

Mikrobiologija vaje

a) Aseptično delo:

- z vsemi mikrobi postopamo kot da so zdravju škodljivi
- razkuževanje rok (pred in po delu) in opreme, pipetiranje prepovedano
- aseptično z mikrobi ob plamenu, da ne okužimo gojišč z mikrobi iz okolja ali laboratorija z delovnimi mikrobi
- prepovedano početi karkoli kar bi privedlo do nastanka aerosolov
- sortiranje in avtoklaviranje (steriliziramo) smeti
- razlitje razkužiti (stančevina, 30' razkužilo)

b) Vaje

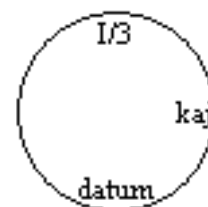
0) Analiza

a) Obogatitveni krvni agar

analiza kašelj, sušilnik, lasišče, prst

b) MO analize

- zrak 2x na PA (30°C)
- neživa/živa narava 2x ŠA (30°C)
- aerobno/anaerobno zemlja ATA (0'01% Tween, 30°C)
- voda ŠA (50ml-filter, 37°C)



1) Mikrobiološka gojišča

a) Teorija

Nacepiti ali inokulirati, nacepek/nacepljena vrsta ali inokulum.

Gojišča- za rast, shranjevanje ali transport mikroorganizmov (sterilizirana-uničiti vse žive celice). Gojišče dovolj zadosti potrebo po viru E, osnovnih gradbenih elementih (ni sam sposoben sintetizirati ali pa so končni acetroji elektronov)

Metabolni procesi

- katabolični (pretvorba E, dobljene iz različnih virov kot je ATP)
- anabolični (kemijsko vezna E se načrtno uporabi za sintezo lastnih substanc iz gradbenih elementov iz gojišča ali same celice)

Mikroorganizmi

- fototrofi (svetloba)	- avtotrofi (vir C je CO ₂ , sposobni rasti ob odsotnosti organ. snovi, sposobni sintetizirati organske snovi iz nežive anorganske)
- kemotrofi (kemijske substance) <ul style="list-style-type: none">- kemoorganotrofi (organske)- kemolitotrofi (prokarionti E iz nekaterih anorganskih substanc)	- heterotrofi (vir C je organski-sladkor)
- aerobi (končni acceptor elektronov je kisik)	
- anaerobi (končni acceptor so drugi substrati)	

Za rast **hranilne substance** v anorganski/organski obliki CHNOPS in elemente v sledih Mg, Mn, Fe, K, Na, Mo, Co, Zn, Cu... Potrebujemo tudi kompleksnejše molekule kot vitamini, rastni faktorji...

Agar je težko razgradljiv polisaharid iz morskih alg, dodamo ga v koncentraciji 1-1'5%. Agar s pH= >5 naravnamo po sterilizaciji preden se agar strdi.

Sestava gojišč

vir	anorganska oblika	organska oblika
C	CO ₂ , HCO ₃	glukoza, saharoza, acetat...
H	H ₂ O in ostale molekule	
N	NH ₄ Cl, NaNO ₃ , N ₂	AK, proteinski ekstrakti...
O	kisik iz zrak	
P	NaHPO ₄ , KH ₂ PO ₄	fosforilirani proteini, ADP...
S	H ₂ S, MgSO ₄ , cys, met	
makroelementi	klorove in kalijeve soli	
elementi v sledih	klorove in natrijeve soli	

Gojišča

Delimo na naravna (mleko, sokovi, sir) in umetna ...

minimalno MG	je definirano, vsebuje najnujnejše za rast nezahtevnih heterotrofov. C je saharid (mono-, di-), ostalo v anorganski soli.
kompleksno KG	boljša rast nezahtevnih mikroorganizmov in zahtevnih heterotrofov. Peptonsko gojišče, mesni bujon, pivinsko gojišče, LB medij, številni agar.
selektivno	omogočajo hitrejšo rast določene vrste mikroorganizma pred drugimi . McConkeyev bujon (endobakterije), celulozno (sinteza celuloze), antibiotično (rezistentni sevi z genom za rezistenco)
bogatitveno	določena vrsta preraste ostale v inokulumu (pospeševanje rasti zelene, zaviranje ostalih). Dušikfiksirajoče bakterije v gojišču ni N.
diferencialno	ločevanje mikroorganizmov, določenih sevov glede na določene lastnosti (različne oblike rasti bakterij - glede na lastnosti)
produkcijsko	mikroorganizme prisilijo v sintezo zelenega produkta. A.niger rabi sladkor (15-25%), pH=2'5 in brez Mn ²⁺ , da proizvede citronsko k.
obogateno	dodamo nekaj gojišču, krvni agar je tak.

Kultura je vse kar zraste na gojišču, delimo na mešane (primarna, kontaminirana) in čiste (direktna-izoliramo celico, indirektna-iz razmaza izbereš skupek). **Kolonija** so vse potomke ene celice. **Celična linija** je neskončno nacepljanje 'nesmrtnih' celic. **Neoplazemske celične linije**- celice transformirane z tumorskimi virusi/kemikalijami in povzročajo v drugih organizmih raka. Encim **tripsin** odlepi celice od podlage.

Sterilizacija

-temperaturna	- avtoklav (121 °C) za bakterijske spore, tekočine ne zavrejo, steklovina, sterilizacija gojišč za uporabo (pred vlivanjem) - tindalizacija (segrevanje 3x na 100 °C) za substrate, ki ne prenesejo avtoklava, 1. unižimo mezofile, 2. kalitev spor termofilov in bakterij - suha vročina (160 °C) za steklovino in lab. orodje, ki ga nesmemo vlažiti, uniči RNA - obžiganje (hlajenje v 70% alkoholu) za prenašalno orodje (cepilne zanke)
- s filtracijo	(membranski filtri pod 0'5µm, vata-plastni filter) za sterilizacijo raztopin z temperaturno neobstojnimi substancami, ne zadržuje virusov, filter zraka
- z dezinfekcijskimi sredstvi	(ne uničijo spor) za razkuževanje površine in rok
- germicidna UV-luč	za sterilizacijo zraka in večje delovne površine

b) vaja

priprava produkcijskega gojišča z 1% saharozo, Mn ioni in pH 2'5 (A.niger ne dela najbolje). Vlivanje MG v petrijevke.

2) Nacepljanje mikroorganizmov

a) vaja

- izolacija čiste kulture (anaerobno zemlja, nasičenost s kulturami na ATA, 30°C)
opis: r = 2mm, svetlo oranžne barve, rob je naguban, profil koncentrično naguban, konsistenca trdna, na KG rdeče barve
- različna gojišča (na MG E.coli, na KG in PA pa S.cerevisiae in A.niger; PA najboljše)
- nacepljanje po poševniku in priprava suspenzije gljiv A.niger (Tween 80)
- titracija citronske kisline

filtracija 1ml v 2 elrenmajerci + 4ml H₂O + 3 kapljice fenolftaleina

skupina	g/100ml
1	0'18
2	0'321
3	0'256
4	0'237

titracija z 0'1M NaOH

$$M_{r_{cit.k.}} = 192'13$$

$$V_{kulture} = 100ml$$

$$V_{NaOH} = 0'4 ml$$

$$M_{r_{NaOH}} = 40$$

$$3n_{NaOH} = n_{cit.k.}$$

$$n_{NaOH} = V \times c = 0'4ml \times 0'1mol/L = 0'04mmol$$

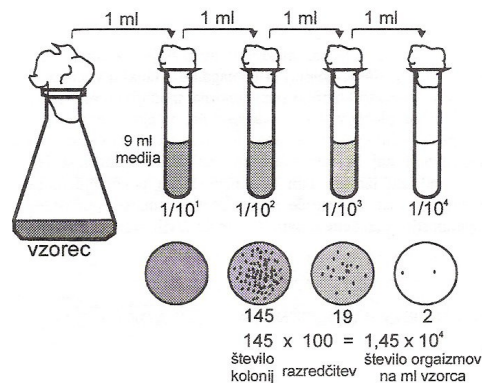
$$m_{cit.k.} = n_{NaOH} \times M_{cit.k.} / 3 = 2'56 mg$$

Nastaja zaradi osmotski šok (Cu²⁺ povzročijo da encim v Krebsovem ciklu ne deluje prav).

3) Štetje mikroorganizmov

a) Teorija

Žive celice štejemo po metodi z razredčitvami, za glive velja 10-100 in za bakterije 30-300. Razredčujemo v fiziološki raztopini, 0'01% Tween80 ali peptonski vodi (mikroorganizmi preživijo, a se ne morejo razmnoževati). Aerobe razmažemo, anaerobe vmešamo v poltrdi agar.



Merjenje rasti

a) merjenje celične mase	b) merjenje števila celic
-direktna	- direktne/števne
-ke (prisotnost N, DNA...)	- hemocitometer, el. števec
-fi (suha/mokra teža)	- indirektno/gojitvene
-indirektna (tvorba/poraba CO ₂ , O ₂)	- štetje na/v ploščah
-merjenje motnosti	- MPN

Računanje

N ₂	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸	Upoštevaš
1	309	67	X	X	10-100 za bakterije in
2	285	86	19	X	30-300 za gljive, dobiš
3	250	45	20	X	delitveni index
index	2'	3	0	0	
$N_1 = \frac{285+250+67+86+45}{2'3} \times 10^5 = 3'19 \times 10^7 \text{ CFU/ml}$					

N ₁	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	Upoštevaš vse,
1	102	13	1	zdesetkaš na isto redenje,
2	138	9	0	zdeliš z št. vseh štetij.
3	123	16	1	
$N_1 = \frac{1'02+1'38+1'23+1'3+0'9+1'6+1+0+1 \times 10^7}{9} = 1'05 \times 10^7 \text{ CFU/ml}$				

Metoda nalivanja plošč (poltrdi agar z mikrobi naneseemo na trdi agar) je primerna za določevanje števila fakultativnih aerobov, mikroaerofilov, aerotolerantnih anaerobov in delno obligatnih anaerobov.

Metoda razmaza po površini petrijevke je primerna za fakultativne anaerobe (z ali brez kisika), obligatne aerobe (samo kisik) in mikroaerofile (toleranti na kisik in na nižn parni tlak).

b) Vaja

štetje na ploščo	nalivanje na ploščo	metoda najbolj verjetnega
------------------	---------------------	---------------------------

- redčenje 10^1 - 10^7 po 1ml (1:9 ali 10x) (20ml suspenzije spor <i>S.cerevisiae</i> in <i>A.niger</i> ; 1ml vzorec in 9 ml fiziološke) - nacepljanje samo 10^5 - 10^8 na PA 0'1ml (10x redčenje), razmaz in inkubacija 30°	- <i>E.coli</i> redčenje 10^1 - 10^7 (1:9 ali 10x) po 1ml prenos (1ml+ 9 ml fiziološke) - 5 ml poltrdnega agarja + 0'1ml vzorca (10x redčenje), zlijemo na ploščo, inkubacija 37° samo 10^5 - 10^8	števila - <i>E.coli</i> redčenje 10^1 - 10^{11} (10x) po 1ml prenos. - nacepitev v tekoče gojišče 1ml vzorca + 9ml hranilne juhe (10x)
--	---	---

MNP

Suma: 3 3 3 2 0 0

N: 1×10^{10} CFU/ml

10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}	10^{-11}	10^{-12}
+	+	+	+	-	-
+	+	+	-	-	-
+	+	+	+	-	-

4) Mikrobiloške zbirke

a) Teorija

Zbirke za dolgotrajno shranjevanje določenih sevov mikroorganizmov nespremenjeni obliki. Predvsem za raziskave (biotehniški potencial). Ne sme povzročiti spremembe genetskega materiala, v pogojih shranjevanja morajo preživeti, ne sme priti do kontaminacije. Ohranjevanje:

- z rednim cepljenjem (- kontaminacija, \$, gen. spremembe)
- v odsotnosti zraka (specifično; pod parafinskim oljem)
- v suhem okolju (silika gel, kremenov pesek, papirni trakovi, steklene kroglice)
- v hladnem pri določeni T (kristali-glicerol; alkoholi)
- v liofiliziranem stanju (spore-specifično)

b) Vaja

API-test 20C aux (6776673- *Candida guilliermondi*) so testi z različnimi viri C in N

5) Mutacije-avksotrofi

a) Teorija

Mutacija-podedovana sprememba v zaporedju nukleotidnih baz v genomu organizma
Divji tip- iz narave izoliran sev
Prototrof- avksotrof z lastnostmi divjega seva
Avksotrof-mikroorganizem, ki za svojo rast potrebuje 1ali več spojin, ki jih sam ne more sintetizirati.

Mutageni:

kemijski

- bazni analogi (5-Br-Uracil in 2-aminopurin, napačno parjenje)
- kemikalije za DNA (HNO_2 deaminira A,G,C in NH_2OH pa C)
- alkalirajoči agensi (etilmetansulfonat dodajanje metilov, derivati mitomicina in nitrozoguanidina zlepljajo verige-delecija ali točkovna mutacija)
- analogi baznih parov (et-Br in akridinska barvila)

Po določenem času izpostavljanja mutagen odstranimo in celico speremo (filtriranje, centrifugiranje). Pazimo na sterilnost. 1-10% preživelost da največ mutantov. Nacepljanje, inkubacija, selekcija.

fizikalni

- ionizirajoče sevanje (X-žarki povzročijo izredno reaktivne proste radikale, okvara DNK)
- neionizirajoče (UV-germicidna luč, nastanek pirimidinskih dimerov, fotoliza popravlja-tema!)

Selekcija:

Izolacija avksotrofni mutantov (obsevanje z UV) s tehnika replikacij (žametna tkanina, ježek) napravimo selekcijo z MG - avksotrofi ne preživijo (primerjava z KG). Sporogene, filamentozne organizme nacepimo na tekoči MG in inkubiramo, nastale hife sfiltriramo in odstranimo, spore (tudi avksotrofne) nacepimo na hranilno gojišče(vzkljijejo). Z nadaljnimi analizamo definiramo tip avksotrofije.

b) Vaja (4 tedni)

- umeritvena krivulja (suspenzija spor, razmaz za štetje, UV luč 1-6' in 10^1 - 10^4 redčenjex10 od plošče); iz grafa pogoji preživetja, nacepljanje in UV(1,6' in 10^{3-4}), priprava replika plošč-ježek, primerjava plošč

6) Presejalne metode za iskanje mikroorganizmov z določeno lastnostjo

a) Teorija

Presejalne metode za hitro iskanje ekstracelularnih encimov in metabolitov (ugotavljanje prisotnosti določenih molekul pri velikem številu mikroorganizmov). Mehanizme globalne kontrole-sinteza encima po prepisu gena, prepis sprožijo kar substrati/indikatorji (pektin za pektinaze).

Katabolna represija C in N pomeni, da se encimi, kljub prisotnosti indikatorja, sintetizirajo le, če ni v gojišču lažje razgradljivega vira N in C.

Detekcija z metodo zbistritvene cone, z barvno reakcijo (barvni indikatorji) ali z UV-obsevanjem (absorbpcija svetlobe).Kot končni test je submerzna fermentacija

b) Vaja

- točkovno nacepljanje suspenzije na MGg, MGš in MGgš seva K-148 in A-78
 - obarvanje z jodovico; katabolna represije, če α -amilaza ne bo razgrajala in ne bo zbistritvene cone na MGgš (mora rasti tudi na plošči MGg da velja test)
 K-148 nima katabolne represije, raste na vseh ploščah, A-78 nima, raste, kontaminanta ima zbistritveno cono

7) Protoplasti

a) Teorija

Za vnos tuje DNA potrebno celično steno razgradit in obdelati membrano da postane prepustna. Izotonični pogoji z kloridnimi solmi ali nizkomolekularnimi inertnimi sladkorji. Z inkubacijo celic v izotonični raztopini (pufri) ob prisotnosti specifičnih litičnih encimov (razgradnja stene) praviloma dobimo sferične protoplaste. Protoplasti na primernem (tekočem) gojišču lahko regenerirajo celično steno (velika umrljivost)

b) Vaja

Protoplasti občutljivi mehansko;DTE prepreči oksidacijo in s tem inaktivacijo encimov. Po protoplastiranju sfiltriramo nerazgrajen micelij preko steklene volne. Pripravimo različne koncentracije, ki jih 100 μ l dodamo 4ml mehkega agarja CMSMA in zlijemo na plošče CMSA.

8) Dezintegracija mikrobnih celic in priprava celičnega ekstrakta

a) Teorija

Grobi encimski preparat/celični homogenat vsebuje le v pufri topne substance.

Načini:

Princip povečane stižne sile	za Gram(-) in nekatere Gram(+) paličaste bakterije, manj za gljive
Ultrazvočna dezintegracija	za lizo protoplastov, ločitev membran pri Gram(-) bakterij, suspendiranje centrifugiranih oborin, manj za razbijanje celičnih sten
Hitro sproščanje pritiska	suspenzija celic, N mehurčki poškodujejo
Mehansko tretje zmrznjenih celic	za zmrznjene ali liofilizirane mikrobne celice, v primernem pufri stremo v terilnici, efekt večji z abrazivnimi sredstvi
Razbijanje celic s steklenimi kroglicami	za Gram(+) bakterije in gljive, manj za Gram(-), tekoči dušik + kroglice + rotacija (Braunov dezintegrator)
Encim. razgradnja celič. sten	za Gram(+) bakterije, če odporne na lizocim uporabimo muramidaze
Zmrzovanje in taljenje	za Gram(-) bakterije, da lahko potem uporabimo lizocim (zunanjo uniči)

Za ohranitev encimske aktivnosti in preprečitev denaturacije proteinov v homogenatu ne segrevamo preko 4 °C. Pufri tudi dodamo inhibitorje proteaz (EDTA) in reducirajoče agense (DTE).Ustavitev bikemijskih procesov z potopitvijo celic v

raztopino 60% metanol ali odgovorjajoči pufer (ohlajena na -40 °C). Ob razbijanju celic deaktivacija encimov za določevanje metabolitov v homogenatu s TCA (obori proteine). Za encimatsko določevanje jo potem nevtraliziramo.

b) Vaja

- priprava grobega encimskega preparata (filtracija micelija, zmrzevanje N, Braunov dezintegrator, ekstrakcijski pufer, supernatant)

-merjenje encimske aktivnost 6-fosfofrukto-1-kinaze (PFK) v homogenatu

- aldoza, triozafosfat in glicerol-3-fosfat dehidrogenaza razgradijo produkt fruktozo-1,6-difosfat do glicerol-3-fosfata (NADH v NAD⁺-merimo A)

- prebitni encimi ne zavirajo reakcije, zato oksidacija NADH enaka hitrosti pretvorbe fruktoze-6-fosfat v fruktozo-1,6-difosfat, kar je pogojeno z aktivnostjo PFK

- v kiveto (encimski pufer, bidestilirano vodo, DTT, TPI/G3PDH, ALD NADH, vzorec), sledimo spremembi A, dodamo F6P in merimo, isto ATP

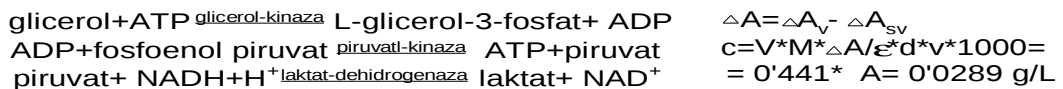
$$v = v_v - v_{sv} \quad v = \frac{\Delta A * 1000 * V_{kiv}}{\Delta t * \epsilon * d * V_v} = \frac{\Delta A * 7936}{\Delta t} \quad \text{(mU/ml)} \quad \begin{array}{l} V_v - \text{vzorec} \\ V_{sv} - \text{slepi vzorec (brez ATP)} \end{array}$$

Ni uspelo-verjetno preveč pufra.

- priprava celičnega ekstrakta za določevanje nivoja celičnih metabolitov

- filtracija micelija, zmrzevanje N, Braunov dezintegrator+TCA, supernatant + nasilčen timol-modro, dodajamo CaCO₃ do preskoka v modro, supernatant + HCl po kapljah

- določanje nivoja glicerola v celičnem ekstraktu

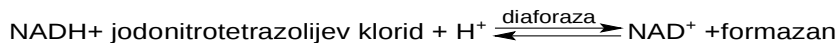
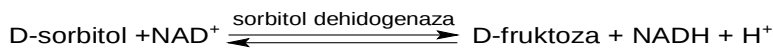


$$\Delta A_{sv} = 1'1156 - 1'0847 = 0'0309 \quad \Delta A_v = 1'0422 - 0'9458 = 0'0964$$

9) Določanje intracelularnega volumna

a) Teorija

Poleg količine nekega metabolita, moramo določiti tudi volumen celice. Da določimo volumen raztopine izven celice, le-te inkubiramo v raztopini neke molekule z znano koncentracijo, ki celice ne morejo metabolizirati, ne sme vstopiti čez membrano, je dovolj majhna, da ostane v predelu celičnih sten (težko razgradljiv poliol sorbitol).



Količino formazana oz. posredno sorbitola izračunamo iz razlike absorbanc.

b) Vaja

$$H_2O_{in+eks} = MT - ST \quad H_2O_{eks} = (c_2/c_1) * V = 0'185 \text{ ml} \quad V = 25 \text{ ml}$$

$$c_2 = (V * M_{sor} / \epsilon * d * v * 1000) * \Delta A = 0'2792 * \Delta A = 0'0673 \text{ g/L} \quad c_1 = 9'11 \text{ g/L (sorbitol)}$$

$$H_2O_{in} = MT - ST - H_2O_{eks} = 0'5475 \text{ g} - 0'0539 \text{ g} - 0'185 \text{ ml} = 5'725 \text{ (ml/g ST)}$$

$$S.cerevisiae \ 1'72 \text{ (ml/g ST)} \quad A.niger \ 5'725 \text{ (ml/g ST)}$$