

Eesti koolinoorte 49. bioloogiaolümpiaad

Mikrobioloogia praktiline töö



Eesnimi :

Perekonnanimi :

Kool :

Klass :

Rühm :

Juhendaja: Triinu Visnapuu, TÜ MRI geneetika doktorant

1. Mikroobide arvukus õhus (Koch'i lihtsadestusmeetod) (7p)

Sissejuhatus:

Õhk võib sisaldada suurel arvul erinevaid mikroobe. Kuigi mikroobirakud on õhust raskemad, võivad tõusvad õhuvoolud ja liikumine rakke kanda pindadelt väga kõrgele ja kaugele.

Toiteagari söötmeplaadile on ruumiõhust 5 minuti jooksul sadestatud mikroobe. Järgnevalt inkubeeriti söötmetasse 1 nädala jooksul toatemperatuuril, et mikroobirakkudest moodustuksid kolooniad.

Materjalid:

õhkkülviga toiteagari söötmeplaat,
marker,
kalkulaator.

Praktiline töö:

- Loe kokku söötmel olevad nii bakterite kui ka hallitusseente kolooniad. Markeeri loetud kolooniad, et ei toimuks ühe koloonia mitmekordset arvestamist.
Söötmeplaadil nr. oli kolooniat.
- Arvuta välja mitu kolooniat moodustavat mikroobirakku (*CFU – colony forming unit*) on 1 m³ õhus kui on teada, et 5 min jooksul sadeneb 100 cm² suurusele pinnale sama palju mikroobe, kui neid on 10 dm³ õhus. Söötmetassi raadius on 4.25 cm.
..... *CFU/m³*

Lisaküsimus:

Milliste tunnustega mikroobirakud on õhkkeskkonnas kõige vastupidavamad?

2. Jogurti mikrobioloogiline koostis (18p)

Sissejuhatus:

Jogurti tootmiseks kasutatakse väherasvast piima ja erinevaid bakterikultuure. Piimhappebakterid toodavad laktaati ja maitseühendeid (näiteks orgaanilised happed, atsetaldehüüd, diatsetüül). Enim kasutatavateks juuretise tüvedeks on näiteks *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*. Lisaks fermenteerijatele sisaldavad paljud jogurtid ka probiootilisi tervisele kasulikke kultuure (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* ja *Bifidobacterium*).

Materjalid:

jogurt,
alusklaas,
pinsetid,
gaasipõleti,
tikud,
plastikust külviaas,
destilleeritud vesi,
Huckeri kristallviolett,
pesunõu,
filterpaberid,
valgusmikroskoop,
immersiooniõli,
objektiivipuhastuspaber,
eetri-etanooli segu.

Praktiline töö:

- Valmista jogurtist mikroskoobipreparaat ja vaatle seda valgusmikroskoobis õliimeersioonisüsteemis.
- 1) Süüta gaasipõleti. Võta pinsettidega etanoolilahusest alusklaas ning tõmba see leegist läbi. Lase etanoolil ära põleda.
 - 2) Aseta jahtunud alusklaasile veepudelist tilk destilleeritud vett. Võta jogurtist plastikust külviaasaga veidi materjali ja suspendeeri veetilgas, et tekiks kergelt hägune segu. **Ära võta liiga palju materjali!**
 - 3) Tõmba veetilk laiali, et preparaat paremini kuivaks. **NB! Väldi vedelikutilga tugevat hõõrumist.** Jäta lauale kuivama.
 - 4) Fikseeri kuivanud preparaat termiliselt. Selleks tõmba rakkudega alusklaas seda pinsettide vahel hoides mõned korrad läbi leegi nii, et katsudes on klaas kuum. **Ära kuumuta märga preparaati ega lase materjali kõrbema!**
 - 5) Värv fikseeritud preparaati 1 min Huckeri kristallviolettiga. Selleks kata preparaat kõigepealt kristallviolettiga. 1 minuti pärast pese ettevaatlikult destilleeritud veega üleliigne värv pesunõusse.
 - 6) Kuivata preparaadi servad filterpaberiga, lase preparaadil kuivada ja mikroskoobi see õliimmersioonisüsteemis. Selleks asetage preparaadile tilk immersiooniõli, keera vaatluseks alla õlis kasutatav objektiiv (100x suurendus) ja fokuseeri preparaat kasutades mikroskoobi makro- ja mikrokruvisid. Preparaati esemelaual saad liigutada kasutades vastavat hooba. Objektiiv peab olema õlivilga sees.
 - 7) **Valmis preparaati näita juhendajale!**
 - 8) Peale kasutamist puhasta objektiiv spetsiaalse puhastuspaberiga, mida niisuta eetri-etanooli seguga!

- **Otsi preparaadist erinevaid jogurtis sisalduvaid baktereid. Joonista ja/või kirjelda neid (kuju, suurus, agregatsioon).**

Lisaküsimus:

Millest toodavad mikroobid laktaati? Nimeta erinevaid tegureid, millest sõltub happe tootmise kiirus ning hulk!

3. Suhkrute kasutamine bakteritüvedel (15p)

Sissejuhatus:

Tundmatute mikroobide identifitseerimiseks ja määramiseks tuleb uurida sellele iseloomulikke genotüübilisi (näiteks 16S rRNA geenjärjestus) ja fenotüübilisi tunnuseid (biokeemilised, füsioloogilised jt.). Mitmesuguste süsinikuallikate kasutamine on sageli mikroobirühmade eristamisel ja liikide identifitseerimisel oluliseks tunnuseks. C-allika kasutamiseks ja sellest happeliste produktide moodustumiseks on mikroobile vajalikud nii substraati lagundavad kui ka transpordivad ensüümid.

On teada, et enterobakterite hulka kuuluv *Escherichia coli* looduslik tüvi ei suuda kasutada sahharoosi, kuid fruktoosi, mannitooli ja ksüloosi ta kasutab. *E. coli*'le lähedane *Citrobacter freundii* kasutab lisaks ka sahharoosi. Mullabakterid *Pseudomonas stutzeri* ja *P. mendocina* kasutavad suhkruid üldiselt vähem. *P. mendocina* ei kasuta antud valikust ühtegi suhkrut ja *P. stutzeri* tarbib ainult ksüloosi.

Materjalid:

Süsivesikute kasutamise põhisöödet sisaldavad katseklaasid, kuhu on pistekülviga külvatud bakteritüvi. Söötmed sisaldavad 1% suhkruid (fruktoos, sahharoos, mannitool, ksüloos).

Praktiline töö:

- Vaatle sissekülviga katseklaase, kuhu on erinevaid suhkruid sisaldavale süsivesikute söötmele külvatud üks eelpoolmainitud tüvedest. Võrdle söötmete värvusi katseklaasiga, kuhu on külv tegemata (K). Tulemused kanna tabelisse.
- Kuna süsivesikute põhisööde sisaldab kahte indikaatorvärvi, siis saad hinnata, kas antud tüvi kasutab vastavat suhkrut. Broomtümoolsinine on happelises keskkonnas kollase ja aluselises sinise värvusega, fenoolpunane on madala pH juures kollane, aga kõrge pH korral punane. Kui tüvi kääritab antud suhkrut, siis on sööde (**värvus**), ning kui bakter kasutab peptooni mitte suhkruid ja happelisi produkte ei teki, siis on sööde (**värvus**).

Sööde	Söötme värvus	pH	Kas tüvi kasutab seda suhkrut?
Kontroll (K)			X
Fruktoos (Fru)			
Sahharoos (Sah)			
Mannitool (Man)			
Ksüloos (Ksül)			

- Suhkrute kasutamise järgi määra, millise eelpoolnimetatud tüvega on tegemist.

Lisaküsimus:

Millist tüüpi mikroobirühmaga on tegu, kui kasv on olemas süsivesikute põhisöötmes (toitainete poolest rikas sööde) söötmesamba pinnal toatemperatuuril (~23°C)?

SÖÖTMED JA LAHUSED:

Toiteagar

Lihaekstrakt 3 g; pepton 5 g; agar 15 g 1 l dest. vee kohta. Söötme pH 6.8.

Süivesikute kasutamise põhisoode

Pärmiekstrakt 1 g; pepton 2 g; fenoolpunane 0.04 g; broomtümoosinine 0.02 g; agar 2.5 g 1 l dest. vee kohta. Söötme pH 7.1. Peale autoklaavimist lisatud filtersteriilitud suhkrud lõppkontsentratsiooniga 1%.

Söötmed on steriilitud autoklaavimisega 15 min 121°C.

Huckeri kristallviolett

Valmistatakse A ja B lahuse kokkusegamisel. A – 2 g kristallvioletti 20 ml 95% etanoolis; B – 0.8 g ammoniumoksalaati 80 ml dest. vees. Lahus filtreeritakse.

Immersiooniõli eemaldussegu

Eeter 70%; etanool 30%.

Kasutatud kirjandus

Alamäe, T. jt. Bioloogia gümnaasiumile II osa. Tartu, 2000.

Heinaru, E. ja Vedler, E. Praktilisi töid mikrobioloogiast. Tartu, 2007.

http://www.loodusajakiri.ee/eesti_loodus/artikkel442_415.html

<http://www.miksike.ee/docs/lisa/5klass/2keemia/jogurtivalmistamine.htm>