

# *Eesti koolinoorte 57. bioloogiaolümpiaad*

## *Mikrobioloogia praktikum*

---



Eesnimi: .....

Perekonnanimi: .....

Juhendaja: Triinu Visnapuu, TÜ MRI teadur  
*Vastused ja kommentaarid lisatud kaldkirjas*

### **Töö 1. Jogurtis leiduvate bakterite mikroskoobipreparaat**

#### **Sissejuhatus:**

Jogurtit nagu ka muid hapendatud piimatooteid on inimkond valmistanud ja söönud juba aastatuhandeid. Algselt kasutati nn. isehapnemist ehk spontaanset fermentatsiooni, milles osalevad mikroobid pärinesid toorainest, ümbritsevast õhust või tegemise nõust. Tänapäeval toodakse jogurtit enamasti tööstuslikult ning lisatakse kindlaid starterkultuure, et toote kvaliteet ja maitseomadused oleksid ühtlasemad. Happetootjatena kasutatakse jogurtites põhiliselt baktereid *Streptococcus thermophilus* ja *Lactococcus lactis*. Lisaks sisaldavad mitmed biojogurtid hapet taluvad baktereid perekondadest *Lactobacillus* ja *Bifidobacterium*. Neid probiootilisi kultuure lisatakse eelkõige erinevate kasulike toimete tõttu, mis neil mikroobidel inimese organismile on.

#### **Materjalid:**

biojogurt tuubis  
puhas külviaas  
alusklaas  
pinsetid  
gaasipõleti  
tikud  
destilleeritud vesi pesupudelis  
Huckeri kristallviolett  
pesunõu  
filterpaberid

valgusmikroskoop  
immersiooniõli  
marker  
objektiivipuhastuspaber  
eetri-etanooli segu mikroskoobi objektiivi puhastamiseks

### Praktiline töö:

**Tee jogurtist preparaat ning vaatle jogurtibaktereid valgusmikroskoobis õliimmersioonisüsteemis.**

- 1) Süüta gaasipõleti. Võta puhas alusklaas.
- 2) Aseta alusklaasile veepudelist tilk destilleeritud vett. Võta puhta plastikust külviaasaga tuubist veidi materjali (jogurtit) ja sega veetilgas korralikult. Võta pigem vähem materjali, et preparaat oleks pigem läbipaistvam.
- 3) Hajuta veetilk külviaasaga üle alusklaasi laiali, et preparaat paremini kuivaks. Jäta see 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) Värvfiikseeritud preparaati **Huckeri kristallvioletiga**. Selleks kata preparaat kõigepealt kristallvioletiga. 1 minuti pärast pese ettevaatlikult destilleeritud veega üleliigne värv pesunõusse. Hoia värvimise ja pesu ajal preparaati pinsettide vahel.
- 6) Kuivata preparaadi servad filterpaberiga, lase preparaadil kuivada ja **vaata seda õliimmersioonisüsteemis**. Selleks asetä 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. **Fokuseerida preparaati ainult esemelauda langetades!** Objektiiv peab olema õlivilga sees.
- 7) **Valmis preparaati näita juhendajale!** Kirjuta alusklaasi servale markeriga oma nimi.
- 8) Peale kasutamist puhasta objektiiv spetsiaalse puhastuspaberiga, mida niisuta eetri-etanooli seguga.

*Preparaadi tegemisel hinnati metoodika jälgimist: kas materjali oli võetud sobival hulgal, kas preparaat oli korralikult kuivatatud, kas materjal oli korralikult fikseeritud, kas värv oli piisavalt hästi välja pestud. Kuna fookuskaugus on õliimmersioonis väga väike, siis vajadusel abistasid juhendajad preparaadi fokuseerimisel.*

### Ülesanne:

Otsi preparaadist erinevaid kujuga jogurtibaktereid. Kirjelda neid (kuju, agregatsioon, esinemissagedus). Mitut eri tüüpi baktereid näed?

*Preparaadis on kolme erineva kujuga baktereid:*

- 1) *ümarad kokid (Streptococcus sp. või Lactococcus sp.), mis moodustavad ahelaid või suuremaid kogumikke, kõige arvukamad;*
- 2) *pulgakujulised batsillid (Lactobacillus sp.), mis on üksikult või kahekaupa, keskmise*

*esinemissagedusega;*

*3) ebakorrapärase või kõverdunud kujuga pulgakujulised bifidobakterid (Bifidobacterium sp.), mis on üksikult, preparaadis on neid kõige vähem.*

### **Küsimused:**

**Milline hape tekib mikroorganismide abil jogurti tootmise käigus laktoosist?**

*Püimhape ehk laktaat*

**Mis materjali sisaldab jogurt lisaks bakteritele (see värvub aluselise värvi toimetel)?**

*Aluselise värvi toimetel värvub ka jogurtimaatriks, mis sisaldab kaseiini jt. vadakuvalke ning polüsahhariide.*

## **Töö 2. Bakterite arvukuse määramine tilkkülvi meetodil**

### **Sissejuhatus:**

Bakterid on üherakulised prokarüootsed organismid, mis paljunevad pooldumise teel. Erinevad bakterite liigid on olulised nii looduses kui ka inimeste elus. Soolekepikest (*Escherichia coli*) kasutatakse laialdaselt mudelorganismina laborikatsetes. Bakterirakkude arvukuse määramine on oluline näiteks geneetiliste modifikatsioonide või keskkonnategurite mõju hindamiseks bakterite eluvõimele.

Toitaineterikkale söötmele (LB) külvati tilkkülvi meetodit kasutades *Escherichia coli* kultuuri erinevaid lahjendusi. Seejärel kasvatati bakterirakke 24 h, et söötme pinnale moodustuksid kolooniad.

### **Materjalid:**

*E. coli* kolooniad LB söötmeplaadil  
marker  
kalkulaator

### **Praktiline töö:**

Leia söötmel olevatest *E. coli* tilkkülvidest sobiv lahjendus, kus kolooniad on üksteisest eristatavad. Loe vastavas tilgas kokku kolooniad. Markeeri loetud kolooniad tassi põhjal, et ei toimuks ühe koloonia mitmekordset arvestamist.

**Söötmeplaadil nr. .... oli ..... lahjendusefaktoriga tilgas ..... kolooniat.**

*Töös oli söötmeplaadile külvatud mikroobikultuuri kümnekordsete lahjenduste rida:  $10^0 - 10^8$ . Ühest lahjendusest oli kaks kordust. Sobivast lahjendusest, kust oli võimalik kolooniaid loendada, tuli lugeda kolooniad ning leida kahe tilga aritmeetiline keskmine kolooniate arv (CFU). Erinevalt tähistatud söötmeplaatidel olid mõnevõrra erinevad kolooniate arvud. Järgnev lahenduskaik on ühe tüüpilise näite põhjal. Lahjendusfaktor on lahjenduse pöördväärtus.*

*Söötmeplaadil nr. X oli  $10^6$  lahjendusfaktoriga tilgas 6.5 kolooniat.*

### Ülesanne:

Leia bakterite elusrakkude arvukus (*colony forming unit* – CFU) 1 ml algses kultuuris kasutades saadud kolooniate arvu ja sellele vastavat lahjendust. Ühe tassile külvatud tilga maht oli 5  $\mu$ l.

*Kuna küsitud on CFU milliliitri algkultuuri kohta, siis tuleb külvimäära puhul teha teisendus: 5  $\mu$ l = 0.005 ml.*

*Kehtib valem, kus  $CFU(1/ml) = \frac{\text{kolooniate arv} \cdot \text{lahjendusfaktor}}{\text{külvimäär}}$*

$$\text{Arvutus: } CFU(1/ml) = \frac{6.5 \cdot 10^6}{0.005} = 1.3 \cdot 10^9$$

*Vastus: Algkultuuris oli  $1.3 \cdot 10^9$  CFU/ml.*

### Küsimus:

**LB tardsööde sisaldab trüptooni (saadud kaseiini lüüsimisel), pärmiekstrakti (saadud purustatud pärmirakkudest), NaCl ja agarit. Milliste tunnustega mikroobid kasvavad LB söötmeplaadil?**

*Söötmeplaadil saavad kasvada ainult aeroobsed bakterid. Kuna LB sööde on mitmesuguste toitainete ja vitamiinide poolest rikas sööde, siis kasvavad sellel suure toitainete nõudlusega bakterid, kes ise paljusid aineid ei sünteesi (auksotroofid) ning orgaanilist ainet tarvivad mikroobid (heterotroofid).*

## Töö 3. Bakterite ja hallitusseente arvukuse määramine ruumiõhus

### Sissejuhatus:

Baktereid ja hallitusseente eoseid leidub kõikjal meie ümber. Kuna mikroobid on väga väikesed ja kerged, siis paiskuvad nad pindadelt õhku ja levivad edukalt õhuvooludega. Seega on ümbritsevas õhus alati mikroorganisme, mille suur arvukus võib põhjustada inimestel terviseprobleeme.

Õhus leiduvate aeroobsete mikroorganismide arvukuse määramiseks kasutatakse Kochi lihtsadesustmeetodit. Tardsöötmeaga tassid avatakse vähemalt 5 minutiks, seejärel suletakse kaanega ning asetatakse vastavalt standardmeetodikale 5 päevaks kasvama. Söötmeplaadile sadenenud mikroobidest kasvavanud kolooniad loendatakse ning tehakse vastavad arvutused.

### Materjalid:

õhukülviga saadud mikroorganismide kolooniad LB söötmeplaadil  
marker  
kalkulaator

### Praktiline töö:

Vaatle söötmele olevaid mikroobikolooniaid ning loenda eraldi bakterite ja hallitusseente kolooniad.

Markeeri loetud kolooniad tassi põhjal, et ei toimuks ühe koloonia mitmekordset arvestamist.

**Söötmeplaadil nr. .... oli ..... bakterikolooniat ja ..... hallituseene kolooniat.**

***Erinevalt tähistatud söötmeplaatidel olid mõnevõrra erinevad kolooniate arvud. Hallitusseni ei esinenud kõigil söötmeplaatidel. Järgnev lahenduskäik on ühe tüüpilise näite põhjal.***

***Söötmeplaadil nr. Y oli 7 bakterikolooniat ja 2 hallituseene kolooniat.***

### Ülesanne:

Leia bakterite ja hallitussente arvukus 1 m<sup>3</sup> õhus, kui on teada, et 5 min jooksul sadeneb 100 cm<sup>2</sup> suurusele pinnale sama palju mikroobe, kui neid sisaldub 10 dm<sup>3</sup> seisvas õhus. Tasse diameetriga 9 cm hoiti antud katses lahti 10 minutit.

***Tuleb leida kasutatud ringikujulise põhjaga söötmeplaadi pindala, kui antud on diameeter:***

$$S = \pi r^2, \text{ kus } r = 9/2 = 4.5 \text{ cm}$$

$$S = 63.6 \text{ cm}^2$$

*Vastavalt toodud seaduspärale, kus  $100 \text{ cm}^2$  suurusele pinnale langeb samapalju mikroobe, kui on  $10 \text{ dm}^3$  õhus, saab teha arvutused:*

$$\begin{array}{r} 7 \text{ bakterikolooniat} - 63.6 \text{ cm}^2 \\ x \quad \quad \quad - 100 \text{ cm}^2 \end{array}$$

$$x = \frac{7 \cdot 100}{63.6} = 11$$

*Arvesse tuleb võtta, et proovi kogumise aeg oli kaks korda pikem, st. 10 minutit. Seega 5 min jooksul sadenes  $11/2 = 5.5$  kolooniat.*

*Vastavalt küsimusele, tuleb teisendada  $10 \text{ dm}^3$  kuupmeetriteks:  $10 \text{ dm}^3 = 0.01 \text{ m}^3$ , st. 100 kordne erinevus.*

*Bakterirakkude arv kuupmeetris ruumiõhus:  $5.5 \cdot 100 = 550$ .*

*Hallitusseente kolooniate puhul tuleb teha analoogiline arvutus:*

$$\begin{array}{r} 2 \text{ seenekolooniat} - 63.6 \text{ cm}^2 \\ x \quad \quad \quad - 100 \text{ cm}^2 \end{array}$$

$$x = \frac{2 \cdot 100}{63.6} = 3.14$$

$$3.14/2 = 1.57$$

$$1.57 \cdot 100 = 157$$

*Vastus:  $1 \text{ m}^3$  ruumiõhus oli 550 bakterirakku ja 157 hallitusseene eost.*

### **Küsimus:**

**Milliste väliste tunnuste alusel on võimalik üksteisest eristada bakteri- ja hallituseene kolooniaid?**

*Bakterikolooniad on enamasti pigmenteerunud (kollakad, punakad), siledama ja läikivama või limasema pinnaga, tavaliselt kiiremakasvulisemad. Hallitusseente kolooniad on valkjad, kuivemad, krobelised või pintslitaolised ning aeglasema kasvuga.*