

Održavanje i uzgoj živog materijala

BAKTERIJE

Prije nego li se počne sa uzgojem bakterija ili gljiva, dobro je informirati se o biologiji i posebnim obilježjima pojedinih sojeva i vrsta. Svaka vrsta zahtijeva posebne uvijete koji su joj potrebni za optimalan rast i razvoj. Pojedini sojevi bakterija rastu na za to posebno napravljenim podlogama (medijima), i kod određene temperature (vidi u mikrobiologiji). Kulture se uzgajaju u velikim epruvetama začepljenim smotuljkom vate, ili u Petrijevim zdjelicama, poklopljene. Čep sprječava kontaminaciju kolonije, ali dehidraciju medija.

Bakterijske kulture moraju se ponovo nacijepiti u nove kolonije svaka 2-3 tjedna. Novoj kulturi potrebno je otprilike 24 do 48 sati da se potpuno razvije, odnosno, da se pojavi obojenje kod vrsta kod kojih se to javlja. Čuvanje na nižoj temperaturi, usporava rast, pa tako omogućuje dulje održavanje kultura.

GLJIVE

Gljivice i plijesni zahtijevaju drukčiji medij za uzgoj. Najčešće su to mediji koji sadrže više ugljikohidrata i imaju nešto niži pH. Kulture gljivica i plijesni razvijaju se nešto duže od bakterijskih kultura: 3-7 dana.

Održati čistu kulturu najvažniji je cilj kod naciepljivanja novih kultura u kolonije. Laboratorijsko suđe mora biti posve čisto, a ponekad kada je potrebno držati kulture na višoj temperaturi, posude s kulturama stavljaju se u inkubator. Posude s kulturama inkubiraju se okrenute naglavačke, da bi se spriječilo nakupljanje vlage i otapanje i razrjeđivanje hranjivog medija. S druge strane, u inkubatoru je potrebno držati posudicu s vodom kako bi se spriječilo preveliko isušivanje hranjive podloge.

ALGAE I CYANOBACTERIA

Nakon što ste donijeli kulturu u laboratorij, odčepite spremnik i aerirajte ju čistom pipetom. Kulturu držite poklopljenu, ali odčepljenu da bi zrak mogao nesmetano cirkulirati. Kulture držite pod difuznim svjetlom na temperaturi od oko 21 °C. Ovisno o vrsti temperatura se može podesiti od 10 °C do 28 °C. Osnovni uvijeti držanja opisani su u Tablici 1.

Alge uzgajajte u plitkim posudama (zapremina ovisi o tome koliko algi želite uzgojiti). Pod pravilnim osvjetljenjem i temperaturom alge će "cvjetati". Za osvjetljenje upotrijebite hladno bijelo svjetlo, fluorescentne lampe od 40 W biti će sasvim dovoljne. Nove kulture trebaju imati ciklus osvjetljenja: 16 sati svjetla i 8 sati tame. Nakon 10 dana promijenite dužinu trajanja osvjetljenja u ciklus: 12 sati svjetla, 12 sati tame. Naciepljujte na svježi medij svakih 6-8 tjedana.

Tablica 1. Osnovni ekološki uvjeti za uzgoj algi.

Kultura	Raspon Temperature	Osvjetljenje	Medij (hranjiva podloga)
Cyanobacteria			
<i>Gloeocapsa</i>	18° C - 21° C	srednje do slabo	B.M.M., P.S.O.
<i>Oscillatoria</i>	18° C - 21° C	srednje do slabo	B.M.M., P.S.O., Knop ot.
<i>Anabaena</i>	18° C - 21° C	srednje do slabo	B.M.M., P.S.O.
<i>Nostoc</i>	18° C - 21° C	srednje do slabo	B.M.M., P.S.O.
Chrysophyta			
Diatoms	18° C - 21° C	srednje do jako	P.S.O., v /
Chlorophyta			
<i>Chlamydomonas</i>	18° C - 21° C	srednje do jako	B.M.M., P.S.O.
<i>Chlorella</i>	18° C - 21° C	srednje do jako	B.M.M., P.S.O.
Desmidiiales	18° C - 21° C	srednje do jako	P.S.O.
<i>Hydrodictyon</i>	18° C - 21° C	srednje	B.M.M.
<i>Oedogonium</i>	18° C - 21° C	srednje do jako	B.M.M., Knop ot.
<i>Spirogyra</i>	5° C - 15° C	srednje do jako	P.S.O. v / CaCO ₃
<i>Ulothrix</i>	15° C - 18° C	srednje	B.M.M., P.S.W.
<i>Volvox</i>	20° C - 24° C	srednje do jako	B.M.M., Knop ot.
Euglenophyta			
<i>Euglena</i>	21° C - 25° C	srednje	P.S.O. v /

B.M.M. = Bristolov modificiran medij ; P.S.O. = Pringsheim otopina; v = voda

HRANJIVE PODLOGE (za alge)

Bristolov modificiran medij

Napravite šest otopina, svaku tako da otopite određenu količinu soli u 400 ml vode:

- 10 g natrij nitrata (NaNO₃)
- 1 g kalcij klorida (CaCl₂ · 2H₂O)
- 3 g magnezij sulfata (MgSO₄ · 7H₂O)
- 3 g kalij hidrogen fosfata - dibasic (K₂HPO₄)
- 7 g kalij hidrogen fosfata - monobasic (KH₂PO₄)
- 1 g natrij kloride (NaCl)

Uzmite 10 ml svake otopine i dodajte u 900 ml destilirane vode. Zatim dodajte kapljicu 1% željezo-klorid otopine, 40 ml of Pringsheim's Soil Water ekstrakta i autoklavirajte. Nakon autoklaviranja imati ćete točno jednu litru medija.

Pringsheim otopina

Dodajte 300 g vrtne zemlje (negnojene) u posudu volumena 1 gallon (3,8 L). Dolijte vode, tako da posuda bude $\frac{3}{4}$ puna, dodajte 1 g kalcij karbonata (CaCO_3). Pokrijte posudu i zagrijavajte (steam) po jedan sat u naredna tri dana.

Za kulture *Spirogyra*, **NE** dodajte kalcij karbonat. Za kulturu *Euglene* dodajte $\frac{1}{4}$ supke graška prije zagrijavanja. Za kulture *Diatomea*, dodajte 10–30 mg natrij metasilikata ($\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) na svaku litru medija.

Knopova otopina

Otopite svaku od navedenih soli u 1 L destilirane vode:

- 1 g kalij nitrat (KNO_3)
- 1 g magnezij sulfat (MgSO_4)
- 1 g kalij hidrogen fosfata - dibasic (K_2HPO_4)
- 3 g kalcij nitrate ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$)

Za trenutnu upotrebu, dodajte 5 L destilirane vode ovoj otopini. Dobro promiješajte i autoklavirajte.

Euglena medij

Prokuhajte miješajući: 20 zrna pšenice, 15 zrna riže 5 ml obranog mlijeka i 500 ml izvorske vode. Kad zakipi kuhajte još 5 minuta. Pustite da se ohladi preko noći i tada dodajte *Euglena*. Držite na dobro osvijetljenom mjestu, ali ne izloženo direktno sunčevim zrakama (pregrijavanje bi moglo ubiti *Euglene*). Nacijepite kulturu svaki mjesec.

PROTOZOA

Nakon što ste donijeli kulturu u laboratorij, odčepite spremnik i aerirajte ju čistom pipetom. Kulture držite pod difuznim svjetlom ili u tami na temperaturi od 18 °C to 22 °C. Ovisno o vrsti temperatura se može podesiti od 10 °C do 28 °C. Osnovni uvjeti držanja opisani su u Tablici 2.

Kulture praživotinja držite u plitkim steriliziranim posudama, u svakoj neka bude oko 2,5 cm hranjive podloge. Posude neka budu prekrivene kako bi se spriječila evaporacija i kontaminacija. Isparenu vodu zamijenite destiliranom ili izvorskom. Nemojte upotrebljavati vodu iz pipe, a u slučaju da nemate druge mogućnosti, pustite ju da odstoji nekoliko dana i tek onda upotrijebite. pH kulture mora biti neutralan (7) ili malo alkaličan. Nacjepite na novu hranjivu podlogu svaki mjesec ili prije ako se ukaže potreba.

HRANJIVE PODLOGE (za praživotinje)

Chalkley medij

otopite dolje navedene soli u 1 L vode:

- 0.1 g natrij klorid (NaCl)
- 0.006 g kalcij klorid (CaCl₂)
- 0.004 g kalij klorid (KCl)

Istočite medij u posude. Dodajte 4 (za amebae), ili 8 (za trepetljikaše), prokuhanih zrna riže ili pšenice u svaku posudu s kulturom. Pustite da stoji 24 do 48 sati kako bi se razvile bakterije. Dodajte nekoliko mililitara *Chilomonas* kulture (ili nekog drugog malog protozoa) u medij.

Sjeno-Riža medij

Pripremite autoklaviranjem ili prokuhavanjem nešto izvorske vode ili odstajale vodovodne vode. Dodajte dva zrna riže i nešto već prije prokuhanog sijena u svaku posudu s kulturom.

Pšenični medij

Pripremite autoklaviranjem ili prokuhavanjem 4 zrna pšenice po jednoj kulturi. Za trepetljikaše 8 zrna. Pustite medij da se ohladi 24 sata i tada razlijte u posude. Jednom mjesečno dodajte 4-8 zrna pšenice u svaku kulturu.

Opaska: medij napravljen namakanjem ili kuhanjem svježeg ili suhog organskog materijala (najčešće biljnog) naziva se "infuzij". U pravilu se stavlja, 7 g organskog materijala (zrna pšenice, riže, zobene pahuljice, sijeno i td .) na jednu litru vode. Neki organski materijal kao primjerice sijeno, potrebno je prethodno obraditi (sterilizirati). Pred-tretman se sastoji u tome da se materijal stavi u kipuću vodu jednu do dvije minute, a zatim dalje čuva u sterilnim uvjetima do upotrebe. Nakon što se takav pred-tretirani materijal doda mediju, potrebno je pričekati 24 do 48 sati, da se razviju bakterije i tek onda nasaditi kulturu praživotinja.

Tablica 2. Osnovni ekološki uvjeti za uzgoj praživotinja.

Kultura	Osvjetljenje	Medij (hranjiva podloga)
Sarcodina		
<i>Amoeba proteus</i>	slabo	Chalkley, Sijeno-Riža med.
<i>Pelomyxa carolinensis</i>	slabo	
Mastigophora		Vidi Kulture algi (Tablica 1)
Ciliata		
<i>Blepharisma</i>	slabo	Sijeno-Riža med., Pšenični med.
<i>Didinium</i>	slabo	Koncentrat <i>Paramecium</i>
<i>Paramecium caudatum</i>	srednje do slabo	Chalkley, Sijeno-Riža, Pšenični
<i>Paramecium multimicronucleatum</i>	srednje do slabo	Chalkley, Sijeno-Riža, Wheat
<i>Spirostomum</i>	slabo	Sijeno-Riža, Chalkley
<i>Stentor</i>	srednje	Sijeno-Riža, Pšenični med.
<i>Vorticella</i>	slabo	Pšenični med., Chalkley

HYDRA

Nakon što ste donijeli kulturu u laboratorij, odčepite spremnik i aerirajte ju čistom pipetom. *Hydra* se drži na slabom svjetlu kod temperature od 21 °C. Previše svjetla omogućuje veliki razvoj algi koji je štetan za hidre. Životinje držite u manjem akvariju ili malo većoj kristalizirki ispunjenoj izvorskom ili jezerskom vodom. Ne upotrebljavajte vodovodnu ili deioniziranu vodu.

Hidre je teško održavati duže u laboratoriju. Hrane se račićima, roda *Daphnia* ili *Artemia*. Hidre hranite jednom dnevno. Neprobavljenu hranu otklonite dekantiranjem (odlijevanjem), jer bi u protivnom mogla zagađiti kulturu. Dekantiranu vodu nadomjestite svježom vodom.

Čak i dobro održavane kolonije hidra povremeno počinju masovno umirati. Razlozi mogu biti različiti, a uglavnom se tiču nekih sitnih promjena u okolišu: mala promjena temperature, nedovoljno kisika, previše hrane, ili zagađena voda. **Ako životinje naglo počinju umirati, trebate reagirati brzo: odmah ih premjestite u novu posudu sa čistom vodom.**

Ukoliko uzgajate zelene hidre (*Chlorohydra viridissima*) držite ih 8 do 10 sati dnevno na svjetlu. Ove životinje imaju u tkivu simbiotske zelene alge koje trebaju svjetlo za fotosintezu.

PLANARIA (VIRNJACI)

Nakon što ste donijeli kulturu u laboratorij, odčepite spremnik i aerirajte ga čistom pipetom. Virnjaci izbjegavaju izravno svjetlo, a najbolje im odgovara difuzno svjetlo i temperatura između 20 °C i 22 °C.

Životinje možete držati u manjim kadicama ili posudama drukčijeg oblika. Radi lakšeg uočavanja i manipuliranja, preporuča se plitka posuda svjetlijeg dna. Hranite ih svježim goveđim jetrima ili žutanjkom tvrdo kuhanog jajeta. Hranu je dovoljno u pravilu davati jednom tjedno, ali ako držite više životinja može i češće. Porcije su male: kuglica ispasirane goveđe jetre ili zgnječenog žutanjka veličine zrna graška, dovoljna je za oko 50 životinja. Nakon što ste hranu ubacili u posudu sa životinjama, pričekajte sat vremena. Zatim oprezno prikupite sve životinje i prebacite ih u posudu s čistom vodom. U protivnom bi se kolonija mogla kontaminirati (planarije su jako osjetljive na povećanu količinu organskih tvari u vodi). Ako ste životinje prikupili u prirodi u izvorima ili gorskim potocima, držite ih u hladnjaku.

DAPHNIA (VODENBUHA)

Nakon što ste donijeli kulturu u laboratorij, odčepite spremnik i aerirajte ga čistom pipetom. *Daphnia* držite na difuznom ili indirektnom svjetlu, kod temperature 18 - 24 °C.

Držite ih u akvariju ili posudi koja ima veliku otvorenu površinu, kako bi se poboljšala izmjena plinova, u izvorskoj ili prethodno odstajaloj vodovodnoj vodi. Najmanji volumen je 1 do 2 litre. Važno je napomenuti da je *Daphnia* jako osjetljiva na klor i veće količine kalcija. Zato je vrlo bitno da se ne koristi izravno voda iz pipe! Također, akvarije ili posude u kojima se uzgajaju ovi račići, nipošto nemojte aerirati šupljikavim kamenčićima. Maleni mjehurići zraka često se uvuku ispod ljušturica životinje i izazivaju smrt. Ako je potrebno provoditi aeraciju, činite to tako da u vodu upuhujete zrak sporo u velikim mjehurima.

Evo još nekoliko važnih napomena oko hranjenja *Daphnia*:

(1) Dva do tri puta tjedno izmjerite 50 do 100 ml vode *Daphnia* kulture i nadomjestite ju sa jednakom količinom kulture ne-filamentoznih alga kao što je *Chlorella*.

(2) Izmiješajte 1/4 žutanjka tvrdo kuhanog jajeta u 500 ml vode i pustite da odstoji dva do tri dana, kako bi se razvile bakterije. Zatim izmijenite jednake volumene vode kulture i ove otopine ko što je objašnjeno u prethodnoj točki.

(3) Pripremite suspenziju kvasca (germe): dodajte malo suhog kvasca i šećera u malo mlake vode, ostavite da stoji 1 do 2 sata i tada dodajte nekoliko pipeta ovog medija kulturi *Daphnia*. Suspenzija kvasca ili tvrdo kuhanog žutanjka trebaju se dodavati u umjerenim količinama kako bi ih jedike *Daphnia* mogle pojesti u nekoliko sati ili tijekom jednog dana. U protivnom će kultura buknuti i ubrzo nakon toga uginuti od prenapučenosti. Povremeno je dobro izmijeniti nešto vode iz kulture sa čistom vodom ili medijem koji sadrži minerale (primjerice Knop otopina).

ROTATORIA (KOLNJACI)

Nakon što ste donijeli kulturu u laboratorij, odčepite spremnik i aerirajte ga čistom pipetom. Kolnjake držite na indirektnom svjetlu, kod sobne temperature.

Držite ih u akvariju ili posudi ispunjenom akvarijskom ili jezerskom vodom. Posudu poklopite da onemogućite evaporaciju, ali ne potpuno, tako da zrak ipak može cirkulirati. Kolnjake možete hraniti na slijedeći način:

- (1) hranite ih jednostaničnim algama kao što su: *Chlorella* or *Chlamydomonas*.
- (2) kratko prokuhajte 20 zrna pšenice u 1 litri vode. Pustite da medij stoji nekoliko dana, a zatim razlijte u manje posude i dodajte kolnjake. Nakon nekoliko tjedana, kada se kultura razraste, razdijelite ju u dvije posude i hranite medijem od pšenice.
- (3) Promiješajte 0.5 g tvrdo kuhanog žutanjka s malo deionizirane vode. Pastu rastopite u 500 ml vode i ostavite da odstoji. Četvrtog, šestog i osmog dana dodajte kolnjake u medij. Nacjepljujte koloniju na novu hranjivu podlogu svakih nekoliko tjedana.

OCTENI OBLIĆI (*TURBATRIX*)

Nakon što ste donijeli kulturu u laboratorij, odčepite spremnik i aerirajte ga čistom pipetom. Vrsta *Turbatrix aceti* često se u velikoj množini nalazi u octu. Podnosi octenu kiselinu u koncentraciji do 13,5 %, a može podnijeti pH 11,5. Nekoliko sati može živjeti u živinom kloridu u koncentraciji koja je za mnoge životinje odmah smrtonosna.

Web Site: www.flinnsci.com