktnim štetjem celic v števni komorici. Tipična števna komorica je npr. hemocitometer. To je steklena ploščica z 2 osrednjima ploščadma, ki sta natančno 0,1 mm pod nivojem ravnine stranskih grebenov. Obstajajo različni tipi hemocitometrov in primarno so namenjeni za štetje krvnih celic (Neubauer, Thoma, Bürker...). Za štetje bakterij se uporabljajo posebne števne komore (Petroff-Hauser, Helber), pri katerih je ta višina 0,02 mm.

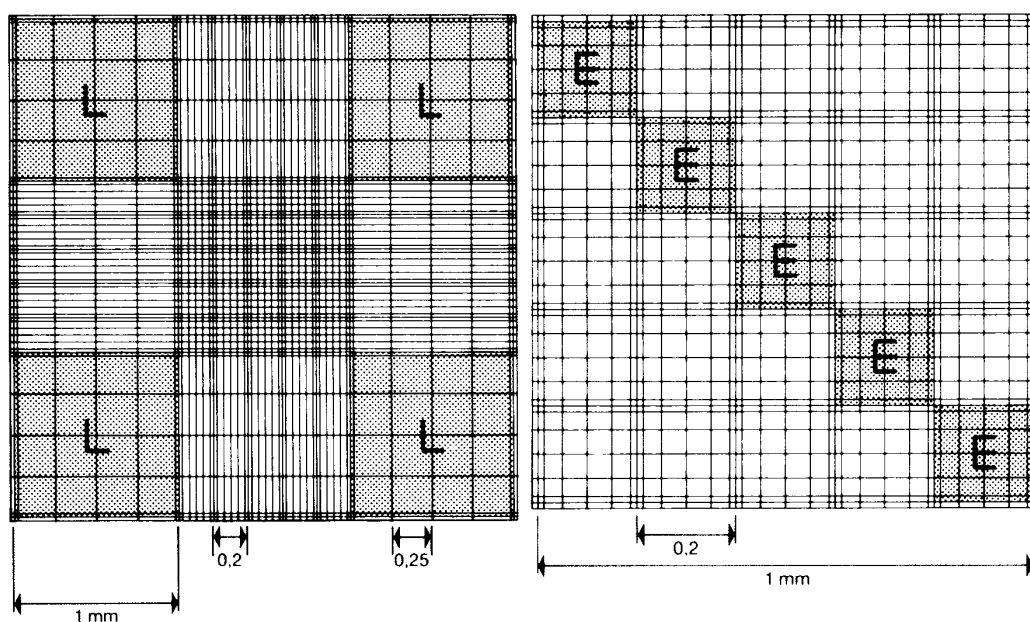
Vsaka sredinska ploščad ima natančno vgravirano mrežico s standardizirano velikostjo kvadratkov. Števno komoro pripravimo tako, da najprej rahlo navlažimo stranske grebene, nanju pritismo poseben krovnik, da pokrijemo obe mreži. Pri tem pazimo, da ne pritiskamo na osrednji del, ker lahko zlomimo krovnik. Pri pravilno nameščenem krovniku se pokažejo mavrični Newtonovi krogi. Primerno redčen vzorec za štetje potegnemo s kapilarnim tokom v Pasterjevo pipeto do višine 1 cm, konico pipete potem prislonimo na centralno površino, tik ob krovnik in kapilarni tok sam potegne vsebino v števni prostor. Potreben volumen za pravilno napolnjeno komoro je približno 10 μ l. Pri polnjenju moramo paziti, da je števna ploščad napolnjena do robov in da se vzorec ne preliva v sosednjo komoro ali na stranske grebene. Napolnjeno števno komorico pustimo stati par minut, da se celice usedejo. Pozorni moramo biti, da se komora ne posuši, ker štetje potem ni zanesljivo. Pod mikroskopom se najprej pod 100x povečavo orientiramo po mrežici, ki jo lažje najdemo z bolj zaprto zaslonko. Štejemo

pod 400x povečavo mikroskopa, ko vidno polje zapolnjuje 1 E kvadrata. Pri štetju upoštevamo pravila štetja. Ker natančno poznamo volumen 1 kvadratka, lahko po štetju izračunamo število celic na ml.

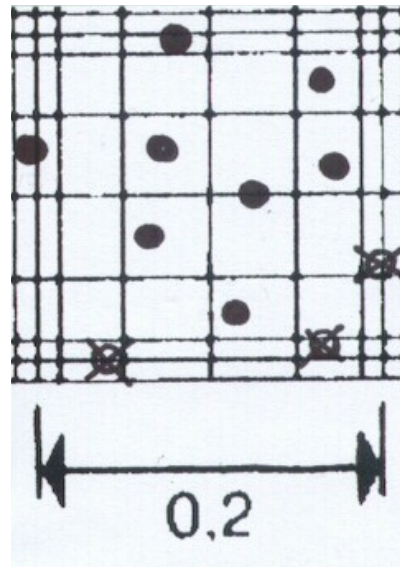
Po uporabi števno komoro speremo z destilirano vodo in rahlo osušimo s staničevino. Ne uporabljamo detergentov ali grobih predmetov, ker lahko uničimo mrežico. Krovnika ne zavržemo!



Slika 10: Števna komora s strani (a) in priprava vzorca za štetje (b)



Slika 11: Mrežica Neubauerjeve števne komorice (levo) s povečanim osrednjim kvadratom (desno). Večji L kvadrati so namenjeni za štetje levkocitov, manjši E kvadratki pa za štetje eritrocitov. Preštujemo celice v 5 E kvadratkih v diagonali in šteje ponovimo še 2-krat v novo pripravljenih števni komorah. Iz 15 E kvadratkov dobimo povprečje na 1 kvadrata, volumen 1 E kvadratka je $0,2 \times 0,2 \times 0,1$ mm, dobimo število celic na ml in upoštevamo se redčitev.



Slika 12: Strategija štetja celic s pomočjo števne komore. Na sliki je 1 E kvadrata s površino $0,04 \text{ mm}^2$. Štejemo vse celice, ki so znotraj kvadratka do srednjega od 3 robov. Celice, ki se dotikajo robov ali so na robu, upoštevamo tiste, ki so v stiku z zgornjim in levim robom, ne upoštevamo pa tistih, ki so v stiku z desnim in spodnjim robom. Tako se izognemo subjektivnemu vplivu na število celic. Zanesljive rezultate dobimo, če imamo v 1 E kvadratu 5 do 15 celic, drugače si pripravimo ustrezne redčitve.

10.2.1.2. Določanje števila živih mikroorganizmov

10.2.1.2.1 Vitalno barvanje

Ta način določanja števila živih mikroorganizmov temelji na dejstvu, da določena barvila v mrtve celice prodirajo, v žive pa ne. Tripan modro je eno od barvil, s katerim razlikujemo žive in mrtve celice. Za vitalno barvanje uporabljamo 0,4 % raztopino tega barvila. V epici zmešamo 0,5 mL raztopine tripana, 0,3 mL fiziološke raztopine in 0,2 mL ustrezne redčitve kulture. Barvamo 5 do 15 minut. Preden napolnimo števno komoro, mešanico dobro premešamo in pod mikroskopom določimo delež viabilnosti. Mrtve celice se obarvajo temno modro, medtem ko žive ostanejo nepobarvane. Paziti moramo, da ne barvamo več kot 15 minut (sem se šteje tudi čas mikroskopiranja), ker po tem času začne barvilo prodirati tudi v žive celice.

10.2.1.2.2 Gojivne tehnike (indirektne števne metode)

Pri večini metod za določanje števila živih celic inokuliramo trdno gojišče z vzorcem ali njegovo razredčino. Po inkubaciji lahko določimo število celic iz števila kolonij, ki zrastejo na ali v mediju. Pri čemer seveda predpostavljamo, da zraste ena kolonija iz ene žive celice. Število celic, ki dejansko zrastejo v kolonije pa je vsaj delno odvisno od uporabljenega medija

in inkubacijskih pogojev. Običajno namesto števila celic pri uporabi teh metod uporabljamo enoto **CFU (colony forming units)**, saj ni nujno, da vse celice tvorijo kolonije in da kolonija vedno zraste iz ene same celice.

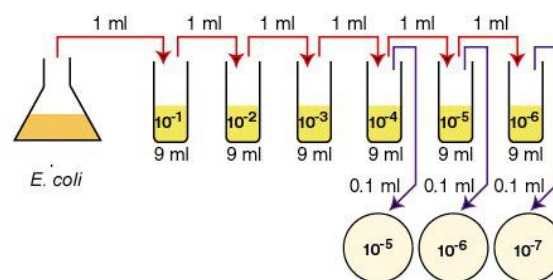
Pri gojitvenih tehnikah štetja mikroorganizmov poznamo več metod. Najbolj uporabljane so naslednje tri:

- **štetje na razliti plošči** (spread plate)
- **štetje v razliti plošči** (pour plate)
- **štetje na nakapljani plošči** (drop plate)

Pri **metodi štetja na razliti plošči** vcepek volumna od 50 do 100 μL razmažemo na površino sterilne agarske plošče s pomočjo steklene palčke ali hokejke. Plošče inkubiramo, da zrastejo kolonije. Število živih mikrobnih celic izračunamo iz števila zraslih kolonij, volumna uporabljenega inokuluma in stopnje redčitve inokuluma. Plošče premera 10 cm so števne, če zraste na njih od 30 do 300 kolonij, zato si moramo pripraviti več redčitev osnovne kulture.

Pri **metodi štetja v razliti plošči** inokulum volumna 1 mL odpipetiramo v prazno petrijevko in prelijemo z ohlajenim agarskim gojiščem (45°C). Ploščo nežno krožno premešamo, da se celice enakomerno porazdelijo. Po strditvi gojišča inkubiramo in preštejemo kolonije. Metoda je bolj primerna za štetje fakultativnih anaerobov, medtem ko je metoda na razliti plošči bolj uporabljana za štetje obligatnih aerobov.

Pri **metodi nakapljane plošče** najprej napravimo redčitveno vrsto vzorca (do 10^{-6}). Na sterilno agarsko ploščo nanese po eno kapljico znanega volumna (10 μL) vsake redčitve. Inkubiramo dokler se ne pojavi vidna rast. Vsaka kapljica, ki je vsebovala manj kot 15 živih celic, bo dala števno število kolonij na plošči. Iz poznanega volumna inokuluma, redčitvene stopnje in števila kolonij izračunamo število živih celic v vzorcu.



Slika 13: Redčitvena vrsta

10.2.2 Določitev celične mase

10.2.2.1 Določitev suhe in organske snovi mikrobnih celic

Pri določitvi suhe in organske snovi v mikrobnih biomasi, je vzorce predhodno potrebno filtrirati (brezpepelni filtri) ali pa centrifugirati, da odstranimo suho oz. organsko snov gojišča. Za določitev suhe snovi vzorce (predhodno tudi filtre) sušimo do konstantne teže pri 105°C, za določitev organske snovi pa vzorce potem še žarimo do konstantne teže pri 550°C. Organsko snov izračunamo iz razlike teže suhe snovi in teže pepela, ki ostane po žaritvi na 550°C.

10.2.2.2 Določitev proteinov mikrobne kulture z metodo po Lowryju

Princip metode: celične proteine hidroliziramo v alkalni raztopini, dodamo reagente po Lowryju, merimo absorpcijo in določimo koncentracijo proteinov v vzorcu. V ta namen pripravimo umeritveno krivuljo z različnimi koncentracijami BSA (govejega serumskega albumina).

Umeritvena krivulja:

iz osnovne raztopine BSA 0,4 mg/mL si pripravimo naslednje redčitve (v paralelkah!)

- **0.00 mg/mL** 200µL vode (naredi 3x, še za referenco)
- **0.08 mg/mL** 160µL vode + 40µL osn. razt. BSA
- **0.16 mg/mL** 120µL vode + 80µL osn. razt. BSA
- **0.24 mg/mL** 80µL vode + 120µL osn. razt. BSA
- **0.32 mg/mL** 40µL vode + 160µL osn. razt. BSA
- **0.40 mg/mL** 200µL osn. razt. BSA

V vsako ependorfko dodaj še po 200µL 1M NaOH.

Alkalna hidroliza vzorca:

- delamo v paralelkah
- pripravimo si ustrezne redčitve vzorcev (neredčen vzorec in redčitve 1: 10, 1: 20, 1: 50)
- 200µL vzorca zmešamo z 200µL 1M NaOH
- ependorfko dobro zapremo in kuhamo na 100°C 5 min
- ohladimo

Reagenti:

- **LOWRY A** = 5% Na₂CO₃
- **LOWRY B** = 1% NaK-tartrat + 0.5% CuSO₄·5H₂O, pH = 7
- **MEŠANICA OD** = LOWRY A : LOWRY B = 50 : 1 (pripravi 50 mL za celo skupino)
- **FOLIN CIOCALTEU** reagent = tik pred uporabo ga razredčimo z destilirano vodo v razmerju 1 : 2 (en del Folina in en del vode; pripravi 10 mL za celo skupino)

Izvedba testa:

v pripravljene standardne raztopine BSA in ohlajene vzorce dodamo:

- po 1000 µL mešanice OD
- ! po 200 µL razredčenega Folin Ciocalteu reagenta in TAKOJ premešaj na vortexu

Razvoj barve poteka 30 minut in je stabilna do 1 ure. Absorbanco merimo na spektrofotometru pri 700 nm v plastičnih kivetah. Koncentracije izračuna spektrofotometer na osnovi umeritvene krivulje.

10.3 NALOGE

10.3.1 Skupno število mikroorganizmov - direktno štetje v števni komori

Pripravite redčitveno vrsto kulture kvasovk v fiziološki raztopini (do 10⁻⁵) in poiščite ustrezno redčitev, da dobite 5-15 celic na 1 E kvadrata. Po 2 študenta skupaj naredita eno meritev (preštejeta 3-krat po 5 kvadratkov) in preračunate število celic na mL v osnovni kulturi.

10.3.2 Vitalno barvanje

V isti kulturi kvasovk določite še delež viabilnosti, vendar vzemite manj redčeno kulturo, ker jo z barvilom še dodatno redčite.

10.3.3 Štetje laktobacilov na nakapljani plošči

Pripravite 2 redčitveni vrsti na skupino do 10^{-6} (označite I, II) kulture *Lactobacillus acidophilus*. Pripravite 250 mL MRS agarja za celo skupino (66,2 g/L) in ga avtoklavirajte. Razlijte plošče, posušite in vsak študent dobi 1 ploščo. Razdelite jo na 6 delov in označite. Na sredino odpipetirate 10 μ L neredčene kulture in potem v vsak razdelek redčitve od 10^{-1} do 10^{-6} . Vsako redčitev še enkrat dobro premešajte in pazite, da se vam posamezne kapljice ne zlijejo med seboj. Pustite ploščo stati na delovnem pultu vsaj 30 minut, da se kultura dobro vpije in ne razlija. Zložite plošče v anaerobni lonček, ga pripravite in inkubirajte pri 37°C. Na naslednjih vajah poiščite števno redčitev (manj kot 15 kolonij) in izračunajte število CFU na mL v osnovni kulturi.

10.3.4 Določanje skupnega števila mikroorganizmov v mleku - štetje v razliti plošči

Za celo skupino pripravite 1 redčitveno vrsto surovega mleka do 10^{-5} . Pripravite 200 mL agarskega gojišča z mlekom v prahu v sestavi:

- 5 g/L peptona
- 2,5 g/L kvasnega ekstrakta
- 1 g/L glukoze
- 15 g/L agarja
- 1 g/L mleka v prahu

in ga avtoklavirajte. Vzamete redčitve od 10^{-2} do 10^{-5} in odpipetirate po 1 mL v prazne petrijevke. Predhodno jih označite z redčitvami in sicer po 2 petrijevki za redčitvi 10^{-2} in 10^{-5} , ter po 3 za redčitvi 10^{-3} in 10^{-4} . Na kulture nalijte ohlajeno agarsko gojišče in nežno horizontalno premešate. Kulturo odpipetirate samo par minut pred nalitjem agarskega gojišča, ker se vam drugače celice primejo na posodo oz. se izsušijo. Posušite plošče in jih inkubirate pri 30°C. Pri naslednjih vajah določite števno redčitev (30-300 kolonij na ploščo) in izračunate število CFU na ml mleka.

10.3.5 Štetje mikroorganizmov na razliti plošči

Pripravite redčitev kulture *E. coli* do 10^{-9} (za celo skupino 1 redčitvena vrsta). Vzamete redčitve od 10^{-4} do 10^{-9} in od vsake prenesete po 100 μ L na površino hranilnega agarja. Redčitvi 10^{-4} in 10^{-9} nanese na 1 ploščo, vse ostale pa na 2 plošči. Redčitev razmažete s hokejko po celi površini plošče. Inkubirate pri 37°C. Na naslednjih vajah ugotovite katera redčitev je števna in izračunajte število CFU na ml osnovne kulture.

10.3.6 Rastna krivulja

Izdelali boste rastno krivuljo kulture *E. coli* sev JM109 v LB bujonu. Gojili jo boste pri 37°C in merili na vsake 30 minut. Pri prvi rastni krivulji bo *E. coli* inkubirana v vodni kopeli in sicer bomo nacepili 100 μ L čez noč zrasle kulture v 10 mL LB bujona v Bellco epruveti. Vsake pol ure boste s spektrofotometrom odčitali optično gostoto pri 654 nm (OD_{654}), ki je merilo za turbidnost. Pred vsako meritvijo umerimo spektrofotometer (s sterilnim gojiščem ga postavimo v ničelni položaj). Iz zbranih podatkov narišite rastno krivuljo.

Pri drugi rastni krivulji bomo *E. coli* inkubirali v stresalniku pri 150 obr/min. Nacepili bomo 100 μ L čez noč zrasle kulture v 100 mL LB bujona v erlenmajerici, ki omogoča boljšo oksigenacijo gojišča med mešanjem. Vsake pol ure boste odvzeli po 1 ml vzorca (aseptično!) v plastično kiveto in pomerili OD₆₅₄ na spektrofotometru. Hkrati boste pripravili tudi 1 mL sterilnega gojišča v kiveti, ki bo služil kot referenca. Podatke pridobite še od predhodne ali naslednje skupine in izrišite celotno rastno krivuljo.

10.3.7 Določanje celične biomase - proteini po Lowryju

Razdelili se boste v tri skupine, od katerih bo ena izdelala umeritveno krivuljo, ostali dve pa vzorce mikrobnih kultur.