



REPUBLIKA SLOVENIJA
MINISTRSTVO ZA ŠOLSTVO IN ŠPORT



BIOTEHNIŠKI
IZOBRAŽEVALNI
CENTER LJUBLJANA



Naložba v vašo prihodnost
OPERACIJO DELNO FINANCIRA EVROPSKA UNIJA
Evropski socialni sklad

Laboratorijsko delo v veterini 1

Priročnik za laboratorijske vaje za veterinarske tehnike

Bianka Mertelj



REPUBLIKA SLOVENIJA
MINISTRSTVO ZA ŠOLSTVO IN ŠPORT



BIOTEHNIŠKI
IZOBRAŽEVALNI
CENTER LJUBLJANA



Naložba v vašo prihodnost
OPERACIJO DELNO FINANCIRA EVROPSKA UNIJA
Evropski socialni sklad

Naslov: Laboratorijsko delo v veterini 1
Izobraževalni program: Veterinarski tehnik
Modul: Laboratorijsko delo v veterini
Avtor: Bianka Mertelj, dr. vet. med.
Strokovni recenzent: Emil Grah, dr. vet. med.
Lektorica: Marjana Mastinšek-Šuštar, prof. slov.
Založnik: Biotehniški izobraževalni center Ljubljana

CIP - Kataložni zapis o publikaciji
Narodna in univerzitetna knjižnica, Ljubljana

579.62(075.3)(076.5)

MERTELJ, Bianka

Laboratorijsko delo v veterini 1 [Elektronski vir] : priročnik za laboratorijske vaje za veterinarske tehnike / Bianka Mertelj. - El. knjiga. - Ljubljana : Biotehniški izobraževalni center, 2011. - (Izobraževalni program Veterinarski tehnik. Modul Laboratorijsko delo v veterini)

Način dostopa (URL): <http://www.konzorcij-bss.bc-naklo.si/>. - Projekt Biotehniška področja, šole za življenje in razvoj

ISBN 978-961-93116-1-5 (pdf)

257869824

Ljubljana, 2011

© Avtorske pravice ima Ministrstvo za šolstvo in šport Republike Slovenije.

Gradivo je sofinancirano iz sredstev projekta Biotehniška področja, šole za življenje in razvoj (2008-2012).

Operacijo delno financira Evropska unija iz Evropskega socialnega sklada ter Ministrstvo za šolstvo in šport. Operacija se izvaja v okviru operativnega programa razvoja človeških virov za obdobje 2007 – 2013, razvojne prioritete: Razvoj človeških virov in vseživljenjskega učenja, prednostna usmeritev: Izboljšanje kakovosti in učinkovitosti sistemov izobraževanja in usposabljanja.

Vsebina tega dokumenta v nobenem primeru ne odraža mnenja Evropske unije. Odgovornost za vsebino dokumenta nosi avtor.

OSNOVE DELA V LABORATORIJU	4
LABORATORIJSKI PRIBOR IN STEKLOVINA	5
ČIŠČENJE LABORATORIJSKEGA PRIBORA	7
TEHTANJE.....	9
MIKROSKOPIRANJE.....	11
Načini mikroskopiranja	12
PRIPRAVA MIKROSKOPSKIH PREPARATOV	14
PIPETIRANJE.....	16
PRIPRAVA RAZKUŽIL	19
UPORABA GORILNIKA.....	20
ŠTETJE MIKROORGANIZMOV	21
MERJENJE VELIKOSTI MIKROORGANIZMOV MIKROMETRIJA	22
BAKTERIOLOŠKE PREISKAVE.....	24
DELO V MIKROBIOLOŠKEM LABORATORIJU	24
Navodila za delo v mikrobiološkem laboratoriju	25
Pravila prve pomoči	26
PRIPRAVA HRANILNIH PODLOG	28
OSNOVNA GOJIŠČA	28
PRIPRAVA KRVNEGA AGARJA	29
PRIPRAVA ČOKOLADNEGA AGARJA	30
PRIPRAVA ŠKROBNEGA AGARJA	30
PRIPRAVA GOJIŠČA ZA IZOLACIJO GLIV	30
SHRANJEVANJE GOJIŠČ	32
DOKAZOVANJE MIKROORGANIZMOV	33
IZOLACIJA ČISTE KULTURE.....	35
DOLOČANJE MORFOLOŠKIH ZNAČILNOSTI RAZLIČNIH KOLONIJ	36
IZOLACIJA ČISTE KULTURE Z REDČENJEM.....	38
BIOKEMIJSKA DEJAVNOST BAKTERIJ	41
IZDELAVA ANTIBIOGRAMA.....	43
BARVANJE BAKTERIJ	47
BARVANJE BAKTERIJSKIH RAZMAZOV	47
IDENTIFIKACIJA BAKTERIJSKE KULTURE.....	51
STERILIZACIJA	52
LITERATURA.....	55

OSNOVE DELA V LABORATORIJU

Verjetno je v laboratoriju med veterinarskimi tehniki in doktorji veterinarske medicine najbolj izraženo timsko delo. Medtem ko so veterinarji usposobljeni, da razlagajo rezultate testa, morajo biti veterinarski tehniki usposobljeni, da pridejo do teh rezultatov. Prav zato je izrednega pomena, da zna tehnik izpeljati test, ga ovrednotiti in razumeti pomembnost natančnosti. Vsak laik lahko sledi navodilom kuharske knjige, vendar bo le usposobljen tehnik znal sprejeti pravilno odločitev, ko gre pri postopku kaj narobe in bo prepoznal nenavaden rezultat testa.

Laboratoriji se med seboj razlikujejo tako po namembnosti kot po opremljenosti. Pomembno je, da ima vsak:

- prostor za sprejem vzorcev,
- prostor za nečisti in čisti del z vodo,
- omare s steklovino in z drugim priborom,
- omaro z reagenti,
- hladilnik,
- delovno površino opremljeno s plinom, z elektriko in mikroskopom,
- prostor z opremo za sterilizacijo.

V laboratoriju mora delo vedno potekati umirjeno, brez prerivanja in vpitja. Spoštovati je potrebno vse varnostne ukrepe, opisane v nadaljevanju.

LABORATORIJSKI PRIBOR IN STEKLOVINA

Laboratorijska steklovina je običajno narejena iz posebnega stekla, ki prenese višje temperature kot navadno steklo (150 °C). Uporabljamo jo za znanstvene in kemijske poskuse, različne preiskave in mikrobiološko delo. V zadnjem času je inventar izdelan tudi iz plastičnih materialov, predvsem zaradi cene in enostavnosti uporabe. Kljub temu plastika ne more zamenjati vseh izdelkov, ker je steklo sorazmerno inertno, transparentno, odpornejše na visoke temperature in okolju prijaznejše.

NALOGA

Spoznajte in narišite laboratorijsko steklovino in pribor: epruveto, čašo, bučko, erlenmajerico, stekleno paličico, predmetno in krovno stekelce, lij, merilni valj, petrijevko, pipete, stojalo za epruvete, stojalo za mežnar in privino, bakteriološko zanko, gorilnik, trinožno stojalo in mrežico ter tarilnico.

Epruvete so lahko različnih velikosti:

- majhne so 45 mm visoke, z notranjim premerom 5 mm, uporabljamo jih za shranjevanje kultur;
- serološke so 100 mm visoke in s premerom 8 mm, uporabljamo jih za serološke reakcije ali manjše količine gojišč;
- mlečne so 100 mm visoke in s premerom 10–18 mm, namenjene za odvzem mlečnih in krvnih vzorcev;
- bakteriološke so 160 mm visoke in s premerom 10–12 mm, uporabljamo jih za gojišča;
- večje uporabljamo za shranjevanje sterilnega pribora (kapilar).

Epruvete zapiramo z gumijastimi, s kovinskimi, plutovinastimi ali staničevinastimi zamaški. Kovinski in staničevinasti zamaški ne tesnijo, zato morajo tako zaprte epruvete vedno stati pokonci. Uporabljamo tudi plastične epruvete za enkratno uporabo.

Steklene **čaše** so lahko različnih velikosti. So ovalne oblike, imajo ravno dno in koničast rob za lažje izlivanje tekočin. Na njih je oznaka za količino tekočine.

Bučka je posoda z okroglim prostorom za izvajanje poskusov in z dolgim vratom. Lahko je različne velikosti in z oznako za maksimalno količino tekočine. Ima lahko brušen notranji rob vratu za zapiranje s steklenim zamaškom.

Erlenmajerica je podobna bučki, le da ima ravno dno, poševno stožčasto steno in kratek vrat. Volumen je lahko 25–5000 mL. Zapiramo jo lahko s staničevinastim, z gumijastim ali s plutovinastim zamaškom, ki ga pokrijemo s papirnatim klobukom in zavežemo z vrvico.

Stekleno paličico uporabljamo za mešanje vsebine in pri kuhanju.

Predmetna stekelca imajo površino 70 X 26 mm in so debeline 1 mm. Uporabljamo jih za pripravo mikroskopskih preparatov. En del je lahko iz brušenega stekla, namenjenega za pisanje po njem (za označevanje).

Krovna stekelca imajo površino 18 X 18 mm ali 22 X 22 mm in so debela 0.17 mm. Z njimi pokrivamo preparate na predmetnem stekelcu.

Lij je steklena posoda, ki služi za pretakanje tekočin ali za filtracijo.

Merilni valj je ozka in visoka posoda različnih volumnov za natančno odmero tekočin. Ima razširjen podstavek in koničast rob za lažje izlivanje tekočin. Ob strani ima graduirano skalo natančnosti do 0,1 mL. Lahko je tudi iz plastičnega materiala.

Petrijevke uporabljamo za trdna gojišča in shranjevanje ter gojenje različnih mikroorganizmov. So ploščate oblike z ožjim dnom in nekoliko širšim pokrovom. Rob pokrova je nižji od dna. Premer je lahko 50, 100 ali 200 mm. Uporabljamo predvsem plastične za enkratno uporabo, ki so sterilizirane že med izdelavo.

Pipete so različnih velikosti (1, 2, 5, 10; 20, 25, 50 ml). Poznamo merilne, ki imajo graduirano skalo z določeno natančnostjo, in polnilne, ki jih lahko natančno napolnimo samo z določenim volumnom. Shranjujemo jih v kasete za petrijevke ali vsako posebej zavito v papir. Pipetiramo z gumijastimi nastavki, ki delujejo po načelu tlaka in podtlaka.

Stojala za epruvete so lahko kovinska ali plastična in različne velikosti. Na njih postavimo epruvete med delom ali med shranjevanjem.

Stojalo za mežnar in privino služi za postavitve določene steklovine (npr. lija) na določeno višino. Sestavljeno je iz trinožne opore in visoke kovinske palice.

Bakteriološke (cepilne) zanke so izdelane iz nerjaveče žice, na koncu zakrivljene v zanko. Na drugem koncu je držalo, ki ne prevaja toplote. Z njimi prenašamo preiskovani material ali mikroorganizme na gojišča in pripravljamo mikroskopske preparate. Zanka je lahko kalibrirana tako, da ima zajeta kapljica volumen 0,01 mL. Uporabljamo tudi plastične zanke za enkratno uporabo, ki so že sterilizirane.

Gorilnik uporabljamo za sterilizacijo predmetov z ožiganjem in za preprečevanje kontaminacije kužnin in kultur. Uporabljajo se plinski, le izjemoma tudi alkoholni gorilniki.

Trinožno stojalo je izdelano iz kovine. Okrogli obroč, na katerega postavimo mrežico, je postavljen na tri "noge". Mednje postavimo gorilnik in na tako pripravljenem stojalu lahko kuhamo.

Mrežica je iz mrežaste kovine, na katero je v krogu nanesena keramika.

Tarilnice so porcelanaste skledice različnih velikosti, priloženo imajo pestilo. V njih lahko zdrobimo material za preiskavo.

Prijemalka za epruvete je lesena in podobna ščipalki za obešanje perila, le da ima en ročaj daljši. Uporabljamo jo za držanje epruvete nad plamenom.

ČIŠČENJE LABORATORIJSKEGA PRIBORA

V laboratoriju morata biti popoln red in čistoča, vsaka stvar mora biti na svojem mestu, vedno čista, da jo lahko v vsakem trenutku uporabimo. Po opravljenem delu moramo vse očistiti, postaviti na svoje mesto, izklopiti električno in plinsko napeljavo. Laboratorij zapustimo šele, ko je vse popolnoma urejeno.

Pri delu morata biti laboratorijska posoda in pribor popolnoma čista, brez sledi maščobe ali kakšne druge nečistoče. Na mastnih stenah pipet in biret se zadržujejo kapljice tekočin, zato prihaja do napačnih rezultatov, kar je predvsem problematično pri kvantitativnih analizah.

Obstajajo številne metode za čiščenje laboratorijske steklovine. Večinoma čistimo po naslednjem vrstnem redu:

- steklovino namočimo v raztopini detergenta, da odstranimo sledi maščobe in grobe nečistoče. Za zelo umazano steklovino lahko uporabimo natrijev ali kalijev lug, žvepleno kislino ali alkoholne raztopine;
- grobe nečistoče odstranjujemo mehansko s ščetkanjem in z drgnjenjem. Namesto tega lahko uporabimo ultrazvočni čistilec, ki mu dodamo detergent;
- s topilom odstranimo in speremo še zadnje nečistoče (z acetonom speremo občutljivo steklovino ali tako, ki takoj potrebujemo);
- na koncu speremo še z destilirano vodo;
- steklovino lahko posušimo tako, da jo postavimo narobe obrnjeno na stojalo za steklovino, ki ima po možnosti vgrajen sušilec na topli zrak. Lahko pa postavimo steklovino v vakuumski sušilec.

Material in inventar: steklovina, čistilo, razkužilo, ščetka, destilirana voda, sušilnik, sterilizator.

NALOGA

1. Z ustreznim čistilom (detergentom) in s ščetko odstranite vso umazanijo s steklovine.
2. Za 24–48 ur namočite očiščeno steklovino v razkužilo (krom žveplova kislina).
3. Dobro splahnite steklovino pod tekočo vodo in na koncu še z destilirano.
4. Steklovino postavite v sušilnik in po končanem sušenju na svoje mesto.
5. Steklovino za mikrobiološke preiskave ustrezno zaprite (zamašite, zavijte v papir, vložite v kovinske kasete) in sterilizirajte v avtoklavu 20 minut pri 121 °C.

TEHTANJE

Tehtanje je eno od najpomembnejših opravil pri kvantitativnih preiskavah. Uporabljamo lahko priročno električno tehtnico, ki ne zahteva posebnega znanja, ali analitično, ki je zahtevnejša za uporabo in točna do 0,1 mg.

Analitične tehtnice so zelo drage in da bi ohranile svojo natančnost, se moramo držati določenih pravil:

1. Tehtnica mora stati na trdni vodoravni podlagi in ne sme biti izpostavljena nobenim tresljajem ali spremembam.
2. Neobremenjena tehtnica mora biti vedno zaskočena. Pred postavitvijo ali jemanjem tudi najmanjše uteži mora biti zaskočena, ker se drugače uničuje površina vzmeti in tehtnica postaja vse manj občutljiva.
3. Da bi bila tehtnica zaščitena pred vlago, mora biti vedno zaprta, v zadnji del pa postavimo higroskopsko snov, ki jo po potrebi zamenjamo.
4. Snovi, ki jo tehtamo, ne postavljamo na posodo za tehtanje, temveč na ploščico ali tehtalni čolniček. Če tehtamo higroskopske snovi, jih damo v zaprte posodice za tehtanje. Pri tem vedno stehamo posodico za tehtanje in nato snov skupaj s posodico. Nato iz skupne teže odštejemo težo posodice in tako dobimo težo tehtane snovi.
5. Snov, ki jo tehtamo, vedno damo v posodo za tehtanje ali iz nje s tehtalno žlico.
6. Uteži, posodice in drugo postavimo na tehtnico s pinceto, ker so roke vedno malo vlažne in mastne.
7. Uteži postavimo na tehtnico vedno po vrstnem redu od najtežje k najlažji, dokler se ne vzpostavi ravnotežje.
8. Odčitavamo vedno pri zaprti tehtnici, ker že najmanjši premiki zraka (tudi dihanje tistega, ki tehta) lahko vplivajo na natančnost tehtnice.
9. Snovi, ki jih tehtamo, morajo biti ohlajene na sobno temperaturo, ker tople snovi vedno absorbirajo nekaj vlage iz zraka.
10. Tehtnica mora biti vedno čista in treba je paziti, da po njej ničesar ne stresemo.
11. Začeto tehtanje ne smemo nikoli prekiniti in vedno moramo tehtati z istimi utežmi.

12. Pri izredno natančnih tehtanjih je treba tehtati dvakrat.

Material in inventar: navadna in analitična tehtnica, tehtalni čolniček, snov za tehtanje.

NAVODILO

1. Pripravite vse potrebno za tehtanje.
2. Zatehtajte določeno količino snovi po prejšnjih navodilih.

MIKROSKOPIRANJE

Glavni deli mikroskopa

Mikroskop je nepogrešljiv del laboratorijske opreme. V šolskem laboratoriju uporabljamo svetlobni binokularni mikroskop. Sestavljen je iz optičnih, mehaničnih in pomožnih optičnih delov.

Optični deli so okularja in objektivni, ki imajo v svoji notranjosti sistem leč. Vsak od njih ima lastno povečavo, ki jo spreminjamo z menjanjem objektivov.

Okularja sta nameščena na zgornji del tubusa in imata 10-kratno povečavo.

Objektivi so pritrjeni na revolver in imajo 4-, 10-, 40- in 100-kratno povečavo.

Povečavo mikroskopa dobimo tako, da pomnožimo povečavo okularja s povečavo objektivna.

Pomožni optični deli mikroskopa so: kondenzor, zaslonka, filet in vir svetlobe.

Vir svetlobe je običajno lučka, vgrajena v nogo mikroskopa.

Kondenzor je sestavljen iz leč in se nahaja med virom svetlobe in mizico mikroskopa.

Njegova funkcija je, da enakomerno razprši svetlobo na opazovan predmet. Pritrjen je na stojalo mikroskopa in ima vijak za dvigovanje in spuščanje. Pri nameščanju kondenzorja gledamo v predmet in kondenzor z obračanjem vijaka dvigamo in spuščamo, dokler vidno polje ni enakomerno osvetljeno.

Z zaslonko uravnavamo snop svetlobnih žarkov tako, da jo odpiramo ali zapiramo. Nahaja se pod mizico in je pritrjena na stojalo.

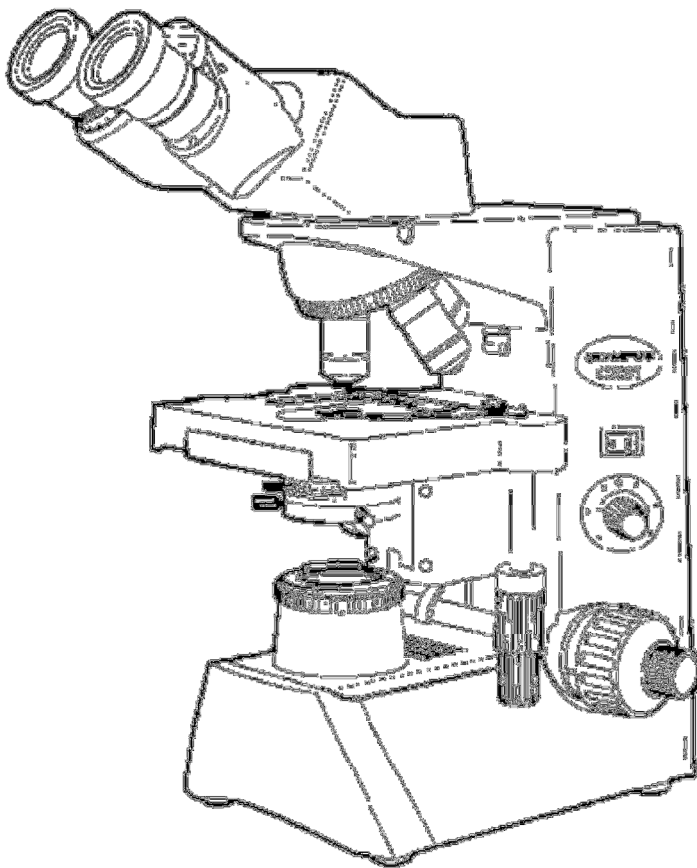
Filter se nahaja nad virom svetlobe ali pod kondenzorjem. Svetlobo obarva tako, da je podobna naravni.

Mehanični deli mikroskopa so: noga, stojalo, tubus, revolver, mizica, mikro- in makrovijak, pero za pritrditev predmetnega stekla, stikalo za vklop.

Na nogo je pričvrščeno stojalo mikroskopa. Na stojalo je z zgornje strani pritrjen tubus, nanj pa s spodnje strani revolver. Na sredini je pritrjena mizica, na kateri je pero. Ob strani ima mikroskop stikalo za vklop in električni kabel. Na stojalo sta nameščena makro- in mikrovijak. Služita za približevanje in oddaljevanje mizice in s tem izostritvi gledanega predmeta. Makrovijak uporabljamo samo pri najmanjši povečavi, mikrovijak pa pri vseh preostalih.

NAVODILO

Na mikroskopu določite posamezne dele mikroskopa.



Slika 1: Mikroskop

Načini mikroskopiranja

Mikroskopiranje v svetlem vidnem polju

S spreminjanjem objektivov lahko sliko različno povečamo (40-, 100-, 400- in 1000-krat). Prve tri povečave so “suhe” in jih uporabljamo za male in srednje povečave. 1000-kratna

povečava je imerzijska in jo uporabljamo za velike povečave. Povečava in kakovost slike sta odvisni od kakovosti okularjev in objektivov.

Pri uporabi suhih objektivov je med lečo objektiva in preparatom zrak. Ta nima enakega lomnega količnika svetlobe kot steklo. Zato se del svetlobnih žarkov, ki prehaja skozi opazovani predmet, razprši in ne tvori slike.

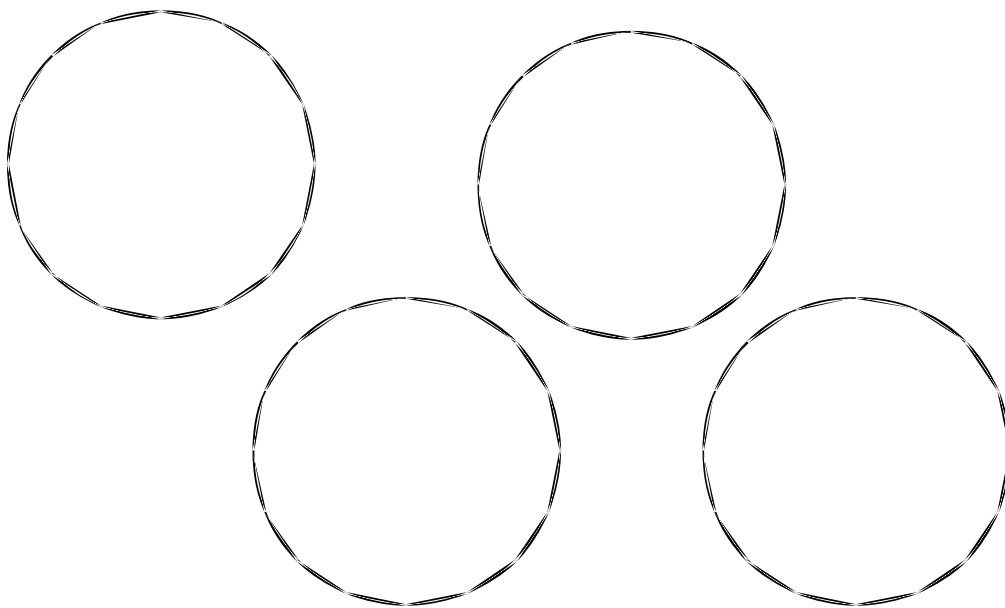
Ko uporabljamo imerzijski objektiv, uporabljamo tudi imerzijsko olje, ki ima enak lomni količnik kot steklo. Imerzijski objektiv potopimo v imerzijsko olje na opazovanem predmetu in s tem preprečimo lomljenje svetlobnih žarkov. Zato se zmanjša razpršenost in slika je jasnejša kljub večji povečavi. Ko mikroskopiramo z imerzijskim mikroskopom, je slika lepša, če dvignemo kondenzor in odpremo zaslonko. Kakor je povečava manjša, zapiramo zaslonko in spuščamo kondenzor.

Po uporabi moramo imerzijsko olje popolnoma odstraniti z objektiva, saj se sicer olje zasuši in objektiv ni več uporaben.

NALOGA

Poiščite sliko pod 40-, 100-, 400- in 1000-kratno povečavo ter narišite sliko.

Material in inventar: trajni histološki preparati, mikroskop, imerzijsko olje, staničevina.



Slika 2: Preparati pod različnimi povečavami

PRIPRAVA MIKROSKOPSKIH PREPARATOV

Preparate pripravimo na predmetnem stekelcu in ponavadi pokrijemo s krovnim stekelcem. Pomembno je, da so stekelca popolnoma čista. Lahko jih operemo z milom in razmastimo še s 70 % etanolom. Če pripravljamo več mikroskopskih preparatov naenkrat, jih moramo označiti z oznako na robu predmetnega stekelca.

Nativni mikroskopski preparat

Z nativnimi mikroskopskimi preparati opazujemo žive neobarvane bakterije, glive ali praživali. Opazujemo njihovo obliko, gibanje in medsebojni odnos.

Poznamo dva nativna mikroskopska preparata: pokrito in visečo kapljico.

Pokrito kapljico pripravimo tako, da na razmaščeno predmetno stekelce kanemo kapljico suspenzije oz. tekočega gojišča z mikroorganizmi in pokrijemo s krovnim stekelcem. Krovno stekelce položimo na predmetnega nad kapljico pod kotom 45° in ga rahlo spuščamo tako, da ne nastanejo zračni mehurčki.

Za **visečo kapljico** potrebujemo predmetno stekelce, ki ima v sredini vdolbinico. Okoli nje namažemo vazelin. Kapljico z mikroorganizmi kanemo na krovno stekelce in predmetno stekelce z vdolbinico položimo na krovnega tako, da je kapljica na sredini vdolbinice. Predmetno stekelce hitro obrnemo, da kapljica obvisi na krovnem stekelcu.

Obarvani mikroskopski preparati

Preparate obarvamo zato, da predmet lažje opazujemo, ugotovimo njegovo obliko, strukturo in posamezne dele (npr. celic). Pripravimo jih tako, da najprej na predmetno stekelce nanesemo vzorec, ga fiksiramo in glede na preiskavo ustrezno obarvamo.

Pri nekaterih vajah bomo opisali posebnosti barvanja za posamezne vzorce.

Material in inventar: suspenzija kvasovk, suspenzija praživali, listi ciklame, predmetna in krovna stekelca, vazelin, nasičena raztopina soli, destilirana voda, kapalke, pinceta, preparirna igla, mikroskop, vpojni papir.

NALOGA

1. Pripravite nativni preparat kvasovk in praživali. Poiščite sliko pod 400-kratno povečavo.
2. Pripravite visečo kapljico kvasovk in praživali. Poiščite sliko pod 100-kratno povečavo.
3. Liste ciklame preparirajte in naredite tanek nativni preparat.
4. Poiščite sliko pod 100-kratno povečavo.
5. Na eno stran krovnega stekelca kanite 1–2 kapljici nasičene raztopine. Z druge strani krovnega stekelca položite vpojni papir in opazujte dogajanje skozi mikroskop.
6. Na strani, kjer je bil papir, sedaj kanite 3–4 kapljice destilirane vode, na nasprotno stran pa položite vpojni papir. Opazujte dogajanje skozi mikroskop.

PIPETIRANJE

Pipete so laboratorijski pripomočki za odmerjanje in prenašanje določenega volumna tekočin. Točen volumen kažejo le, če ima tekočina, ki jo pipetiramo, sobno temperaturo oz. temperaturo 20 °C. Poleg temperature in volumna mora imeti pipeta tudi oznako, ki nam pove, ali je treba tekočino po napolnitvi pipete do konca izprazniti (izpihati) ali pa jo pustimo, da sama izteče iz pipete in v njej ostane le še določen, preračunan volumen tekočine.

Oznake na pipetah so angleške kratice: IN, EX, TC ali TD.

Oznaki **IN** in **TC** pomenita, da je treba vsebino pipete popolnoma izpihati. Pravi je tisti volumen, ki je v pipeti. Angleška beseda IN v slovenskem jeziku pomeni v. Kratica TC izhaja iz angleške besedne zveze *to contain* in pomeni vsebovati.

Oznaki **EX** in **TD** pomenita, da moramo tekočino pustiti, da sama izteče iz pipete, v pipeti pa ostane določen stalni volumen, ki ga ne smemo izpihati in ni vračunan v volumen, ki je napisan na pipeti. Angleška beseda EX pomeni v slovenskem jeziku iz, kratica TD pa izhaja iz angleške besedne zveze *to discard* in pomeni zavreči.

Poznamo tri vrste pipet: merilno

polnilno

avtomatsko

Razlikujejo se po namembnosti in natančnosti.

Merilno uporabljamo, ko želimo z isto pipeto odmerjati določeno količino tekočine ali manjšo od predvidene s samo pipeto.

Polnilno pipeto uporabljamo za pipetiranje tolikšne količine tekočine, kot je s pipeto predvideno.

Z **avtomatskimi** pipetami lahko odpipetiramo samo tisti volumen, ki smo ga določili oz. nastavili na držalu pipete. Sestavljene so iz več delov in potrebujemo „tipse“, v katere pipeta potegne želen volumen tekočine. Mikropipete so namenjene za pipetiranje zelo majhnih volumnov vzorca 1–1000 µL.

Pipetiranje z avtomatskimi pipetami

Večina avtomatskih pipet ima dve stopnji pipetiranja, da lahko iz pipete po potrebi iztisnemo tudi zadnjo kapljico tekočine (podobno kot pri steklenih pipetah z oznako IN, ko moramo zadnjo kapljico izpihati še z usti). Ko pipetiramo, moramo tekočino povleči samo do prve stopnje, da ne dobimo napačnega volumna. Vsebine z avtomatsko pipeto ne smemo potegniti prehitro, ker lahko del tekočine prodre v notranjost pipete in jo onesnaži, pipeta pa se sčasoma zamaši. Onesnažene pipete s kužnim materialom so tudi vir okužbe. Zato je treba avtomatsko pipeto po končanem delu, pogosto pa tudi že med njim, očistiti in razkužiti s 70 % etanolom. Paziti moramo, da nastavki za pipetiranje niso zamašeni, da ni zamašena odprtina v pipeti in da pipeta ne pušča. Pipete, ki imajo nameščene steklene kapilare, nimajo dveh stopenj pipetiranja, ker se iz njih iztisne vsa vsebina. Te pipete moramo na koncu izplakniti z destilirano vodo in vodo pustiti v notranjosti kapilare do naslednje uporabe.

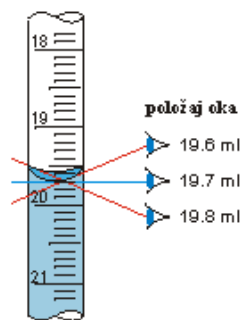
NALOGA

Narišite pipete ter jih glede na vrsto in velikost napolnite z določeno količino vode.

1. Na vrh pipete natakните žogico za pipetiranje.
2. Pritisnite na črko A in izpraznite zrak iz žogice.
3. Postavite konico pipete v tekočino za pipetiranje in nežno pritiskajte na črko S, da začne podtlak vleči tekočino v pipeto. Če premočno stisnete ali predolgo držite, boste v žogico potegnili tekočino. Zato je lahko žogica neuporabna za nadaljnje delo in lahko se okuži s pipetiranim materialom. V pipeto potegnite več tekočine, kot je predvideno v nalogi.
4. Dvignite pipeto v višino oči in s pritiskom na črko D počasi spuščajte tekočino, dokler ne bo meniskus tekočine na črti zelenega volumna.
5. Vajo ponovite s črpalko za pipetiranje.

Za natančno pipetiranje je pomembno, da je meniskus tekočine, ki jo pipetiramo, na izbrani črti (določena količina) in da so oči v pravilnem položaju (kot na sliki).

Pipete se razlikujejo glede na maksimalno količino tekočine, ki jo je proizvajalec predvidel (npr. 1 mL, 2 mL, 5mL, 20 mL itd.).



Slika 3: Pipeta

PRIPRAVA RAZKUŽIL

V laboratoriju uporabljamo že pripravljena razkužila ali jih sproti pripravimo z redčenjem ali mešanjem različnih snovi. Sproti pripravljamo tista, ki v razredčeni obliki niso dalj časa obstojna. Pri tako pripravljenih razkužilih moramo napisati na embalažo datum, ko smo razredčino pripravili. Pri delu in pripravi razkužil moramo upoštevati navodila za varno delo in uporabljati zaščitno opremo (halje, rokavice, očala).

Vodikov peroksid (H_2O_2) uporabljamo predvsem za čiščenje in razkuževanje okuženih ran, sluznice in oči in tudi za določanje biokemične aktivnosti bakterij. Učinkovitost, čeprav kratkotrajna, je v prostem OH^+ radikal in peni, ki odstrani nečistoče in bakterije s površine rane.

Krom žveplovno kislino uporabljamo za odstranjevanje nečistoč (krvi, maščob idr.) s steklovine. To je zelo močna kislina in treba je upoštevati vsa pravila, ki veljajo za ravnanje z jedkimi snovmi.

Virucid extra je razkužilo v prahu, ki ga lahko glede na koncentracijo uporabljamo za različne namene. Površine opreme, pribor in zrak (v obliki razpršila) razkužujemo z 0,5 % raztopino, površine tal pa z 1 % raztopino. Učinkovito in hitro uniči vse znane viruse pa tudi grampozitivne in gramnegativne bakterije ter glivice.

Material in inventar: merilni valj, pipete, čaše, steklenice z brušenim vratom in zamaškom, destilirana voda, 30 % H_2O_2 , kalijev ali natrijev bikarbonat, žveplena kislina, Virucid extra.

NALOGA

1. Imate 30 % H_2O_2 . Pripravite 100 mL 3 % H_2O_2 . 10 mL 30 % H_2O_2 zmešajte z 90 mL destilirane vode.
2. Pripravite krom žvepleno kislino. 120 g kalijevega ali natrijevega bikarbonata raztopite v 1 L destilirane vode in mu počasi dodajajte 1200 g žveplene kisline. POZOR! Ob mešanju tekočin se sprošča toplota.
3. Pripravite 1,5 L 0,5 in 1 % raztopine Virucid extra. Zatehtajte 7,5 oz. 15 g Virucid extra in dodajte ob mešanju do 1,5 L destilirano vodo.

UPORABA GORILNIKA

V laboratoriju uporabljamo gorilnik za segrevanje, kuhanje, sterilizacijo (npr. bakterijske zanke) in za zagotavljanje asepticnosti delovnega okolja.

Preden prižgemo plin, odpremo glavni ventil in rumeni ventil pri samem gorilniku. Ventil je odprt, ko je vzporedno s cevjo napeljave. Preverimo, ali je na gorilniku dotok zraka zaprt. Odpremo ventil (dvakrat zavrtimo) na gorilniku in prižgemo vžigalico. Približamo jo vrhu gorilnika in stisnemo varovalo na gorilniku. Plin začne izhajati iz gorilnika in se vžge. Tak plamen ni primeren za delo. Odpremo dotok zraka in plamen postane močan (videti je, kot bi bil plamen v plamenu). Na vrhu notranjega plamena je najvišja temperatura in to točko uporabljamo npr. za ožiganje bakteriološke zanke. 20 cm okoli gorilnika se ustvari aseptično okolje, primerno za mikrobiološko delo.

Ko gorilnika ne potrebujemo več, zapremo dotok zraka in ventil na samem gorilniku. Na gorilniku bo še naprej gorel le plamenček, ki nam omogoča, da plamen hitro ponovno prižgemo. Če gorilnika ne bomo več uporabljali, zapremo še ventil na cevi za dovod plina.

Material in inventar: gorilnik, vžigalice, bakteriološka zanka, erlenmajerica, krpa.

NALOGI

1. Ponazorite prižiganje gorilnika in ugotovite, na kateri točki je plamen najmočnejši.
2. Prikažite ožiganje bakteriološke zanke in vratu erlenmajerice.

ŠTETJE MIKROORGANIZMOV

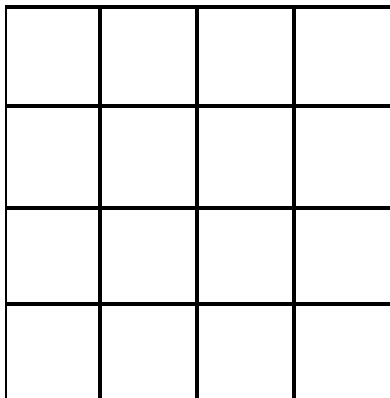
Za štetje mikroorganizmov uporabljamo Bürker-Türkovo komoro. Sestavljena je iz objektnega stekelca, na katerem se nahaja mreža, in krovnega stekelca.

Sredinska mreža je sestavljena iz 16 velikih kvadratov, vsak je razdeljen na 25 manjših kvadratov. Skupaj torej $25 \times 16 = 400$ kvadratov. Stranica enega kvadrata je $1/20$ mm. Površina enega kvadrata je torej $1/400$ mm². Ker je takih kvadratov štiristo, je skupna površina mreže $1/400 \times 400 = 1$ mm². Polje, na katerem je mreža, je za $1/10$ mm nižje od sosednjih polj, tako da je prekrit točno določen volumen tekočine, ko krovno stekelce prekrije objektnega. Ker je površina mreže 1 mm², višina stolpca tekočine pa $0,1$ mm, je volumen kapljice, ki je zaprta v komoro, 1 mm² x $0,1$ mm = $0,1$ mm³. Ta volumen je osnova za preračunavanje skupnega števila celic v 1 cm³ oz. v 1 mL tekočine.

Material in inventar: Bürker-Türkova komora, krovno stekelce, suspenzija kvasovk in mikroskop.

NALOGA

1. Bürker-Türkovo komoro in krovno stekelce dobro očistite s 70% alkoholom.
2. Poiščite mrežo pod 400-kratno povečavo.
3. S kapalko nanesite suspenzijo mikroorganizmov (kvasovk) na Bürker-Türkovo komoro in pokrijte s krovnim stekelcem. V preparatu ne sme biti zračnih mehurčkov.
4. Preštejte, koliko je celic v 8. kvadratih in izračunajte povprečje v enem kvadratu. Če se kakšna kvasovka nahaja na črti, štejemo kvasovke, ki se nahajajo na zgornji in desni črti kvadrata, v ta kvadrat. Preračunajte, koliko je celic v 1 mL tekočine.



MERJENJE VELIKOSTI MIKROORGANIZMOV

MIKROMETRIJA

Velikost mikroorganizmov je v mikrobiologiji zelo pomembna. Določimo jo lahko z mikroskopom, ko mikroorganizme merimo z okularnim merilom. Ne glede na izbrano povečavo mikroskopa ima vsak mikroskop lastno povečavo, ki se lahko malenkostno razlikuje od predvidene. Zato moramo, preden začnemo meriti velikost bakterij ali kvasovk (v μm), ugotoviti, koliko μm je velik razdelek na okularnem merilu.

Mikroskop umerimo z objektnim merilom. Objektni mikrometer je objektno steklo, ki ima vgravirano skalo, razdeljeno na 100 razdelkov, skupne dolžine 1 mm. En razdelek torej meri 0,01 mm oz. 10 μm .

Material in inventar: okularno in objektno merilo, predmetno in krovno stekelce, suspenzija kvasovk, mikroskop.

NALOGA

1. V okular vstavite okularni mikrometer, objektni mikrometer pa položite na mizico mikroskopa.
2. Izostrite sliko (400-kratna povečava) in s premikanjem mizice poravnajte okularni in objektni mikrometer tako, da se začetni črtici (začetka skale) ujemata, merili pa sta vzporedni.
3. Poiščite črtico, kjer se razdelka na objektnem in okularnem merilu spet ujemata.
4. Preštajte število razdelkov v objektnem merilu med dvema mestoma, kjer se črtici prekrivata, in si število zapišite. Preštajte še število razdelkov okularnega merila med dvema mestoma prekrivanja in si tudi to število zapišite.
5. Izračunajte, kolikšno razdaljo v objektnem stekelcu predstavlja razdelek okularnega merila, tako da število razdelkov na objektnem merilu pomnožite z 10 μm in delite s številom razdelkov na okularnem mikrometru.

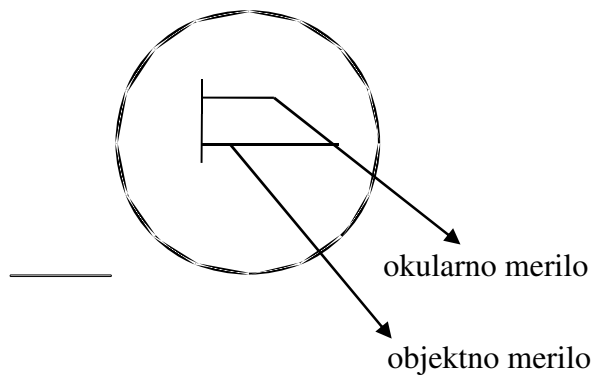
6. Dobljeni koeficient (**k**) nam pove, kolikšni dolžini (v μm) ustreza en razdelek okularnega merila.
7. Pripravite preparat kvasov (suspenzijo).
8. Pod 400-kratno povečavo poiščite sliko kvasovk.
9. Preštajte, koliko razdelkov okularnega merila zavzema ena kvasovka.
10. Izračunajte velikost kvasovk, tako da število dobljenih razdelkov pomnožite s koeficientom (**k**).

število razdelkov objektnega merila x 10 μm

Koeficient (**k**) = -----

število razdelkov okularnega merila

velikost mikroorganizma (kvasovke) = število razdelkov okularnega merila x **k**



Slika 4: Izračun velikosti kvasovke

BAKTERIOLOŠKE PREISKAVE

Sposobnost veterinarja, da postavi diagnozo, oceni in zdravi kužno bolezen, je večja, če uporablja laboratorijske teste. Natančnost in vrednotenje teh testov pa je odvisna od sposobnosti veterinarskega tehnika, odgovornega za laboratorijske preiskave. Vsak veterinarski tehnik, ki dela v laboratoriju, mora biti usposobljen za izvedbo in ovrednotenje takšnih testov. Prav zaradi izredno velikega števila mikroorganizmov, kot tudi podobnosti med njimi, lahko pride do napak, česar v praksi ne smemo dovoliti. Napake nastajajo pri določanju gram statusa bakterij, v rasti kolonije na gojišču, spremembi glede na okolje, biokemični dejavnosti idr.

Pomembna je tudi odgovornost veterinarskega tehnika, ki dela s kužnim materialom, da ne okuži drugih ljudi, okolice ali samega sebe. Zato mora spoštovati pravila aseptičnega dela in varstva pri delu.

V mikrobiološki laboratorij lahko pošljemo pravzaprav vse vzorce, ki jih lahko živali odvezamemo. Najpogosteje preiskujemo vzorce urina, brise s kože ali sluznice in mleko. Manj pogosto preiskujemo vzorce krvi, blata ali tkiv.

Laboratorijski delavci se pred vstopom v laboratorij preoblečejo v zaščitno obleko, svojo pa pustijo v za to določenem prostoru. Delajo na očiščenih in razkuženih površinah ob močnem ognju, ne več kot 20 cm stran od ognja. Ves pribor, ki ga uporabijo med preiskavo, morajo razkužiti in sterilizirati. Gojišča za enkratno uporabo in vzorce morajo po uporabi neškodljivo uničiti (avtoklavirati). Vse površine po opravljenem delu razkužijo, izklopijo električno in plinsko napeljavo ter prižgejo ultravijolično luč za razkuževanje zraka v prostoru.

DELO V MIKROBIOLOŠKEM LABORATORIJU

Mikrobiološki laboratorij je prostor za mikrobiološke preiskave. Glede na mikroorganizme, ki jih preiskujemo, ločimo bakteriološke, virološke in mikološke laboratorije. Zaščitni ukrepi v laboratoriju so odvisni od patogenosti mikroorganizmov.

V laboratoriju pazimo na red in čistočo. Ves čas ravnamo tako, da preprečujemo okužbo ljudi, opreme in materiala. S saprofitskimi in manj patogenimi mikroorganizmi delamo na delovnih

površinah (mizah, pultih), ki niso posebej zaščitene. Z bolj patogenimi mikroorganizmi delamo v brezprašnih komorah, ki zagotavljajo boljšo zaščito delavcev, kužnine in okolice. S posebno nevarnimi mikroorganizmi delamo v prostorih, ki so popolnoma izolirani. Vanje vstopamo in izstopamo skozi predprostore za razkuževanje, kjer se delavci preoblečejo in razkužijo. Ves kužni material iz prostora gre takoj v sterilizacijo. Stene, tla in delovne površine morajo biti iz materiala, ki ga z lahkoto razkužimo.

V laboratoriju je potrebna enakomerna dnevna svetloba. Okna morajo biti velika in morajo gledati na sever ali na severovzhod. Za eno delovno mesto potrebujemo 16 m². Vsako delovno mesto mora imeti priključek za elektriko, plin in vodo. Poleg miz ali pultov so v laboratoriju mikroskopi, omare z najnujnejšim laboratorijskim priborom, termostati za inkubacijo bakterij in hladilniki za shranjevanje materiala in po potrebi še druga oprema.

Navodila za delo v mikrobiološkem laboratoriju

1. V laboratoriju imamo oblečeno čisto in zlikano haljo, ki mora biti zapeta. Rokavi morajo prekriti spodnje oblačilo.
2. V laboratoriju ne jemo, ne pijemo in ne kadimo. Vanj prinesemo samo delovni zvezek in pisalo. Drugo pustimo v garderobni omarici.
3. Dolge lase moramo speti, da ne bi padli po kužnem materialu ali da jih ne bi ožgali na gorilniku.
4. Z rokami se ne dotikamo obraza (predvsem ust in oči).
5. Med delom morajo biti vrata in okna zaprta, da zrak ne prenaša mikroorganizmov. Zato se po laboratoriju tudi ne sprehajamo po nepotrebnem.
6. Kužnino in kužen pribor odlagamo na posebne pladnje oz. v posode z razkužilom.
7. Kužnine ne zlivamo v odtok.
8. Kovinske predmete sproti steriliziramo nad plamenom (bakteriološke zanke, pincete). Ožigamo tudi vratove erlenmajeric in epruvet.
9. Pri delu upoštevamo načela asepse (delo ob plamenu do 20 cm).
10. Če se s kužnino dotaknemo kože ali sluznice, moramo takoj povedati učitelju in upoštevati navodila za prvo pomoč.

11. Če kaj razbijemo ali razlijemo kužnino, obvestimo učitelja. Nato mesto pokrijemo s staničevino ali papirnatimi brisačami in prelijemo z razkužilom. Ko se razkužilo posuši, prenesemo material na mesto, kjer ga lahko zažgemo.
12. Po končanem delu pospravimo delovno površino in jo razkužimo. Izklopimo elektriko, plin in vodo.
13. Preden zapustimo laboratorij, si roke umijemo in prelijemo z razkužilom, ki se mora na rokah posušiti.
14. Pri delu s patogenimi mikroorganizmi uporabljamo kapo, masko, rokavice in predpasnik.

NALOGA

Razložite, zakaj je treba upoštevati navodila za delo v mikrobiološkem laboratoriju.

Pravila prve pomoči

Pri **okužbi ustne votline** kužnino takoj izpljunemo v posodo z razkužilom. Usta speremo (grgramo) s svežo 0,1 % raztopino kalijevega permanganata ali 1 % raztopino vodikovega peroksida z dodatkom pepsina. To večkrat ponovimo (vsaj 3-krat) in vedno izpljunemo v posodo z razkužilom. Nato nekaj minut žvečimo suh kruh ali živalsko oglje, ki ga izpljunemo in usta speremo z vodo. Pri sumu, da je kužnina zašla globlje v prebavni trakt, je treba popiti vsaj 0,5 L slane vode in poiskati zdravniško pomoč.

Pri **okužbi nepoškodovane kože** mesto večkrat polijemo z razkužilom in ga pustimo na koži, da izhlapi. Če sumimo, da imamo opravka z mikroorganizmi, ki lahko prodrejo skozi nepoškodovano kožo, poiščemo zdravniško pomoč.

Pri **okužbi rane** pustimo, da kri neovirano izteka iz rane, saj jo tako tudi čisti. Iztekati mora v posodo z razkužilom. Rano razkužimo z jodovim razkužilom, jo sterilno obvežemo in poiščemo zdravniško pomoč.

NALOGA

Razložite, v katerih primerih lahko pride do okužbe delavca v laboratoriju.

PRIPRAVA HRANILNIH PODLOG

Za gojenje bakterij v laboratoriju uporabljamo posebna gojišča oz. hranilne podloge. Uporabljamo jih za: izolacijo bakterij iz kužnine, gojenje čistih kultur, determinacijo in identifikacijo bakterijskih vrst, njihovo shranjevanje in izdelavo antibiograma. Vsako gojišče mora biti sterilno in do uporabe shranjeno v hladilniku.

Po sestavi delimo gojišča na: - naravna (mleko, krompir itd.)

- umetna (hranilni, krvni agar itd.)

Po konsistenci delimo bakterijska gojišča na:

- tekoča
- poltekoča oz. poltrdna
- trdna

OSNOVNA GOJIŠČA

Osnovna gojišča uporabljamo za rast večine bakterij in so po sestavi najenostavnejša.

Peptonska voda je raztopina 1 % peptona in 0,5 % NaCl v destilirani vodi. Pepton je vir beljakovin, ki jih dobijo iz mišic, fibrina, kazeina, soje in se razkrojijo s pepsinom, tripsinom in kislinami. Pred uporabo peptonsko vodo steriliziramo v avtoklavu in sterilno napolnimo epruvete. To gojišče spada med tekoča gojišča.

Nevtralni bujon je raztopina 1 % peptona in 0,5 % NaCl v mesni juhi. Mesno juho (*bouillon*) dobimo tako, da vzamemo 1 del nemastnega mesa s kostmi in vezmi in kuhamo v 2 delih vode 1 uro ali uporabimo mesni ekstrakt v 0,5 % raztopini. Ohlajeno juho filtriramo in ji dodamo pepton in NaCl. Pred uporabo bujon steriliziramo v avtoklavu in sterilno napolnimo epruvete. Tudi to gojišče spada med tekoča gojišča.

Nevtralni agar pripravimo tako, da nevtralnemu bujonu dodamo agaragar. Agaragar pridobivajo iz posebnih alg in gojišču da potrebno trdnost. Nevtralnemu bujonu dodamo 1,5–

3,5 % agarja, če hočemo dobiti trdno gojišče. Če pa želimo poltrdno gojišče, dodamo 1 % agarja. Agar se v vodi stopi šele pri 100 °C in začne strjevati pri 45 °C.

Danes dobimo na tržišču že pripravljena gojišča v prahu, ki jim dodamo ustrezno količino destilirane vode, steriliziramo v avtoklavu in razlijemo v sterilne posode.

Material in inventar: erlenmajerica, steklena paličica, sterilne PVC-petrijevke, gojišče v prahu (hranilni agar), destilirana voda, tehtnica, tehtalna žlica, merilni valj, alufolija, avtoklav, gorilnik, alkoholni flomaster, hladilnik.

NALOGA

1. Izračunajte, koliko hranljivega agarja morate zatehtati za pripravo 200 mL gojišča.
2. Zatehtajte ustrezno količino gojišča v prahu in dodajte mrzlo destilirano vodo. Mešajte s stekleno paličico, da se hranljivi agar v vodi raztopi. Erlenmajerico zamašite z alufolijo in avtoklavirajte (15–20 minut pri 121 °C).
3. Sterilno razlijte v predhodno označene in sterilne petrijevke, počakajte, da se agar strdi in shranite v hladilnik.
Gojišče razlivamo aseptično, in sicer 20 cm od plamena. Pripravimo si petrijevke po dve skupaj (eno na drugi).
4. Erlenmajerico zavijte v kuhinjsko krpo, odstranite zamašek iz alufolije in potegnite vrat erlenmajerice skozi plamen. Vlijte 0,5 cm agarja v spodnjo petrijevko in nato še v zgornjo. Postopek ponavljajte toliko časa, dokler ne porabite vsega hranilnega agarja.
5. Ko se agar strdi, obrnite petrijevke, zavijte v alufolijo in napišite datum priprave. Tako pakirane hranilne podloge shranimo v hladilnik pri +4 °C za največ 3 mesece.

PRIPRAVA KRVNEGA AGARJA

Osnovna gojišča lahko obogatimo z dodajanjem različnih snovi. Za gojenje zahtevnejših ali patogenih bakterij lahko uporabimo krvni agar.

Za pripravo potrebujemo citratno ali defibrinirano kri. Citratna kri je polna kri, ki ji je dodana citratna sol, ki prepreči koagulacijo krvi. Nekatere bakterije moti prisotnost antikoagulantov,

zato take krvi ne uporabljamo pogosto. Defibrinirano kri dobimo tako, da kri takoj po odvzemu mešamo z leseno sterilno palčko, na katero se prime fibrin. Pogosteje uporabimo kri, ki med odvzemom teče v transfuzijsko steklenico, v kateri so steklene kroglice. Steklenico neprestano pretresamo in fibrin se nabere na kroglicah, ki jih nato odstranimo. Nato pripravimo hranilni agar in mu pri temperaturi 45–50 °C dodamo 5 % defibrilirane krvi. Najpogosteje uporabljamo ovčjo kri, lahko tudi govejo ali konjsko.

PRIPRAVA ČOKOLADNEGA AGARJA

Začetna priprava čokoladnega agarja je ista kot priprava krvnega. Razlika je v tem, da, ko standardiziranem krvnem agarju dodamo kri, segrejemo mešanico na 60 °C, da eritrociti popokajo in gojišče dobi lepo čokoladno barvo. Tak agar uporabljamo za zelo občutljive in običajno bolj virulentne povzročitelje.

Material in inventar: krvni agar, destilirana voda, erlenmajerica, steklena paličica, tehtnica, tehtalna žlička, citratna oz. defibrinirana kri, avtoklav, gorilnik, krpa.

NALOGA

Pripravite krvni in čokoladni agar.

PRIPRAVA ŠKROBNEGA AGARJA

Škrobni agar pripravimo tako, da osnovnemu hranilnemu agarju dodamo 10 % škroba v prahu. Tako gojišče uporabljamo za bakterije ali kvasovke, ki za svojo rast nujno potrebujejo škrob, ali za dokazovanje biokemične dejavnosti mikroorganizmov (amilaze).

PRIPRAVA GOJIŠČA ZA IZOLACIJO GLIV

Glive rastejo razmeroma počasi; nekatere zrastejo v nekaj dneh, druge v nekaj tednih. Ker je v kužnini, iz katere želimo izolirati glive, velika verjetnost prisotnosti bakterij, te hitreje rastejo, porabijo vso hrano in običajno zatrejo rast gliv. Zato je potrebno gojišču dodati antibiotik, ki zavre rast bakterij, vendar ne deluje na glive.

Material in inventar: erlenmajerica, steklena paličica, sterilne PVC-petrijevke, gojišče v prahu (hranilni agar), škrob v prahu, kloramfenikol, destilirana voda, tehtnica, tehtalna žlica, merilni valj, alufolija, avtoklav, gorilnik, alkoholni flomaster, hladilnik.

NALOGA

1. V erlenmajerico zatehtajte ustrezno količino hranilnega agarja in škroba v prahu.
2. Dolijte 500 mL destilirane vode. Lahko dodate še 10 g glukoze.
3. Dobro premešajte s stekleno paličico in dodajte kloramfenikol (0,03 g na 0,5 L).
4. Erlenmajerico zamašite z alufolijo in postavite v avtoklav za 20 minut na 121 °C.
5. Po končanem avtoklaviranju aseptično razlijte gojišče v sterilne petrijevke.

Pripravite gojišče za izolacijo gliv.

SHRANJEVANJE GOJIŠČ

Po pripravi trdna gojišča najprej pustimo na sobni temperaturi, da se strdijo. Nato petrijevke obrnemo tako, da je gojišče na zgornji strani petrijevke. Pri shranjevanju petrijevok nastaja kondenz, ki ne sme kapljati po gojišču. Sterilna gojišča do uporabe shranjujemo v hladilniku. Več gojišč skupaj zavijemo v alufolijo, napišemo, kakšno gojišče smo zapakirali in datum priprave. Do uporabe jih shranjujemo v hladilniku pri +4 °C najdlje 3 mesece.

DOKAZOVANJE MIKROORGANIZMOV

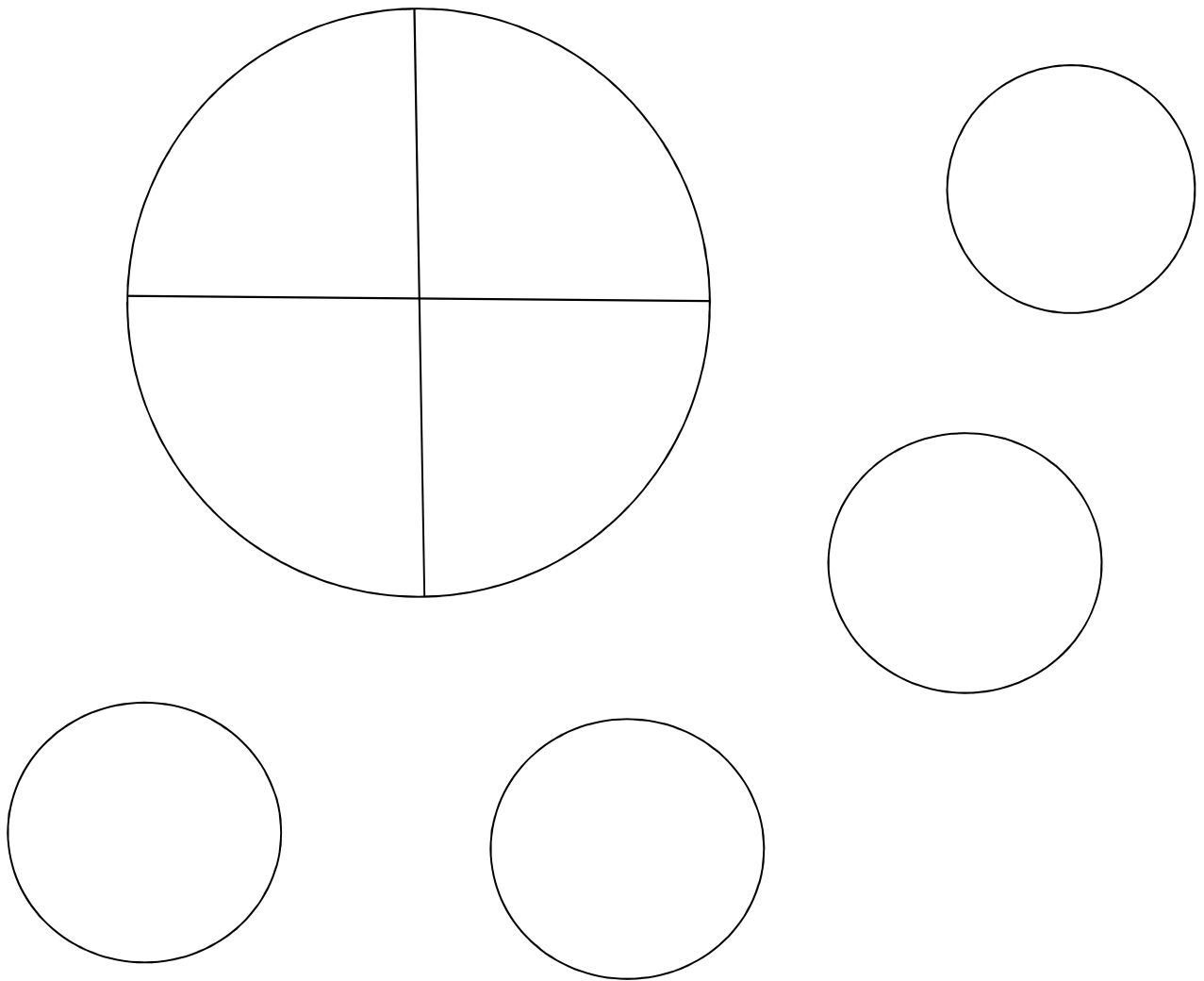
Mikroorganizmi se nahajajo povsod okoli nas, na koži in sluznici. Zaradi majhnosti jih ne moremo videti s prostim očesom. Vidni postanejo pod določeno mikroskopsko povečavo in s posebnim barvanjem ali ko se razmnožijo (kolonije) in postanejo vidni.

Večina bakterij zraste na umetnih gojiščih pri optimalnih razmerah inkubacije v 24 urah. Takrat na trdnih gojiščih rastejo v kolonijah. Kolonija je skupek bakterijskih celic, ki nastane po ustreznem času inkubacije iz ene same bakterijske celice, ki smo jo cepili na gojišče in jo sestavljajo samo njeni potomci. Lahko so različnih barv, oblik, konsistence, različnih površin, robov in celo različnega vonja.

Material in inventar: petrijevka s hranilnim agarjem, sterilna vatirana paličica, alkoholni flomaster, termostatska komora, hladilnik.

NALOGA

1. Na površini petrijevke, kjer je gojišče, z alkoholnim flomastrom označite štiri kvadrante.
2. Previdno in na hitro odprite del pokrova petrijevke in potegnite s prstom po površini agarja prvega kvadranta.
3. Enako ponovite z umitim prstom na drugem kvadrantu.
4. Nato si roke razkužite. Ko se razkužilo posuši, se s prstom dotaknite tretjega kvadranta.
5. Vzemite sterilno vatirano paličico, podrgnite po mizi in nato še po četrtem kvadrantu petrijevke.
6. Petrijevko postavite v termostatsko komoro na 37 °C za 24 ur.
7. Naslednjič preštajte število kolonij, določite koliko različnih kolonij je zraslo, in skicirajte. Pozorni bodite na barvo kolonije, velikost, vraščanje v gojišče, površino in rob kolonije.



Slika 5: Gojišča bakterij

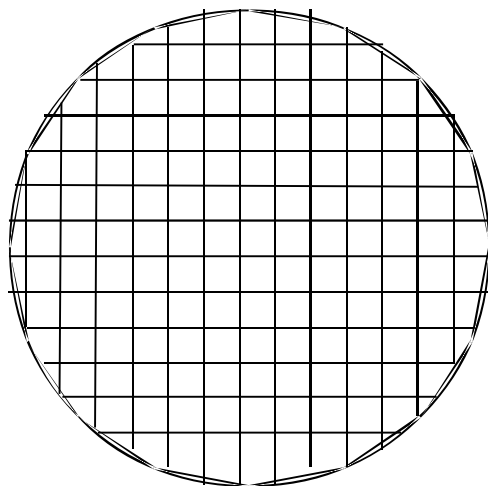
IZOLACIJA ČISTE KULTURE

Bakterije z gojiščem tvorijo kulturo. Če je ta sestavljena iz več vrst bakterij, jo imenujemo mešana kultura. Takšna je v naši okolici. Pri mešanih kulturah je težko, velikokrat nemogoče, določiti oz. determinirati posamezne bakterije. Zato iz mešanih kultur naredimo čisto kulturo, sestavljeno iz gojišča in bakterij iste vrste.

Material in inventar: sveža hranilna podloga, cepilna zanka, gorilnik, kovinska lopatka, termostat, gorilnik.

NALOGA

1. Izberite eno kolonijo in opišite njene lastnosti (obliko, barvo, rob, površino itd.).
2. S sterilno bakteriološko zanko aseptično precepitate na novo gojišče s pikiranjem.
3. Petrijevko postavite v termostatsko komoro na 37 °C za 24 ur.



Slika 6: Izolacija čiste kulture

DOLOČANJE MORFOLOŠKIH ZNAČILNOSTI RAZLIČNIH KOLONIJ

Iz okolice izolirane bakterije, kot tudi vse druge, imajo določene fiziološke in morfološke značilnosti. Za določanje morfoloških značilnosti je nujno potrebno bakterije najprej izolirati, da dobimo čisto kulturo, kjer so kolonije lepo ločene. Med sabo se razlikujejo po velikosti, barvi, obliki, robovih, prosojnosti, prečnem prerezu in strukturi.

Za opis morfoloških značilnosti uporabljamo trdna gojišča, ker je rast v kolonijah primerna za opazovanje in opisovanje. Pomagamo si lahko tudi s povečevalnim steklom.

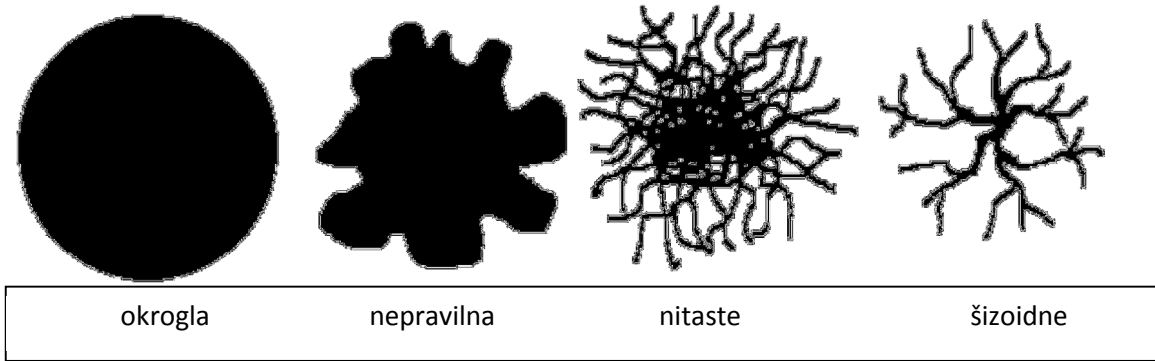
Velikost izmerimo z ravnilom (določimo premer kolonij v mm).

Barve so lahko zelo različne: od bele, rumene, zelene, oranžne, črne, rdeče itd.

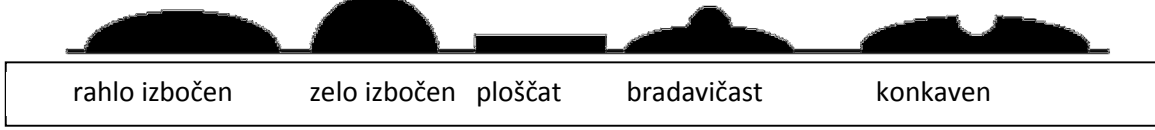
Prosojnost določimo z gledanjem proti svetlobi. Kolonije so ali niso prosojne.

Kolonije so različnih **oblik**. Lahko so:

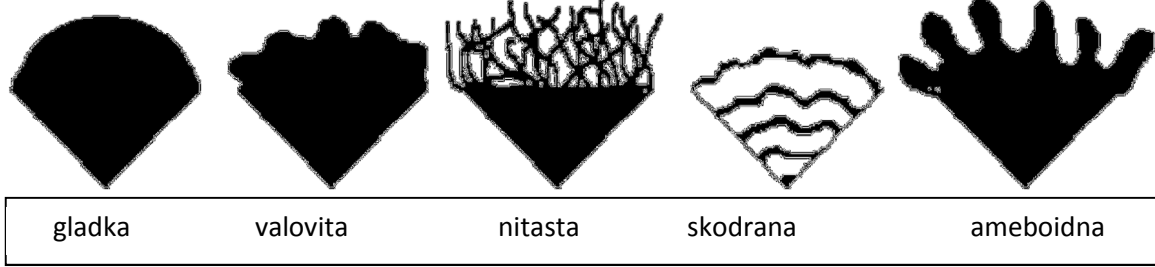
OBLIKA



PREREZ



STRUKTURA IN ROB



Slika 7: Vrste kolonij po obliki

IZOLACIJA ČISTE KULTURE Z REDČENJEM

Z enostavno izolacijo čiste kulture včasih dobimo pregosto rast posameznih kolonij ali pa kolonije celo prerastejo celotno gojišče. Takih kolonij ne moremo opisati. Zato uporabljamo tehniko redčenja, kjer na začetku nanosa dobimo gosto rast, nato pa vse redkejšo.

Material in inventar: sveža hranilna podloga, cepilna zanka, gorilnik, termostat, gorilnik.

NALOGA

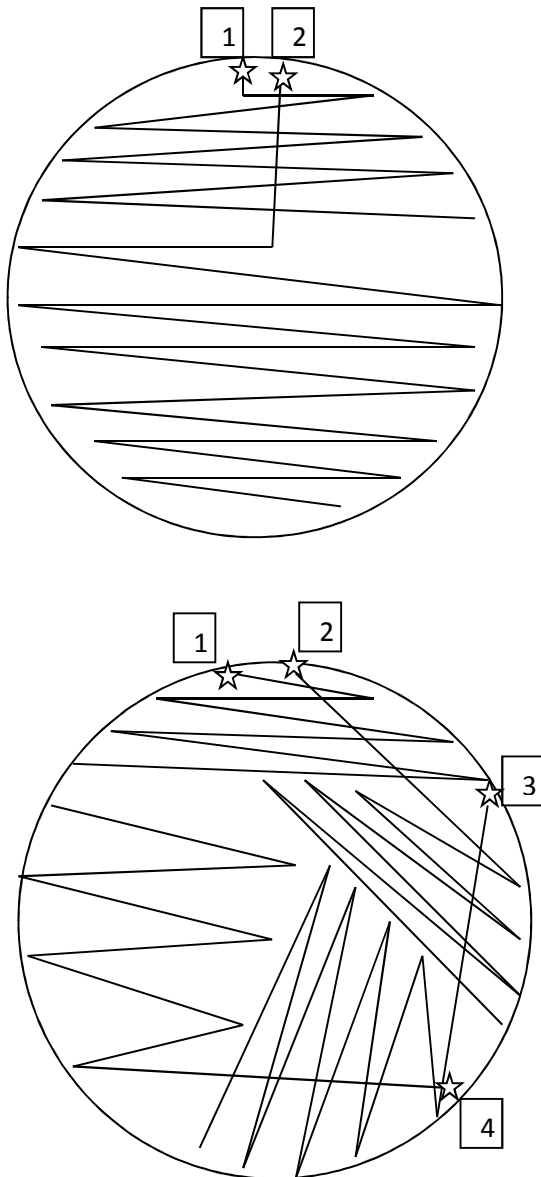
1. Prižgite gorilnik in nastavite močan plamen.
2. Če ste desničarji, postavite okuženo in sterilno petrijevko z gojiščem na levo stran gorilnika, z gojiščem obrnjenim navzgor. Petrijevke odpiramo le, kolikor je nujno in vedno proti plamenu.
3. Ožgite bakteriološko zanko, ohladite jo ob gorilniku v sterilnem gojišču.
4. Odprite okuženo petrijevko, z zanko zajemite kolonijo in petrijevko zaprite. Ne vračajte se ponovno v isto petrijevko.
5. Odprite sterilno petrijevko in potegnite prvič le do 1/8 gojišča, kot prikazuje slika.
6. Zaprite petrijevko, ožgite bakteriološko zanko, ohladite jo ob gorilniku v sterilnem gojišču na nasprotni strani, kot ste nanесли bakterije.
7. Drugič potegnite po gojišču tako, da zajamete prvi nanos in ga raznesete do 1/4 gojišča.
8. Postopek še enkrat ponovite tako, da tretjič zajamete drugi nanos in ga raznesete na preostali del gojišča.
9. Petrijevko označite in postavite v termostat na 37 °C za 24 ur.
10. Preglejte rast na gojišču in narišite rast kolonij.

Bakterije nanesite s štirikratnim redčenjem, kot prikazuje slika 11.

POZOR! Pred vsakim nanosom moramo bakteriološko zanko ožgati (sterilizirati) in ohladiti.
Iz prvotne kužnine zajamemo bakterije samo enkrat.

POGOSTE NAPAKE:

- slaba ureditev delovnega prostora,
- delo več kot 20 cm od ognja (nevarnost okužbe iz zraka),
- govorjenje pri delu (nevarnost okužbe iz ustne votline),
- neožiganje zanke,
- premalo ohlajene zanke (uničenje bakterij, ni rasti),
- neoznačene petrijevke (možnost zamenjave).



Slika 8: Nanos z redčenjem

BIOKEMIJSKA DEJAVNOST BAKTERIJ

Z biokemijsko preiskavo ugotavljamo, katere encime ima preiskovana kultura. Pri določanju bakterij ugotavljamo: encime za razkroj snovi, najpogosteje sladkorje, beljakovine, škrob, maščobe, aminokislino, amide (urea), prisotnost reduktaz (redukcija npr. nitratov v nitrite), nekaterih posebno pomembnih encimov, kot sta katalaza in oksidaza, izrabljanje nekaterih snovi kot edinega vira ogljika (citrata) in vmesne ali končne produkte metabolizma.

Razkroj ogljikovih hidratov pod vplivom mikroorganizmov imenujemo saharoliza, mikroorganizme pa saharolitične. Razkroj ogljikovih hidratov ugotavljamo običajno na podlagi njihovih končnih produktov, kot so kisline in plini. Kisline dokažemo tako, da običajnemu gojišču dodamo indikator, ki ob spremembi pH spremeni barvo gojišča. Če gojišču dodamo Andradejev indikator, se barva gojišča ne spremeni, dokler pH ne pade pod 5, ko se obarva rožnato. Bromtimol moder indikator obarva gojišče modro, vendar se že pri manjšem nastanku kisline razbarva oz. obarva rumeno. Metilrdeč indikator obarva gojišče rumeno do oranžno. V prisotnosti kisline postane barva intenzivnejša, rdeča.

Proteolitične bakterije imajo encime za **razkroj beljakovin** in **aminokislin**. Ugotovimo jih lahko tako, da preiskovane mikroorganizme cepimo na gojišče z želatino. Če so prisotne proteolitične bakterije, se bo želatina po določenem času inkubacije utekočinila. Če se utekočini zaradi temperature v termostatu (37 °C), se bo spet strdila, ko gojišče postavimo v hladilnik. Pri pozitivni reakciji bo ostalo gojišče tekoče.

Žveplovodik se običajno sprošča pri razgradnji beljakovin ali drugih snovi, ki vsebujejo beljakovine. Za dokaz žveplovodika dodamo gojišču brezbarven svinčev acetat. Nasadimo preiskovano kulturo in po določenem času inkubacije se bo nastali žveplovodik vezal na svinec in nastal bo PbS, ki obarva gojišče črno.

Encim katalaza **razkraja vodikov peroksid** v H₂O in O₂. Stafilokoki imajo pozitiven katalazni preizkus, streptokoki pa negativnega.

Z vajo bomo dokazovali, ali izolirana bakterija vsebuje encim katalazo in amilazo.

Material in inventar: bakteriološka zanka, petrijevka s škrobnim agarjem, petrijevka s hranilnim agarjem, gorilnik, 10 % H₂O₂, jodovica.

NALOGA

Dokaz prisotnosti encima katalaze v čisti kulturi enostavnega gojišča

1. 10 % H₂O₂ kanite na kolonijo bakterij. Če je reakcija burna (pojav pene), je pozitivna. Bakterija vsebuje encim katalazo.
2. S sterilno bakteriološko zanko zajemite preiskovane bakterije in jih prenesite na kapljico destilirane vode na predmetno stekelce.
3. Razmažite in dodajte eno kapljico 10 % H₂O₂.
4. Izpeljite postopek in ocenite reakcijo.

Dokaz prisotnosti encima amilaze v gojišču z dodanim škrobom

1. Na kolonijo na škrobnem agarju polijte malo jodovice in počakajte 1 minuto.
2. Če se okoli kolonije pojavi neobarvano področje (obroč), je encim amilaza prisoten.
3. Izpeljite postopek in napišite rezultat.

Škrob v prisotnosti joda pomodri. Če bakterija vsebuje encim amilazo, bo ta razgradil škrob.

IZDELAVA ANTIBIOGRAMA

Antibiogram je preiskava, s katero ugotavljamo, na katere antibiotike in kemoterapevtike je občutljiva preiskovana kultura. Poznamo dve metodi.

Difuzijska metoda

Pri difuzijski metodi nanese enakomerno suspenzijo kulture na ustrezno trdno gojišče. Nato nanese na gojišče t. i. diske z antibiotiki (tabletko ali filter papir, prepojen s standardno količino antibiotika). Pustimo približno 1 uro, da antibiotik difundira v gojišče, potem inkubiramo v razmerah, primernih za preiskovano kulturo. Po inkubaciji izmerimo premer inhibicijske cone okrog posameznega diska, in ga izrazimo v milimetrih ter iz navodil proizvajalca diskov ocenimo stopnjo občutljivosti kulture.

Včasih smo občutljivost označevali s križci, in sicer:

++++ odlično

+++ dobro

++ slabo

+ zelo slabo

– ali 0 kultura je rezistentna oz. ni občutljiva

Danes občutljivost bakterij označujemo s črkami, in sicer:

S – zelo občutljiv

I – srednje občutljiv

R – rezistenten

Dilucijska metoda

Pri dilucijski metodi ugotavljamo, kako različne koncentracije antibiotika delujejo na preiskovane bakterije. Preiskavo naredimo tako, da pripravimo serijo epruvt z ustreznim

tekočim gojiščem, v katere dodamo naraščajoče (običajno dvakratne) koncentracije antibiotika. V vsa gojišča cepimo enako količino preiskovane kulture in jih inkubiramo v ustreznih razmerah. Po inkubaciji ocenimo rast pri posameznih koncentracijah antibiotika. Če želimo ugotoviti, ali je antibiotik samo zavrl rast bakterij ali jih je ubil, moramo prenesti manjšo količino gojišča, kjer ni očitne rasti, na gojišče brez antibiotika. Najnižja koncentracija, ki je zavrla rast (na gojišču brez antibiotika bakterije še rastejo), se imenuje minimalna inhibitorna koncentracija – MIK. Najnižja koncentracija, ki bakterije ubije (na gojišču brez antibiotika ni več rasti), pa minimalna baktericidna koncentracija – MBK.

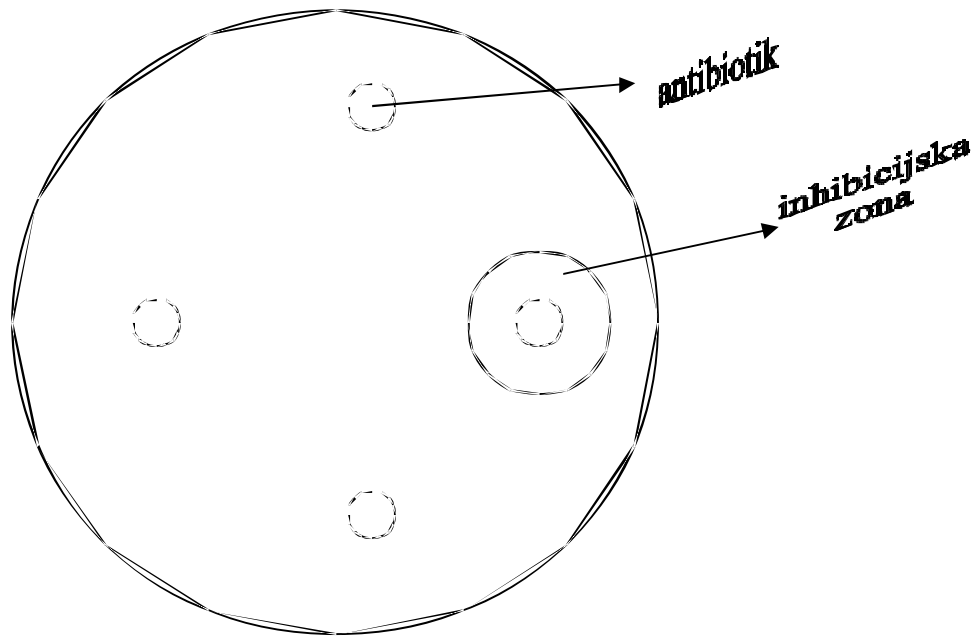
Material in inventar: petrijevka s hranilnim agarjem, z različnimi antibiotiki prepojeni diski, bakteriološka zanka, gorilnik, pinceta, čaša z alkoholom, termostat.

NALOGA

Izdelajte antibiogram po difuzijski metodi.

1. Na spodnjo stran petrijevke s hranilnim agarjem napišite začetne črke antibiotikov (A – amoksicilin, G – gentamicin itd.), ki jih boste uporabili. Prižgite gorilnik.
2. Ožgite bakteriološko zanko, ohladite zraven ognja v sterilnem gojišču.
3. Zajemite kulturo in jo razmažite na sveže gojišče. Razmaz mora biti gost in v vseh smereh.
4. S pinceto postavite diske antibiotika na gojišče.
5. Pinceto namočite v alkohol, potegnite čez plamen in počakajte, da alkohol izgori.
6. S pinceto postavite disk na označeno mesto na gojišču. To ponovite tolikokrat, dokler ne postavite vseh diskov na gojišča.
7. Postavite petrijevko v termostatsko komoro na 37 °C za 24 ur.
8. Naslednjič z ravnilom izmerite inhibicijsko cono in določite ustreznost antibiotika oz. rezistenco.

Če se pojavijo znotraj inhibicijske cone posamezne kolonije (običajno bistveno manjše), so to mutirane bakterije, ki so postale rezistentne.



Slika 9: Antibiogram

Inhibicijska cona je za vsak antibiotik lahko drugačna in jo določi proizvajalec glede na rezultate preizkusov. V preglednici imate predstavljene nekatere antibiotike in interpretacijo inhibicijskih zon.

Preglednica 1: Antibiotiki in inhibicijske cone

ANTIBIOTIK (OZNAKA)	S (zelo občutljivi) premer večji od:	I (srednje občutljiv)	R (rezistenten) premer manjši od:
penicilin (P)	31	22–31	22
streptomicin (S)	20	16–20	16
gentamicin (G)	18	13–18	12
eritromicin (E)	26	20–26	20
linkomicin (L)	20	15–20	14
kloramfenikol (K)	22	18–22	17
sulfonamid (Si)	29	21–29	20
azitromicin (AZM 15)	19	16–18	15
cefotaksim (CTX 10)	23	15–22	14
ofloksacin (OFX 5)	16	13–15	12
ceftriakson (CRO 30)	21	14–20	13

BARVANJE BAKTERIJ

Bakterije na razmazu obarvamo zato, da jih lažje opazujemo, predvsem kadar ugotavljamo, kakšne oblike so. S specialnim barvanjem ugotavljamo, ali imajo kapsulo, spore, bičke ali druge strukture.

PRIPRAVA BAKTERIJSKIH RAZMAZOV

Pred barvanjem moramo pripraviti razmaz preiskovane kulture na predmetno stekelce. Predmetno stekelce je potrebno najprej razmastiti (z milom, s 70 % alkoholom) in sterilizirati (2–3 potege skozi plamen). Iz tekočih gojišč prenesemo kapljico z bakterijami na predmetno stekelce in razmažemo s sterilno bakteriološko zanko. S trdnih gojišč zajamemo s sterilno bakteriološko zanko bakterije in jih razmažemo v kapljici fiziološke raztopine na predmetnem stekelcu.

FIKSACIJA BAKTERIJSKIH RAZMAZOV

Ko se razmazi posušijo, jih moramo fiksirati (prilepiti na predmetno stekelce), da jih pri barvanju ne speremo. Fiksiramo lahko s toploto ali kemično. S toploto fiksiramo tako, da razmaz trikrat potegnemo skozi najmočnejši del plamena. Za kemično fiksacijo najpogosteje uporabljamo metanol, nato aceton ali formalin.

BARVANJE BAKTERIJSKIH RAZMAZOV

Poznamo enostavna in sestavljena barvanja. Pri enostavnem barvanju obarvamo razmaz samo z enim barvilom, pri sestavljenem pa uporabljamo več barvil hkrati ali zaporedno. S takim barvanjem se različne vrste mikrobov različno obarvajo.

Za barvanje bakterij uporabljamo naslednja barvila:

- modro: metilensko in azurno modrilo, toluidin,
- rdečo: fuksin in safranin,
- vijolično: kristalno in gencijansko vijolično,
- zeleno: metilno zeleno in malahitno.

Enostavna barvanja

Barvanje po Pfeifferju je enostavno barvanje, ko barvamo bakterije z 1 % vodno raztopino karbolnega fuksina 30 sekund, nato speremo in posušimo.

Za **barvanje po Löfflerju** uporabljamo metilensko modrilo, ki mu je dodan KOH. Fiksiran razmaz prelijemo s tem barvilom za 3–5 minut, nato speremo in posušimo.

Sestavljena barvanja

Barvanje po Gramu je sestavljeno, diferencialno in orientacijsko barvanje. Uporabljamo ga za barvanje bakterij. Po Gramu se bakterije obarvajo temno vijoličasto ali rdeče. Ker se določene vrste bakterij po Gramu vedno obarvajo enako, jih na podlagi tega delimo v dve skupini:

- gramsko pozitivne (vijolične, modrovijolične) **G +**
- gramsko negativne (rdeče) **G –**

Gramsko pozitivne bakterije se obarvajo z gencijanskim vijoličnim barvilom in jih etanol ne razbarva. Gramsko negativne bakterije se najprej obarvajo vijolično, vendar jih zaradi zgradbe stene etanol razbarva in se naknadno obarvajo s fuksinom rdeče.

Material in inventar: predmetno stekelce, bakteriološka zanka, gorilnik, fiziološka raztopina, destilirana voda, posode za barvanje, pinceta, barvila (metilvijoločno modrilo, lugol, 1 % karbolni fuksin).

NALOGA

Priprava bakterijskega razmaza

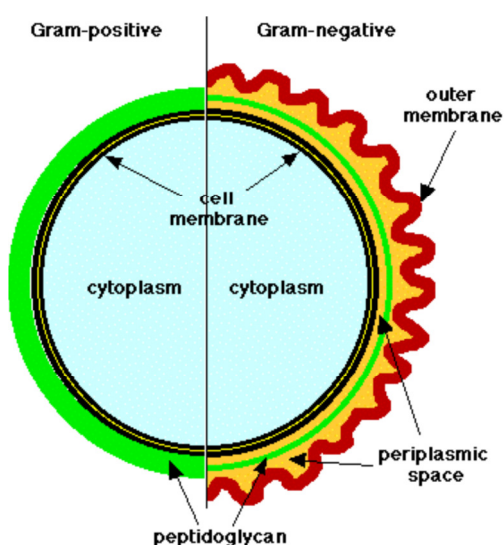
1. Objektivno stekelce očistite s 70 % etanolom in na hitro potegnite skozi plamen 2–3-krat.
2. Na 1/3 predmetnega stekelca kanite kapljico sterilne fiziološke raztopine.
3. Ožgite bakteriološko zanko, ohladite jo zraven ognja v kapljici vode.

4. Zajemite bakterije z zanko in jih razmažite v fiziološki raztopini po predmetnem stekelcu.
5. Predmetno stekelce postavite poševno na podlago in pustite na zraku, da se posuši.
6. Ko je razmaz popolnoma suh (moten madež na steklu), potegnite predmetno stekelce skozi plamen 2–3-krat tako, da je razmaz obrnjen navzgor. S tem se bakterije prilepijo na steklo in preparat je fiksiran.

NALOGA

Barvanje bakterijskega razmaza

1. Razmaz prelijte z metilvijoličnim modrilom za 2 minuti.
2. Barvilo odlijte in sperite z destilirano vodo.
3. Razmaz prelijte za 1 minuto z lugolom.
4. Odlijte lugol in razbarvajte s 3 % acetonskim alkoholom. Pustite delovati 30 sekund.
5. Sperite z destilirano vodo.
6. Odlijte vodo in prelijte razmaz z 1 % raztopino karbolnega fuksina za 30 sekund.
7. Sperite z destilirano vodo in posušite na zraku.
8. Mikroskopsko (pri 100-kratni povečavi) določite obliko bakterije, odnos do drugih bakterij in barvo.



Slika 10: Barvanje bakterijskega premaza

Barvanje po Möllerju uporabljamo za barvanje bakterijskih spor.

Material in inventar: predmetno stekelce, bakteriološka zanka, gorilnik, fiziološka raztopina, destilirana voda, posode za barvanje, pinceta, barvila (5 % kromova kislina, 10 % karbolni fuksin, 5 % žveplena kislina, metilensko modrilo po Löfflerju).

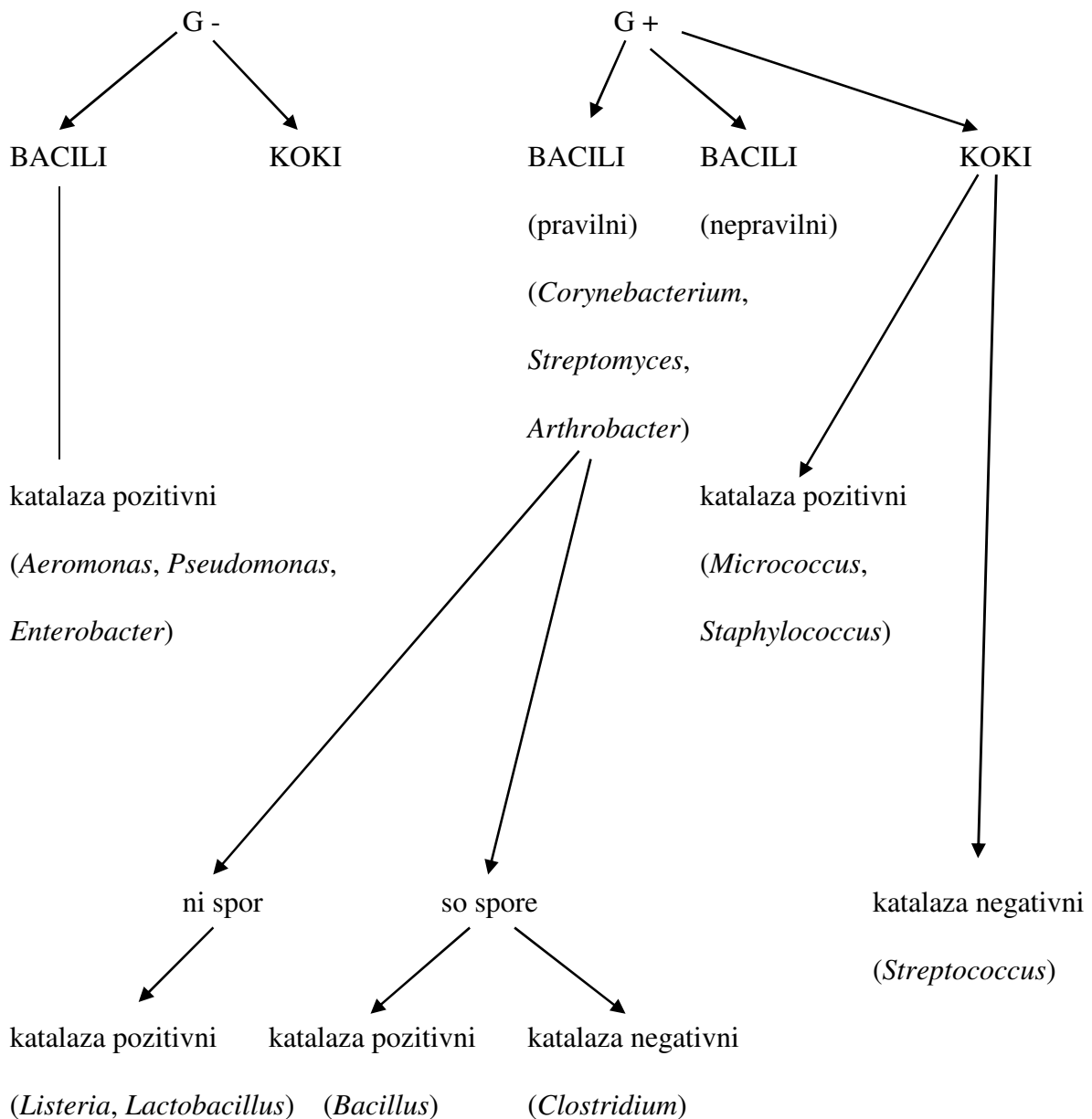
NALOGA

1. Pripravite razmaz sporuliranih bakterij in ga fiksirajte.
2. Prelijte s 5 % vodno raztopino kromove kisline za 1–3 minute.
3. Sperite z destilirano vodo.
4. Prelijte z 19 % raztopino karbolnega fuksina in segrevajte nad plamenom. Ko se pojavijo mehurčki, prenehajte s segrevanjem, da se razmaz ne posuši.
5. Prelijte s 5 % raztopino žveplove kisline za 5 sekund.
6. Sperite z destilirano vodo.
7. Prelijte z metilenskim modrilom po Löfflerju za 1–2 minuti.
8. Sperite z destilirano vodo in posušite.
9. Mikroskopsko (pod 100-kratno povečavo) določite obliko oz. postavitev bakterijskih spor glede na samo celico.

IDENTIFIKACIJA BAKTERIJSKE KULTURE

NALOGA

Strnite rezultate vseh dosedanjih vaj. S pomočjo literature določite rod bakterije, in če lahko, določite še vrsto bakterije, ki ste jo izolirali.



STERILIZACIJA

Sterilizacija pomeni uničenje vseh mikroorganizmov in njihovih spor. Glede na vrsto mikroorganizma govorimo o baktericidnem, fungicidnem in virucidnem delovanju. Steriliziramo v glavnem s fizikalnimi sredstvi.

Za sterilizacijo uporabljamo:

1. toploto a) suho

b) vlažno

2. sevanje a) ultravijolično svetlobo

b) žarke gama

3. ultrazvok

4. pline

5. mehanično odstranjevanje (bakterij in glivic) s filtracijo

Dezinfekcija pomeni ubijanje bolezenskih (patogenih) mikroorganizmov, večinoma s kemijskimi sredstvi.

S suho toploto (z vročim zrakom) steriliziramo v suhem sterilizatorju. Postopek traja tri ure pri temperaturi 160–180 °C. Če je temperatura višja, lahko skrajšamo čas sterilizacije.

VPRAŠANJA

Katere predmete oz. materiale lahko steriliziramo s suhim zrakom?

Plamen uporabljamo v laboratoriju za segrevanje, kuhanje, aseptično delo in sterilizacijo.

Kaj lahko steriliziramo s plamenom?

Z vlažno toploto steriliziramo v avtoklavu pri nižji temperaturi, in sicer 121–130 °C, 15–20 minut.

Katere predmete oz. materiale lahko steriliziramo v avtoklavu?

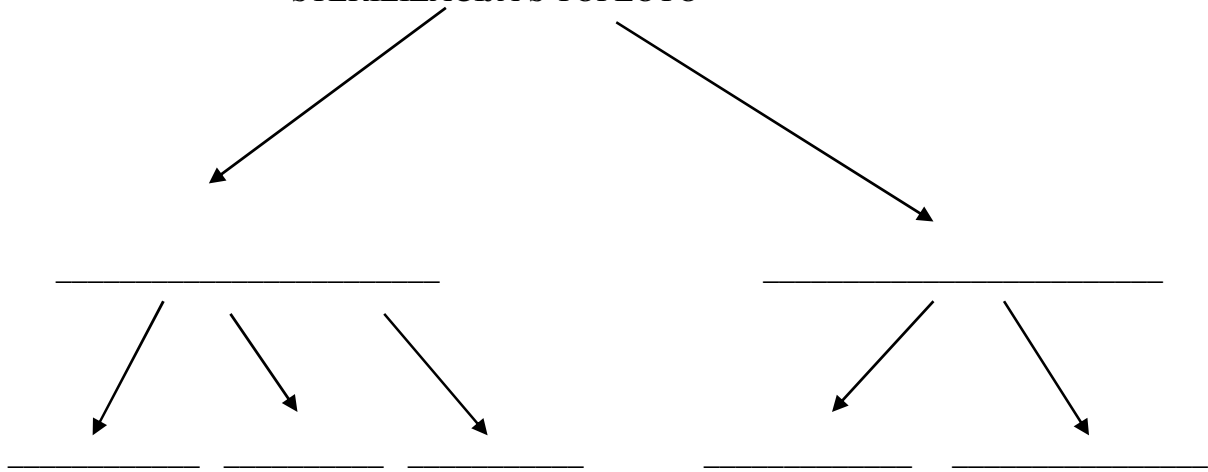
Z ionizirajočim sevanjem (γ -žarki) lahko steriliziramo plastične predmete.

Kateri predmeti, ki jih uporabljamo v laboratoriju, so sterilizirani z γ -žarki?

Z ultravijoličnim sevanjem (z UV-lučjo) steriliziramo prostore in delovne površine.

V shemo vpišite, kako delimo sterilizacijo s toploto.

STERILIZACIJA S TOPLOTO



LITERATURA

1. Brglez, I. *Priročnik za vaje iz mikrobiologije*. Ljubljana: Biotehniška fakulteta, VTOZD za veterinarstvo, 1984.
2. Bole-Hribovšek, V., Hostnik, P. *Osnove dela v mikrobiološkem laboratoriju*. Ljubljana: Veterinarska fakulteta, 1996.
3. Božič, M., Predin, R., Trehtar, M. *Mikrobiologija*. Delovni zvezek za mikrobiološke vaje. Ljubljana: DZS, 2007.
4. Henrix, M. C. *Laboratory Procedures for Veterinary Technicians*. ZDA, Mashy, 2002.