

Praktická úloha č. 1 (60 minút, 40 bodov)

Téma: Mikrobiológia

Niektoré druhy mikroorganizmov majú využitie v potravinárstve. Príkladom je výroba piva, vína či syrov. Táto praktická úloha je zameraná na spoločenstvo mikroorganizmov dôležité pre dozrievanie syra typu **Camembert/hermelín**.

Camembert sa vyrába z mlieka, do ktorého sa pridá syridlo a štartovacia kultúra baktérií mliečneho kvasenia. Baktérie premieňajú mliečny cukor, laktózu, na laktát, čo spôsobuje pokles pH na 4,6 – 4,7. Syry sú vytvarované, nasolené a sú zaočkované kultúrou mikroorganizmov. Dozrievajú pri teplote 11 – 13°C minimálne po dobu 21 dní a potom sa dostávajú na pulty obchodných reťazcov.

V prvej časti úlohy si pripravíte mikroskopický preparát, v ktorom budete pozorovať mikroorganizmy osídľujúce povrch hermelínu a zistíte, ako činnosť mikroorganizmov vplýva na pH syru. V druhej časti úlohy budete riešiť teoretické úlohy zamerané na molekulárnu biológiu, fyziológiu a systematiku spoločenstva mikroorganizmov, ktoré osídľujú povrch hermelínu.

Pomôcky:

- syr s ušľachtilou plesňou,
- indikátorový pH papierik,
- mikroskop,
- podložné a krycie sklíčko,
- kadičku označenú „VODA“ (môže byť pripravená pre skupinu študentov),
- špáradlá/preparačnú ihlu/pinzetu,
- Pasteurovu pipetu,
- prázdnu kadičku/nádobu s objemom 10 – 20 ml,
- milimetrový papier,
- lepidlo (môže byť pripravené pre skupinu študentov)

Skontrolujte si, že na pracovnom stole máte pripravené všetky pomôcky. V prípade, že niektorá z nich chýba, zavolajte učiteľa.

Úloha 1: Pripravte mikroskopický preparát obsahujúci mikroorganizmy osídľujúce povrch hermelínu. Vašou úlohou bude pozorovať mikroskopickú hubu *Penicillium camemberti*. Na povrchu syra vytvára biele mycélium. Pomocou preparačnej ihly/špáradla/pinzety odoberte čo najmenší kúsok mycélia, vložte do kvapky vody na podložnom sklíčku, jemne prikryte krycím sklíčkom a pozorujte mikroskopom. Pozorovanie zakreslite a popíšte štruktúry, ktoré vidíte. Nezabudnite uviesť zväčšenie.

Číslo súťažiaceho:

Nákres:

Úloha 2: Pomocou pH indikátorového papieriku určte pH syru v bezprostrednej blízkosti mikroorganizmov. Do kadičky odoberte špáradlom približne 1 g syru (z oblasti syra vyznačenej obdĺžnikom na obrázku, množstvo ekvivalentné veľkosti semena hrachu) a rozmiešajte v čo najmenšom objeme vody (1 – 2 ml). Do takto pripraveného roztoku ponorte indikátorový papierik **a odčítajte príslušnú hodnotu pH na základe farebnej stupnice, ktorú Vám poskytne učiteľ.** Následne papierik nalepte do zadania a zapíšte odčítanú hodnotu pH.



Číslo súťažiaceho:

Priložený pH indikátorový papierik	Odčítaná hodnota pH	Body

Úloha 3: Predpokladajte, že hodnota pH syra súvisí s koncentráciou laktátu. Na základe výsledku experimentálnej časti označte správne tvrdenie:

- A. Mikroorganizmy osídľujúce povrch hermelínu využívajú laktát ako živinu, čo vedie k zvýšeniu pH (alkalizácii) povrchu hermelínu.
- B. Mikroorganizmy osídľujúce povrch hermelínu produkujú vysoké množstvá laktátu, čo vedie k ďalšiemu zníženiu pH (acidifikácii) povrchu hermelínu.
- C. Mikroorganizmy osídľujúce povrch hermelínu nedokážu laktát využiť ako zdroj energie ani ho neprodukujú. V experimente preto nebola zaznamenaná zmena pH oproti počiatočnej hodnote 4,6 – 4,7 (pred zrením syra).

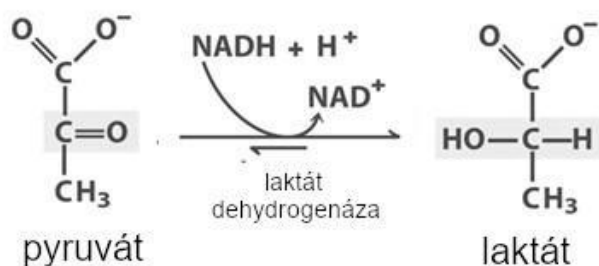
Pokračujte v riešení nadväzujúcich teoretických úloh.

Úloha 4: Pri výrobe syra sú využívané kultúry baktérií a mikroskopických húb. Baktérie a huby sa líšia stavbou bunky. V nasledujúcej tabuľke sú uvedené rôzne bunkové štruktúry. Vyznačte **krížikom**, ktoré z nich nájdeme v bakteriálnej bunke a/alebo bunke húb.

Štruktúra	Bakteriálna bunka	Hubová bunka
Bunková stena tvorená chitínom		
Cytoplazmatická membrána		
Mitochondria		
Ribozómy		
Endoplazmatické retikulum		
Aktínový cytoskelet		

Číslo súťažiaceho:

Úloha 5: Baktérie mliečneho kvasenia dokážu metabolizovať disacharid laktózu. Produktom je laktát, ktorý vzniká z pyruvátu účinkom enzýmu laktátdehydrogenázy (reakcia na obrázku).



Označte správne tvrdenie/-ia:

- A. V reakcii laktátdehydrogenázy dochádza k redukcii pyruvátu.
- B. NAD slúži ako koenzým reakcie katalyzovanej laktátdehydrogenázou.
- C. Reakcia je príkladom oxidatívnej fosforylácie.
- D. Z jednej molekuly laktózy vznikne maximálne jedna molekula laktátu.

Úloha 6: V prvej časti úlohy ste sa zoznámili s hubou *Penicillium camemberti*, ktorá je súčasťou spoločenstva mikroorganizmov na povrchu syra. Chceli by ste zakresliť jeho rastovú krivku, a preto prevediete nasledovný experiment. V čase 0, 5, 10, 15 a 20 dní vyrežete z povrchu zrejúceho syra štvorček s plochou 1 cm², odvážite a zriedite 10-krát v riediacom roztoku. Suspenziu premiešate a riedite ešte 10-krát do celkového objemu 1 ml.

100 µl výslednej suspenzie vysejete na tri Petriho misky s médiom a po 4-dňovej inkubácii spočítate, koľko kolónií vytvoril *P. camemberti* (jeho kolónie ste od kolónií iných druhov odlíšili vďaka unikátnej morfológii). Výsledky znázorňuje tabuľka nižšie.

	Deň 0	Deň 5	Deň 10	Deň 15	Deň 20
Miska 1	0	85	94	99	105
Miska 2	0	92	95	103	101
Miska 3	0	93	91	98	99
Priemer	0				
Počet cfu <i>P. camemberti</i> /c m ² syra	0				

Úloha 6.1: Vypočítajte priemerný počet kolónií na miskú pre dni 5 – 20. **Výsledok zaokrúhlite na celé čísla. Vyplňte do tabuľky vyššie.**

Úloha 6.2: Vypočítajte priemerný počet kolónií tvoriacich jednotiek (cfu) na cm² povrchu hermelínu (Nezabudnite, že sme suspenziu mikroorganizmov riedili a vysievali sme len 100 µl). **Vyplňte do tabuľky vyššie.**

Úloha 6.3: Do milimetrového papiera vyneste body zodpovedajúce počtu cfu *P. camemberti* na cm² povrchu hermelínu v závislosti na čase a body prepojte krivkou. **Milimetrový papier označte svojim súťažným číslom.**

Úloha 6.4: Na základe zostrojenej rastovej krivky označte, ktoré z nasledujúcich tvrdení je/sú pravdivé:

- A. V prvých 5 dňoch sa *P. camemberti* na povrchu hermelínu intenzívne delí.
- B. Po 5. dni dochádza k spomaleniu rastu *P. camemberti* na povrchu hermelínu.
- C. V 10. dni je *P. camemberti* na povrchu hermelínu v exponenciálnej fáze rastu.
- D. Od 15. dňa na povrchu hermelínu vôbec nedochádza k deleniu *P. camemberti*, postupne sa vyčerpávajú živiny a bunky odumierajú.

Úloha 7: Okrem huby *P. camemberti* sa na povrchu hermelínu vyskytujú aj ďalšie mikroorganizmy. Ktorú z nasledujúcich metód by ste využili pre presnú identifikáciu čo najviac rôznych druhov organizmov?

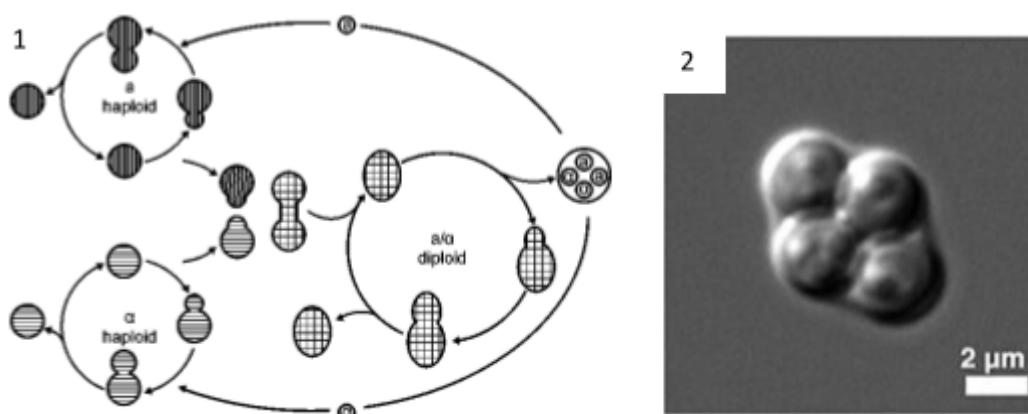
- A. Skenovacia elektrónová mikroskopia povrchu hermelínu.
- B. Detekcia mikroorganizmov na povrchu hermelínu pomocou hybridizácie izolovanej DNA so špecifickými sondami.
- C. Kultivácia mikroorganizmov zo steru povrchu hermelínu na pevných médiách s rôznym zložením a mikroskopická analýza.
- D. Izolácia genómovej DNA zo steru povrchu hermelínu a následné sekvenovanie.

Úloha 8.1: Využitou metódou bol v spoločenstve mikroorganizmov identifikovaný druh kvasinky *Kluyveromyces lactis*. Ako jeden z mála kvasinkových druhov dokáže metabolizovať laktózu, a preto sa často vyskytuje v mliečnych produktoch. Pre spracovanie laktózy je dôležitá funkcia dvoch génov (*LAC12* a *LAC4*), ktorých transkripcia prebieha oboma smermi z jediného promótoru. *LAC12* kóduje transportér laktózy a *LAC4* kóduje enzým štiepiaci laktózu na glukózu a galaktózu. Na základe uvedených informácií rozhodnite, ktoré tvrdenie/-ia je/sú pravdivé:

- A. Pri nulovej mutácii génu *LAC4* (mutácia, ktorá spôsobí úplnú stratu funkcie génu) síce dokáže kvasinka transportovať laktózu do bunky, ale nedokáže ju štiepiť na glukózu a galaktózu.
- B. Proteín kódovaný génom *LAC12* obsahuje transmembránové domény.
- C. Kvasinka s nulovou mutáciou *LAC12* dokáže rásť na médiu s laktózou ako jediným zdrojom uhlíku.
- D. Kvasinka s mutáciou promótorovej sekvencie, ktorá bráni naviazaniu transkripčných faktorov, dokáže rásť na médiu s laktózou ako jediným zdrojom uhlíku.

Úloha 8.2: Podobne ako kvasinka pivná, *Kluyveromyces lactis* má dva párovacie typy (α , a). V životnom cykle (obr.1) sa vyskytuje haploidné štádium, keď sa bunky párovacieho typu α , resp. a rozmnožujú nepohlavne pučaním. Za vhodných podmienok dôjde k párovaniu kvasiniek opačného párovacieho typu. Výsledkom je diploidná bunka s genotypom α/a , ktorá sa tiež môže rozmnožovať nepohlavne pučaním. Pri určitých podmienkach podstupuje meiózu a výsledkom sú spóry, z ktorých sa potom vyvinú haploidné bunky s párovacím typom α , resp. a .

Číslo súťažiaceho:



Na **obrázku 2** vidíte mikroskopickú snímku, ktorý zachytáva štádium zo životného cyklu kvasinky *Kluyveromyces lactis*. Označte, ktoré tvrdenie/-ia o tomto štádiu je/sú pravdivé:

- A. Na obrázku sú štyri bunky s rovnakým genotypom.
- B. Bunky na obrázku sú haploidné.
- C. Bunky na obrázku sú dvojjadrové.
- D. Bunky na obrázku sú výsledkom meiózy.

KONIEC PRAKTICKEJ ÚLOHY

Po skončení krajského kola Vás radi privítame v spoločnej diskusii o úlohách na platforme Discord, na serveri "Biologická olympiáda". Link nájdete v autorských riešeniach.