

Univerza v Ljubljani
Biotehniška fakulteta
Oddelek za živilstvo

OSNOVNI PRINCIPI IDENTIFIKACIJE PLESNI, KVASOVK IN BAKTERIJ V ŽIVILIH

SKRIPTA IN DELOVNI ZVEZEK ZA LABORATORIJSKE VAJE PRI PREDMETU ŽIVILSKA
MIKROBIOLOGIJA

Barbara Jeršek

Ljubljana, 2014

Ljubljana, november 2014

Izdajatelj: Univerza v Ljubljani
Biotehniška fakulteta
Oddelek za živilstvo

e-publikacija v pdf formatu dostopna na <http://www.bf.uni-lj.si/knjiznice/knjiznica-odd-za-zivilstvo/ucbeniki-v-elektronski-obliki/>

Vse pravice pridržane. Noben del te publikacije se ne sme reproducirati ali uporabiti na kakršenkoli drug način (gafični, elektronski ali mehanski, vključno s fotokopiranjem, snemanjem ali prenosom v baze podatkov) brez pisnega soglasja nosilca avtorskih pravic.

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

579.67(075.8)(076.5)(0.034.2)

JERŠEK, Barbara

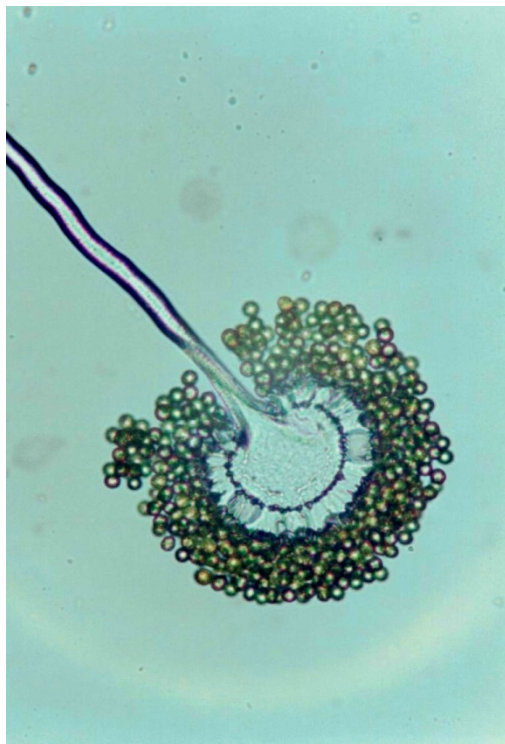
Osnovni principi identifikacije plesni, kvasovk in bakterij v živilih [Elektronski vir] : skripta in delovni zvezek za laboratorijske vaje pri predmetu Živilska mikrobiologija / Barbara Jeršek. - El. knjiga. - Ljubljana : Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, 2014

Način dostopa (URL): <http://www.bf.uni-lj.si/knjiznice/knjiznica-odd-za-zivilstvo/ucbeniki-v-elektronski-obliki>

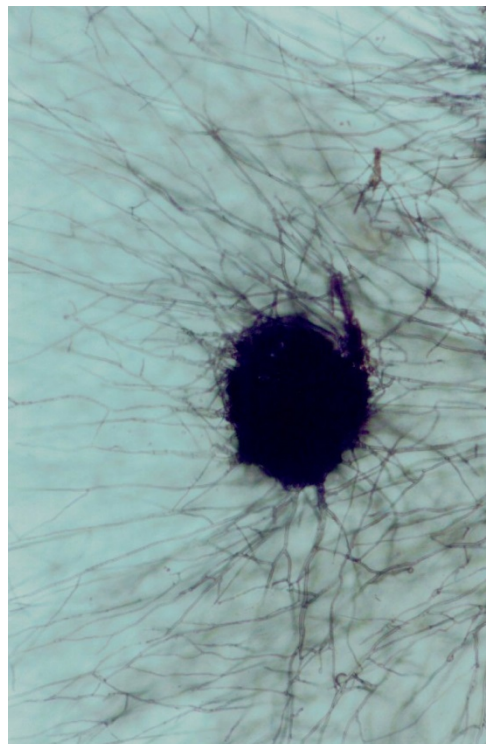
ISBN 978-961-6333-68-9 (pdf)

276772864

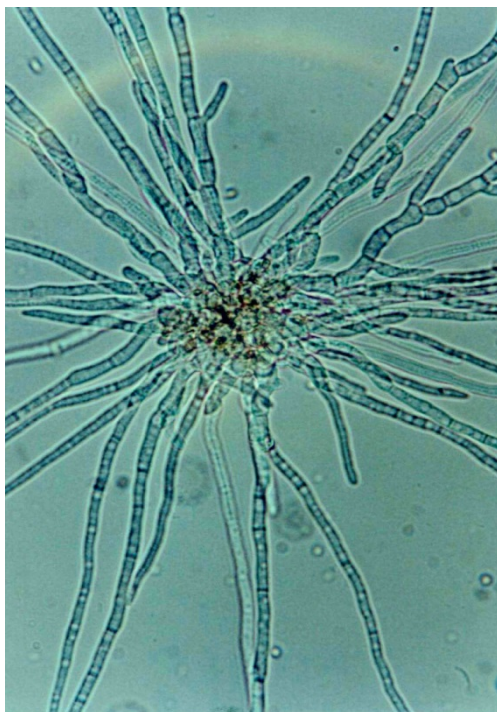
FOTOGRAFIJE MIKROKULTUR PLESNI



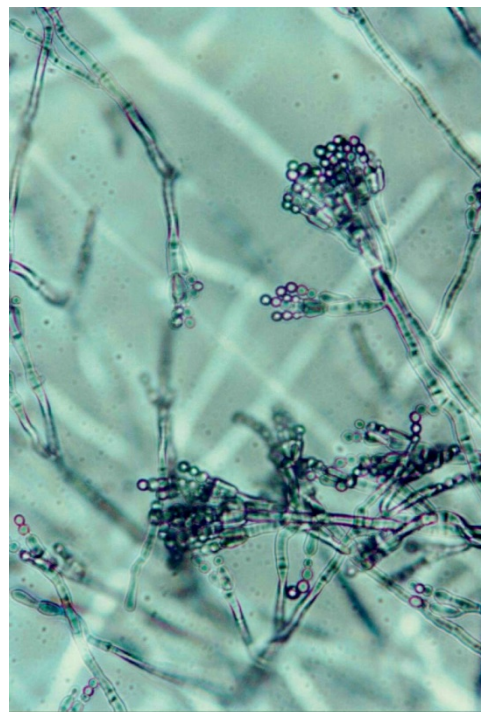
Mikrokultura 1: *Aspergillus*



Mikrokultura 2: *Chaetomium*



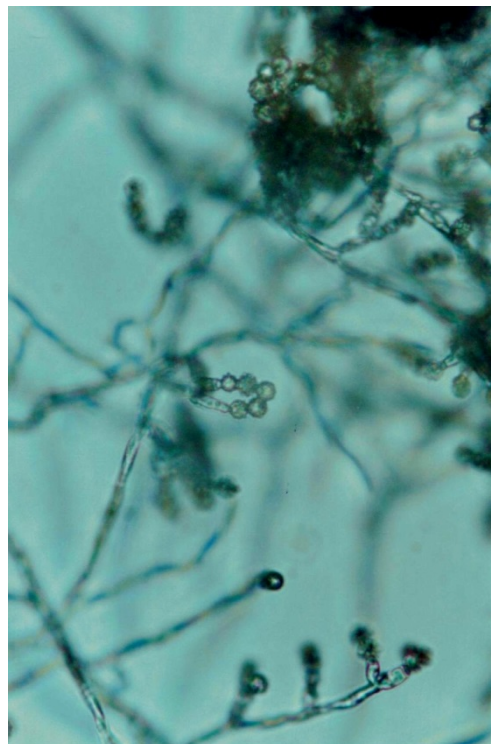
Mikrokultura 3: *Cladosporium*



Mikrokultura 4: *Penicillium*



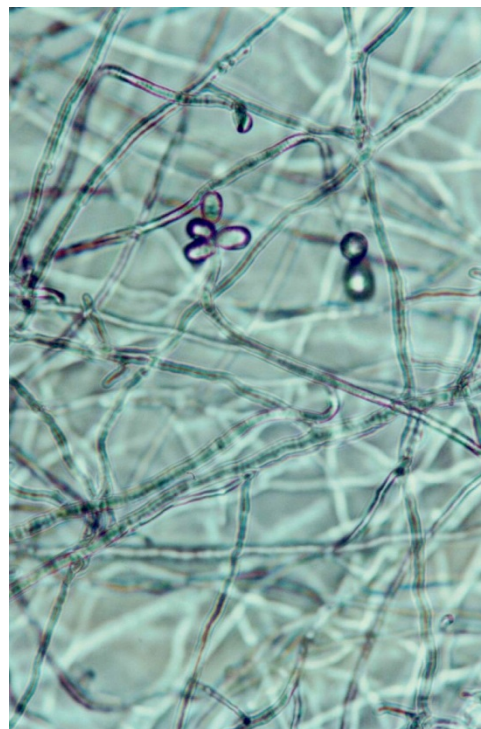
Mikrokultura 5: *Alternaria*



Mikrokultura 6: *Scopulariopsis*



Mikrokultura 7: *Curvularia*



Mikrokultura 8: *Trichothecium*

VSEBINA

UVOD	5
TAKSONOMSKE SKUPINE, NOMENKLATURA	5
KLASIFIKACIJSKI SISTEM	6
GLIVE	7
ZYGOMYCOTA	7
ASCOMYCOTA IN DEUTEROMYCOTA	8
Ascomycota.....	8
Deuteromycota	9
KLASIFIKACIJA PLESNI	11
OPISI GLAVNIH RODOV PLESNI	13
<i>Plesni rodu Mucor</i>	13
<i>Plesni rodu Rhizopus</i>	14
<i>Plesni rodu Chaetomium</i>	15
<i>Plesni rodu Acremonium</i>	16
<i>Plesni rodu Alternaria</i>	17
<i>Plesni rodu Aspergillus</i>	18
<i>Plesni rodu Botrytis</i>	19
<i>Plesni rodu Chrysosporium</i>	20
<i>Plesni rodu Cladosporium</i>	21
<i>Plesni rodu Curvularia</i>	22
<i>Plesni rodu Fusarium</i>	23
<i>Plesni rodu Geotrichum</i>	24
<i>Plesni rodu Scopulariopsis</i>	25
<i>Plesni rodu Penicillium</i>	26
<i>Plesni rodu Phoma</i>	27
<i>Plesni rodu Trichothecium</i>	28
<i>Plesni rodu Trichoderma</i>	29
IDENTIFIKACIJA KVASOVK	30
GLAVNE LASTNOSTI KVASOVK, UPOŠTEVANE PRI IDENTIFIKACIJI	30
NAVODILA ZA IZVEDBO TESTOV ZA IDENTIFIKACIJO KVASOVK	33
GLAVNE LASTNOSTI IZBRANIH KVASNIH KULTUR	35
KULTURA KVASOVK I.....	37
KULTURA KVASOVK II.	38
KULTURA KVASOVK III.....	39
KULTURA KVASOVK IV.....	40
KULTURA KVASOVK V.	41
KULTURA KVASOVK VI.....	42
KULTURA KVASOVK VII.....	43
KULTURA KVASOVK VIII.....	44
IDENTIFIKACIJA BAKTERIJ	45
GLAVNE LASTNOSTI BAKTERIJ, UPOŠTEVANE PRI KLASIFIKACIJI IN IDENTIFIKACIJI	45
MORFOLOŠKE LASTNOSTI.....	45
FIZIOLOŠKE IN METABOLIČNE LASTNOSTI.....	46
SEROLOŠKE LASTNOSTI IN FAGOTIPIZACIJA.....	46
EKOLOŠKE ZNAČILNOSTI	47
GENETSKE ANALIZE.....	47
MOLEKULARNE LASTNOSTI.....	47
NUMERIČNA TAKSONOMIJA	47
STANDARDIZIRANE METODE.....	47

DEFINICIJA POZITIVNEGA IN NEGATIVNEGA REZULTATA REAKCIJE.....	48
ČISTA KULTURA.....	48
SPLOŠEN POTEK IDENTIFIKACIJE:.....	48
GRAMNEGATIVNE BAKTERIJE	48
GRAMPOZITIVNE BAKTERIJE.....	49
NAVODILA ZA IZVEDBO TESTOV ZA IDENTIFIKACIJO BAKTERIJ	50
OSNOVNI TESTI.....	50
DODATNI TESTI.....	52
BARVANJE PO GRAMU	54
BARVANJE BAKTERIJSKIH SPOR.....	55
GLAVNE LASTNOSTI IZBRANIH BAKTERIJSKIH KULTUR	55
<i>KULTURA BAKTERIJ I.</i>	59
<i>KULTURA BAKTERIJ II.</i>	60
<i>KULTURA BAKTERIJ III.</i>	61
<i>KULTURA BAKTERIJ IV.</i>	62
<i>KULTURA BAKTERIJ V.</i>	63
<i>KULTURA BAKTERIJ VI.</i>	64
<i>KULTURA BAKTERIJ VII.</i>	65
<i>KULTURA BAKTERIJ VIII.</i>	66
TEKSTOVNO SLIKOVNI KLJUČI ZA IDENTIFIKACIJO PLESNI	67
<u>I. KLJUČ.</u>	67
<u>II. KLJUČ: ZYGOMYCETES.</u>	67
<u>III. KLJUČ: DEUTEROMYCETES</u>	68
<u>IV. KLJUČ: ASCOMYCETES</u>	71
<u>V. FOTOGRAFIJE NATIVNIH MIKROSKOPSKIH PREPARATOV</u>	71
LITERATURA	75

NAVODILA ZA VARNO DELO

- V mikrobiološkem laboratoriju vedno nosite zaščitne halje.
- V mikrobiološkem laboratoriju je prepovedano kajenje ter uživanje hrane in pijač.
- Na delovnem pultu je samo material, ki ga potrebujete za izvedbo preiskave.
- Okna in vrata morajo biti med eksperimentalnim delom zaprta zaradi nevarnosti kontaminacije.
- Pri delu vedno uporabljate aseptično tehniko.
- Plinske gorilnike na začetku in ob koncu dela odpre in zapre vodja vaje oziroma tehnik.
- Pri delu ob plinskem gorilniku bodite pazljivi in zbrani.
- Če pridete do neposrednega kontakta z mikroorganizmi, to takoj sporočite vodji vaj oziroma tehniku.
- Če pride do kontaminacije okolja, mesto najprej razkužite, sperete z vodo in obrišete s papirnato brisačo.
- Kontaminirano steklovino in plastične nastavke za avtomatske pipete odlagajte v pripravljene košare oziroma posode z razkužili.
- V smetnjak nikoli ne odvrzite smeti, ki so kontaminirane z mikroorganizmi.
- Mikroorganizmov ne smete odnašati iz mikrobiološkega laboratorija.
- Z mikroskopi ravnajte pazljivo; pazite, da bodo po mikroskopiranju očiščeni in ugasnjeni.
- Mikroskopske preparate ne mečite v smeti, ampak v pripravljene posode z razkužili.
- Po končanem delu pospravite delovni pult in ga razkužite.
- Po končanem delu razkužite roke, jih temeljito operete z vodo in milom ter posušite s papirnato brisačo.
- Z zdravju škodljivimi in strupenimi snovmi delajte v digestoriju.
- Pri delu bodite zbrani in pazljivi.
- Rezultate in opažanja zapisujte v delovni zvezek.



UVOD

Taksonomija je definirana kot znanost biološke klasifikacije (grško *taxis* pomeni razvrstitev, ureditev, razvrstitev, *nomos* pomeni zakon, načelo, pravilo, zakonitost, *nemein* pomeni razporediti). V širšem pomenu vsebuje taksonomija tri področja: klasifikacija, nomenklatura in identifikacija. Klasifikacija pomeni razvrstitev organizmov v skupine (*taxon*, množina *taxa*) glede na skupne lastnosti ali evolucijsko sorodnost. Nomenklatura se ukvarja z dodelitvami imen taksonomskim skupinam v skladu z publiciranimi pravili (International Committee on Systematic Bacteriology). Identifikacija je proces, pri katerem se določi v katero skupino spada preiskovani izolat. Mikrobná taksonomija je zelo obsežno področje mikrobiologije.

Taksonomske skupine, nomenklatura

Osnovna taksonomska skupina je **vrsta**. Pri evkariontih je vrsta definirana kot skupina sorodnih organizmov, ki se lahko križajo oziroma imajo potomce. **Bakterijska vrsta** je skupina sevov, ki imajo skupne določene stabilne lastnosti in se razlikujejo od drugih skupin sevov. **Sev** pomeni populacijo organizmov, ki izhajajo iz enega organizma. Sevi znotraj vrste se lahko razlikujejo po različnih lastnostih. Bolj natančna definicija bakterijske vrste temelji na sekvencah ribosomalne RNK (rRNK): **Bakterijsko vrsto tvorijo prokarionti, ki imajo 97 % ali več % identičnost sekvenc 16S rRNK.**

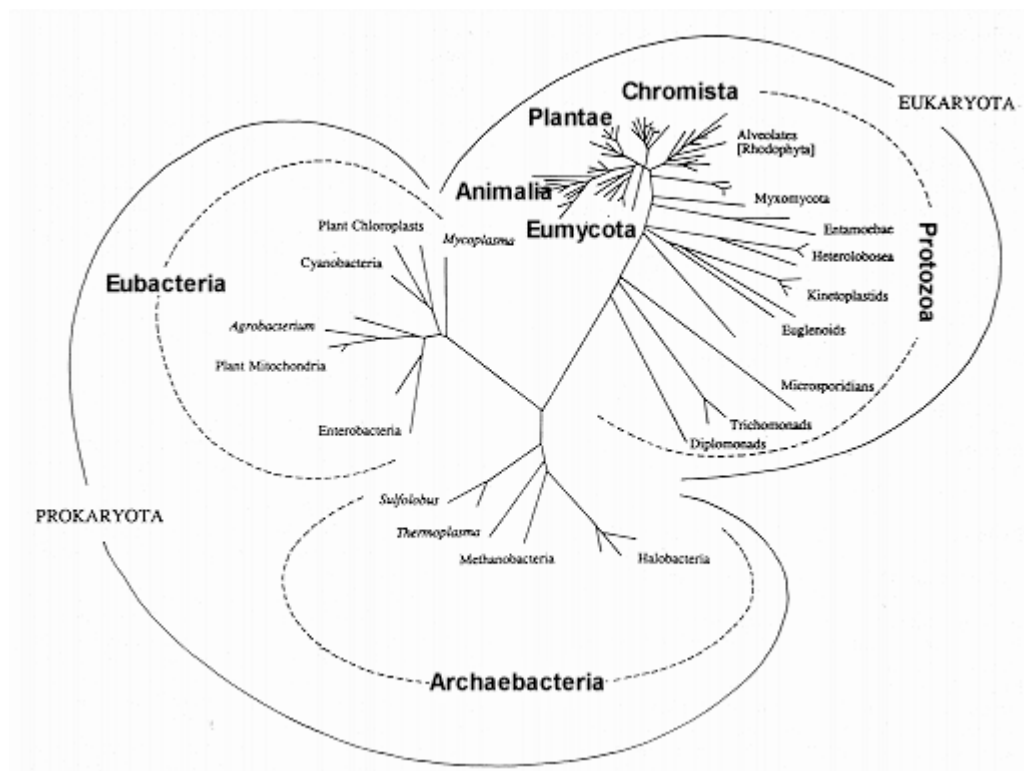
Pri pripravi klasifikacijske sheme se določen mikroorganizem uvrsti v manjšo homogeno skupino, ki je del večje skupine. Skupine so razvrščene **hierarhično** in se ne prekrivajo. Najbolj pogosto uporabljeni taksonomski nivoji so: vrsta, rod, družina, red, razred, oddelek, kraljestvo in področje.

Ime mikroorganizma je vedno sestavljeno iz dveh imen - **binomni sistem** po švedskem botaniku Carlu von Linneju tako, da je najprej navedeno ime rodu, ki je vedno pisano z veliko začetnico in nato ime vrste, ki je vedno pisano z malo začetnico. Vedno sta napisana v kurzivi ali podčrtano. Ime rodu je lahko skrajšano, medtem ko se ime vrste nikoli ne krajša. Opis posameznih bakterij in njihova klasifikacija (vključno s seznamami priznanih imen) so podani v knjigi z naslovom Bergeyev priročnik (1994).

Klasifikacijski sistem

Klasična klasifikacija bakterij je temeljila na **fenotipskih lastnostih**. Evolucijske odnose oziroma sorodnost prokariontov pa temelji na **genotipskih lastnostih**. Klasifikacija torej pomeni razporeditev organizmov v taksonomske skupine (*taxon*) in odraža stopnjo njihove sorodnosti. Hierarhija skupin prikazuje **evolucijske** ali **filogenetske odnose** med organizmi. Zato govorimo o **filogenetskem ali evolucijskem klasifikacijskem sistemu** (filogenetski pomeni izhajajoč iz skupnega prednika), ki temelji bolj na evolucijskih odnosih kot pa na splošnih podobnostih (phylogenia: evolucijski razvoj vrst; grško *phylon* pomeni rod, razvrstiti v rodove, *genesis* pomeni potomstvo, poreklo, izvor, rod).

Prokarionti in evkarionti so glede na sekvence rRNK razvrščeni v sedem kraljestev, ki so prikazani na sliki 1.



Slika 1: Kraljestva prokariontov in evkariontov

Vir: <http://www.mycolog.com/CHAP1.htm>



GLIVE

Glive v kraljestvu **Fungi** se glede na način tvorbe spolnih spor delijo v pet glavnih oddelkov in 1 oddelek v katerem so plesni, ki ne tvorijo spolnih spor. Plesni, ki so kot kvarljivci pomembne za živila, se nahajajo v treh oddelkih Zygomycota, Ascomycota in Deuteromycota.

Zygomycota

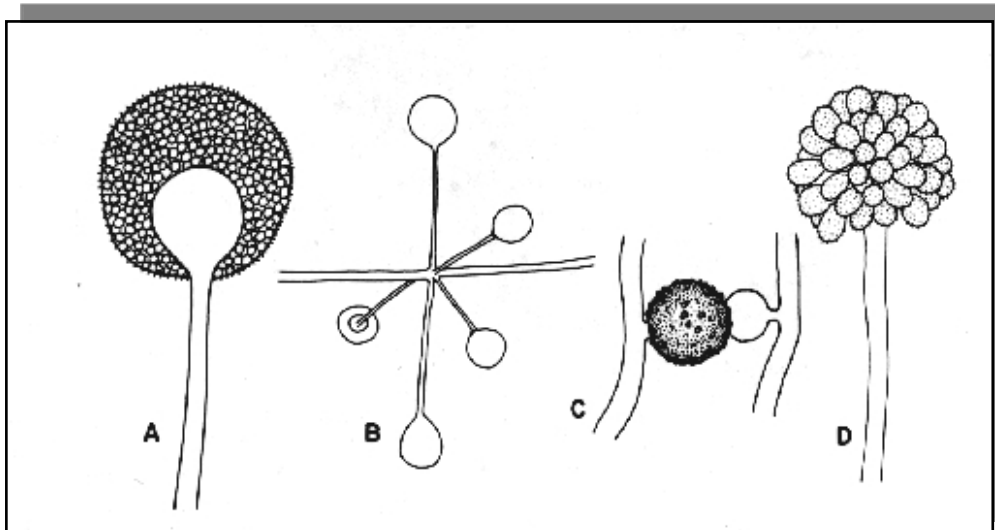
Večina plesni v tem oddelku sodi v razred Zygomycetes.

Glavne značilnosti plesni iz tega razreda so:

- Tvorba zigospor: Vse plesni tvorijo spolne spore, ki se imenujejo **zigospore** (telomorfna oblika plesni). Zigospore so ponavadi veliki (premer zigospore je ponavadi večji od 30 μm) in temno obarvani deli plesni. V čistih kulturah za identifikacijo zigospor ponavadi ne tvorijo.
- Hitra rast: Izolati rastejo zelo hitro in v petrijevki s sladnim agarjem (malt extract agar) v 2 do 4 dneh zrastejo puhaste velike kolonije.
- Neseptiran micelij: Miceliji aktivno rastočih plesni so **brez sept** (prečnih celičnih sten), kar omogoča hitro gibanje protoplazme in njene vsebine (celično jedro, mitohondriji, hranilne snovi) ter tvorbo spor.
- Razmnoževanje s **sporangiosporami** (anamorfna oblika plesni): Sporangiospore so značilna oblika nespolnega razmnoževanja plesni v razredu Zygomycetes. So nespolne spore, ki se tvorijo v **sporangiumu s kolumelo** ali **brez kolumele** na specializirani hifi, ki se imenuje **sporangiofor**. Sporangiospore se lahko tvorijo tudi v **merosporangiju**, ki nima kolumele. Merosporangij je cilindričen sporangij z vrsto merospor. Sporangiospore se tvorijo zelo hitro.
- Tvorba **hlamidospor** (druga anamorfna oblika plesni): nekatere vrste tvorijo hlamidospore, ki so cilindrične do sferične oblike z relativno debelo steno in se tvorijo v substratnem miceliju. Največkrat so bolj odporne proti svetlobi, toploti in sušenju kot sporangiospore.

Večina plesni razreda Zygomycetes ne tvori mikotoksinov. Nahajajo se v zemlji, gnoju, velikokrat so kot patogene plesni na različnih insektih. Plesni kot

kvarljivci iz te skupine so največkrat iz reda Mucorales. Pojavljajo se predvsem na svežih živilih z visoko vrednostjo a_w , so neodporne na toplotno obdelavo živil in kemijsko konzerviranje živil.



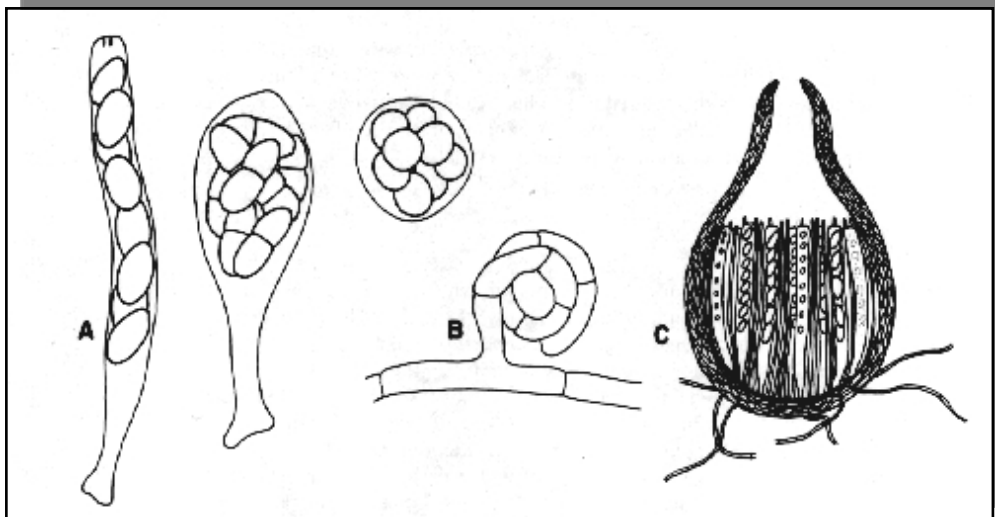
Slika 2: Zygomycota: A: sporangij s sporangiosporami pri plesni *Mucor*, B: sporangiji pri plesni *Absida*, C: zigospora pri plesni *Zygorhynchus*, D: sporangiofor pri plesni *Cunninghamella*

Ascomycota in Deuteromycota

Oddelka Ascomycota in Deuteromycota se od oddelka Zygomycota razlikujeta po osnovnih lastnostih, med katerimi je najbolj očitna tvorba **septiranega micelija**. Posledica tega je v splošnem počasnejša rast plesni.

Ascomycota

Plesni oddelka **Ascomycota** imenovane tudi "askomicete" se razmnožujejo s spolnimi sporami - **askosporami**, ki se tvorijo v **askusih** (E: ascus, M: asci). Hife imajo številne **septe**. Nespolno razmnoževanje je največkrat s **konidiji**. Večino askomicet najdemo v zemlji, nekatere pa tudi v sladkih in morskih vodah.



Slika 3: Ascomycota: A: različne oblike askusov, B: nastanek askusa, C: prerez peritecija s cilindričnim askusom

Deuteromycota

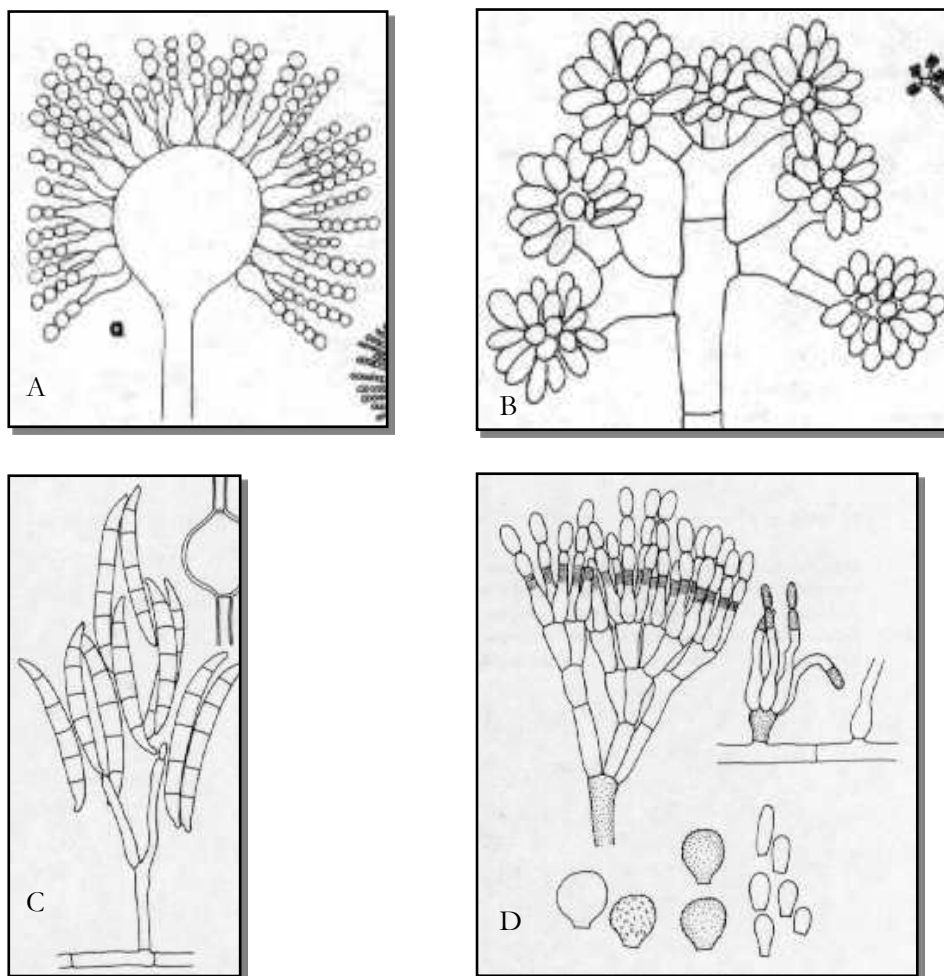
Nespolna oblika določene plesni oziroma strukture, ki tvorijo nespolne spore, se imenuje **anamorf**, spolna oblika se imenuje **telomorf** in skupaj tvorita plesen v celoti – **holomorf**.

Veliko plesni je poznanih le kot anamorfi in ne morejo biti klasificirane kot askomicete ali bazidiomicete, ki jim sicer pripadajo. Klasifikacijski sistem pri plesnih zato dopušča posebno poimenovanje anamorfnih oblik in kot posledica ima veliko plesni dve različni imeni. Na primer ime *Eurotium repens* se nanaša na holomorfno obliko plesni z askosporami in konidiji, medtem ko ime *Aspergillus repens* pomeni le anamorfnobliko iste vrste plesni.

Plesni oddelka **Deuteromycota** so definirane kot septirane plesni, ki ne tvorijo spolnih spor. Te plesni se imenujejo tudi "fungi imperfecti" kot plesni, ki imajo samo **nespolne spore**. Po mitotski delitvi jedra se nespolne spore tvorijo **posamezno** ali v **veržicah** na bolj ali manj specializiranih strukturah in se splošno imenujejo **konidiji** (E: conidium, M: conidia). Za nekatere rodove je značilna tvorba konidijev na specializirani strukturi, ki se imenuje **fialida** ali v celici, ki se imenuje **anelida**. Fialide se lahko nahajajo direktno na zračnem miceliju ali pa so na zračnem miceliju dodatne specializirane celice, ki se imenujejo **metule** (E: metula, M: metulae) in šele nato fialide, ki tvorijo konidije. **Konidiofor** je izraz, ki vključuje zračni micelij ter metule in fialide v primerih, ko so le-te prisotne.

Glavne značilnosti plesni oddelka Deuteromycota:

- nimajo spolnega načina razmnoževanja,
- večina je podobnih plesnim iz oddelka Ascomycota,
- poznanih je približno 1.680 rodov in 17.000 vrst,
- velika večina teh plesni se nahaja na oziroma v zemlji in so saprofiti (povzročajo gnitje) ali paraziti (organizem, ki živi v ali na drugem organizmu – gostitelji in ima od njega korist, gostitelj pa ne) za rastline, relativno malo je živalskih parazitov,
- nespolni način razmnoževanja je najbolj pogosto s sporami, ki so zelo raznolike glede na obarvanost, površinski relief, velikost, obliko, število celic, razporeditev in glede na način tvorbe na miceliju – večina teh lastnosti se uporablja pri identifikaciji rodov in vrst.



Slika 4: Deuteromycota: A: apeks s fialidami in enoceličnimi konidiji pri plesni *Aspergillus*, B: enocelični konidiji značilno v šopih razporejeni na konidioforu pri plesni *Botrytis*, C: večcelični srpasti makrokonidiji pri plesni *Fusarium*, D: anelide in enocelični konidiji s prisekanim topim koncem pri plesni *Scopulariopsis*

3

KLASIFIKACIJA PLESNI

Klasifikacija in identifikacija plesni naj bi temeljila na njihovih različnih načinih spolnega razmnoževanja. Velikokrat pa to ni mogoče, ker plesni tvorijo le nespolne spore (anamorfna oblika plesni). Plesni, ki so kot kvarljivci pomembne za živila, se nahajajo v treh oddelkih Zygomycota, Ascomycota in Deuteromycota.

kraljestvo: **F U N G I**

oddelek: **CHYTRIOMYCOTA**

oddelek: **OOMYCOTA**

oddelek: **ZYGOMYCOTA**

razred: ZYGOMYCETES

red: MUCORALES

družina: MUCORACEAE

rod: ***Rhizopus***

Mucor

družina: THAMNIDIACEAE

rod: *Thamnidium*

oddelek: **ASCOMYCOTA**

razred: ASCOMYCETES

red: SPHAERIALES

družina: SORDARIACEAE

rod: *Neurospora**

družina: EUOTIACEAE

rod: *Bysochlamis*

Chaetomium

oddelek: **BASIDIOMYCOTA**

oddelek: **DEUTEROMYCOTA**

razred: HYPOMYCES

red: HYPOMYCETALES

družina: DEMATIACEAE

rod: *Alternaria*
Cladosporium
Curvularia

družina: MONILIACEAE

rod: *Acremonium*
Aspergillus
Botrytis
Geotrichum
*Chrysonilia**
Penicillium
Scopulariopsis
Trichothecium
Trichoderma

družina: TUBERCULARIACEAE

rod: *Fusarium*

razred: COELOMYCETES

red: SPHAEROPSIDALES

rod: *Phoma*

4

OPISI GLAVNIH RODOV PLESNI

Plesni rodu *Mucor*

MAKROMORFOLOŠKE LASTNOSTI:

- Substratni micelij je rjavo do črno obarvan.
- Zračni micelij je v zgodnjem stadiju belo obarvan, kasneje sivo, nato črno modro zeleno do temno rjavo, je nizke kompaktne strukture.

MIKROMORFOLOŠKE LASTNOSTI:

- Substratni micelij je neseptiran in lahko je razvejan. V njem se kot odebelitve pri nekaterih vrstah lahko tvorijo hlamidospore.
- Hife so neobarvane ali svetlo obarvane.
- Iz hif poženejo sporangiofori, posamično ali v parih, ki so tudi neseptirani.
- Na koncu se sporangiofor razširi v hruškasto kolumelo okoli katere se tvori okrogel sporangij v katerem so sporangiospore, ki so okrogle do ovalne oblike in imajo gladko ali bodičasto površino (ne pa razbrazdano kot plesni rodu *Rhizopus*).

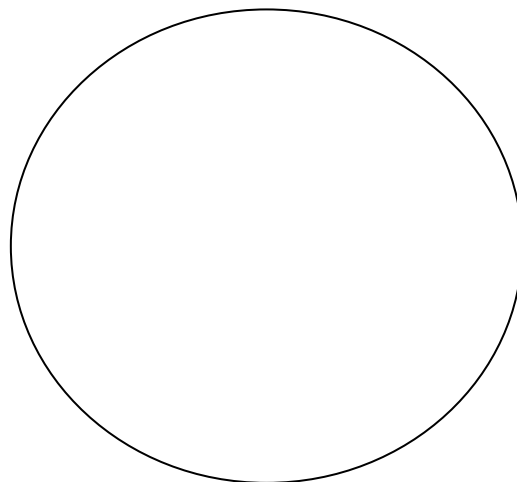
POMEN:

V/na živilih najdemo najmanj 20 različnih vrst iz rodu *Mucor*. Nekatere vrste lahko rastejo v anaerobnih razmerah in tako povzročajo kvar pijač (šibka fermentacija). Rast (kot verižice povezanih "brstečih" celic) je podobna kvasovkam (na preparatu iz tekočine ali tekočega gojišča, čeprav so celice veliko večje od kvasovk). Podobno raste v substratih z visoko koncentracijo NaCl. Plesni rodu *Mucor* so kvarljivci sirov, marmelad, soje, riža, koruze, krompirja.

SLIKA:

Povečava mikroskopa:

1. neseptiran substratni micelij, ki lahko vsebuje hlamidospore
2. neseptiran sporangiofor
3. kolumela
4. okrogli sporangiji
5. sporangiospore



Plesni rodu *Rhizopus*

MAKROMORFOLOŠKE LASTNOSTI:

- Substratni micelij je rjave barve.
- Zračni micelij je sive do rjavo črne barve, je visok, vatasto puhaste strukture, kompakten. Plesen zelo hitro preraste celotno gojišče v petrijevki. Sporangiji so sprva beli, z zorenjem postanejo črni.

MIKROMORFOLOŠKE LASTNOSTI:

- Substratni micelij je neseptiran in vsebuje rizoide, ki izgledajo kot nekakšne korenine po katerih se rod tudi imenuje.
- Na mestih kjer so rizoide se v nasprotni smeri tvorijo sporangiofori, ki so tudi neseptirani.
- Rizoide in sporoangiofori so ponavadi obarvani.
- Sporangiofor se konča s hruškasto tvorbo, ki se imenuje kolumela. Okoli nje se tvori sporangij, v njem se tvorijo sporangiospore. Sporangiospore imajo pogosto razbrazdano površino. Kolumela se s staranjem zgrudi v obliko dežnika.

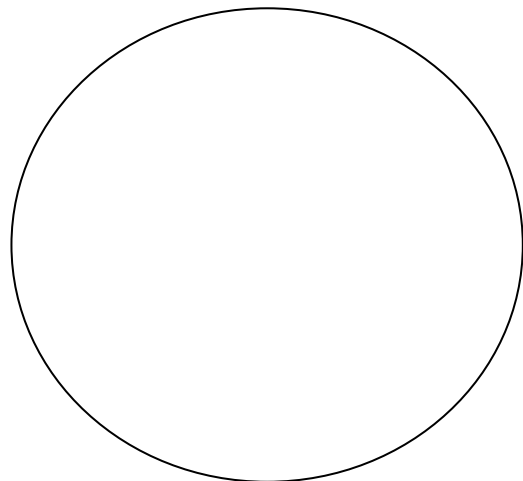
POMEN:

Plesni rodu *Rhizopus* povzročajo gnilobo na različnem sadju (jagode) in zelenjavi (fižol, grah, cvetača). Nekatere vrste so industrijsko pomembne (*R. oligosporus*) pri različnih fermentacijah.

SLIKA:

Povečava mikroskopa:

1. neseptiransubstratni micelij
2. rizoida
3. neseptiran sporangiofor
4. kolumela
5. sporangiji: - polni s sporangiosporami
- prazni brez sporangiospor
6. okrogle ali ovalne sporangiospore



Plesni rodu *Chaetomium*

MAKROMORFOLOŠKE LASTNOSTI:

- Substratni micelij je lahko brezbarven, rjave, sive ali sivo črne barve.
- Kolonije so relativno hitro rastoče, najprej so bele barve, nato se obarvajo sivo olivno zeleno do sivkasto rjave ali črno rjave barve zaradi tvorbe peritecijev, ki dajejo koloniji značilen izgled. Zračni micelij ima puhasto strukturo.
- Razlikovanje vrst v rodu *Chaetomium*:

VRSTA / GOJIŠČE	<i>C. brasiliense</i>	<i>C. funicola</i>	<i>C. globsum</i>
Zračni micelij na CYA	25-30 mm, bele do sive barve	20-25 mm, nizek bel micelij včasih s sivimi lisami	nizek redek bel micelij preraste gojišče z redkimi črnimi peritecijami ($2r=0,2$ mm)
Substratni micelij na CYA	temno siv do črn, včasih brezbarven	brezbarven ali sivo rjave barva	rjav substratni micelij
Zračni micelij na MEA.	25-30 mm, temno sive barve	35-40 mm, nizke kolonije bele ali sive barve	bolj gosta rast, nizka, siva do sivo črna, hife ovijajo številne peritecije
Substratni micelij na MEA	temno sive barve	brezbarven do sivo oliven ali svetlo rjav micelij	rjav substratni micelij

MIKROMORFOLOŠKE LASTNOSTI:

- Periteciji so askokarpi - plodišča obdana s peridijem, to je plastjo sterilnega micelija, so temno rjave do črne barve, imajo obliko podobno jajcu ali ploski steklenici in imajo dolge, goste in čvrste, temno obarvane ter lasem podobne sterilne hife – seta (M: setae). Hife so septirane in nerazvejane s hrapavo površino (*C. globsum*)
- Periteciji imajo odprtino – ostiol, skozi katero izhajajo askusi ali askospore. V periteciji so askusi, ki so cilindrične oblike. V askusu je 4 – 8 enoceličnih askospor, ki so olivno rjave barve in imajo obliko limone.

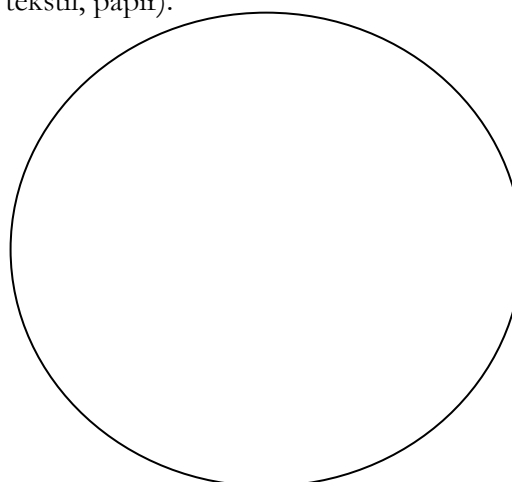
POMEN:

Plesen rodu *Chaetomium* imajo močno celulazno aktivnost in so pogosto v substratih z veliko celuloze, na primer v zemlji, gnoju in gnijočem rastlinju, na materialih z veliko vlage (na primer les, tekstil, papir).

SLIKA:

Povečava mikroskopa:

1. peritecij s hifami
2. septirane hife
3. askospore v obliki limone



Plesni rodu *Acremonium*

MAKROMORFOLOŠKE LASTNOSTI:

- Substratni micelij je neobarvan ali svetlo beige do svetlo oker barve.
- Zračni micelij je nizek, nitaste strukture, svetlo obarvan od bele do svetlo roza barve, svetlo oranžne, rumeno zelene oziroma olivno zelene barve. Kolonije so nizke, zelo počasi rastoče in imajo premer manjši od 25 mm (MEA, inkubacija 10 dni pri 25° C).

MIKROMORFOLOŠKE LASTNOSTI:

- Substratni micelij je septiran in tanek. Na preparatu se vidijo prepleti hif.
- Iz substratnega micelija izhajajo konidiofori, ki so neseptirani in zelo kratki. Na preparatu so vidni kot kratki izrastki na substratnem miceliju.
- Konidiofori tvorijo dolge fialide. Pri nekaterih vrstah fialide izraščajo na substratnem miceliju. Fialide so enostavne in imajo ponavadi obliko šila.
- Fialide tvorijo konidije zaporedno, vendar ne v verižicah. Konidiji so enocelični, podolgovate cilindrične ali ovalne oblike; lahko so tudi nesimetrične oblike. Konidiji so v skupinah, največkrat združeni v zlepljene glavice.

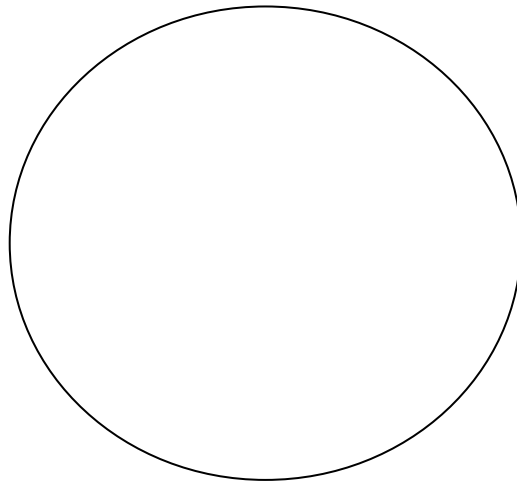
POMEN:

V rodu *Acremonium* so za živila pomembne tri vrste *Acremonium butyri*, *Acremonium strictum* in *Acremonium charticola*. V naravi so te plesni zelo razširjene kot saprofiti, vrsta *Acremonium charticola* je lahko patogena za ljudi. Povzročajo gnilobo na jabolkih, hruškah, bananah in sveži zelenjavi. Plesni vrste *Acremonium strictum* so pogosto izolirali tudi iz pšenice, rži in riža.

SLIKA:

Povečava mikroskopa:

1. substratni micelij: septiran, tanek
2. konidiofor: kratek in neseptiran
3. konidiji:
 - enocelični ovalni do cilindrični,
 - združeni v skupini



Plesni rodu *Alternaria*

MAKROMORFOLOŠKE LASTNOSTI:

- Substratni micelij je rjavo črne barve.
- Zračni micelij je nizek, kompakten, umazano sive do zelene barve oziroma tudi sivo črne barve, kolonije so nizke in kompaktne in imajo premer 50 – 60 mm (CYA, inkubacija 7 dni pri 25° C).

MIKROMORFOLOŠKE LASTNOSTI:

- Substratni micelij je septiran z 1 do 3 septami, je zelo tanek. Na preparatu je svetlejši in tanjši od konidioforov.
- Iz hif izhajajo konidiofori, ki so septirani in kratki (ena, dve do tri celice). V preparatu so ponavadi polomljeni in temnejši od substratnega micelija.
- Konidiofori na koncu tvorijo konidije. V zgodnjem stadiju so konidiji enocelični, koničasti. Z zorenjem se septirajo, najprej prečno, nato še podolžno in imajo značilno obliko kija. Konidiji so pogosto povezani v verižice.

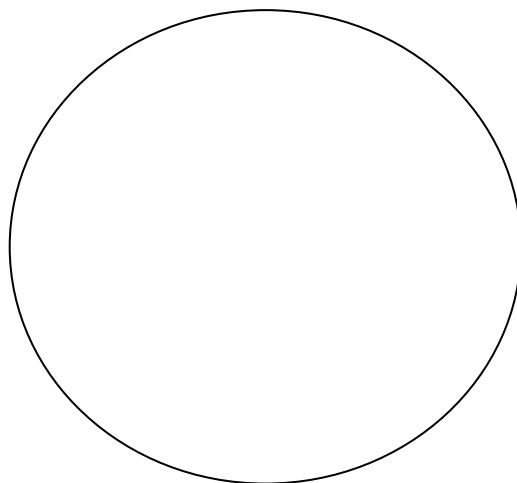
POMEN:

V rodu *Alternaria* je opisanih več vrst in večina je patogenih za rastline kot npr. pšenica, brokoli zelje, cvetača in druga zelenjava, kot kvarljivec se nahaja tudi na melonah in citrusih. Posamezne vrste tvorijo različne toksine, ki jih izločajo v živila (paradižnik, pšenica, koruza, olive).

SLIKA:

Povečava mikroskopa:

1. substratni micelij: septiran, tanek
2. konidiofor: septiran, kratek
3. konidiji:
 - enocelični,
 - prečno in podolžno septirani



Plesni rodu *Aspergillus*

MAKROMORFOLOŠKE LASTNOSTI:

- Substratni micelij: *A. flavus* rumeni, oker do rjavi pigmenti; *A. niger* rumeni do oker pigmenti.
- Zračni micelij: Vrsta *A. flavus* ima zelen do olivno rumen zračni micelij, kolonije imajo premer 60–70 mm (CYA, inkubacija 7 dni pri 25° C), so nizke in vataste strukture. Vrsta *A. niger* ima bel nizek zračni micelij in črn konidije premera 60 mm ali več (CYA, inkubacija 7 dni pri 25° C).

MIKROMORFOLOŠKE LASTNOSTI:

- Substratni micelij je septiran, veliko tanjši od zračnega micelija in razvejan.
- Konidiofor ni septiran, je veliko močnejši, debelejši od substratnega micelija. Na vrhu se razširi v apeks. Bazalna celica v substratnem miceliju, konidiofor in apeks tvorijo veliko celico.
- Na apeksu se tvorijo keglaste celice fialide ali fialide in metule skupaj, ki so radialno razvrščene. Lahko so le primarne fialide ali tudi še sekundarne fialide odvisno od vrste *Aspergillus*. Tvorba fialid je sočasna, medem ko pri rodu *Penicillium* fialide rastejo postopno in pri istem izolatu lahko opazimo fialide, ki tvorijo konidije in hkrati še nerazvite fialide. Za vrsto *A. flavus* so zančilne metule, za vrsto *A. niger* pa fialide in metule.
- Na fialidah se tvorijo konidiji, ki so okrogli z gladko ali malo hrapavo površino in v verižicah do 50. Okrog konidijev nikoli ni ovojnice!

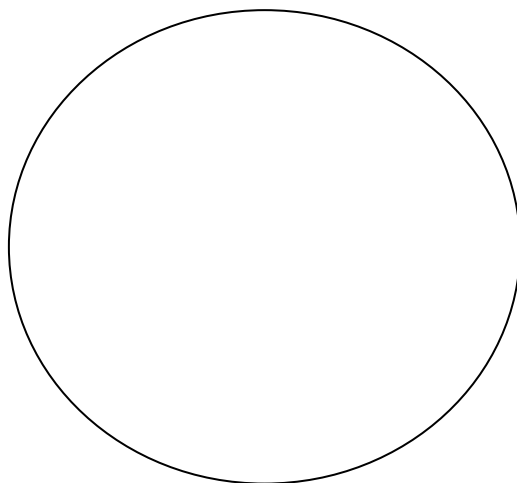
POMEN:

Med 150 poznanimi vrstami v rodu *Aspergillus*, je 30 vrst podrobno opisanih in od teh jih približno 21 vrst najdemo na živilih. Plesni rodu *Aspergillus* spadajo med najpogostejše kvarljivce živil in skupaj s plesnimi rodov *Penicillium* in *Fusarium* tvorijo dominantno skupino plesni na zemlji. Kvarijo kikirikije, lešnike, riž, žita in žitne izdelke, suhomesnate izdelke, sire in drugo sadje in zelenjavo. Nekatere vrste (npr. *A. flavus*) tvorijo aflatoksine, ki so najbolj pomembni mikotoksini. Živilo, ki je okuženo s plesnijo *Aspergillus* ni primerno za uporabo. Plesni rodu *Aspergillus* sodijo tudi med industrijsko zelo pomembne plesni, saj se uporabljajo za sintezo mnogih kemikalij in encimov (npr. *A. niger* pri pridobivanju citronske kisline).

SLIKA:

Povečava mikroskopa:

1. tanek, septiran substratni micelij
2. neseptiran konidiofor
3. apeks s fialidami in metulami
4. konidiji: okrogli v verižicah



Plesni rodu *Botrytis*

MAKROMORFOLOŠKE LASTNOSTI:

- Substratni micelij je bele do sive barve.
- Zračni micelij je nitaste strukture, najprej belo, kasneje pa sivo do temno sivo obarvan. Kolonije prerastejo celo gojišče v petrijevki.

MIKROMORFOLOŠKE LASTNOSTI:

- Substratni micelij je septiran.
- Značilni so dolgi konidiofori, ki so septirani in na koncu nesimetrično razvejani.
- Konidiji so enocelični, elipsoidne oblike in značilno v šopih razporejeni na konidioforih.

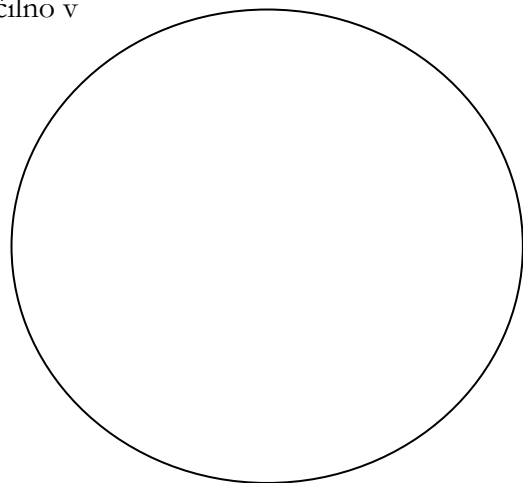
POMEN:

Kot patogena plesen se pojavlja na mnogih rastlinah. Posebej dovzetna za gnilobo je zelenjava (čebula, paradižnik), jagode in drugo sadje (grozdje, jabolka, hruške, jagode, kivi), do okužbe lahko pride pred zrelostjo plodov ali pa kasneje pri skladiščenju in predelavi. Kot kvarljivec se pojavlja tudi na različnih živilskih proizvodih.

SLIKA:

Povečava mikroskopa:

1. substratni micelij: septiran
2. konidiofor: septiran, na koncu nesimetrično razvejan
3. konidiji: elipsoidni, enocelični in značilno v šopih razporejeni na konidioforu



Plesni rodu *Chrysonilia*

MAKROMORFOLOŠKE LASTNOSTI:

- Substratni micelij je brezbarven.
- Zračni micelij je vataste, nitaste strukture, bele do rožnate barve in zelo hitro preraste celo gojišče (tri dni) in tvori veliko oranžnih konidijev, ki so nevarni za kontaminacijo laboratorija. Zato je bolj priporočljiva gojitev te plesni v epruveti.

MIKROMORFOLOŠKE LASTNOSTI:

- Substratni micelij je septiran.
- Zračni micelij je tudi septiran, konidiofori, ki izhajajo iz substratnega micelija so srednje dolgi in se na koncu razvejajo.
- Razmnožuje se z artrokonidiji, ki se zaporedno ločijo od hif.

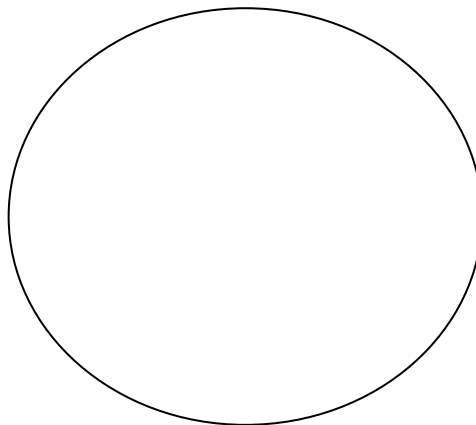
POMEN:

Plesen je poznana kot "rdeča krušna plesen", včasih se pojavi na lešnikih, fižolu in mesnih izdelkih ter pri skladiščenju sadja (jabolka, jagode, maline). Plesen zelo hitro raste tako, da v nekaj dneh preraste gojišče v petrijevki in raste celo iz petrijevke. Zato je pri delu potrebna posebna previdnost (problem kontaminacije laboratorija).

SLIKA:

Povečava mikroskopa:

1. substratni micelij, ki je septiran in debelejši
2. konidiofor: septiran in na koncu razvejan
3. artrokonidiji



Plesni rodu *Cladosporium*

MAKROMORFOLOŠKE LASTNOSTI:

- Substratni micelij je modro črno obarvan.
- Značilne so velike, nizke, kompaktne, baržunaste kolonije, olivno zelene barve.

MIKROMORFOLOŠKE LASTNOSTI:

- Substratni micelij je septiran.
- Konidiofori so razvejani, po obliki podobni drevesom z nežno strukturo. Razraščajo se iz mladih celic. Zaporedno tvorijo enocelične konidije (blastična konidiogeneza), ki so zato po izgledu lahko podobni brstečim kvasnim celicam. Delno ali popolnoma razpadejo na artrokonidije z brsti ali brazgotinami (od brstov). Konidiji so pogosto po obliki, ne po barvi podobni kvasnim celicam. Konidiji so predvsem enocelični, na začetku preden dozori so lahko tudi dvocelični.
- Konidiji so enocelični, elipsoidne oblike.

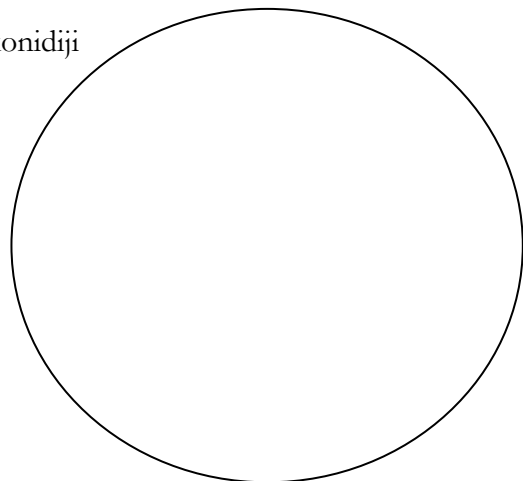
POMEN:

Plesni rodu *Cladosporium* se pojavljajo kot saprofiti in kot patogene plesni za rastline. Konidiji so dobro prilagojeni zračni razpršenosti, saj so majhni, suhi, močno pigmentirani in zelo odporni na sončno svetlobo. Kot patogena plesen se pojavljaj na svežen sadju in zelenjavi, značilen je kvar jagod, paradižnika. Kot kontaminant se pojavlja tudi na drugih živilih. Ker raste tudi pri temperaturah okrog 0° C, povzroča kvar hlajenega mesa in drugih živil skladiščenih pri nizkih temperaturah.

SLIKA:

Povečava mikroskopa:

1. septiran substratni micelij
2. septiran in razvejan konidiofor
3. konidiofor z zaporedno tvorečimi se konidiji
4. enocelični artrokonidiji



Plesni rodu *Curvularia*

MAKROMORFOLOŠKE LASTNOSTI:

- Substratni micelij je siv do modro črn ali rjavo črn.
- Zračni micelij je sivo bele oziroma pogosto rjave do črne barve. Kolonije na CYA so velike (premer 60 mm ali več po inkubaciji 7 dni pri 25° C).

MIKROMORFOLOŠKE LASTNOSTI:

- Substratni micelij: septiran, tanek.
- Konidiofor je septiran, debelejši od substratnega micelija.
- Na konidioforu se tvorijo posamezno, drug za drugim cilindrični, podolgovati konidiji, ki so večcelični. Vedno so prečno septirani (4 - 6 celic). Najprej so enocelični, nato se septirajo prečno.

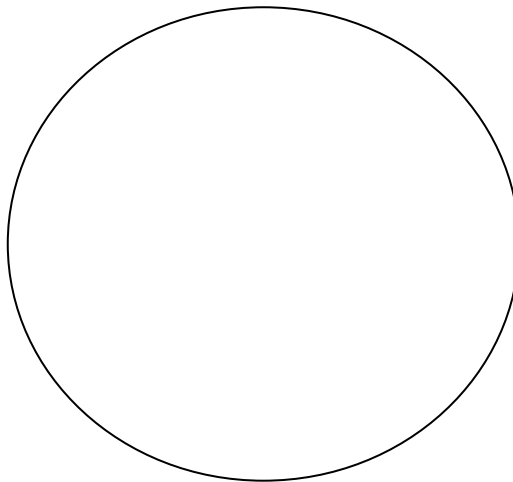
POMEN:

V živilih se najpogosteje pojavlja plesen vrste *Curvularia lunata* najbolj pogosto na rižu, ječmenu in pšenici in povzroča rjavo pegavost. So tudi saprofiti.

SLIKA:

Povečava mikroskopa:

1. substratni micelij: septiran, tanek
2. konidiofor: septiran, močan
3. konidiji: večcelični, podolgovati in prečno septirani



Plesni rodu *Fusarium*

MAKROMORFOLOŠKE LASTNOSTI:

- Substratni micelij je živo obarvan od rumene, rdeče do vijoličaste barve in pigmente izloča tudi v gojišče, ki se zato obarva.
- Zračni micelij je nitast, vatast, belo do svetlo roza, rdeče, vijolično ali rjavo obarvan. Kolonije so velike (40 – 70 mm, CYA, inkubacija 7 dni pri 25° C) in pogosto prerastejo celo gojišče.

MIKROMORFOLOŠKE LASTNOSTI:

- Substratni micelij je septiran. Starejše hife so debelejše, mlajše tanjše in svetlejše.
- Konidiofori so neseptirani, zelo kratki in izhajajo iz substratnega micelija posamično ali v šopih.
- Konidiofori na fialidah lahko tvorijo dve vrsti konidijev:
 - makrokonidiji: so večcelični in v obliki banan, imajo najmanj tri septe
 - mikrokonidiji: večina vrst, ki tvorijo mikrokonidije, tvori enocelične, elipsoidne konidije, ki so lahko nanizani v verižicah ali zlepljeni v neprave glavice
- Hlamidokonidiji: za nekatere vrste v rodu *Fusarium* so značilni tudi hlamidokonidiji v substratnem miceliju.

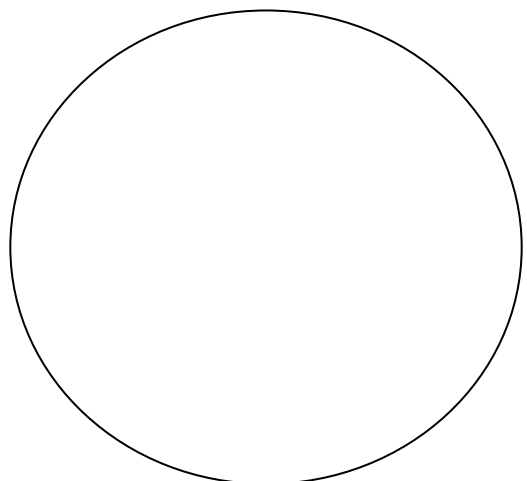
POMEN:

Plesni iz rodu *Fusarium* so poznani rastlinski patogeni mikroorganizmi. Kot kvarljivci, ki povzročajo gnilobo, se nahajajo predvsem na sadju in zelenjavi ter žitnih izdelkih. Tvorijo različne mikotoksine, ki lahko izzovejo slabosti in zastrupitve.

SLIKA:

Povečava mikroskopa:

1. septiran substratni micelij, starejše hife so debelejše, mlajše tanjše in svetlejše
2. kratki konidiofori s fialidami
3. večcelični makrokonidiji
4. enocelični mikrokonidiji oziroma zlepljeni v neprave glavice



Plesni rodu *Geotrichum*

MAKROMORFOLOŠKE LASTNOSTI:

- Substratni micelij je krem, vanilijeve barve.
- Zračni micelij je bele, krem barve in zelo nizek s kompaktno strukturo. Kolonije imajo premer 20 – 45 mm (CYA, inkubacija 7 dni pri 25° C).

MIKROMORFOLOŠKE LASTNOSTI:

- Substratni in zračni micelij sta septirana in se prepletata.
- Razmnožuje se s tvorbo artrokonidijev. To so cilindrične spore, ki nastanejo tako, da se del micelija loči in ko dozori se loči na posamezne artrokonidije.

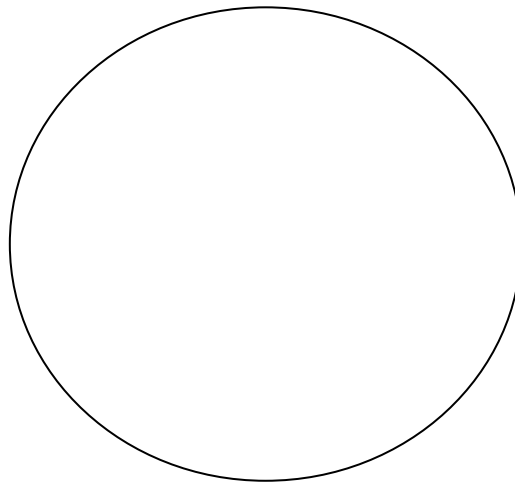
POMEN:

V rodu *Geotrichum* je za živila pomembna vrsta *G. candidum*. Je patogena plesen za citruse (predvsem limone in grapefruit) in povzroča kislo gnilobo. Kot kvarljivec se pojavlja na paradižniku, suhi papriki, korenju, kumarah, čebuli in fižolu. Lahko je kot kontaminant prisotna na procesnih linijah (konzerve, zmrznjena živila). Problem predstavlja tudi v sirarstvu pri proizvodnji mehkih, svežih sirov.

SLIKA:

Povečava mikroskopa:

1. tanek in septiran micelij
2. artrokonidiji cilindrične oblike



Plesni rodu *Scopulariopsis*

MAKROMORFOLOŠKE LASTNOSTI:

- Substratni micelij je rumene do svetlo rjave barve.
- Zračni micelij je različno obarvan, od bele do svetlo rjave barve; nikoli ni zelene ali modre barve. Kolonije so večje ali manjše (40 – 50 mm ali 15 – 30 mm, MEA, inkubacija 7 dni pri 25° C), nizke in redkejša strukture na robovih.

MIKROMORFOLOŠKE LASTNOSTI:

- Substratni micelij je septiran.
- Enostavni ali razvejani konidiofori, ki so septirani.
- Konidiofori imajo na koncu konidiogene celice: anelide, ki tvorijo konidije. Konidiogene celice so lahko posamezno ali na metulah podobno kot pri plesnih rodu *Penicillium* (fialida konidij iztisne, medtem ko se konidij z anelide odtrga in se zato anelida "podaljšuje").
- Konidiji so enocelični, hruškaste oblike z prisekanim topim koncem, ki se najboljše vidi po odpustitvi konidija z anelide. Konidiji so veliki (5 – 8 µm), brezbarvni do rjave barve, pogosto s hrapavo, nagubano površino.

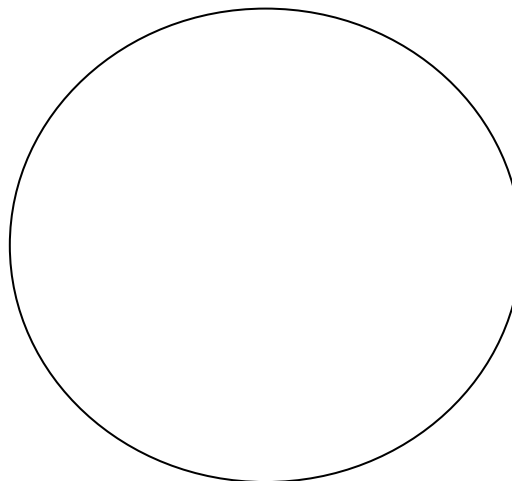
POMEN:

Plesni iz rodu *Scopulariopsis* so saprofiti in se pogosto nahajajo v gnoju, v razpadajoči, v gnili vegetaciji in v zemlji. V živilih se pojavlja vrsta *Scopulariopsis brevicaulis* in sicer v rižu, v riževi moki, v mleku v prahu, v sirih in v maslu. Za človeka je patogena plesen.

SLIKA:

Povečava mikroskopa:

1. septiran substratni micelij
2. septiran konidiofor
3. anelide
4. enocelični konidiji



Plesni rodu *Penicillium*

MAKROMORFOLOŠKE LASTNOSTI:

- Substratni micelij je obarvan rumeno, oker in rjavo.
- Zračni micelij je nizek, vatast, baržunast. Najprej je bele barve, nato se obarva od bele, sive do zelene in modro zelene barve. Konidiji so modre, zelene in bele ali sive barve.

MIKROMORFOLOŠKE LASTNOSTI:

- Substratni micelij je septiran, debelejši in temnejši od zračnega micelija. V preparatu se vidijo prepletene hife.
- Konidiofori posamično ali v parih izhajajo iz bazalnih celice substratnega micelija. So septirani, tanjši in bolj prosojni od substratnega micelija.
- Konidiofor se na koncu cepi v simetrične ali asimetrične razvejitve metule.
- Na metulah se v snopih tvorijo keglaste celice fialide.
- Na fialidah se tvorijo verižice okroglih do elipsoidnih konidijev (do 50) bele ali zelene barve.

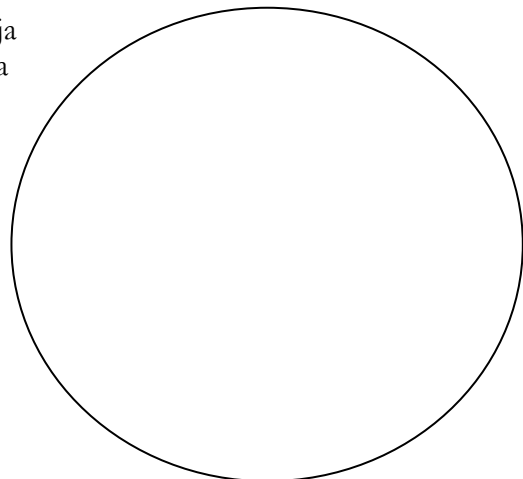
POMEN:

Plesni iz rodu *Penicillium* so, glede na veliko število vrst, ki lahko rastejo na različnih substratih, kot kvarljivci živil med plesnimi najbolj pomembne. Lahko rastejo tudi pri nizkih temperaturah hlajenja in nizkih a_w vrednostih. Splošno razširjene so na žitih in različnih živilih hranjenih v hladilnicah. Večina vrst tvori mikotoksine. Nekatere vrste so tudi industrijsko pomembne, napr. v sirarstvu, *P. camemberti* in *P. roqueforti*, ker imajo zaželeno proteolitično in lipolitično aktivnost ali v farmaciji pri proizvodnji antibiotikov *P. notati*.

SLIKA:

Povečava mikroskopa:

1. substratni micelij: septiran, preplet hif, debelejši in temnejši od zračnega micelija
2. konidiofor: ki se na koncu cepi oziroma tvori metule
3. fialide: keglaste celice na metulah
4. okrogli konidiji: na fialidah v verižicah do 50



Plesni rodu *Phoma*

MAKROMORFOLOŠKE LASTNOSTI:

- Micelij je navadno pigmentiran od sive, rjave do zelene barve in vsebuje piknidijske. Piknidijske dajejo pogosto kolonijam črno rjav izgled. Nekatere kolonije imajo značilno redčo nianso (*Phoma macrostoma*).

MIKROMORFOLOŠKE LASTNOSTI:

- Plesni rodu *Phoma* tvorijo piknidijske. Piknidijske je votlo, sploščeno ali steklenici podobno plodišče. Piknidijske ima eno ali več odprtin – ostioli.
- V piknidijski se tvorijo konidiji (piknidijske so nespolne spore).
- Konidiji so največkrat enocelični, elipsoidne do cilindrične oblike. Lahko so obarvani ali neobarvani.
- Nekatere vrste tvorijo hlamidospore posamezno, v verižicah ali v skupinah (diktiolahlamidospore pri *Phoma glomerata* – imajo podoben izgled kot konidiji pri plesni *Alternaria*).

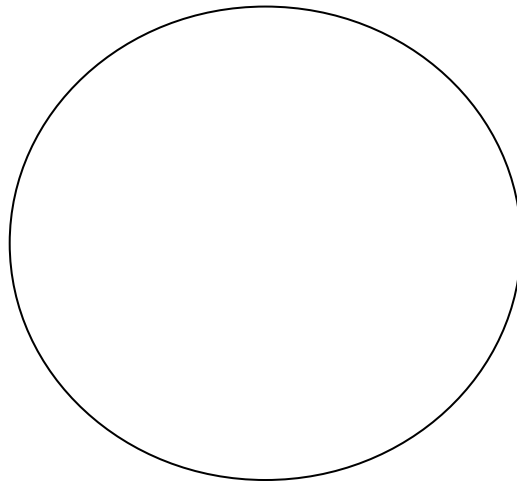
POMEN:

Rod *Phoma* vsebuje več kot 2000 vrst Plesni tega rodu so zelo razširjene v zemlji, pogosto so saprofiti na različnih rastlinah, nekatere vrste so za rastline in človeka patogene.

SLIKA:

Povečava mikroskopa:

1. piknidijske
2. enocelični konidiji



Plesni rodu *Trichothecium*

MAKROMORFOLOŠKE LASTNOSTI:

- Substratni micelij je oranžen.
- Zračni micelij je nizek, vataste strukture in oranžno roza barve. Kolonije na CYA imajo premer 50 – 70 mm (inkubacija 7 dni pri 25° C).

MIKROMORFOLOŠKE LASTNOSTI:

- Substratni in zračni micelij sta septirana in zelo tanka. Pod mikroskopom se po izgledu ne ločita.
- Konidiofor je nerazvejan, na koncu se zaobli in zaobljen del tvori konidije, ki so na konidioforu nanizani v "cik-cak" kratkih verižicah.
- Konidiji so dvocelični in ovalne oblike. Nastanek: najprej se konidiofor odebeli, formira se celična stena in nastane enocelični konidij. Nato se tvori septa in nastane dvocelični konidij. Pod mikroskopom lahko vidimo prazne, zadebeljene eno in dvocelične konidije v značilni obliki črke V.

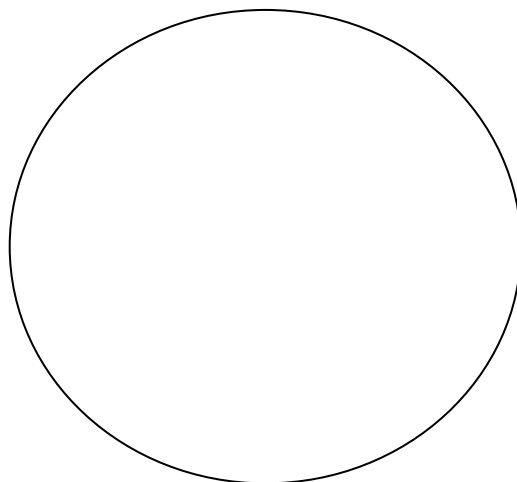
POMEN:

Rod *Trichothecium* vsebuje le eno vrsto *T. roseum*, ki je saprofit in včasih šibek patogen za rastline in živali. Na živilih kot so pšenica, moka, koruza, riž, jabolka, grozdje se pojavlja kot ubikvitaren saprofit. Na splošno kot kvarljivec na živilih ni velikokrat prisotna.

SLIKA:

Povečava mikroskopa:

1. substratni in zračni micelij skupaj
2. konidiji: predvsem so dvocelični in elipsoidne oblike



Plesni rodu *Trichoderma*

MAKROMORFOLOŠKE LASTNOSTI:

- Substratni micelij je brezbarven.
- Kolonije so nizke rasti, zračni micelij je najprej brezbarven, kasneje pa belo zelene barve. Kolonije so rastejo zelo hitro (premer 4 – 9 cm v 5 dneh na krompirjevem agarju) prerastejo celo površino gojišča v petrijevki. Zračni micelij z zorenjem tvori puhasta področja z modro zelenimi "šopi" konidijev.

MIKROMORFOLOŠKE LASTNOSTI:

- Substratni micelij je septiran.
- Konidiofori, ki so tudi septirani, rastejo posamezno ali v kompaktnih šopih iz substratnega micelija. Konidiofori so v obliki nepravilne piramide razvejani v drevesaste tvorbe.
- Na koncih konidiofora se tvorijo fialide, ki so na eni strani oble, na drugi pa koničaste. Različno dolge fialide posamezno ali redkeje v skupinah po 2 do 4 izhajajo iz konidiofora pod različnimi koti.
- Na fialidah se razvijajo okrogli, včasih tudi ovalni konidiji, ki imajo hrapavo površino (*Trichoderma viride*) ali gladko površino (*Trichoderma harzianum*).

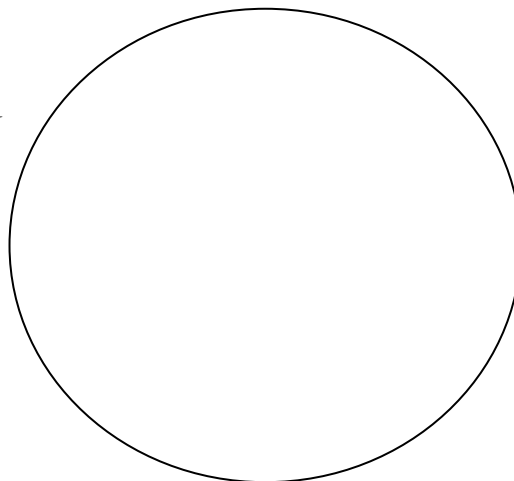
POMEN:

Plesni rodu *Trichoderma* tvorijo majhne konidije, ki se hitro razširijo po zraku in kontaminirajo prostor – zato je potrebna posebna pozornost pri delu s to plesnijo v laboratoriju. Veliko plesni tega rodu tvori hitinaze in celulaze, ki lahko sčasoma popolnoma uničijo druge mikrobne kulture. Plesni rodu *Trichoderma* (predvsem *Trichoderma harzianum*) so kvarljivci jabolk in zelenjave (grah), žit in ker rastejo tudi v notranjosti so povzročitelji gnilobe predvsem pri citrusih (predvsem *Trichoderma viride*).

SLIKA:

Povečava mikroskopa:

1. substratni micelij
2. konidiofor, ki je septiran in razvejan v drevesaste tvorbe
3. fialide na razvejanem konidioforu
4. enocelični konidiji





IDENTIFIKACIJA KVASOVK

GLAVNE LASTNOSTI KVASOVK, UPOŠTEVANE PRI IDENTIFIKACIJI

Glavne lastnosti, ki jih določamo pri identifikaciji kvasovk so mikroskopske (oblika in velikost celic, načini razmnoževanja), kulturelne (rast na trdnem in v tekočem gojišču) ter biokemijske značilnosti (oksidativna in fermentativna poraba ogljikovih spojin, izkoriščanje dušika, tvorba škroba, tvorba različnih encimov) in ekološki znaki (odnos do kisika, odnos do pH, odnos do temperature, odnos do ozmotskega pritiska, rast v prisotnosti antibiotikov).

MIKROSKOPSKE ZNAČILNOSTI

Oblika in velikost celic

Celice kvasovk so lahko različnih oblik (okrogle, ovalne oziroma jajčaste oblike, elipsoidne, podolgovate ali nepravilne oblike) in velikosti (povprečne velikosti: pri okroglih celicah: premer 4 - 6 μm , pri ovalnih celicah: širina 4 –6 μm , dolžina 6 - 10 μm , pri podolgovati celicah širina 4 – 6 μm , dolžina 12 – 16 μm).

Način vegetativnega (nespolnega) razmnoževanja:

BRSTENJE

Ko celica dozori za brstenje nastane na nekem mestu celične stene majhna izboklinica, ki se hitro večja, to pomeni, da celica brsti. Po delitvi jedra se brst oddeli od materine celice in tako nastane nova celica. Na mestu, kjer se nova celica oddeli ostane na površini materine celice in celice brsta okrogla brazgotina. Na tem mestu celici ne moreta več brsteti. Pri optimalnih razmerah traja ta cikel približno dve uri. Pri nekaterih vrstah kvasovk lahko pride do tvorbe **psevdomicelija** in sicer tako, da se novo nastali brst ne oddeli od celice matere in začne že sam brsteti. Z zaporednim ponavljanjem tega procesa dobimo verižice povezanih kvasnih celic, ki se imenujejo psevdomicelij.

Za nekatere kvasovke je značilno, da brstijo le na enem koncu (polarno brstenje), nekatere lahko brstijo na dveh nasprotnih koncih (bipolarno brstenje) in pri tistih kvasovkah, ki lahko brstijo na kateremkoli mestu celice imenujemo to multipolarno brstenje.

PREČNA DELITEV

Nekatere vrste kvasovk se razmnožujejo podobno kot bakterije s prečno delitvijo. Ko celica dozori se jedro razdeli, ti dve novi jedri se oddaljita in na sredini celice se tvori dvojna prečna stena, nato se celici ločita.

Pri hitri rasti se celice kvasovk delijo, ne da bi se po končani delitvi ločile med seboj oziroma oddaljile ena od druge in na ta način nastane **pravi micelij**.

FRAGMENTACIJA

Tiste kvasovke, ki začasno tvorijo psevdomicelij oziroma micelij se lahko razmnožujejo tudi s fragmentacijo, to je tvorbo artrospor oziroma oidijev (rod *Trichosporon*).

BLASTOSPORE

To so spore, ki zrastejo iz micelija ali psevdomicelija in to samo pri kvasovkah, ki nimajo spolnega razmnoževanja ("kot grozdki").

HLAMIDOSPORE

Oblikujejo se le pri nekaterih kvasovkah kot zadebelitve micelija.

Način generativnega (spolnega) razmnoževanja:

TVORBA ASKUSA Z ASKOSPORAMI

Večanje števila kvasovk s spolnim razmnoževanjem je velikokrat počasnejše kot pri brstenju.

Število askospor v askusu je značilno za posamezne vrste kvasovk na primer le 1 - 2 askospori, 4 askospore, 8 askospor ali večje število askospor v askusu.

Za posamezne vrste askosporogenih kvasovk so tudi značilne oblike askospor: oble do jajčaste, elipsoidne, ledvicam ali grahu podobne, srste ali luni podobne, podobne klobuku ali čeladi, iglaste,... značilna je tudi površina askospor, ki je lahko gladka, bodičasta ali bradavičasta.

KULTURELNE ZNAČILNOSTI

Oblika rasti v tekočem gojišču: rast na dnu, ali na vrhu ali pa tvori motnost v epruveti. Rast na trdnem gojišču: opazujemo barvo, obliko, prerez, rob in površino kolonije na gojišču.

BIOKEMIJSKE ZNAČILNOSTI

Oksidativna in fermentativna poraba ogljikovih spojin:

Kvasovke kot vir ogljika uporabljajo sladkorje in še nekatere organske spojine.

Sladkorje lahko uporabljajo fermentativno - to je v anaerobnih procesih in oksidativno. Posamezna vrste sladkorjev lahko izkoriščajo le določene vrste kvasovk in zato nam pri identifikaciji pomagajo te določitve:

-ali kvasovka določen sladkor lahko izkorišča

-ali ga izkoristi fermentativno ali oksidativno.

Izkoriščanje dušika:

Amonijeve soli (na primer amonijev sulfat) pomenijo za kvasovke najprimernejši vir dušika – dušik iz amonijevega sulfata lahko izkoriščajo vse kvasovke. Le manjše število kvasovk lahko izkorišča dušik iz nitratov. Zato uporabljamo to sposobnost kvasovk, da asimilirajo nitrato za identifikacijo.

Tvorba škroba ali škrobu podobnih snovi:

Ta test pomaga pri identifikaciji kvasovk predvsem iz rodu *Cryptococcus*, saj je za nekatere vrste značilno, da tvorijo ekstracelularne polisaharide.

Tvorba encima ureaza:

Nekatere kvasovke imajo encim ureaza, druge nimajo tega encima.

EKOLOŠKI ZNAKI

Odnos do kisika:

Pove nam ali so kvasovke aerobne, anaerobne ali mikroaerofilne in to lahko določamo vzporedno pri gojitvi kulture v tekočem gojišču.

Odnos do pH:

Posamezno kulturo cepimo v gojišča z različnimi vrednostmi pH in po inkubaciji ugotovimo, kje najbolje raste (na primer pH 2,5, 3,5, 4,5).

Odnos do temperature:

Posamezno kulturo inkubiramo pri različnih temperaturah na primer 20° C, 24° C in 37° C in opazujemo, kje je najboljša rast.

Odnos do ozmotskega pritiska:

Kvasovke - kvarljivci lahko rastejo pri zelo visokih koncentracijah sladkorja (60%).

Rast v prisotnosti cikloheksimida:

Nekatere kvasovke lahko rastejo v prisotnosti 0,01% cikloheksimida (antibiotik, ki deluje na mnoge glive, je inhibitor sinteze proteinov v ribosomih evkariontov).



NAVODILA ZA IZVEDBO TESTOV ZA IDENTIFIKACIJO KVASOVK

Teste z oznakami 2, 3, 5, 7, 8, 9 izvedemo s čistimi kulturami na trdnih gojiščih, teste z oznakami 1, 4, 6 izvedemo s suspenzijami čistih kultur v fiziološki raztopini.

1. RAST KVASOVK V TEKOČEM GOJIŠČU

V tekoče gojišče glukoza kvasni pepton (GKP) cepimo 1 ml čiste kulture, premešamo in po 7-dnevni inkubaciji pri 28° C na stresalniku določimo obliko rasti: usedlina, motnost, površinski obroč, otočki na površini, vzdignjeni robovi, mrena.

Vsebinsko epruveto premešamo na mešalniku in naredimo nativni preparat tako, da vzamemo 3 cepilne zanke suspenzije. Določimo obliko celic (okrogla, ovalna, elipsoidna, podolgovata, limonasta, kapljasta, stekleničasta) in način vegetativnega razmnoževanja (brstenje: unipolarno, bipolarno, multipolarno delitev, kombinacija obeh).

2. RAST KVASOVK NA TRDNEM GOJIŠČU

Na trdno gojišče agar GKP s cepilno zanko cepimo preiskovano kulturo (»tri pike«). Po 7-dnevni inkubaciji pri 28° C določimo obliko kolonije, barvo kolonije, površino kolonije (sploščena, gladka, gladka z vzpetino na sredini, gladka s kraterjem na sredini, hrapava s kraterjem na sredini, gladka z micelijem v gojišču, gladka nakodrana, konveksna nakodrana) in rob kolonije (gladek, valovit, narezljan, krpast, nakodran).

3. SPORULACIJA

Na trdno gojišče za sporulacijo: acetatni agar McClary cepimo kulturo s cepilno zanko (»cik-cak«). Po podaljšani inkubaciji 2 - 6 tednov pri 28 °C naredimo barvni preparat. Uporabimo modificirano Kinyounovo metodo (acidorezistentno barvanje). Na objektu stekelcu v majhni kapljici vode razmažemo kulturo s cepilno zanko, razmaz posušimo na zraku, fiksiramo in ga barvamo:

- karbol fuksin 5 min
- barvilo odlijemo
- speremo z 70 % alkoholom
- razbarvamo z raztopino HCl + etanol
- speremo z vodo

- metilensko modrilo 1 min
- speremo z vodo
- preparat osušimo s papirnato brisačo

Dodamo kapljico cedrovega olja in imerzijsko mikroskopiramo. Vegetativne celice in askusi so modre barve, askspore pa rdeče. Za identifikacijo kvasovk je pomembno tudi število askospor v askusu, njihova oblika in površina (sferoidne in gladke, ledvičaste, klobučaste, saturnaste, gladke, sferoidne hrapave, saturnaste hrapave, podolgovate s priveskom, suličaste, iglaste, čeladi podobne).

4. TVORBA PSEVDO ALI PRAVEGA MICELIJA

Dve cepilni zanki kvasne suspenzije cepimo na gojišče krompirjev agar na objektnem stekelcu, ki je v petrijevki (mikrokultura). Gojišče s kulturo pokrijemo s krovnim stekelcem. V petrijevki je kos vate, namočene v sterilno vodo. Po 7- do 14-dnevni inkubaciji pri 28° C mikrokulturo mikroskopiramo in opazujemo tvorbo psevdo ali pravega micelija.

5. ASIMILACIJA DUŠIKOVIH SPOJIN

Na dve trdni gojišči, ki vsebujeta ogljikovo bazo z dodatkom enkrat kalijevega nitrata in drugič pa z dodatkom amonijevega sulfata cepimo kulturo s cepilno zanko »cik-cak«. Po 7-dnevni inkubaciji pri 28° C je pozitivna reakcija rast kolonij na gojišču.

6. FERMENTACIJA GLUKOZE

Uporabimo tekoče gojišče, ki vsebuje 0,5 % kvasni ekstrakt in 50 mM glukoze, in durhamovo cevko. V gojišče cepimo 1 ml čiste kulture in po 7-dnevni inkubaciji pri 28° C določimo kot pozitivno reakcijo pojav plina v durhamovi cevki.

7. TVORBA EKSTRACELULARNIH ŠKROBU PODOBNIH SNOVI

Uporabimo poševno trdno gojišče in kulturo cepimo s cepilno zanko »cik-cak« po gojišču. Po 7-dnevni inkubaciji pri 28° C določimo tvorbo škroba z dodatkom lugolove jodove raztopine. Pozitivna reakcija je modro-vijolično obarvanje površine.

8. TEST NA UREAZO

V tekoče gojišče Christensen cepimo eno cepilno zanko kvasne kulture in dobro premešamo. Inkubacija je pri 37° C, vsakih 30 min (do 2 dni) se določa sprememba barve in pozitivna reakcija je vijolična barva.

9. RAST V PRISOTNOSTI 0,01 % CIKLOHEKSIMIDA

Na trdno gojišče z D-glukozo in s cikloheksimidom (0,01 %) cepimo kulturo s cepilno zanko »cik-cak«. Po 7-dnevni inkubaciji pri 28° C je pozitivna reakcija rast kolonij na gojišču.

GLAVNE LASTNOSTI IZBRANIH KVASNIH KULTUR

Kvasovke rodu *Candida*

Tvorijo v tekočem gojišču usedlino, na trdnem gojišču so kolonije s kraterjem bele barve s hrapavo površino in nazobčanim robom. Celice so oble ali cilindrične oblike in multipolarno brstijo. Nimajo spolnega razmnoževanja. Tvorijo psevdomicelij. Ne rastejo na gojišču s KNO_3 in ne na gojišču s cikloheksimidom. Kvasovke fermentirajo glukozo, ne tvorijo ekstracelularnih škrobu podobnih snovi in nimajo ureaze.

Kvasovke rodu *Debaryomyces*

Na trdnem gojišču tvorijo krem bele kolonije. Kvasovke imajo okrogle ali kratke ovalne celice, ki multipolarno brstijo. Nekatere vrste tvorijo enostaven psevdomicelij. Tvorijo 1 – 2 askospori, redkeje več, v askusu. Askospore so okrogle ali ovalne in imajo bradavičasto površino. Ogljikovih hidratov ne fermentirajo ali zelo slabo. Ne rastejo na gojišču s nitratom in nimajo ureaze. Nekatere vrste lahko rastejo na gojišču s cikloheksimidom.

Kvasovke rodu *Hansenenula*

V tekočem gojišču tvorijo usedlino, kolonije na trdnem gojišču so krem bele barve z gladko površino in kraterjem ter valovitim robom. Celice so okrogle ali ovalne in multipolarno brstijo. Tvorijo 1 – 4 klobuku podobne askospore z gladko površino. Ne tvorijo micelija ali psevdomicelija. Fermentirajo glukozo, izkoriščajo nitrate, ne tvorijo škroba, nimajo ureaze in ne rastejo na gojišču s cikloheksimidom.

Kvasovke rodu *Hanseniaspora*

Tvorijo v tekočem gojišču usedlino; na trdnem gojišču so kolonije krem bele barve, sploščene s svetlečo površino in gladkim robom. Kvasne celice so apikulatne, ovalne in podolgovate oblike in bipolarno brstijo. Tvorijo 1 – 2 askospori, ki so podobne klobuku ali čeladi in imajo hrapavo površino. Psevdomicelija ne tvorijo. Ne rastejo na gojišču s KNO_3 . Fermentirajo glukozo. Ne tvorijo ekstracelularnih škrobu podobnih snovi in nimajo ureaze. Rastejo v prisotnosti cikloheksimida.

Kvasovke rodu *Pichia*

Na trdnem gojišču so kolonije krem bele barve z gladko svetlečo površino in gladkim robom. Kvasne celice so ovalne, podolgovate in multipolarno brstijo. Psevdomicelija ne tvorijo ali pa tvorijo enostaven psevdomicelij. Značilne so klobučaste askospore, v askusu so 4 askospore. Fermentirajo glukozo. Nekateri sevi lahko izkoriščajo nitrate. Ne tvorijo škrobu podobnih snovi in nimajo ureaze, ne rastejo v prisotnosti cikloheksimida.

Kvasovke rodu *Rhodotorula*

V tekočem gojišču tvorijo usedlino in motnost; na trdnem gojišču so kolonije oranžno rdeče barve z gladko površino in robom in imajo na sredini krater. Celice so ovalne ali podolgovate oblike in polarno brstijo. Askospor ne tvorijo. Redke vrste oblikujejo psevdomicelij. Kolonije rastejo na gojišču s KNO_3 in ne rastejo na gojišču s cikloheksimidom. Kvasovke ne fermentirajo glukoze in drugih sladkorjev in ne tvorijo ekstracelularnih škrobu podobnih snovi, imajo pa encim ureazo.

Kvasovke rodu *Saccharomyces*

V tekočem gojišču tvorijo usedlino, motnost in obroč; na trdnem gojišču so kolonije krem bele barve z gladko površino, imajo krater in gladek rob kolonij. Celice so okrogle ali cilindrične oblike in multipolarno brstijo. Tvorijo 1–4 ali več elipsoidnih gladkih askospor. Psevdomicelija ne tvorijo, lahko se pojavijo posamezne hife. Ne rastejo na gojišču s KNO_3 in ne rastejo v prisotnosti cikloheksimida. Fermentirajo glukozo, ne tvorijo ekstracelularnih škrobu podobnih snovi in nimajo ureaze.

Kvasovke rodu *Schizosaccharomyces*

V tekočem gojišču tvorijo usedlino, na trdnem gojišču so kolonije so krem bele barve, površina je gladka in ima na sredini dvignjen center, rob je gladek. Celice so oble do cilindrične oblike in se delijo. Kvasovke tvorijo 1–4 gladke askospore. Ne tvorijo psevdomicelija, ne rastejo na gojišču s KNO_3 in ne na gojišču s cikloheksimidom ter ne tvorijo ekstracelularnih škrobu podobnih snovi. Fermentirajo glukozo in imajo encim ureazo.

Kvasovke rodu *Zygosaccharomyces*

Na trdnem gojišču so kolonije krem bele barve. Razmnožujejo se z brstenjem, in askosporami – imajo do štiri oble askospore. Celice so ovalne, oble oblike in ne tvorijo micelija, psevdomicelija ponavadi ne tvorijo ali pa je zelo enostaven. Fermentirajo glukozo. Ne tvorijo ekstracelularnih škrobu podobnih snovi in nimajo ureaze. Ne rastejo na gojišču s cikloheksimidom in ne na gojišču s KNO_3 .

KULTURA KVASOVK I.

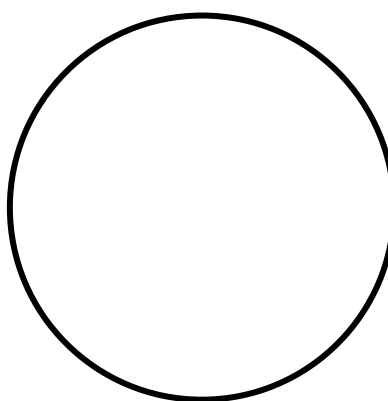
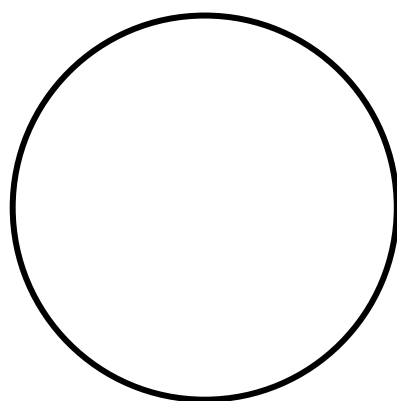
Za kulturo I. določite lastnosti in rezultate vpišite v tabelo!

LASTNOSTI	OPIS REZULTATOV
1. Rast v tekočem gojišču GKP:	
• oblika rasti	
• oblika celic	
• vegetativno razmnoževanje	
2. Rast na trdnem gojišču GKP:	
• barva kolonije	
• površina kolonije	
• rob kolonije	
3. Tvorba askospor	
4. Tvorba psevdomicelija	
5. Asimilacija dušikovih spojin:	
• $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	
• KNO_3	
6. Fermentacija glukoze	
7. Tvorba škroba	
8. Ureaza	
9. Gojišče s cikloheksimidom (0,01 %)	

Narišite slike mikroskopskih preparatov in opišite glavne lastnosti!

Nativni preparat:

Barvni preparat:



Kultura I. je

KULTURA KVASOVK II.

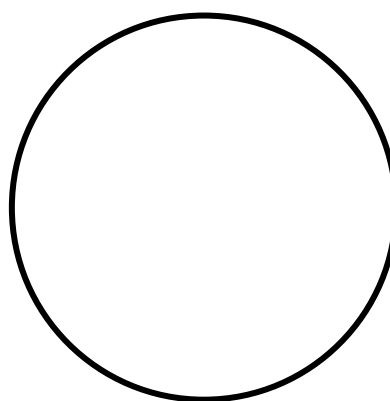
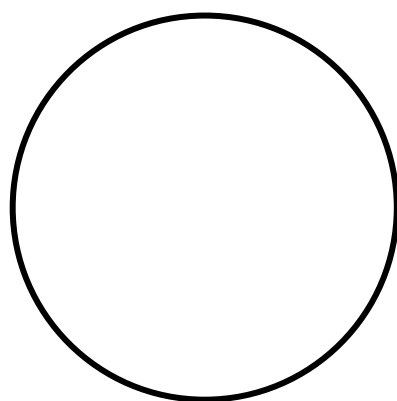
Za kulturo II. določite lastnosti in rezultate vpišite v tabelo!

LASTNOSTI	OPIS REZULTATOV
1. Rast v tekočem gojišču GKP:	
• oblika rasti	
• oblika celic	
• vegetativno razmnoževanje	
2. Rast na trdnem gojišču GKP:	
• barva kolonije	
• površina kolonije	
• rob kolonije	
3. Tvorba askospor	
4. Tvorba psevdomicelija	
5. Asimilacija dušikovih spojin:	
• $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	
• KNO_3	
6. Fermentacija glukoze	
7. Tvorba škroba	
8. Ureaza	
9. Gojišče s cikloheksimidom (0,01 %)	

Narišite slike mikroskopskih preparatov in opišite glavne lastnosti!

Nativni preparat:

Barvni preparat:



Kultura II. je

KULTURA KVASOVK III.

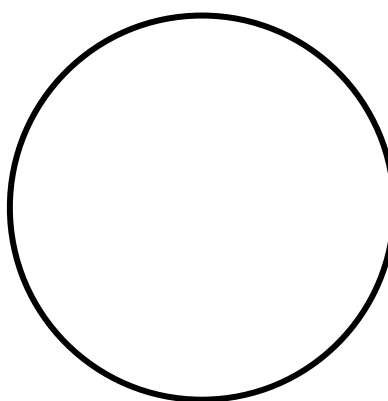
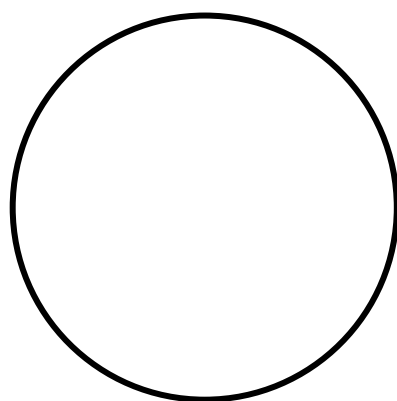
Za kulturo III. določite lastnosti in rezultate vpišite v tabelo!

LASTNOSTI	OPIS REZULTATOV
1. Rast v tekočem gojišču GKP:	
• oblika rasti	
• oblika celic	
• vegetativno razmnoževanje	
2. Rast na trdnem gojišču GKP:	
• barva kolonije	
• površina kolonije	
• rob kolonije	
3. Tvorba askospor	
4. Tvorba psevdomicelija	
5. Asimilacija dušikovih spojin:	
• $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	
• KNO_3	
6. Fermentacija glukoze	
7. Tvorba škroba	
8. Ureaza	
9. Gojišče s cikloheksimidom (0,01 %)	

Narišite slike mikroskopskih preparatov in opišite glavne lastnosti!

Nativni preparat:

Barvni preparat:



Kultura III. je

KULTURA KVASOVK IV.

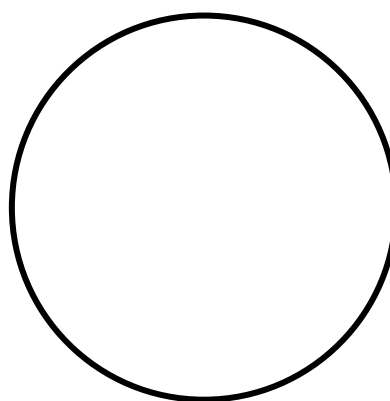
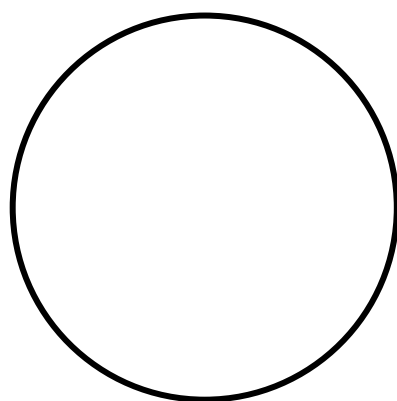
Za kulturo IV. določite lastnosti in rezultate vpišite v tabelo!

LASTNOSTI	OPIS REZULTATOV
1. Rast v tekočem gojišču GKP:	
• oblika rasti	
• oblika celic	
• vegetativno razmnoževanje	
2. Rast na trdnem gojišču GKP:	
• barva kolonije	
• površina kolonije	
• rob kolonije	
3. Tvorba askospor	
4. Tvorba psevdomicelija	
5. Asimilacija dušikovih spojin:	
• $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	
• KNO_3	
6. Fermentacija glukoze	
7. Tvorba škroba	
8. Ureaza	
9. Gojišče s cikloheksimidom (0,01 %)	

Narišite slike mikroskopskih preparatov in opišite glavne lastnosti!

Nativni preparat:

Barvni preparat:



Kultura IV. je

KULTURA KVASOVK V.

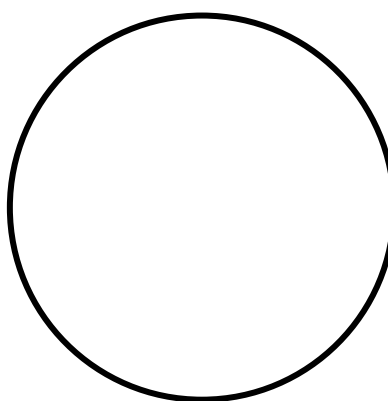
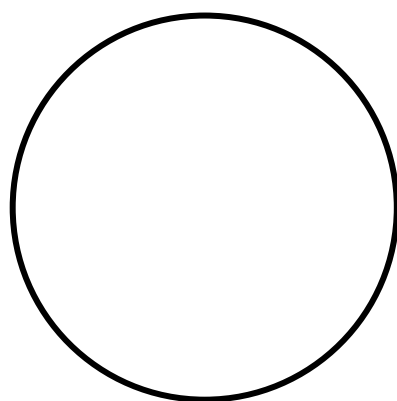
Za kulturo V. določite lastnosti in rezultate vpišite v tabelo!

LASTNOSTI	OPIS REZULTATOV
1. Rast v tekočem gojišču GKP:	
• oblika rasti	
• oblika celic	
• vegetativno razmnoževanje	
2. Rast na trdnem gojišču GKP:	
• barva kolonije	
• površina kolonije	
• rob kolonije	
3. Tvorba askospor	
4. Tvorba psevdomicelija	
5. Asimilacija dušikovih spojin:	
• $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	
• KNO_3	
6. Fermentacija glukoze	
7. Tvorba škroba	
8. Ureaza	
9. Gojišče s cikloheksimidom (0,01 %)	

Narišite slike mikroskopskih preparatov in opišite glavne lastnosti!

Nativni preparat:

Barvni preparat:



Kultura V. je

KULTURA KVASOVK VI.

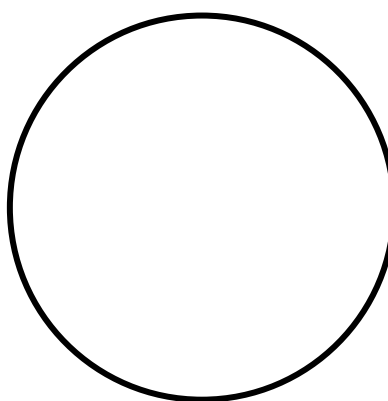
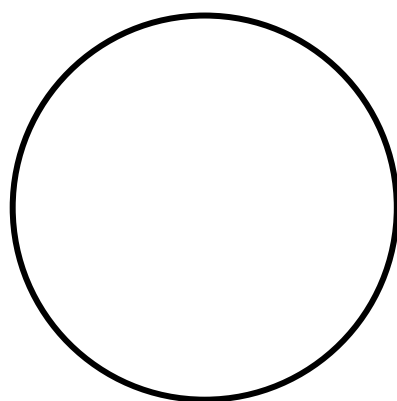
Za kulturo VI. določite lastnosti in rezultate vpišite v tabelo!

LASTNOSTI	OPIS REZULTATOV
1. Rast v tekočem gojišču GKP:	
• oblika rasti	
• oblika celic	
• vegetativno razmnoževanje	
2. Rast na trdnem gojišču GKP:	
• barva kolonije	
• površina kolonije	
• rob kolonije	
3. Tvorba askospor	
4. Tvorba psevdomicelija	
5. Asimilacija dušikovih spojin:	
• $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	
• KNO_3	
6. Fermentacija glukoze	
7. Tvorba škroba	
8. Ureaza	
9. Gojišče s cikloheksimidom (0,01 %)	

Narišite slike mikroskopskih preparatov in opišite glavne lastnosti!

Nativni preparat:

Barvni preparat:



Kultura VI. je

KULTURA KVASOVK VII.

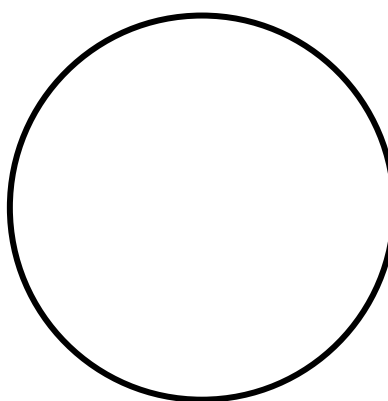
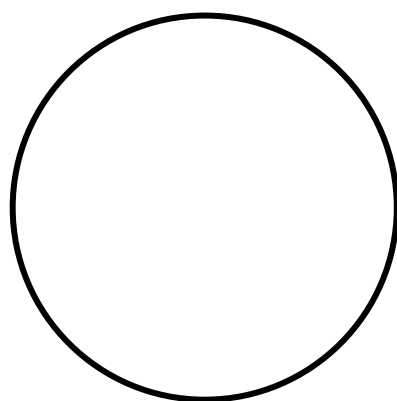
Za kulturo VII. določite lastnosti in rezultate vpišite v tabelo!

LASTNOSTI	OPIS REZULTATOV
1. Rast v tekočem gojišču GKP:	
• oblika rasti	
• oblika celic	
• vegetativno razmnoževanje	
2. Rast na trdnem gojišču GKP:	
• barva kolonije	
• površina kolonije	
• rob kolonije	
3. Tvorba askospor	
4. Tvorba psevdomicelija	
5. Asimilacija dušikovih spojin:	
• $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	
• KNO_3	
6. Fermentacija glukoze	
7. Tvorba škroba	
8. Ureaza	
9. Gojišče s cikloheksimidom (0,01 %)	

Narišite slike mikroskopskih preparatov in opišite glavne lastnosti!

Nativni preparat:

Barvni preparat:



Kultura VII. je

KULTURA KVASOVK VIII.

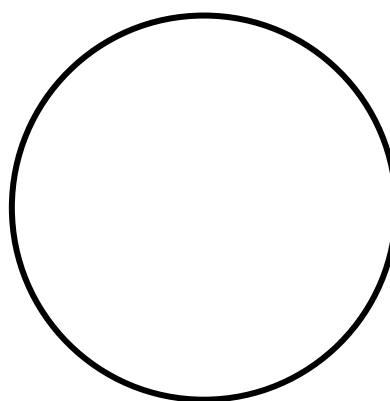
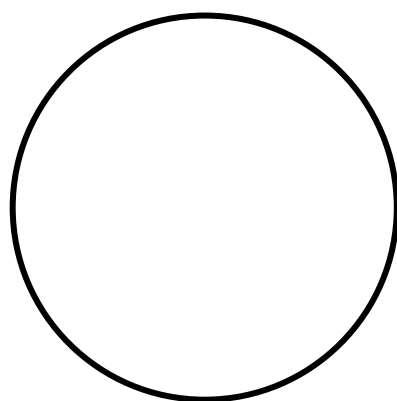
Za kulturo VIII. določite lastnosti in rezultate vpišite v tabelo!

LASTNOSTI	OPIS REZULTATOV
1. Rast v tekočem gojišču GKP:	
• oblika rasti	
• oblika celic	
• vegetativno razmnoževanje	
2. Rast na trdnem gojišču GKP:	
• barva kolonije	
• površina kolonije	
• rob kolonije	
3. Tvorba askospor	
4. Tvorba psevdomicelija	
5. Asimilacija dušikovih spojin:	
• $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	
• KNO_3	
6. Fermentacija glukoze	
7. Tvorba škroba	
8. Ureaza	
9. Gojišče s cikloheksimidom (0,01 %)	

Narišite slike mikroskopskih preparatov in opišite glavne lastnosti!

Nativni preparat:

Barvni preparat:



Kultura VIII. je

.....



IDENTIFIKACIJA BAKTERIJ

Identifikacijske sheme niso klasifikacijske sheme. Identifikacijska shema za skupino mikroorganizmov je lahko narejena šele potem, ko je bila skupina mikroorganizmov klasificirana, kar pomeni, da je bila po določenih lastnostih različna od drugih skupin.

Na splošno velja, da so lastnosti organizmov izbrane za identifikacijske sheme, lahko določljive. Prav tako naj bi bilo teh lastnosti čim manj oziroma toliko kolikor je nujno potrebno za identifikacijo.

GLAVNE LASTNOSTI BAKTERIJ, UPOŠTEVANE PRI KLASIFIKACIJI IN IDENTIFIKACIJI

Vsak organizem je potrebno najprej klasificirati, to pomeni uvrstiti v določeno skupino oziroma klasifikacijsko shemo. Glede na klasifikacijo se nato izdelajo identifikacijske sheme za praktično uporabo pri identifikaciji različnih organizmov.

Glavne lastnosti bakterij pri njihovi klasifikaciji in identifikaciji so morfološke, fiziološke in metabolične in serološke lastnosti, fagotipizacija, ekološke značilnosti, genetske analize in molekularne lastnosti.

MORFOLOŠKE LASTNOSTI

Mikromorfološke lastnosti:

Oblika celic: koki (največkrat okrogli, včasih ovalni ali elipsoidni), bacili ali paličaste bakterije, svedraste oblike (vibrion, spirila, spiroheta).

Formacija celic:

Koki so lahko posamično (monokok) ali pa se združujejo v pare (diplokok), verižice (streptokok), v obliko grozda (stafilokok), v obliko ploščice, ki je debela le en kok (mikrokok) ali v obliko kocke (sarcina).

Paličaste bakterije so lahko posamično ((mono)bacil) ali pa združene v v parih (diplobacili) ali v verižicah (streptobacili).

Velikost bakterij: Velikost bakterijskih celic je različna in se meri z mikrometri, $1\mu\text{m} = 10^{-6}\text{m}$ (na primer paličaste bakterije *Escherichia coli* so velike $1 \times 3\mu\text{m}$), medtem ko so evkariontske celice veliko večje (premer tudi več kot $200\mu\text{m}$).

Reakcija na barvanje po Gramu: celice grampozitivnih bakterij se obarvajo modro violično, celice gramnegativnih bakterij se obarvajo rožnato rdeče.

Kapsule: Pri mnogih bakterijah pokriva celično steno še ena bolj ali manj debela plast, ki jo imenujemo kapsula. Zgradba kapsul je različna (polisaharidi, polipeptidi).

Sporogenost: Nekatere bakterije tvorijo endospore, ki so lahko manjše kot je premer celice: terminalne, subterminalne ali centralne ali večje kot je premer celice: klostridialna ali plektridialna oblika.

Število in lokacija flagel: je za vrsto ali sev značilna lastnost.

Makromorfološke lastnosti:

Oblika kolonije (pikčaste ($2r < 1\text{mm}$), okrogle ($2r > 1\text{mm}$), nepravilne, rizoidne), **rob kolonije** (gladek, nazobčan, rizoiden), **prerez kolonije** (nizek, raven, dvignjen, blazinast, konveksen), **barva kolonije** (večina bakterij tvori brezbarvene do bele, krem kolonije; nekatere bakterije tvorijo pigmente, na primer bakterije vrste *Staphylococcus aureus* tvorijo karotenoide in so kolonije rumeno obarvane), **površina kolonije** (gladka, mat, sijajna, sluzasta, granulirana, s koncentričnimi krogi, radialno nazobčana).

FIZIOLOŠKE IN METABOLIČNE LASTNOSTI

Fiziološke in metabolične lastnosti bakterij so zelo pomembne, ker so direkten odraz narave in aktivnosti bakterijskih encimov in transportnih proteinov. Ker so proteini pogojeni z genetsko sestavo, analize teh lastnosti omogočajo indirektno primerjavo bakterijskih genomov. Med najbolj pomembnimi fiziološkimi in metaboličnimi lastnostmi so izkoriščanje različnih virov ogljika in dušika, fermentacijski produkti, mehanizmi pretvorbe energije, gibljivost, ozmotska toleranca, odnos do kisika (striktni anaerobi, fakultativni anaerobi, striktni anaerobi in mikroaerofili), tvorba sekundarnih metabolitov ter učinki metaboličnih inhibitorjev in antibiotikov.

SEROLOŠKE LASTNOSTI IN FAGOTIPIZACIJA

Mikroorganizmi delujejo kot antigeni, ki v gostitelju povzročijo tvorbo protiteles. Antiserumi so komercialno dostopne raztopine protiteles, ki se jih lahko uporablja pri identifikaciji bakterij, saj so reakcije antigen – protitelo zelo specifične. Protitelesa so lahko vrstno specifična ali specifična za posamezne seve. Fagotipizacija pomeni določitev fagov na katere je občutljiva bakterija in se uporablja za ločevanje sevov znotraj ene vrste.

EKOLOŠKE ZNAČILNOSTI

Primeri taksonomsko pomembnih lastnosti so življenjski cikel, narava simbiotskega odnosa, sposobnost bakterij, da povzročajo bolezni (patogenost), gostiteljeve lastnosti kot so pH, temperatura, kisik,..., optimalna temperatura, optimalna vrednost pH.

GENETSKE ANALIZE

Med najbolj pomembnimi genetskimi lastnostmi pri bakterijah je študij izmenjave genetskega materiala pri transformaciji in konjugaciji ter študij plazmidov.

MOLEKULARNE LASTNOSTI

Pri klasifikaciji so študije proteinov in nukleinskih kislin zelo pomemben del raziskav. Amino kislinske sekvence proteinov direktno odražajo sekvence molekul mRNK in s tem tudi strukturo genov odgovornih za njihovo sintezo. Primerjava proteinov različnih bakterij je tako taksonomsko zelo pomembna lastnost. Proteine se lahko primerja direktno z primerjavo amino kislinskih sekvenc proteinov z enakimi funkcijami. Ker so to precej zamudne analize, se velikokrat poslužujejo hitrejših metod, kot na primer elektroforetska gibljivost proteinov in reakcije protitelo – antigen. Vedno bolj pomembno področje je študij in proučevanje nukleinskih kislin (RNK, DNA), saj je njihova analiza neodvisna od fenotipskih lastnosti. Primerjava bakterijskih genomov je možna na več načinov:

- določitev mol % G + C v DNK, pri bakterijah mol % G + C variira med 25 % in 80 %, vendar je kljub tako širokemu območju, pa je ta % za določeno vrsto konstanten in značilen.
- različne hibridizacijske tehnike
- najbolj natančne podatke se dobi s sekvenciranjem (dela) DNK

Numerična taksonomija

Numerična taksonomija pomeni kvantitativen pristop oziroma način obdelave podatkov in je po definiciji grupiranje taksonomskih enot v skupine na osnovi enakovrednih lastnosti z numeričnimi metodami. To pomeni, da se podatki o lastnostih organizmov priredijo za računalniško obdelavo in da se izvede numerična analiza. Klasifikacija temelji na splošni podobnosti organizmov. Za natančno in zanesljivo klasifikacijo se uporabi od 50 do nekaj 100 lastnosti organizma. Izračunana podobnost med izolati služi za njihovo razvrščanje v različne taksonomske nivoje. Če je podobnost 90 % ali več se izolata uvrstita v isto vrsto.

Standardizirane metode

Rezultati različnih testov so odvisni od velikosti inokuluma, inkubacijske temperature, časa inkubacije, sestave medija, razmerja med površino in volumnom medija. Zato naj bi bile vse razmere standardizirane, kar je izvedbeno zelo zahtevno in ni vedno izvedljivo. V veliko pomoč so komercialni večtestni sistemi (na primer API). Nujna je tudi primerjava rezultatov preiskovanega seva z rezultati, ki jih dajo sevi, katerih identiteta je določena (referenčni sevi).

Definicija pozitivnega in negativnega rezultata reakcije

Rezultati testov naj bi bili ponovljivi in jasno opredeljeni kot pozitivni in negativni rezultati. Ker tako idealnih testov ni, je potrebno natančno definirati, kaj pomeni pozitiven in, kaj negativen rezultat, da je določen test lahko uporaben v identifikacijski shemi.

Čista kultura

Čista kultura je, z redkimi izjemami, vedno nujna za izvajanje identifikacijskih testov. Novejše tehnike identifikacije, ki uporabljajo genske sonde ali verižno reakcijo s polimerazo (PCR, angl. polymerase chain reaction), se lahko izvajajo tudi v mešanih mikrobnih populacijah.

Splošen potek identifikacije:

1. Izolacija čiste mikrobne kulture
2. Nadaljevanje dela od širših kategorij proti vedno bolj specifičnim organizmom
3. Uporaba vseh informacij, da se čim bolj zoži obseg možnih organizmov
4. Uporabi se najmanjše možno število testov
5. Primerjava izolata z referenčnim sevom

GRAMNEGATIVNE BAKTERIJE

Po Bergeyevem priročniku so bakterije razdeljene v 4 oddelke od katerih so 3 oddelki bakterije in eden arheje (I. gramnegativne bakterije s celično steno, II. grampozitivne bakterije s celično steno, III. bakterije brez celične stene, IV. arheje). Vsak oddelek je naprej razdeljen na razrede in ti v rede, družine, rodove in vrste.

V Bergeyevem priročniku so gramnegativne bakterije razvrščene v 7 skupin in od teh so za živilstvo pomembne predvsem naslednje:

SKUPINA 2: AEROBNE / MIKROAEROFILNE, GIBLJIVE, HELIČNE ALI VIBRION GRAMNEGATIVNE BAKTERIJE

So gramnegativne celice helične ali vibron oblike (manj kot en zavo), gibljive. Imajo respiracijski metabolizem in potrebujejo kisik kot končni akceptor elektronov. So aerobi ali mikroaerofili. Nahajajo se v zemlji, vodi, morski vodi, rastlinah, prebavnem traktu živali in ljudi. Nekatere vrste so patogene.

rodovi: *Campylobacter*

SKUPINA 4: GRAMNEGATIVNE AEROBNE / MIKROAEROFILNE PALČKE IN KOKI

So gramnegativne palčke ali koki z respiratornim tipom metabolizma in potrebujejo kisik kot končni akceptor elektronov. Nahajajo se v zemlji, vodi, morski vodi, rastlinah, prebavnem traktu živali in ljudi. Nekatere vrste so patogene.

rodovi: *Acetobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Brucella*, *Flavobacterium*, *Legionella*, *Moraxella*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Xantomonas*

SKUPINA 5: FAKULTATIVNO ANAEROBNE GRAMNEGATIVNE PALČKE

So gramnegativne palčke, ki lahko rastejo v aerobnih razmerah in imajo respiracijski tip metabolizma ali v anaerobnih razmerah s fermentacijskim tipom metabolizma. Lahko so prosto živeče ali v asociaciji s človekom, živalmi ali rastlinami. Nekatere vrste so patogene.

PODSKUPINA 1: družina Enterobacteriaceae

rodovi: *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Kluyvera*, *Proteus*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Yersinia*

PODSKUPINA 2: družina Vibrionaceae

rodovi: *Aeromonas*, *Vibrio*

GRAMPOZITIVNE BAKTERIJE

V Bergeyevem priročniku so grampozitivne bakterije brez aktinomicet razvrščene v 6 skupin in od teh so za živilstvo najbolj pomembne naslednje:

SKUPINA 17: GRAMPOZITIVNI KOKI

So grpozitivni koki, mezofilne in nesporogene bakterije. Lahko so aerobi, fakultativni anaerobi ali striktni anaerobi.

rodovi: *Enterococcus*, *Micrococcus*, *Pediococcus*, *Sarcina*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*

SKUPINA 18: SPOROGENE GRAMPOZITIVNE PALČKE IN KOKI

Značilna je tvorba endospor odpornih na toploto (70° - 80° C, 10 min). Večinoma so gibljive bakterije, lahko so aerobi, fakultativni anaerobi, mikroaerofili ali anaerobi.

rodovi: *Bacillus*, *Clostridium*

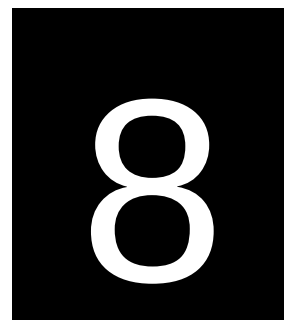
SKUPINA 19: PRAVILNE, NESPOROGENE GRAMPOZITIVNE PALČKE

So grampozitivne nesporogene bakterije, nepigmentirane, mezofilne. Nekatere vrste so patogene.

rodovi: *Brochothrix*, *Lactobacillus*, *Listeria*

SKUPINA 20: NEPRAVILNE, NESPOROGENE GRAMPOZITIVNE PALČKE

rodovi: *Acetobacterium*, *Bifidobacterium*



NAVODILA ZA IZVEDBO TESTOV ZA IDENTIFIKACIJO BAKTERIJ

OSNOVNI TESTI

1. RAST NA TRDNEM GOJIŠČU

Uporabimo trdno neselektivno gojišče (na primer hranljivi agar, NA) in čisto kulturo cepimo s cepilno zanko (izolacija). Po 24-urni inkubaciji pri 37° C določimo:

- morfologijo kolonije: oblika, rob, prerez in barva
- morfologijo celic: naredimo mikroskopski razmaz, ki ga barvamo po Gramu in opazujemo: obliko celic, formacijo celic in reakcijo na barvanje po Gramu.

2. SPOROGENOST

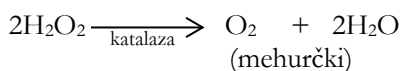
Sporogenost bakterij določimo iz testa 1 tako, da naredimo mikroskopski razmaz in ga barvamo po Schaeffer-Fulton.

3. TEST NA KATALAZO

V tri kapljice H₂O₂ (3 %) na objektnem stekelcu umešamo eno kolonijo iz testa 1 in pojav mehurčkov kisika pomeni, da ima bakterija encim katalazo.

Katalaza je encim, ki ga tvorijo nekatere aktivno rastoče aerobne bakterije. Striktni anaerobi nimajo sposobnosti uporabljati kisik pri respiraciji in zato tudi nimajo katalaze.

Pozitiven rezultat testa:



4. RAST V POLTRDNEM POKONČNEM GOJIŠČU

Uporabimo poltrdno pokončno gojišče za gibljivost bakterij z 0,3 % agarja in cepimo s cepilno iglo - vbod do dna. Po 24-urni inkubaciji pri 37° C določimo rast bakterij in s tem gibljivost:

- enakomerna rast ob vbodu - negibljive bakterije
- drevesasta rast ob vbodu - gibljive bakterije
- raztresena rast po celotnem gojišču - zelo gibljive bakterije

5. ODNOS DO KISIKA

Uporabimo trdno gojišče, ki ga pred uporabo raztopimo in ohladimo na 45° C. Čisto kulturo (0,1 ml) cepimo v gojišče z avtomatsko pipeto in suspenzijo premešamo. Po 24-urni inkubaciji pri 37° C določimo:

- rast le na dnu - anaerobne bakterije
- rast po celotnem gojišču - fakultativno anerobne bakterije
- rast na površini gojišča - aerobne bakterije
- rast tik pod površino gojišča – mikroaerofilne bakterije

6. FERMENTACIJA SLADKORJEV

Uporabimo tekoče gojišče, ki vsebuje pepton, določen sladkor, indikator vrednosti pH in durhamovo cevko. V gojišču z oznako 6.a je kot sladkor glukoza in indikator brom krezol purpur, v gojišču 6.b je laktoza in indikator brom timol modro. Cepimo v vsako gojišče po 1 ml čiste kulture, suspenzijo premešamo in po 24-urni inkubaciji pri 37° C opazujemo tvorbo kisline in pojav plina v durhamovi cevki.

Pozitiven rezultat testa:

sladkor $\longrightarrow$ kislina (pH se zniža) ali kislina in plin
(rumena barva ali rumen barva in mehurčki v durhamovi cevki)

7. PROTEOLIZA

Uporabimo poltrdno gojišče (mesno peptonski bujon, MPB) z dodatkom želatine (120g/l) in kulturo cepimo s cepilno iglo (vbod do dna). Po 24-urni inkubaciji pri 37°C moramo gojišče ohladiti v hladilniku, ker je želatina pri temperaturah nad 20 ° C tekoča. Opazujemo utekočinjenje želatine, ki pomeni, da imajo preiskovane bakterije ekstracelularne proteolitične encime, želatinaze.

Pozitiven rezultat testa:

želatina $\xrightarrow{\text{želatinaza}}$ polipeptidi (verige amino kislin)
polipeptidi $\xrightarrow{\text{želatinaza}}$ posamezne amino kisline (utekočinjeno gojišče)

DODATNI TESTI

Glede na rezultate osnovnih testov izberemo dodaten test / dodatne teste, s katerim(i) identificiramo preiskovano bakterijsko kulturo.

1. HEMOLIZA

Uporabimo trdno gojišče krvni agar (KA), ki vsebuje kri in kulturo cepimo s cepilno zanko (izolacija). Krvni agar je obogatitveno in diferencialno gojišče na katerem določamo različne tipe hemolize. Po 24-urni inkubaciji pri 37° C opazujemo:

- nastanek zelene cone okrog kolonij pomeni, da α -hemolizini deloma razgradijo hemoglobin
- nastanek prozorne cone okrog kolonij pomeni, da β -hemolizini popolnoma razkrojijo hemoglobin
- rast kolonij brez cone pomeni, da kultura nima hemolizinov

2. LIPOLIZA

Na trdno gojišče Tributyrin agar, ki kot edini vir ogljika vsebuje tributirin cepimo kulturo (»črta«) s cepilno zanko. Po 24-urni inkubaciji pri 37° C določimo lipolitične bakterije z rastjo kolonij okoli katerih je prozorna cona.

3. TVORBA INDOLA

Preiskovano kulturo cepimo v peptonsko vodo, ki vsebuje triptofan (aminokislina z indolovim obročem). Po 24 urni inkubaciji pri 37°C, dokažemo sproščeni indol z dodatkom Ehrlichovega reagenta in Kovačevega reagenta. V primeru pozitivne reakcije se izloči živordeč indolov obroč.

Triptofan se s pomočjo triptofanaz, ki jih tvorijo nekatere bakterije, in vode hidrolitsko cepi, in nastane indol. Indol reagira z aldehidno skupino p-metilaminobenzaldehida (sestavini Ehrlichovega in Kovačevega reagenta). Nastane rdeče obarvan kompleks.

Pozitiven rezultat testa:

triptofan $\xrightarrow{\text{triptofanaza}}$ NH₃ + piruvična kislina + indol

indol + Ehrlichov reagent + Kovačev reagent $\longrightarrow$ rdeče obarvan kompleks

4. TEST NA METIL RDEČE

Kulturo cepimo v tekoče gojišče z glukozo (gojišče MR-VP), premešamo in po 2-5 dnevni inkubaciji pri 35° C ugotavljamo način pretvorbe glukoze. Večina enterobakterij v 24 urah pretvori glukozo do piruvične kisline. Nekatere enterobakterije v naslednjih 2–4 dnevih piruvično kislino pretvorijo v različne kisline (mlečna, očetna, mravljična kislina), ki jih dokažemo z dodatkom indikatorja metil rdeče, če se gojišče obarva rdeče. Pri pH vrednosti 6,0 je indikator metil rdeče rumene barve. Če se tvori manjša količina kislin, se pH vrednost sicer zniža, vendar ne pade pod 4,2. Oranžna barva po dodatku indikatorja zato pomeni negativen rezultat testa.

Pozitiven rezultat testa:

glukoza $\longrightarrow$ piruvična kislina (po enodnevi inkubaciji pri 35° C)

piruvična kislina $\longrightarrow$ različne kisline, pH < 4,2

različne kisline + metil rdeče $\longrightarrow$ rdeča barva gojišča

5. TEST NA VOGES PROSKAUER

Iz gojišča v testu 4 dokazujemo tudi tvorbo acetoina (acetilmetilkarbinola) tako, da po inkubaciji odlijemo 2,5 ml suspenzije v novo epruveto in dodamo raztopino α -naftola (6 kapljic) in raztopino KOH (2 kapljici). Premešamo in če v 15-ih minutah nastane rdeča barva je test na VP pozitiven.

Razgradnja glukoze pri nekaterih enterobakterijah lahko poteka preko piruvata do nevtrálnih produktov kot je acetoin. Acetoin se ob dodatku KOH in pod vplivom kisika iz zraka, pretvori v diacetil. Ta tvori rdeč kompleks ob prisotnosti α -naftola.

Pozitiven rezultat testa:

glukoza $\longrightarrow$ piruvična kislina

piruvična kislina $\longrightarrow$ acetoin

acetoin + α -naftol + KOH $\longrightarrow$ rdeča barva gojišča

6. IZKORIŠČANJE CITRATA

Na poševno gojišče, ki kot edini vir ogljika vsebuje citrat, cepimo kulturo s cepilno zanko. Po 24 – 48 urni inkubaciji pri 37°C opazujemo rast bakterij in spremembo barve gojišča. V gojišču je dodan indikator bromtimol modro (zelene barve pri pH 6,9, modre barve pri pH 7,6). Bakterije, ki imajo encim citraza rastejo na gojišču, izkoriščajo citrat in s tem spremenijo pH gojišča, kar se vidi s spremembo barve gojišča iz zelene v modro.

Pozitiven rezultat testa:

citrat $\xrightarrow{\text{citraza}}$ oksalocetna kislina + očetna kislina

oksalocetna kislina $\longrightarrow$ piruvična kislina + CO₂

CO₂ + Na⁺ $\longrightarrow$ Na₂CO₃ (pH se poviša) modra barva gojišča in rast kolonij

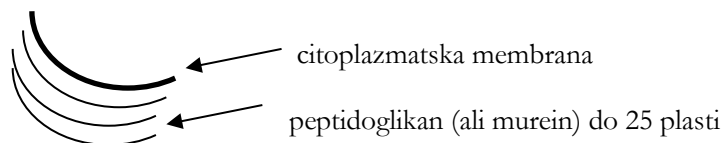
Test tvorba indola, test na metil rdeče, test na Voges Proskauer, izkoriščanje citrata se uporabljajo za identifikacijo enterobakterij in jih skupaj označimo kot **test IMViC**.

7. RAST V GOJIŠČU S KALIJEVIM CIANIDOM

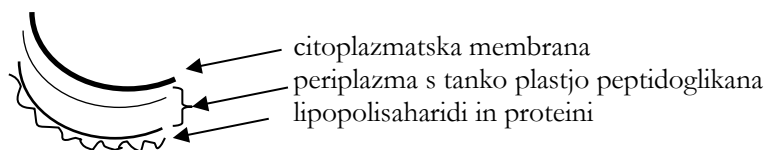
V tekoče gojišče s KCN cepimo kulturo s cepilno zanko in vsebino premešamo na namiznem mešalu. Po 24 – 48 urni inkubaciji pri 37°C opazujemo rast bakterij kot pojav motnosti gojišča.

BARVANJE PO GRAMU

Grampozitivne bakterije imajo relativno enostavno sestavljeno celično steno, ki jo sestavljajo:



Gramnegativne bakterije imajo večplastno kompleksno celično steno, ki jo sestavljajo:



Pri grampozitivnih bakterijah je celična stena tanka in alkohol povzroči dehidracijo – pore peptidoglikana se zmanjšajo in barvni kompleks kristal violet-lugol ostane v celični steni.

Pri gramnegativnih bakterijah gre alkohol skozi peptidno plast in tanko plast peptidoglikana in raztopi barvni kompleks kristal violet-lugol.

Na objektno steklo damo kapljico vode, s cepilno zanko vzamemo vzorec kolonije iz testa 1 in jo razmažemo na 1 - 2 cm². Razmaz pustimo na zraku, da se posuši in nato ga fiksiramo ter barvamo po spodaj opisanem postopku.

Postopek barvanja:

Barvanje:	barva Gr+:	barva Gr-:
• kristal violet 2 min	vijolične	vijolične
• speremo z vodo	vijolične	vijolične
• lugol 2 min	vijolične	vijolične
• speremo z alkoholom (96%)	vijolične	brezbarvne
• speremo z vodo	vijolične	brezbarvne
• safranin 30 s	vijolične	rdeče
• speremo z vodo	vijolične	rdeče

Preparat osušimo s papirnato brisačo, dodamo cedrovo olje in mikroskopiramo (R = 1000x): Grampozitivne bakterije so vijoličaste barve, gramnegativne bakterije so rdeče barve. Če barvamo celice kvasovk po Gramu, se obarvajo kot grampozitivne bakterije, čeprav imajo kemijsko sestavo celične stene popolnoma drugačno kot bakterije. To pomeni, da barvanje po Gramu ni v direktni korelaciji s kemijsko sestavo, ampak je tudi v korelaciji s fizikalno strukturo celične stene.

BARVANJE BAKTERIJSKIH SPOR

Za mikroskopsko ločitev endospor in bakterijskih vegetativnih celic uporabljamo barvanje po Schaeffer-Fulton. Primarno barvilo, malahitno zelenilo, na fiksiranem razmazu segrevamo zato, da barvilo lahko prodre skozi relativno nepropustne ovojnice spore. Malahitno zelenilo se veže tudi na vegetativne celice, vendar se ob spiranju z vodo iz celic tudi izpere in celice so po barvanju z malahitnim zelenilom brezbarvne. Za večji kontrast celice barvamo še s safraninom, ki se veže le na vegetativne celice, in so zato rdeče obarvane.

Na objektno stekelce damo kapljico vode, s cepilno zanko vzamemo kolonijo iz trdnega gojišča in jo razmažemo na 1 - 2 cm². Razmaz pustimo na zraku, da se posuši in nato ga fiksiramo ter barvamo po spodaj opisanem postopku.

Postopek barvanja:

- razmaz pokrijemo s papirnato brisačo
- prelijemo s 5 % raztopino barvila malahitno zelenilo
- segrevamo 3 min ("da se kadi", barvilo ne sme vreti ali se posušiti)
- pustimo še 1 min brez segrevanja
- dobro speremo z vodo
- prelijemo z 0,5 % raztopino safranina in barvamo 30 s
- speremo z vodo

Preparat osušimo s papirnato brisačo, dodamo kapljico cedrovega olja in mikroskopiramo (R = 1000x): vegetativne celice so rdeče barve, spore so zelene.

GLAVNE LASTNOSTI IZBRANIH BAKTERIJSKIH KULTUR

Bakterije rodu *Campylobacter*

Bakterije rodu *Campylobacter* so komenzali v črevesu mnogih toplokrvnih divjih in domačih živali, pogosto jih najdemo pri perutnini in govedu. Zato sta surovo mleko in meso pogosto izvor epidemije enteritidisa. Termofilni vrsti *Campylobacter jejuni* in *Campylobacter coli* sta patogeni za človeka. Bolezen se navadno začne po zaužitju živila kontaminiranega z majhnim številom patogenih bakterij. Znamenja so profuzna diareja, ki jo spremljajo slabost in trebušni krči.

Bakterije rodu *Campylobacter* so gramnegativne spiralno ukrivljene in gibljive palčke. So mikroaerofilne bakterije z respiratornim tipom metabolizma. Rastejo v atmosferi s 3 % do 15 % O₂ in 3 % do 5 % CO₂. Imajo encima oksidaza in katalaza, ne izkoriščajo sladkorjev. Ne hidrolizirajo želatine, testa na MR in VP sta negativna in nimajo lipaze. Termofilne vrste *Campylobacter jejuni* in *Campylobacter coli*, *Campylobacter upsaliensis* in *Campylobacter lari* rastejo pri 42° C in ne pri 25° C. Vrsti *Campylobacter jejuni* in *Campylobacter coli* se razlikujeta v hidrolizi hipurata: *C. jejuni*: pozitivno, - *C. coli*: negativno.

Bakterije rodu *Pseudomonas*

Bakterije rodu *Pseudomonas* so razširjene v naravi (v zemlji, vodi in zraku, na rastlinah) in jih pogosto izoliramo iz svežih živil (zelenjava, meso, perutnina). So najbolj pomembna skupina bakterij – kvarljivcev, ki povzročajo kvar živil v hladilnicah, saj je veliko vrst in sevov psihrotrofnih. Pomembnejše vrste so *P. aeruginosa*, *P. fragi* in *P. fluorescens*. *P. aeruginosa* je lahko povzročitelj zastrupitve ljudi s hrano, če je kontaminacija živila velika $N > 10^6$ cfu / g (ml).

Bakterije rodu *Pseudomonas* so gramnegativne palčke brez posebne formacije (posamezne celice). So aerobne bakterije s striktno respiratornim tipom metabolizma in potrebujejo kisik kot končni akceptor elektronov. Imajo eno ali več polarnih flagel – so gibljive bakterije, imajo encim katalazo in proteolitične ter lipolitične encime. Glukozo izkoriščajo, laktoze ne.

Bakterije rodu *Escherichia*

Bakterije rodu *Escherichia* so v črevesu ljudi in toplokrvnih živali. Najbolj pomembna je vrsta *Escherichia coli* in sicer kot indikator higiene živil in kot povzročitelj gastroenteritisov in drugih okužb. Bakterije *E. coli* se prenašajo direktno od živali na človeka, od človeka do človeka in preko kontaminiranih živil. Večina serotipov je nepatogenih, nekateri pa so za ljudi lahko zelo nevarni (na primer O55, O111, in O128). Enteropatogeni sevi povzročijo hudo diarejo in bruhanje in okužbe so zelo nevarne za dojenčke in otroke. Nekateri enteropatogeni sevi tvorijo tudi enterotoksine. Bakterije vrste *E. coli* so gramnegativne palčke združene v parih ali nepravilnih skupinah. So gibljive, fakultativno anaerobne bakterije, ki najbolje rastejo pri 37° C (enteropatogeni sevi pri 42- 44° C). Imajo respiratorni in fermentativni tip metabolizma. Izkoriščajo glukozo in laktozo do kisline in plina. Imajo katalazo, nimajo proteolitičnih encimov. Rezultati testa IMViC: + + - -.

Bakterije rodu *Proteus*

Bakterije rodu *Proteus* se nahajajo v zemlji, vodi, odpadnih vodah, človeških in živalskih fekalijah in v gnijočih odpadkih. Kot kvarljivce so jih izolirali iz različnih zelenjavnih in mesnih izdelkov ter jajc, so mezofilni kvarljivci živil hranjenih pri sobni temperaturi.

Bakterije rodu *Proteus* so gramnegativne palčke, ki se nahajajo posamezno, v parih ali krajših verižicah. Imajo več flagel in so gibljive. So fakultativno anaerobne bakterije z respiratornim in fermentativnim tipom metabolizma. Iz glukoze tvorijo kislino in plin, laktoze ne izkoriščajo. Imajo katalazo in proteolitične encime ter rastejo v gojišču s KCN. Rod *Proteus* zajema štiri vrste z različnimi biokemijskimi lastnostmi in nekatere lastnosti so podane v tabeli.

Test / Vrsta	<i>P. mirabilis</i>	<i>P. myxofaciens</i>	<i>P. penneri</i>	<i>P. vulgaris</i>
Tvorba indola	-	-	-	+
Test MR	+	+	+	+
Test VP	d	+	-	-
Citrat	d	+	-	(-)
Tvorba H ₂ S	+	-	d	+
Hidroliza želatine	+	+	d	+

Legenda: + ... več kot 90 % sevov je pozitivnih, - ... več kot 90 % sevov je negativnih, d ... 11-89 % sevov je pozitivnih

Bakterije rodu *Salmonella*

Bakterije rodu *Salmonella* so zelo razširjene, njihovo glavno naravno okolje so prebavila ljudi in živali. Gostitelji jih izločajo v okolje z blatom, v katerem lahko preživijo več let, od tu pa se širijo v tla, vodo, odplake. Zaradi neustreznih higienskih razmer lahko pridejo tudi v živila. Salmonele so izolirali iz različnih živil predvsem živalskega izvora (perutnina, svinjina, govedina, jajca, surovo mleko). Poznanih je preko 2000 serotipov in večina salmonel je patogenih za ljudi in živali. Salmonele povzročajo pri ljudeh različna obolenja in so odgovorne za številne okužbe s hrano. Salmoneloza je skupni izraz za okužbe ljudi in živali s salmonelami. Salmonele serotipov *S. Typhi* in *S. Paratyphi* povzročajo zelo nevarni obolenji z največjo umrljivostjo, tifus in paratifus. Tisti ljudje, ki preživijo salmonelozo in tisti pri katerih se bolezen ni razvila, lahko postanejo klicenosci in so potencialno nevarni za okolico.

Salmonele so gramnegativne paličaste bakterije. So gibljive in fakultativno anaerobne bakterije. Iz glukoze tvorijo kislino, plina navadno ne tvorijo, laktoze ne izkoriščajo. So oksidaza negativne in katalaza pozitivne. Ne rastejo v gojišču s KCN. Ne tvorijo indola in acetoina, tvorijo kislino iz glukoze in lahko rastejo na citratu kot edinem viru ogljika. Ne hidrolizirajo želatine.

Bakterije rodu *Enterococcus*

Primarni vir bakterij rodu *Enterococcus* je prebavni trakt (črevo) ljudi in živali, pogosto so tudi na rastlinah, v zemlji in na insektih. Služijo lahko kot indikator higiene živil in vode (indikatorji fekalne kontaminacije). Izolirali so jih iz različnih živil kot so siri, mesni izdelki, mleko. S hrano se prenašata dva pomembna enterokoka: *Enterococcus pyogenes* in *Enterococcus faecalis*. *Enterococcus pyogenes* povzroča boleznih dihal. *Enterococcus faecalis* je večkrat kontaminant v gnjati, klobasah in smetani. Povzroča blago obliko gastroenteritisa, inkubacija je 2 – 18 ur in se kaže kot slabost, diareja in bruhanje. Bakterije rodu *Enterococcus* so grampozitivni koki, ki se nahajajo v parih ali krajših verižicah. So fakultativno anaerobne in negibljive bakterije. Bakterije *Enterococcus faecalis* izkoriščajo laktozo, so katalaza negativne in tvorijo na krvnem agarju β -hemolizo.

Bakterije rodu *Staphylococcus*

Bakterije rodu *Staphylococcus* naseljujejo sluznice in kožo ljudi (nosna votlina, roke, obraz, oči, grlo, intestinalni trakt) in toplokrvnih živali. Od tu lahko pridejo v zrak, na prašne delce, na obleko in druga mesta, ki so lahko vir kontaminacije živil s stafilokoki. Za kontaminacijo živil so seveda najbolj nevarni posamezniki z gnojnimi tvorbami, ki delajo z živil. Pomembnejše vrste, ki tvorijo koagulazo, nukleazo in /ali enterotoksine so *Staph. aureus*, *Staph. epidermidis*, *Staph. intermedius* in *Staph. haemolyticus*. Najbolj proučevana vrsta je *Staph. aureus*, saj so poznani nekateri sevi kot povzročitelj gastroenteritisa. Na splošno so stafilokoki lahko kontaminanti v vseh živilih živalskega izvora in tistih živilih, ki pridejo v direkten kontakt s človekom, če ni naknadno vključen tehnološki postopek, ki bi jih uničil.

Bakterije vrste *Staph. aureus* so grampozitivni koki, ki se nahajajo posamezno, v parih in v nepravilnih skupinah (grozdasta formacija). So fakultativno anaerobne in negibljive bakterije. Lahko tvorijo karotenoidne pigmente. Imajo katalazo in izkoriščajo glukozo ter laktozo do kislin. So proteoliti in imajo β - hemolizine.

Bakterije rodu *Bacillus*

Bakterije rodu *Bacillus* so razširjene v naravi (zemlja, zrak, voda, rastline) in so jih pogosto izolirali tudi iz različnih živil živalskega izvora (na primer: žitni izdelki, izdelki

iz krompirja, zelenjavne juhe). Rod *Bacillus* vsebuje patogeno vrsto *B. anthracis* (vranični prisad) in vrsto *B. cereus*, v kateri so nekateri sevi patogeni. Uživanje živil živalskega izvora in različnih kuhanih mesnih jedi, ki so bila kontaminirana z bakterijami vrste *B. cereus*, je bilo večkrat vzrok za zastrupitve (bolečine v trebuhu in diareja po 8 do 16 urah). Živila so vsebovala večje koncentracije *B. cereus* ($10^5 - 10^8$ cfu/g). Druga oblika zastrupitve (slabost bruhanje, po 1 do 5 urah) je povezana z uživanjem kuhanega riža, ki je po kuhanju dalj časa na sobni temperaturi. Sevi *B. cereus* torej tvorijo najmanj dve vrsti toksinov (toplotno nestabilen toksin (uničen v 30 min pri 56° C) in toplotno obstojen toksin (ni uničen po 90 min segrevanju pri 126° C)). Za rod *Bacillus* je značilno, da vsebuje sporogene bakterije, ki imajo različne fiziološke lastnosti: lahko so psihrotrofi, mezotrofi ali termofili, nekatere vrste so tudi halotolerantne.

Bakterije vrste *B. cereus* so grampozitivne in sporogene bakterije s centralnimi ali subterminalnimi sporami. Celice imajo obliko daljših palčk, ki so posamezne, v parih ali krajših verižicah. So fakultativno anaerobne in aerobne bakterije in so gibljive. Imajo katalazo in proteolitične encime. Izkoriščajo glukozo, laktoze ne izkoriščajo, testa MR in VP sta pozitivna in značilna je α -hemoliza na krvnem agarju.

Bakterije rodu *Clostridium*

Bakterije rodu *Clostridium* so v naravi zelo razširjene (zemlja, voda, zrak, rastline), prisotne so tudi v človeškem in živalskem intestinalnem traktu. Večina vrst je anaerobnih, čeprav se nekatere vrste lahko razmnožujejo tudi v navzočnosti kisika (na primer *Cl. perfringens*). Rod *Clostridium* vsebuje več vrst in za človeka patogeni sta *Cl. butulinum* in *Cl. perfringens* (tvorijo različne eksotoksine). Okužba z bakterijami *Cl. butulinum* je zelo huda (po 12 do 72-urah se pojavi slabost, bruhanje, glavobol, občutek suhosti kože, ust, grla, kasneje zaprtost, padec telesne temperature, paraliza mišic, dvojni vid, in na koncu odpoved dihalnega sistema) in traja od 1 do 10 dni, smrtnost je med 30 in 65 %. Uživanje živila močno kontaminiranega z bakterijami *Cl. perfringens* se po 6 – 24 urah kaže kot diareja, bolečine v trebuhu in slabost, običajno po 24 urah simptomi minejo. Rod *Clostridium* vsebuje mezotrofne, psihrotrofne in tudi termofilne vrste oz. seve, ki so pomembni tudi kot kvarljivci predpripravljenih jedi in konzerviranih izdelkov.

Bakterije rodu *Clostridium* so grampozitivne, sporogene palčke, ki se pogosto nahajajo v parih ali krajših verižicah. Večina vrst je obligatno anaerobnih in gibljivih. Nimajo katalaze.

Bakterije rodu *Listeria*

Bakterije rodu *Listeria* so ubikvitarne v naravi. Sorazmerno dolgo preživijo v neugodnih razmerah, saj rastejo v širokem temperaturnem območju vse od 0,4° C do 45° C, pri pH vrednostih od 4,4 do 9,6 in pri a_w do 0,92. Posledica je relativno pogosta prisotnost teh bakterij v živilih kot na primer: surovo mleko, siri, meso, perutnina, zelenjava. Za človeka je patogena vrsta *L. monocytogenes* in najpogostejši vir okužbe je uživanje kontaminirane hrane. Listerioza je infekcija z več različnimi oblikami med katerimi je pogost meningitis, nevarna je tudi za nosečnice pri katerih lahko pride do splava ali drugih komplikacij. Epidemiološki podatki kažejo, da je smrtnost najvišja med bakterijskimi okužbami s kontaminiranimi živilami.

Bakterije rodu *Listeria* so grampozitivne, nesporogene palčke. Imajo katalazo, so gibljive med 20°C in 25°C in fakultativno anaerobne bakterije. Za vrsto *L. monocytogenes* je značilno, da tvori β -hemolizo na krvnem agarju, da izkorišča ramnozo in ne izkorišča skilozе in ima pozitiven test CAMP. Za vrsto *L. innocua* je značilno, da ne tvori β -hemolize na krvnem agarju, izkorišča ali ne ramnozo in ne izkorišča skilozе in ima negativen test CAMP.

KULTURA BAKTERIJ I.

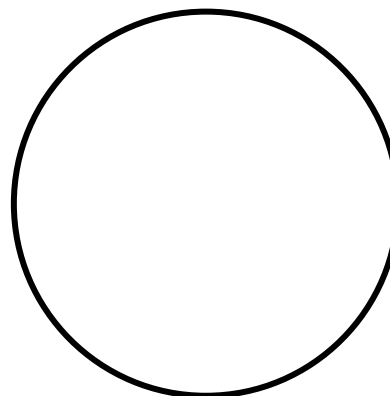
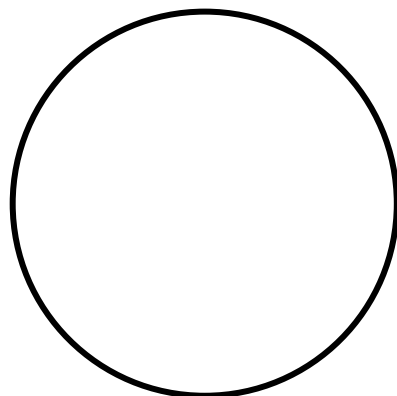
Za kulturo I. določite lastnosti in rezultate vpišite v tabelo!

LASTNOSTI	OPIS REZULTATOV	
1. MORFOLOGIJA		
• KOLONIJE:		
• barva		
• oblika		
• rob		
• CELICE:		
• oblika		
• formacija		
• Gr+ / Gr-		
2. SPOROGENOST		
3. KATALAZA		
4. GIBLJIVOST		
5. ODNOS DO O ₂		
6. FERMENTACIJA	kislina	plin
• glukoza		
• laktoza		
7. PROTEOLIZA		
DODATNI TEST:		
•		
•		
•		
•		

Narišite slike mikroskopskih preparatov in opišite glavne lastnosti!

Barvni preparat po Gramu:

Barvni preparat po Schaeffer-Fulton:



Kultura I. je

KULTURA BAKTERIJ II.

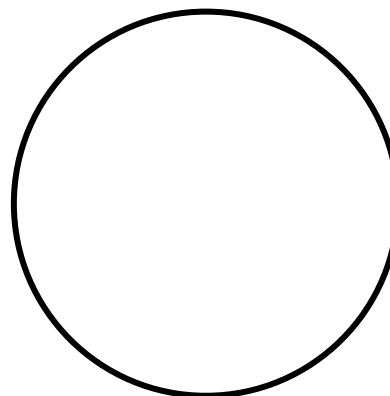
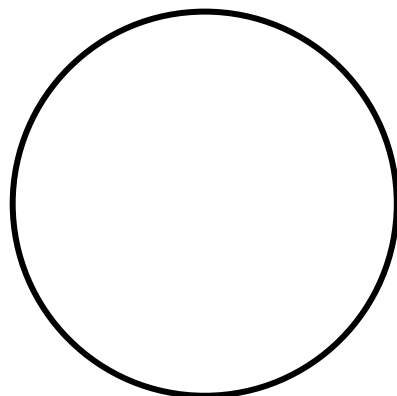
Za kulturo II. določite lastnosti in rezultate vpišite v tabelo!

LASTNOSTI	OPIS REZULTATOV	
1. MORFOLOGIJA		
• KOLONIJE:		
• barva		
• oblika		
• rob		
• CELICE:		
• oblika		
• formacija		
• Gr+ / Gr-		
2. SPOROGENOST		
3. KATALAZA		
4. GIBLJIVOST		
5. ODNOS DO O ₂		
6. FERMENTACIJA	kislina	plin
• glukoza		
• laktoza		
7. PROTEOLIZA		
DODATNI TEST:		
•		
•		
•		
•		

Narišite slike mikroskopskih preparatov in opišite glavne lastnosti!

Barvni preparat po Gramu:

Barvni preparat po Schaeffer-Fulton:



Kultura II. je

KULTURA BAKTERIJ III.

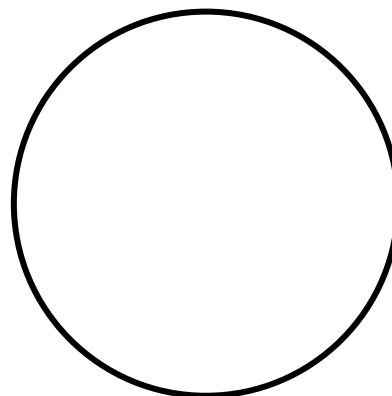
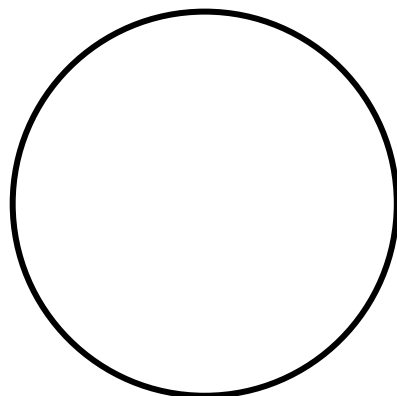
Za kulturo III. določite lastnosti in rezultate vpišite v tabelo!

LASTNOSTI	OPIS REZULTATOV	
1. MORFOLOGIJA		
• KOLONIJE:		
• barva		
• oblika		
• rob		
• CELICE:		
• oblika		
• formacija		
• Gr+ / Gr-		
2. SPOROGENOST		
3. KATALAZA		
4. GIBLJIVOST		
5. ODNOS DO O ₂		
6. FERMENTACIJA	kislina	plin
• glukoza		
• laktoza		
7. PROTEOLIZA		
DODATNI TEST:		
•		
•		
•		
•		

Narišite slike mikroskopskih preparatov in opišite glavne lastnosti!

Barvni preparat po Gramu:

Barvni preparat po Schaeffer-Fulton:



Kultura III. je

KULTURA BAKTERIJ IV.

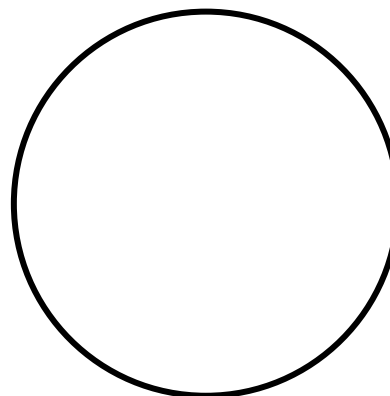
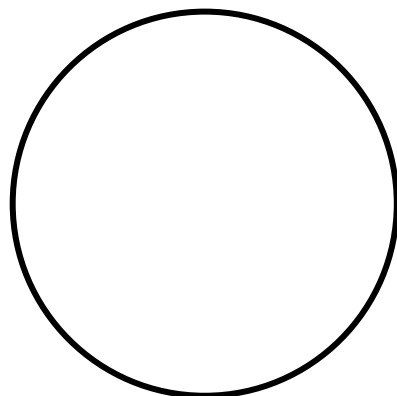
Za kulturo IV. določite lastnosti in rezultate vpišite v tabelo!

LASTNOSTI	OPIS REZULTATOV	
1. MORFOLOGIJA		
• KOLONIJE:		
• barva		
• oblika		
• rob		
• CELICE:		
• oblika		
• formacija		
• Gr+ / Gr-		
2. SPOROGENOST		
3. KATALAZA		
4. GIBLJIVOST		
5. ODNOS DO O ₂		
6. FERMENTACIJA	kislina	plin
• glukoza		
• laktoza		
7. PROTEOLIZA		
DODATNI TEST:		
•		
•		
•		
•		

Narišite slike mikroskopskih preparatov in opišite glavne lastnosti!

Barvni preparat po Gramu:

Barvni preparat po Schaeffer-Fulton:



Kultura IV. je

KULTURA BAKTERIJ V.

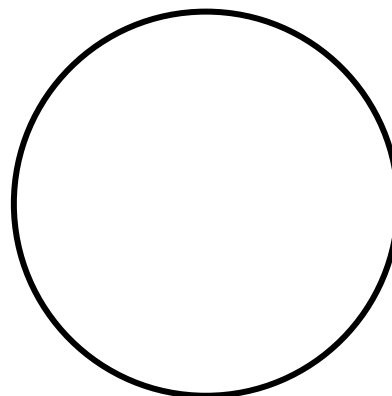
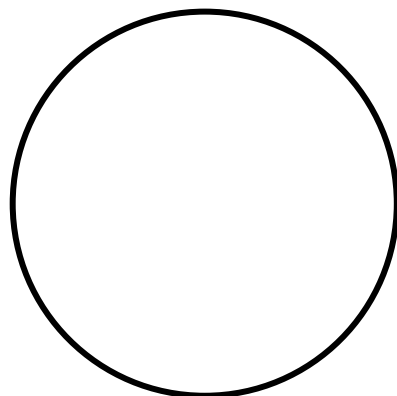
Za kulturo V. določite lastnosti in rezultate vpišite v tabelo!

LASTNOSTI	OPIS REZULTATOV	
1. MORFOLOGIJA		
• KOLONIJE:		
• barva		
• oblika		
• rob		
• CELICE:		
• oblika		
• formacija		
• Gr+ / Gr-		
2. SPOROGENOST		
3. KATALAZA		
4. GIBLJIVOST		
5. ODNOS DO O ₂		
6. FERMENTACIJA	kislina	plin
• glukoza		
• laktoza		
7. PROTEOLIZA		
DODATNI TEST:		
•		
•		
•		
•		

Narišite slike mikroskopskih preparatov in opišite glavne lastnosti!

Barvni preparat po Gramu:

Barvni preparat po Schaeffer-Fulton:



Kultura V. je

KULTURA BAKTERIJ VI.

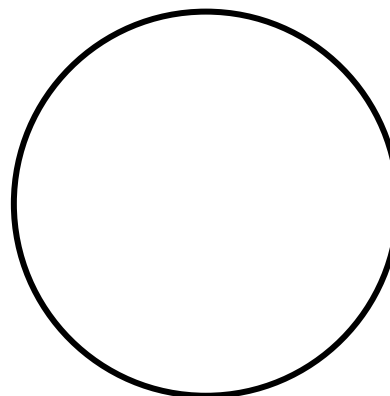
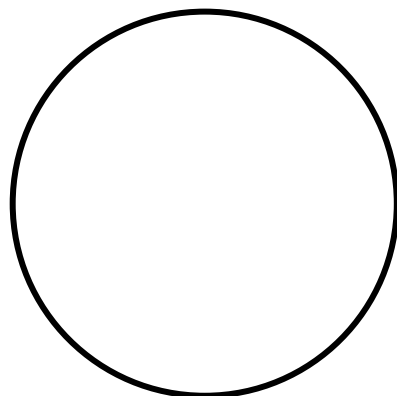
Za kulturo VI. določite lastnosti in rezultate vpišite v tabelo!

LASTNOSTI	OPIS REZULTATOV	
1. MORFOLOGIJA		
• KOLONIJE:		
• barva		
• oblika		
• rob		
• CELICE:		
• oblika		
• formacija		
• Gr+ / Gr-		
2. SPOROGENOST		
3. KATALAZA		
4. GIBLJIVOST		
5. ODNOS DO O ₂		
6. FERMENTACIJA	kislina	plin
• glukoza		
• laktoza		
7. PROTEOLIZA		
DODATNI TEST:		
•		
•		
•		
•		

Narišite slike mikroskopskih preparatov in opišite glavne lastnosti!

Barvni preparat po Gramu:

Barvni preparat po Schaeffer-Fulton:



Kultura VI. je

KULTURA BAKTERIJ VII.

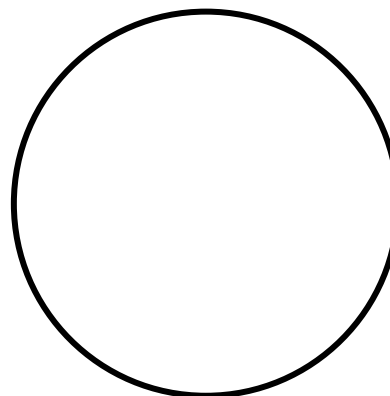
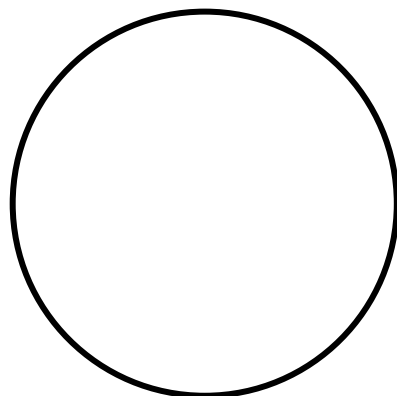
Za kulturo VII. določite lastnosti in rezultate vpišite v tabelo!

LASTNOSTI	OPIS REZULTATOV	
1. MORFOLOGIJA		
• KOLONIJE:		
• barva		
• oblika		
• rob		
• CELICE:		
• oblika		
• formacija		
• Gr+ / Gr-		
2. SPOROGENOST		
3. KATALAZA		
4. GIBLJIVOST		
5. ODNOS DO O ₂		
6. FERMENTACIJA	kislina	plin
• glukoza		
• laktoza		
7. PROTEOLIZA		
DODATNI TEST:		
•		
•		
•		
•		

Narišite slike mikroskopskih preparatov in opišite glavne lastnosti!

Barvni preparat po Gramu:

Barvni preparat po Schaeffer-Fulton:



Kultura VII. je

KULTURA BAKTERIJ VIII.

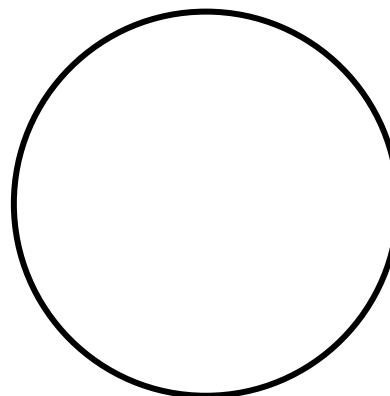
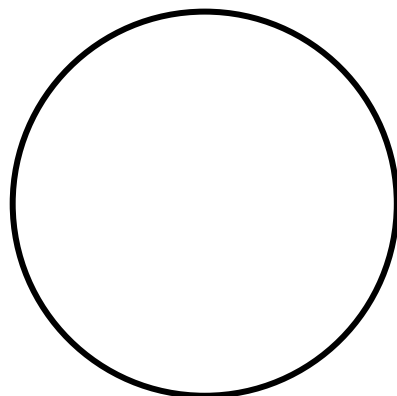
Za kulturo VIII. določite lastnosti in rezultate vpišite v tabelo!

LASTNOSTI	OPIS REZULTATOV	
1. MORFOLOGIJA		
• KOLONIJE:		
• barva		
• oblika		
• rob		
• CELICE:		
• oblika		
• formacija		
• Gr+ / Gr-		
2. SPOROGENOST		
3. KATALAZA		
4. GIBLJIVOST		
5. ODNOS DO O ₂		
6. FERMENTACIJA	kislina	plin
• glukoza		
• laktoza		
7. PROTEOLIZA		
DODATNI TEST:		
•		
•		
•		
•		

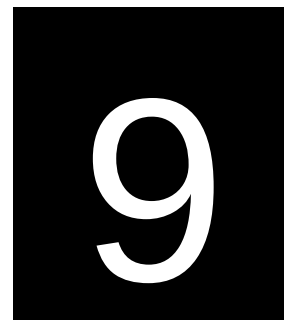
Narišite slike mikroskopskih preparatov in opišite glavne lastnosti!

Barvni preparat po Gramu:

Barvni preparat po Schaeffer-Fulton:



Kultura VIII. je



TEKSTOVNO SLIKOVNI KLJUČI ZA IDENTIFIKACIJO PLESNI

I. KLJUČ

- 1.A. V kolonijah prevladujejo brsteče celice, včasih psevdomicelij, pravega vegetativnega micelija največkrat ni **KVASOVKE**
- 1.B. Kolonije imajo mnogo vegetativnega micelija, konidiji ali druge spore se tvorijo v ali na posebnih celicah **2**
- 2.A. Micelij je navadno brez sept ali pa jih ima le malo, nespolne spore se največkrat tvorijo endogeno v sporangiju **ZYGOMYCETES**
- 2.B. Micelij je ponavadi enakomerno septiran, spolne ali nespolne spore se ne tvorijo v sporangiumu **3**
- 3.A. Nespolne spore se tvorijo na posebno oblikovanih celicah – konidiogene celice **DEUTEROMYCETES**
- 3.B. Spolne spore se tvorijo v askusih ali na bazidijih **4**
- 4.A. Spore se tvorijo v askusih **ASCOMYCETES**
- 4.B. Spore se tvorijo na bazidijih **BASIDIOMYCETES**

II. KLJUČ: ZYGOMYCETES

- 1.A. Sporangiospore se tvorijo v cilindričnem merosporangiju,
ki nima kolumele..... *Syncephalastrum*
- 1.B. Sporangiospore se tvorijo v oblem ali hruškastem sporangiju,
ki ima kolumelo..... 2
- 2.A. Sporangiji in sporangiofori so temno obarvani, sporangiofori so
večinoma nerazvejani in pogosto v skupinah, spore so pogosto z
razbrazdano površino..... *Rhizopus*
- 2.B. Sporangiji in sporangiospore niso pigmentirani ali pa so svetlo obarvani,
sporangiofori so pogosto razvejani, spore imajo gladko površino 3
- 3.A. Sporangiji so hruškaste oblike in imajo povprečen
premer od 10 do 40 μm *Absida*
- 3.B. Sporangiji so okrogle oblike in imajo povprečen
premer večji od 40 μm *Mucor*

III. KLJUČ: DEUTEROMYCETES

- 1.A. Konidiji se tvorijo v piknidijih..... *Phoma*
- 1.B. Konidiji se ne tvorijo v piknidijih, ampak na hifi, konidioforu
ali drugih celicah..... 2
- 2.A. Konidiji se tvorijo v posebnih konidiogenih celicah: fialide,
anelide, ali zaobljeni deli konidiofora, v verižicah ali v obliki glavic..... 3
- 2.B. Konidiji se ne tvorijo v posebnih konidiogenih celicah..... 14
- 3.A. Konidiji so nanizani v ve rižice..... 4
- 3.B. Konidiji so v v skupinah, v obliki glavic..... 10
- 4.A. Konidiji so večinoma dvocelični, kolonije so rožnato
obarvane..... *Trichothecium*

4.B. Konidiji so vedno enocelični, kolonije so različno obarvane	5
5.A. Kolonije so majhne in rdeče rjavo obarvane. Konidiji se tvorijo na fertilni hifi tako, da se odcepijo v skupinah po štiri	<i>Wallemia</i>
5.B. Kolonije so normalno rastoče, konidiji se ne tvorijo z odcepitvijo na fertilni hifi	6
6.A. Konidiofor ima apeks	<i>Aspergillus</i>
6.B. Konidiofor nima apeksa	7
7.A. Konidiogene celice so anelide, konidiji imajo na eni strani značilno odsekano konico	<i>Scopulariopsis</i>
7.B. Konidiogene celice so fialide, konidiji nimajo odsekane konice	8
8.A. Kolonije so temno sive do črne barve, fialide so jajčaste oblike, konidiji so črnkasti	<i>Memnoniella</i>
8.B. Kolonije niso temno sive do črne barve, fialide imajo obliko ploske steklenice	9
9.A. Kolonije so rumene do rjave barve, fialide imajo dolg vrat	<i>Paecilomyces</i>
9.B. Kolonije so pogosto zelenkaste (včasih belkaste), fialide imajo kratek vrat	<i>Penicillium</i>
10.A. Fialide so dolge, imajo obliko šila, polifialid ni	<i>Acremonium</i>
10.B. Fialide so več ali manj v obliki ploskih steklenic in / ali imajo polifialide, ali pa fialid ni	11
11.A. Kolonije so ponavadi zelenkaste (Rast na svetlobi)	<i>Trichoderma</i>
11.B. Kolonije so belkaste, rumene, vijolične, rožnate, rjave	

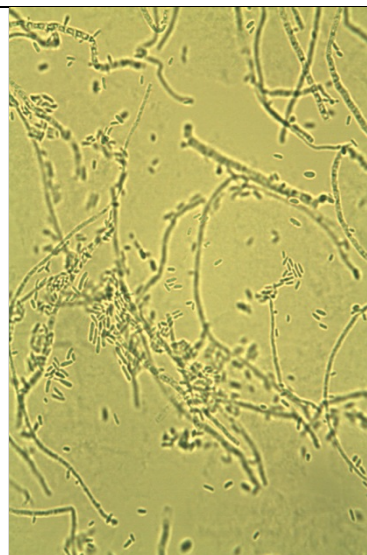
ali črnkaste.....	12
12.A. Kolonije so belkaste, rumeno rožnate, vijolične, včasih tudi zelenkaste, večcelični konidiji imajo značilno obliko banane	<i>Fusarium</i>
12.B. Kolonije so črne, včasih rožnate, septiranih konidijev ni.....	13
13.A. Posamezne fialide na redkih, posameznih neizrazitih konidioforih	<i>Phialophora</i>
13.B. Fialide, ki so širše na vrhu rastejo v gostih skupinah na dolgih nespetiranih ali septiranih konidioforih	<i>Stachbotrys</i>
14.A. Zelo hitro rastoče kolonije (v nekaj dneh prerastejo petrijevko), rožnato oranžne barve z redko in neizrazito volneno strukturo.....	<i>Chrysomillia</i>
14.B. Kolonije niso rožnato oranžne barve	15
15.A. Konidiji so enocelični	16
15.B. Konidiji so večcelični	18
16.A. Izraziti septirani konidiofori, nesimetrično razvejani in na koncih v šopih tvorijo elipsoidne konidije.....	<i>Botrytis</i>
16.B. Konidiofori razvejani z nežno strukturo.....	17
17.A. Konidiji so brezbarvni do krem bele barve, imajo gladko steno in bolj ali manj cilindrično obliko artrokonidijev	<i>Geotrichum</i>
17.B. Na razvejanih delih konidiofora se tvorijo artrokonidiji, ki so po obliki podobni brstečim kvasnim celicam.....	<i>Cladosporium</i>
18.A. Konidiji imajo večinoma le prečne septe.....	<i>Culvularia</i>
18.B. Zreli konidiji imajo prečne in podolžne septe.....	<i>Alternaria</i>

IV. KLJUČ: ASCOMYCETES

- 1.A. Askokarpi so na jasno ločeni zračni hifi.....*Monascus*
- 1.B. Askokarpi niso na posebej ločeni zračni hifi 2
- 2.A. Kolonije rastejo ekstremno počasi, le na gojiščih za kserofile,
askusi imajo 2 askospori v obliki luninega krajca*Xeromyces*
- 2.B. Kolonije rastejo hitreje, askusi vsebujejo ponavadi 8 askospor..... 3
- 3.A. Askokarpi (periteciji) so prekriti s hifami.....*Chaetomium*
- 3.B. Askokarpi (kleistoteciji ali nepokriti askusi) niso prekriti s hifami
askusi so oble ali kroglaste oblike..... 4
- 4.A. Askokarpi so brez posebne stene.....*Byssosclamyces*
- 4.B. Askokarpi imajo posebno ovojnico 5

V. FOTOGRAFIJE NATIVNIH MIKROSKOPSKIH PREPARATOV

Nativni mikroskopski preparati plesni slikani pod svetlobnim mikroskopom pri 400-
kratni povečavi. Druge povečave so navedene ob slikah.



Sl. 1: *Acremonium*



Sl. 2: *Acremonium*



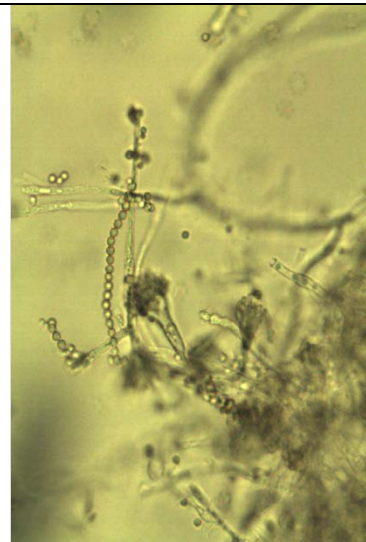
Sl. 3: *Alternaria*



Sl. 4: *Alternaria*



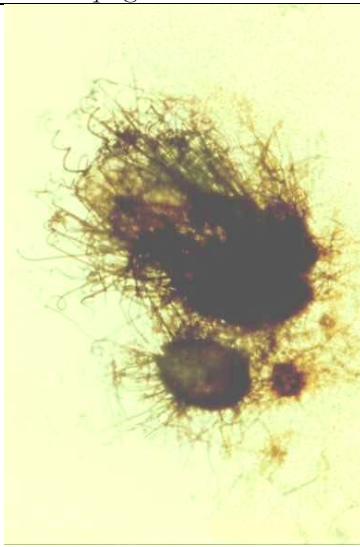
Sl. 5: *Aspergillus*



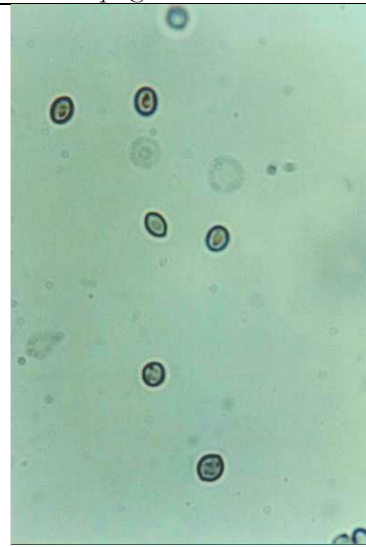
Sl. 6: *Aspergillus*



Sl. 7: *Botrytis*



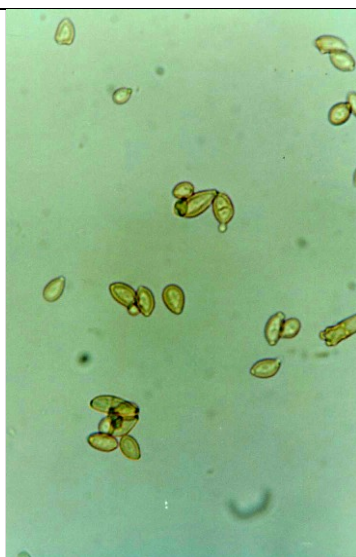
Sl. 8: *Chaetomium* (100x)



Sl. 9: *Chaetomium* (600x)



Sl. 10: *Chrysomya*



Sl. 11: *Cladosporium*



Sl. 12: *Curvularia*



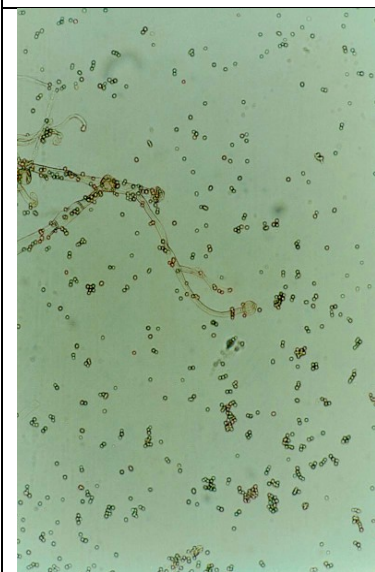
Sl. 13: *Fusarium*



Sl. 14: *Fusarium* (600x)



Sl. 15: *Geotrichum*



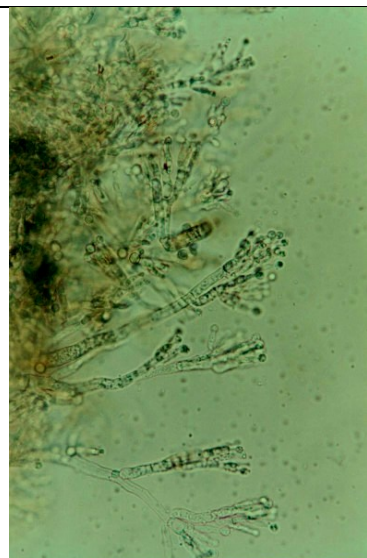
Sl. 16: *Mucor* (100x)



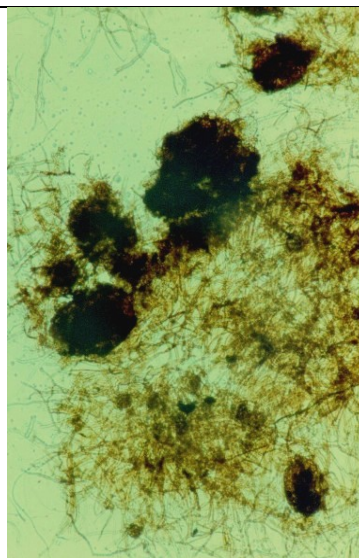
Sl. 17: *Mucor*



Sl. 18: *Penicillium*



Sl. 19: *Penicillium*



Sl. 20: *Phoma* (100x)



Sl. 21: *Phoma*



Sl. 22: *Rhizopus* (100x)



Sl. 23: *Rhizopus* (100x)



Sl. 24: *Scopulariopsis*



Sl. 25: *Scopulariopsis* (600x)



Sl. 26: *Trichoderma*



Sl. 27: *Trichothecium*

LITERATURA

- Aleksander S. K., Strete D. Microbiology A photographic atlas for the laboratory. Canada Benjamin Cummings, 2001, 1-101.
- Barnett J. A., Payne, R. W., Yarrow, D. Yeasts Characteristics and Identification. Cambridge: Cambridge University Press, 1983, 1-60.
- Bergey's manual of determinative bacteriology / [editors] Holt J. G. - 9th ed. - Baltimore: The Williams & Wilkins, Cop., 1994, 787 s.
- Bezjak V. Opća mikrobiologija. Zagreb : Školska knjiga, 1976, 198 s.
- Cappuccino J. G., Sherman N. Microbiology. A Laboratory Manual. 4th ed., Menolo Park, California: The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., 1996, 1-214.
- Deak T., Beuchat L. R. Identification of Foodborne Yeasts. Journal of Food Protection, 50(1987)3, 234-264.
- Duraković S. Prehrambena mikrobiologija. Zagreb : Medicinska naklada, 1991, 297 s.
- Hayes P. R. Food Microbiology and Hygiene. London, Elsevier Applied Science Publisher, 1985, 1-135.
- Holt J. G., Krieg N. R., Sneath P. H. A., Staley J. T., Williams S. T. (ed) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994, 787 s.
- Jay J. Modern Food Microbiology. New York, Van Nostrand Reinhold, 1992, 3 – 234.
- Larone, D. H. Medically important fungi. A guide to identification. 2nd Edition, Washington, American Society for Microbiology, 1993, 230 s.
- Madigan M. T. Parker J. Brock biology of microorganisms - 8th ed., International ed., Upper Saddle River, New Jersey: Prentice-Hall, Inc., cop. 1997, 986 s.
- Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Urednika Gubina M., Ihan A. - Ljubljana: Medicinski razgledi, 2002 (Littera picta), 543 s.
- Pitt, J. I., Hocking, A. D. Fungi and food spoilage. 2nd Edition, London, Blackie Academic and Professional, 1997, 1-320.
- Pitt, J. I., Hocking, A. D. Fungi and food spoilage. Sydmeay, Academic Press, 1985, 1-334.
- Prescott L. M., Harley J. P., Klein, D. A. Microbiology. Dubuque: Wm. C. Brown Publishers, 1993, 404–459.
- Reiss, J. Schimmelpilze. Lebensweise Nutzen Schaden Bekaempfung. Berlin, Springer-Verlag, 1986, 230 s.
- <http://www.botany.utoronto.ca/ResearchLabs/MallochLab/Malloch/Moulds/Moulds.html> (8.7.2008)