

BIC Ljubljana  
Tehniška gimnazija  
Cesta v Mestni log 47  
1000 Ljubljana

Protokol iz laboratorijskih vaj:

**Merjenje velikosti ter enostavno in sestavljeno  
barvanje mikroorganizmov**

Ljubljana, 5. januar 2013

## UVOD

**Glive kvasovke** so enocelični evkariontski organizmi. Z njihovo pomočjo se izdeluje alkohol, najdemo pa jih tudi v kvasu, ki je potreben za izdelovanje kruha. Z aerobnim celičnim dihanjem presnavljajo glukozo, ko pa jim zmanjka kisika, jo presnavljajo s fermentacijo. Velikost kvasovk se giblje med 4 in 10  $\mu\text{m}$ .

**Mlečnokislinske bakterije** so zelo pomembni mikroorganizmi, saj sodelujejo pri tvorbi hranil, so pa tudi pomemben del koristne črevesne flore. Uporablja se jih kot probiotike (Linex), saj zavirajo uničevanje črevesnih bakterij, ki so pomembne za življenje. Hranijo se s sladkorjem, pri presnovi pa nastaja mlečna kislina. So grampozitivne bakterije, njihova velikost pa znaša med 0,5 in 4  $\mu\text{m}$ .

**Ocetnokislinske bakterije** so gramnegativne bakterije. Sodelujejo pri kisanju, kjer oksidirajo alkohol v očetno kislino. Merijo od 0,5 do 4  $\mu\text{m}$ .

**Enostavno barvanje** je postopek, s katerim obarvamo mikroorganizme na preparatu, da se ti bolje vidijo in lažje določimo njihovo obliko in zgradbo. Pri tem uporabimo le eno barvilo, ki je navadno metilensko modrilo.

**Sestavljeno barvanje** je enak postopek kot enostavno barvanje, le da tu uporabimo več različnih barvil. Uporabljamo modro in rdečo barvo, pri tem pa ena intenzivneje obarva mikroorganizme na preparatu in tako določimo gramnegativne oz. grampozitivne mikroorganizme. Od tod poimenovanje postopka-barvanje po Gramu. Obarvanje je odvisno od sestave celične stene, ki je pri grampozitivnih mikroorganizmih sestavljena iz 90 % peptidoglikana, pri gramnegativnih, pa je peptidoglikana zelo malo.

## HIPOTEZA

**Enostavno barvanje gliv kvasovk:** Ker kvasovke obarvamo z metilenskim modrilom, pričakujemo, da se bodo obarvale modro, vendar pa pod mikroskopom zaradi njihove velikosti ne bomo videli nič drugega, kot le njihovo obliko, ki jo določa celična stena.

**Merjenje velikosti gliv kvasovk:** Velikost naj bi se gibala med 4 in 10  $\mu\text{m}$ , ker pa so to enocelični organizmi, bomo pod mikroskopom najverjetneje videli posamezne oblike gliv kvasovk. Oblika bo najbrž samo ena, če smo na preparat dali le eno vrsto gliv kvasovk. Morda se bodo pojavile posamezno in v kolonijah.

**Sestavljeno barvanje mlečnokislinskih bakterij:** Ker so mlečnokislinske bakterije grampozitivne, pričakujemo, da se bodo obarvale modro ali vijolično. Velikost bakterij se bo gibala od 0,5 do 4  $\mu\text{m}$ .

**Sestavljeno barvanje oacetnokislinskih bakterij:** Oacetnokislinske bakterije so gramnegativne, zato so naša pričakovanja, da se bodo obarvale rdeče. Velikost bakterij se bo gibala od 0,5 do 4  $\mu\text{m}$ .

## NAVODILA ZA DELO

**Merjenje velikosti mikroorganizmov:** Na mizico mikroskopa položimo preparat z mikroorganizmi, ki jih želimo izmeriti. S pomočjo okularnega merilca preštejemo število razdelkov, ki jih zavzema mikroorganizem, to število pa pomnožimo s koeficientom, primernim povečavi, pri kateri opazujemo predmet.

**Enostavno barvanje:** Fiksiran preparat prebarvamo z metilenskim modrilom, ga speremo s preparata, in ga posušimo.

**Sestavljeno barvanje:** Fiksiran preparat prelijemo s kristalvioletom, ki ga pustimo delovati minuto, odlijemo in prelijemo z lugolom, ki naj tudi deluje eno minuto in speremo. Vse skupaj razbarvamo z acetonom in etanolom, po spiranju pa pobarvamo s safraninom. Tudi tega pustimo delovati minuto, speremo in posušimo, preparat pa je tako pripravljen za opazovanje.

**Imerzija:** Po tem, ko poiščemo sliko na največji povečavi, revolver premaknemo tako, da bo preparat ležal med imerzijskim in velikim objektivom. Na preparat damo kapljico imerzijskega olja, imerzijski objektiv pa usmerimo na preparat in izostrimo sliko. Po opazovanju preparata objektiv očistimo.

## MERITVE

### VELIKOSTI MIKROORGANIZMOV

#### 1. Glive kvasovke

Velikosti [ $\mu\text{m}$ ]	Povprečje [ $\mu\text{m}$ ]
3,75	
3	
5	3,7
3,25	

3,5	
-----	--

2. Mlečnokislinske bakterije v Linex-u

Velikosti [ $\mu\text{m}$ ]	Povprečje [ $\mu\text{m}$ ]
1,25	
0,75	
1,5	1,25
1,25	
1,5	

3. Mlečnokislinske bakterije v jogurtu

Velikosti [ $\mu\text{m}$ ]	Povprečje [ $\mu\text{m}$ ]
1,5	
1	
1	1,05
0,5	
1,25	

4. Ocetnokislinske bakterije

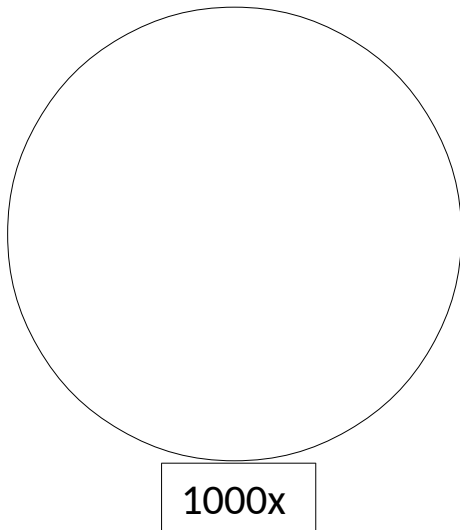
Velikosti [ $\mu\text{m}$ ]	Povprečje [ $\mu\text{m}$ ]
1,75	
2,5	
2,25	2,5
3,25	
2,75	

## IZRAČUN

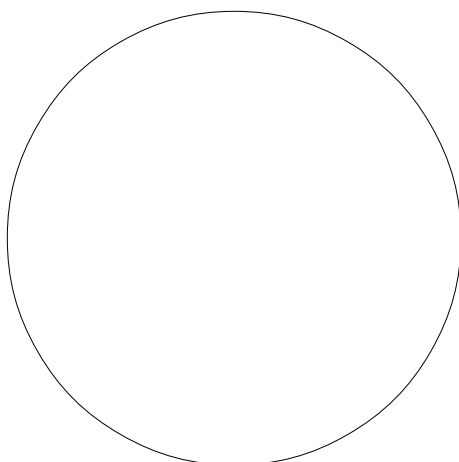
Ker smo vsa opazovanja izvajali pri 400-kratni povečavi, smo koeficient, ki smo ga potrebovali za pretvorbo števila razdelkov, ki jih zavzema mikroorganizem, prav tako izračunali pri 400-kratni povečavi. Koeficient smo izračunali tako, da smo na mizico mikroskopa postavili objektni mikrometer. Opazili smo, da en razdelek objektnega merila zavzema štiri razdelke okularnega merila. Iz tega je sledila enačba: koeficient =  $1 \times 10 \mu\text{m} / 4 = 2,5 \mu\text{m}$ . Pri merjenju mikroorganizmov pri 400-kratni povečavi smo izmerili, koliko razdelkov ta zaseda, in to pomnožili s koeficientom ter dobili velikost mikroorganizma.

## REZULTATI

1. Glive kvasovke

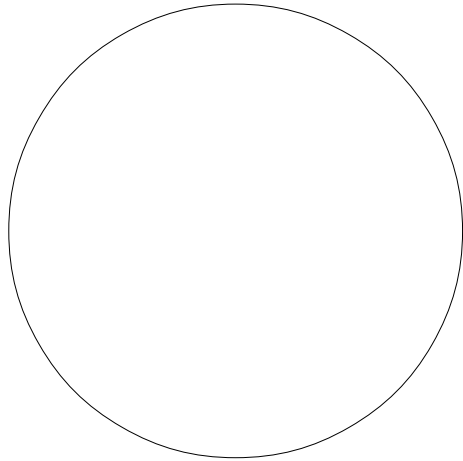


2. Mlečnokislinske bakterije v Linex-u



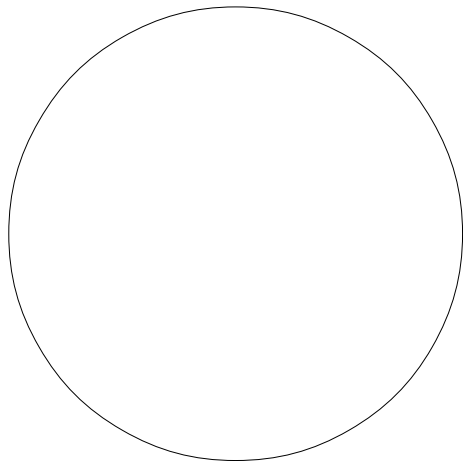
3. Mlečnokislinske bakterije v jogurtu

400x



400x

4. Ocetnokislinske bakterije



400x

## DISKUSIJA

Tako kot smo napovedali v hipotezi, so se glive kvasovke obarvale modro, videli pa smo, da so v obliki krogov, nekatere pa lahko najdemo v kolonijah.

Mlečnokislinske bakterije v Linex-u so se obarvale modro in tudi velikost se je skladala z napovedmi, kar potrjuje hipotezo. Ko pa smo opazovali mlečnokislinske bakterije v jogurtu, smo lahko bili presenečeni, saj so se obarvale rdeče. To je najverjetneje posledica tega, da smo jih po nesreči zakurili na preparat pri pripravi fiksiranega preparata. Na preparatu smo opazili tudi večje rdeče lise, ostanke kurjenja.

Pri oacetnokislinskih bakterijah smo potrdili hipotezo. Obarvale so se rdeče, oblika celic pa je bila enolična.

Že iz uvoda lahko sklepamo, da bodo glive kvasovke največje, kar so potrdile tudi meritve. Od ostalih rezultatov pri kvasovkah je odstopala le ena gliva. Pri bakterijah v Linex-u so se vse celice gibale okoli povprečja, prav takšno sliko lahko razberemo pri jogurtu. Razlika pri mlečnokislinskih bakterijah je v povprečju, kar lahko kaže na odstopanja pri merjenju bakterij ali pa na to, da so v Linex-u uporabljene druge vrste mlečnokislinskih bakterij kakor v jogurtu. Oacetnokislinske bakterije so bile večje kakor mlečnokislinske. Nekatere so dosegle tudi velikost kvasovk, njihova oblika pa je bila rahlo paličasta.

## VIRI

[http://www.dijaski.net/biologija/porocila-vaje.html?  
r=bio\\_vaj\\_metabolizem\\_gliv\\_kvasovk\\_in\\_dokaz\\_produktov\\_vrenja\\_01.pdf](http://www.dijaski.net/biologija/porocila-vaje.html?r=bio_vaj_metabolizem_gliv_kvasovk_in_dokaz_produktov_vrenja_01.pdf)

<http://ro.zrsss.si/projekti/kmetijstvo/mlekoinm/mizdelki/slovar.htm>

[http://www.ffa.uni-lj.si/fileadmin/datoteke/Knjiznica/diplome/2008/  
Zupancic\\_Janja\\_dipl\\_nal\\_2008.pdf](http://www.ffa.uni-lj.si/fileadmin/datoteke/Knjiznica/diplome/2008/Zupancic_Janja_dipl_nal_2008.pdf)

[http://web.bf.uni-lj.si/zt/bioteh/seminar\\_all/zivil/2000\\_01/Ocetna.pdf](http://web.bf.uni-lj.si/zt/bioteh/seminar_all/zivil/2000_01/Ocetna.pdf)

Kapun Dolinar A., Štrumbelj Drusany I.: Laboratorijske vaje 2. letnik tehniška gimnazija, BIC Ljubljana Gimnazija in veterinarska šola