

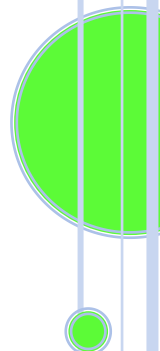
TOKSIKOLOGIJA IN KONTAMINACIJA ŽIVIL

NAVODILA IN DELOVNI ZVEZEK ZA
LABORATORIJSKE VAJE

Popravljen in dopolnjen izdaja

Barbara Jeršek

Ljubljana, 2024



TOKSIKOLOGIJA IN KONTAMINACIJA ŽIVIL

NAVODILA IN DELOVNI ZVEZEK ZA LABORATORIJSKE VAJE

Popravljen in dopolnjen izdaja

Barbara Jeršek
Navodila in delovni zvezek za vaje pri predmetu
Toksikologija in kontaminacija živil

Izdajatelj:
Univerza v Ljubljani
Biotehniška fakulteta
Oddelek za živilstvo

Dostopno na: <https://repozitorij.uni-lj.si/IzpisGradiva.php?id=161682>

Kataložni zapis o publikaciji (CIP) pripravili v Narodni in univerzitetni knjižnici v Ljubljani
COBISS.SI-ID 207405571
ISBN 978-961-6908-33-7 (PDF)

Ljubljana, september 2024

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

KAZALO VSEBINE

MIKOTOKSINI	1
NAMEN	1
POTEK EKSPERIMENTALNEGA DELA	1
NAVODILA	1
DELOVNI ZVEZEK	7
IZVEDBA	7
MATERIAL, POTEK DELA IN REZULTATI	8
ALERGENI	12
NAMEN	12
POTEK EKSPERIMENTALNEGA DELA	12
NAVODILA	12
DELOVNI ZVEZEK	19
IZVEDBA	19
MATERIAL, POTEK DELA IN REZULTATI	20
STAFILOKOKNI ENTEROTOKSINI	24
NAMEN	24
POTEK EKSPERIMENTALNEGA DELA	24
NAVODILA	24
DELOVNI ZVEZEK	29
IZVEDBA	29
MATERIAL, POTEK DELA IN REZULTATI	30
OKOLJSKI ONESNAŽEVALCI	33
NAMEN	33
POTEK EKSPERIMENTALNEGA DELA	33
NAVODILA	33
DELOVNI ZVEZEK	38
IZVEDBA	38
MATERIAL, POTEK DELA IN REZULTATI	39
VIRI	46
PRILOGA	48
MIKOTOKSINI	48
ALERGENI	51
STAFILOKOKNI ENTEROTOKSINI	52
OKOLJSKI ONESNAŽEVALCI	53

Kazalo slik

Slika 1: Shema nacepitve plesni, gojišč in temperatur inkubacije za identifikacijo plesni (1, 2: oznaki izolatov).....	3
Slika 2: Shema nacepitve plesni na gojišče YES za določitev mikotoksinov (1, 2: oznaki izolatov)	3
Slika 3: Shema TLC.....	5
Slika 4: Časovno-temperaturni program za določanje oreha s qPCR.....	17
Slika 5: Odvisnost vrednosti Ct od desetiškega logaritma odstotka oreha v standardnem orehovem piškotu (Terpin, 2010)	18
Slika 6: Časovno-temperaturni program za določanje gena <i>femB</i> s qPCR...	27

Kazalo preglednic

Preglednica 1: Sestavine hranilne raztopine	34
---	----

Kazalo prilog

Priloga 1: Izolacija plesni na gojišču DRBC (A) in gojišču DG18 (B)	48
Priloga 2: Primera identifikacije plesni po Pitt in Hocking (1985).....	48
Priloga 3: Eksudat na koloniji plesni viden s prostim očesom.....	49
Priloga 4: Plesni rodu <i>Aspergillus</i> (400x povečava).....	49
Priloga 5: Plesni rodu <i>Penicillium</i> (400x povečava)	49
Priloga 6: Ohratoksin A (OTA) in aflatoksin B1 (AFB1)	50
Priloga 7: Nanos vzorcev plesni na ploščo za TLC	50
Priloga 8: TLC-plošča za določanje AFB1 osvetljena z UV-svetlobo	50
Priloga 9: Princip določitve pomnožkov pri qPCR s specifično sondo.....	51
Priloga 10: Princip določitve pomnožkov pri qPCR z nespecifično metodo ..	52
Priloga 11: Mikroskopske slike čebulnih celic: (A) anafaza, (B) telofaza, (C) profaza, (D) metafaza, (E) interfaza.....	53
Priloga 12: Mikroskopske slike čebulnih celic z različnimi poškodbami v metafazi in anafazi	54

MIKOTOKSINI

NAMEN

Določite kontaminacijo izbranega živila s plesnimi in potencial izoliranih plesni za tvorbo ohratoksina A (OTA) in aflatoksina B1 (AFB1).

POTEK EKSPERIMENTALNEGA DELA

- Določite prisotnost plesni na/v živilu
- Identificirajte izbrane plesni
- Določite potencialno mikotoksigene plesni
- Določite tvorbo ohratoksina A in aflatoksina B
- Ovrednotite rezultate

NAVODILA

1. Izolacija plesni iz živila s klasičnimi mikrobiološkimi metodami

Za določitev plesni v živilu pripravimo t.i. **osnovno (matično) raztopino** živila (Jeršek, 2023). Pripravimo jo zato, da zagotovimo čimbolj homogeno razporeditev mikroorganizmov v preiskovani količini živila. Odmerimo preiskovano maso ali volumen živila v sterilno plastično vrečko za gnetilnik in dodamo devetkratno količino topila in suspenzijo homogeniziramo (ISO 6887-1: 1999(E)). Če ni posebnih predpisov, je najmanjša količina preiskovanega živila 10 g (ml). Zato 10 g (ml) dobro premešanega vzorca živila aseptično zatehtamo ter dodamo 90 ml topila. Tako dobimo osnovno 10-kratno razredčitev ($R = 10^{-1}$). Vzorec homogeniziramo z gnetilnikom ali mešalom z rezili ("stomacher", "ultra-turax").

Za izolacijo plesni lahko uporabimo **gojišče DRBC** (ang. Dichloran Rose-Bengal Chloramphenicol; gojišče z barviloma dikloran rdeče in bengal ter klormfenikolom), **gojišče OGY** (ang. Oxytetracyclin Glucose Yeast Agar, gojišče z glukozo, kvasnim ekstraktom in oksitetraciklinom), in/ali

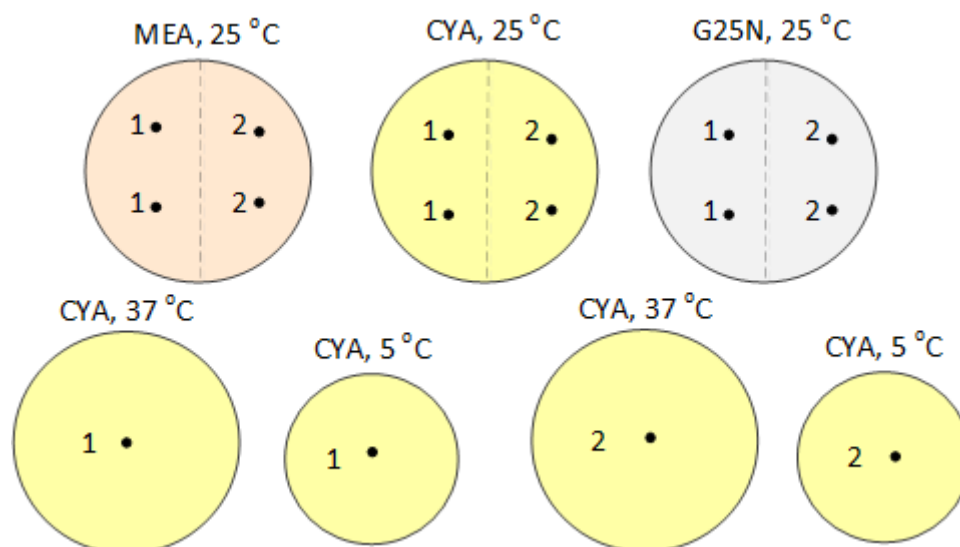
gojišče DG-18 (angl. Dichloran Glycerol, gojišče z dikloranom in glicerolom). Gojišči DRBC in OGY se uporabljata za izolacijo in kvantifikacijo plesni iz živil, ki vsebujejo tudi večje koncentracije bakterij, saj obe gojišči vsebujeta antibiotik, ki njihovo rast zavira. Gojišče DG-18 se uporablja za izolacijo in kvantifikacijo kserofilnih plesni iz suhih in pol-suhih živil (npr. sušeno sadje, kandirano sadje, začimbe, žita, nekateri mesni in ribji izdelki). Gojišče DG-18 vsebuje pepton kot vir dušika, glukozo kot vir energije, in vitamine ter minerale potrebne za rast gliv. V gojišču so tudi dikloran, ki inhibira razširjanje kolonij, kloramfenikol in klor-tetraciklin, ki inhibirata rast bakterij. V gojišču je 18 % (w/w) glicerola, ki zniža a_w (aktivnost vode) iz 0,99 na 0,95). Za izolacijo plesni lahko uporabimo tudi **gojišče MEA** (ang. Malt Extract Agar, gojišče s sladnim ekstraktom). Vsebuje sladni ekstrakt in pepton, dodano pa ima tudi mlečno kislino, ki delno inhibira rast bakterij (pH gojišča 3,5). Gojišča z vzorci živil 7 dni inkubiramo pri 25 °C.

2. Identifikacija plesni

Pri nadaljnjem delu s plesnimi je poleg aseptične tehnike dela obvezno razkuževanje zraka z razpršilom ter razkuževanje površin s 70 % etanolom.

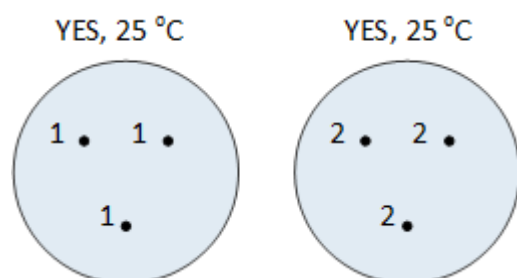
Po inkubaciji gojišč DRBC, OGY ali MEA in DG-18 opišemo rezultate in izberemo posamezne kolonije plesni za njihovo identifikacijo. Za identifikacijo plesni v brezprašni komori pripravimo **suspenzijo spor** (konidijev) (SS). Za pripravo suspenzije uporabimo sterilan 0,05 % agar s Tween 80 (v 1,5 ml-epruveti), v katerega prenesemo spore posamezne plesni s cepilno zanko in vsebino homogeniziramo z namiznim mešalom. Število spor v suspenziji SS lahko določimo s štetjem v števni ploščici (npr. Bürker-Türk), ali z merjenjem optične gostote ali ocenimo vizualno.

Za identifikacijo plesni precepimo spore iz SS s cepilno iglo na gojišča, ki se uporabljajo za identifikacijo plesni (Pitt in Hocking, 1985). Gojišča so **CYA** (angl. Czapek yeast extract agar), **MEA** in **G25N** (25 % Glicerol nitratni agar) po shemi na sliki 1. Vsako gojišče označimo (ime gojišča, temperatura inkubacije, oznaka izolata (1 in 2), s piko označimo mesto nacepitve plesni, ime študenta/ke, skupina). Med 7-dnevno inkubacijo so petrijevke obrnjene normalno.



Slika 1: Shema nacepitve plesni, gojišč in temperatur inkubacije za identifikacijo plesni (1, 2: oznaki izolatov)

Plesni lahko istočasno (kadar gre za vsaj morfološko čiste kulture) precepimo tudi na gojišče **YES** (Yeast Succrose Agar), ki se uporablja za določanje mikotoksinov (slika 2). Gojišče YES inkubiramo pri optimalni temperaturi 7 ali 14 dni.



Slika 2: Shema nacepitve plesni na gojišče YES za določitev mikotoksinov (1, 2: oznaki izolatov)

Za identifikacijo plesni po 7-dnevni inkubaciji določimo za vsak izolat na gojiščih prikazanih na sliki 1 makromorfološke in mikromorfološke lastnosti:

- **Makromorfološke lastnosti** določimo vizualno kot velikost kolonije (premer-2r), barva substratnega micelija, strukture substratnega

micelija, barva(e) zračnega micelija, struktura zračnega micelija, tvorba eksudata.

- **Mikromorfološke lastnosti** vidne z lupo pri 40x povečavi so tvorba eksudata in tvorba kleistotecijev (z askusi in askosporami).
- **Mikromorfološke lastnosti** vidne na nativnem barvnem preparatu pri 400x in 1000x povečavi so septiranost micelija, psevdo-micelij, tvorba in izgled spolnih spor kot so askospore, tvorba vegetativnih spor kot so sporngiospore ali konidiji, oblika in površina spor, vrsta konidiogenih celic, prisotnost specifičnih struktur kot so apeks, metula, fialida, anelida, kleistotecij z askosporami.

Nativni barvni preparat pripravimo v kapljici laktopenola, ki mu lahko dodamo fuksin (lakto-fuksin) ali drugo barvilo za povečanje kontrasta, tako, da vzorec plesni (zračni in substratni micelij) razporedimo z iglami v eno ravnino, pokrijemo s krovnim steklom in odvečno barvilo obrišemo s papirnato brisačo. Pazimo, da med ali po pripravi nativnega preparata ne pride do izsušitve! Podrobna navodila in ključni za identifikacijo plesni so podrobno opisani v Pitt in sod. (1988), Pitt in Hocking (1985) in Samson in sod. (2000).

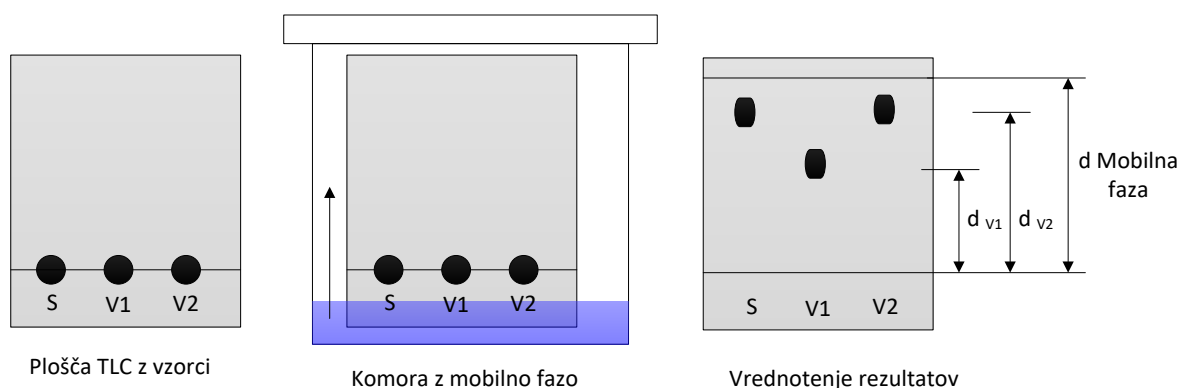
Po zaključenem mikroskopiranju preparate dekontaminiramo v raztopini NaOCl (14 %) in očistimo objektivne na mikroskopu.

Glede na vrsto identificiranih plesni, nato iz literature predvidimo, kateri od izolatov lahko tvorijo mikotoksine in kateri bi lahko tvoril ohratoksin A in/ali aflatoksin B1. Te izolate precepimo na gojišče YES (ang. Yeast Succrose Agar) kot je opisano pri točki 2 in jih inkubiramo vsaj 7 dni pri 25 °C (slika 2).

3. Splošna navodila za določitev mikotoksina s tankoplastno kromatografijo (TLC)

Pri delu z mikotoksini je obvezna uporaba rokavic in zaščitnih očal! Ves material, ki pride v stik z mikotoksinom/mikotoksini odvržemo v vnaprej pripravljene raztopine NaOCl (14 %)! Z vsemi topili ravnamo kot z nevarnimi snovmi in delo opravimo v digestoriju. S TLC lahko mikotoksine določimo po naslednjem postopku:

1. Glede na vrsto mikotoksina, ki ga določamo s TLC, pripravimo najprej mešanico topil – mobilno fazo (200 ml za veliko komoro, 20 ml za malo komoro).
2. Kot stacionarno fazo uporabimo ploščo TLC (Merck, TLC Silica gel 60 F294), ki je sestavljena iz nosilca (aluminijeva pločevina ali steklo) z naneseno tanko plastjo stacionarne faze (silikagel in aluminijev oksid).
3. Na ploščo TLC s svinčnikom rahlo označimo spodnjo črto (2,5 cm od spodnjega roba) in na njej označimo vzorce v razmiku po 1,5 cm (slika 3).
4. Vedno na prvo mesto (S) nanesemo standardno raztopino mikotoksina (5 ali 10 μ l) – pri tem moramo vzorec nanesti zelo pazljivo tako, da je premer lise manjši od 3 mm.
5. Nato nanesemo na mesta V1, V2, V3, ... vzorce čepov plesni. Za vsako plesni nanesemo 3 čepke plesni in vsakega po 3x odtisnemo na isto mesto plošče TLC.
6. Ko zaključimo z nanosom vzorcev, v digestoriju odparimo topilo.
7. Ploščo z vzorci zelo previdno postavimo v komoro z mobilno fazo, komoro pokrijemo ter počakamo, da zaradi kapilarnega tlaka mobilna faza pripotuje skoraj do vrha plošče.



Slika 3: Shema TLC

Legenda: S: raztopina standarda OTA ali AFB1; V1: vzorec plesni; V2: vzorec plesni V2; d: razdalja

8. Ploščo vzamemo iz komore in postavimo v digestorij, da topilo izhlapi.
9. Z UV-svetlobo (366 nm) osvetlimo ploščo tako, da postanejo lise mikotoksina vidne in jih označimo. Izmerimo razdalje, ki jih prepotuje posamezna spojina.
10. Nato izmerimo razdalje, ki jih prepotujejo posamezne spojine in mobilna faza in izračunamo retencijske faktorje. Količnik med razdaljo, ki jo prepotuje posamezna spojina in tisto, ki jo prepotuje mobilna faza imenujemo retencijski faktor (R_f):

$$R_f = d_{\text{spojina}} / d_{\text{Mobilna faza}}$$

TLC se lahko uporablja kot hitra presejalna metoda za oceno tvorbe posameznih mikotoksinov in pri natančni izvedbi lahko poda semi-kvantitativne podatke.

4. Določitev torbe OTA s TLC

Za določitev tvorbe OTA pripravimo mešanico topil – mobilno fazo: TEF v razmerju 5:4:1 (toluen : etil acetat : mravljinčna kislina). Na ploščo TLC s svinčnikom označimo spodnjo črto (2,5 cm od spodnjega roba) in na njej označimo vzorce, ki jih bomo nanесли v razmiku po 1,5 cm (slika 3). Vedno nanesimo na 1 mesto standardno raztopino OTA (5 µl s koncentracijo 1 µg/ml ali 10 µl s koncentracijo 0,5 µg/ml) in nato vzorce čepov plesni. Postopek nadaljujemo po opisu pri točki 3.

5. Določitev tvorbe aflatoksina B1 s TLC

Za določitev tvorbe aflatoksina B1 pripravimo mešanico topil – mobilno fazo: KAC v razmerju 9:1 (kloroform:acetan). Na ploščo TLC s svinčnikom rahlo označimo spodnjo črto (2,5 cm od spodnjega roba) in na njej označimo vzorce, ki jih bomo nanесли v razmiku po 1,5 cm (slika 3). Vedno nanesimo na 1 mesto standardno raztopino AFB1 (5 µl s koncentracijo 1 µg/ml ali 10 µl s koncentracijo 0,5 µg/ml) in nato vzorce čepov plesni. Postopek nadaljujemo po opisu pri točki 3.

DELOVNI ZVEZEK

IZVEDBA

Narišite shemo eksperimentalnega dela!

MATERIAL, POTEK DELA IN REZULTATI

1. Opis živila v/na katerem določate plesni

2. Opis izolacije plesni iz živila

3. Določitev plesni v/na živilu s klasičnimi mikrobiološkimi metodami – kvalitativni in kvantitativni opis plesni izoliranih na gojišču za izolacijo; izbira in oznaka izolatov za identifikacijo

4. Identifikacija plesni

V preglednico napišite makromorfološke lastnosti izolatov 1 in 2!

Gojišče	Makromorfološke lastnosti izolat 1	Makromorfološke lastnosti izolat 2
MEA 25 °C	2r:	2r:
	SM:	SM:
	ZM:	ZM:
	EK:	EK:
CYA 25 °C	2r:	2r:
	SM:	SM:
	ZM:	ZM:
	EK:	EK:
CYA 37 °C	2r:	2r:
	SM:	SM:
	ZM:	ZM:
	EK:	EK:
CYA 5 °C	2r:	2r:
	SM:	SM:
	ZM:	ZM:
	EK:	EK:
G25N 25 °C	2r:	2r:
	SM:	SM:
	ZM:	ZM:
	EK:	EK:

Legenda: 2r: premer kolonije; SM: substratni micelij; ZM: zračni micelij; EK: eksudat

Mikromorfološke lastnosti izolata 1 so:

Mikromorfološke lastnosti izolata 2 so:

Izolat 1 je identificiran kot plesni vrste,
izolat 2 je identificiran kot plesni vrste.....

V preglednico vpišite identificirane plesni in dodajte literaturne podatke
o njihovi tvorbi mikotoksinov.

Vrsta plesni	Mikotoksini

5. Določitev torbe OTA s TLC – narišite shemo plošče TLC, izmerite razdalje, izračunajte retencijske faktorje in opišite rezultate!

6. Določitev torbe aflatoksina B1 s TLC – narišite shemo plošče TLC, izmerite razdalje in izračunajte retencijske faktorje in opišite rezultate!

ALERGENI

NAMEN

Določite oreh (*Juglans regia*) kot alergen v naključno izbranih živilih.

POTEK EKSPERIMENTALNEGA DELA

- Pripravite standardne orehove mešanice;
- Naredite standardno krivuljo za standardno orehove mešanice (izolirajte DNA iz standardnih orehovitih mešanic, spektrofotometrično določite koncentracijo izolirane DNA, pripravite koncentracijo 30 ng/μl izoliranih DNA (normalizacija), izvedite qPCR, iz znanih koncentracij DNA oz. koncentracij oreha (% ut.) in dobljenih vrednosti Ct narišite standardno krivuljo);
- V naključno izbranih živilih določite oreh (iz živil izolirajte DNA, spektrofotometrično določite koncentracijo DNA, pripravite 30 ng/μl koncentracijo izoliranih DNA (normalizacija DNA), izvedite qPCR, iz standardne krivulje določite relativno vsebnost oreha kot alergena)

NAVODILA

1. Priprava standardnih orehovitih mešanic

Standardne orehove mešanice pripravimo z zmletimi ter razmaščenimi orehi in moko.

Mletje orehov:

Mlinček za mletje očistimo s sredstvom za odstranjevanje DNA, operemo z vodo in osušimo s papirnato brisačo. Zmeljemo 10 g orehov, jih prenesemo v tarilnico in jih čim bolj zdrobimo.

Razmaščevanje mletih orehov z acetonom:

V 12 2 ml-epruvet odtehtamo približno 500 mg zdrobljenih orehov. Nato dodamo 1000 μl acetona, epruvete zapremo in vsebino dobro premešamo na namiznem mešalu (1 min). Vzorce 5 min centrifugiramo pri 13. 400 obr./min.

Zgornjo, tekočo fazo odpipetiramo v namizni koš. Nato postopek spiranja orehov z acetonom ponovimo še 2x.

Po zadnjem spiranju zgornjo fazo ponovno zavržemo, zdrobljene orehe pa prenesemo s sterilnim zobotrebcom na filtrirni papir v petrijevki (pazimo, da se filtrirni papir čim manj dotika dna petrijevke!). V petrijevko položimo tudi prazne 2-ml epruvete, v katerih smo razmaščevali vzorce. Nato v polodprtih petrijevkah vzorce sušimo v digestoriju 1-3 ure. Ko so vzorci posušeni, jih previdno prenesemo v 10 ml epruveto s pokrovom.

2. Priprava vzorcev živil

Priprava vzorca živila za določitev alergena (oreh) vsebuje dve fazi – homogenizacija in razmaščevanje vzorca.

Homogenizacija vzorca živila

Vzorec živila homogeniziramo z rezanjem, drobljenjem, mletjem oziroma mešanjem.

Razmaščevanje vzorcev živil z acetonom

V 2 ml-epruveto odtehtamo približno 500 mg homogeniziranega vzorca živila. Nato dodamo 1000 µl acetona, epruveto zapremo in vsebino dobro premešamo na namiznem mešalu (1 min). Vzorec centrifugiramo 5 min pri 13. 400 obr./min. Zgornjo, tekočo fazo odpipetiramo v kozarec za odpadke. Nato postopek spiranja vzorca z acetonom ponovimo še 2x.

Po zadnjem spiranju zgornjo fazo ponovno zavržemo, zdrobljen vzorec pa prenesemo z zobotrebcom na filtrirni papir v petrijevki (pazimo, da se filtrirni papir čim manj dotika dna petrijevke!). V petrijevko položimo tudi prazno 2-ml epruveto, v kateri smo razmaščevali vzorec. Nato v polodprti petrijevki vzorec sušimo v digestoriju 1-3 ure.

3. Priprava standardnih mešanic moke in orehov

Pripravimo naslednje standardne mešanice iz razmaščenih orehov in moke:

Oznaka mešanice	% (ut.) oreha	Priprava
A	0	200 mg moke
B	0,001	V 50 ml-plastično epruveto odtehtamo 9 g moke in ji dodamo 1 g 0,01 % mešanice (D)
C	0,005	V 50 ml-plastično epruveto odtehtamo 9 g moke in ji dodamo 1 g 0,05 % mešanice (E)
D	0,01	V 50 ml-plastično epruveto odtehtamo 9 g moke in ji dodamo 1 g 0,1 % mešanice (F)
E	0,05	V 50 ml-plastično epruveto odtehtamo 9 g moke in ji dodamo 1 g 0,5 % mešanice (G)
F	0,1	V 50 ml-plastično epruveto odtehtamo 9 g moke in ji dodamo 1 g 1 % mešanice (H)
G	0,5	V 50 ml-plastično epruveto odtehtamo 9 g moke in ji dodamo 1 g 5 % mešanice (I)
H	1	V 50 ml-plastično epruveto odtehtamo 9 g moke in ji dodamo 1 g 10 % mešanice (J)
I	5	V 50 ml-plastično epruveto odtehtamo 9,5 g moke in ji dodamo 0,5 g oreha
J	10	V 50 ml-plastično epruveto odtehtamo 9 g moke in dodamo 1 g oreha
K	100	200 mg oreha

Pripravimo najprej vzorec z oznako A, nato vzorec z oznako K, in nato vzorce od J do B. Vsako mešanico dobro premešamo – homogeniziramo pred pripravo naslednje mešanice! Iz standardnih mešanic J – B v 2-ml epruveto natehtamo 200 mg.

4. Izolacija DNA iz standardnih orehovitih mešanic in vzorcev živil

DNA izoliramo s kompletom za izolacijo DNA Nucleospin Food (Macherey-Nagel, Nemčija), ki vsebuje pufer CF, proteinazo K, pufer C2, pufer C3, pufer CE za izpiranje, kolone za koncentriranje DNA in zbiralne epruvete. Če je vzorec živilo, ki vsebuje veliko oreščkov, ga pred izolacijo DNA razmastimo z acetonom po enakem postopku kot je opisan za orehe.

Izolacija DNA:

1. K 200 mg vzorca dodamo 1100 μ l pufru CF vnaprej segretega na 65 °C, premešamo 15 s na namiznem mešalu, dodamo 20 μ l proteinaze K (10 mg/ml) ter 15 s premešamo na namiznem mešalu.
2. Vzorec inkubiramo najmanj 30 min v vodni kopeli pri 65 °C (vsakih 5 min premešamo na namiznem mešalu).
3. Vzorec centrifugiramo 10 min pri hitrosti 13. 400 obr./min.
4. V svežo 2 ml-epruveto prenesemo 300 μ l absolutnega etanola ohlajenega na -20 °C, dodamo 300 μ l pufru C4 in 300 μ l supernanata iz točke 3. Če supernatant vsebuje več faz, odpipetiramo srednjo bistro fazo!
5. Vzorec 30 s mešamo na namiznem mešalniku.
6. 700 μ l vzorca previdno prenesemo v kolono za koncentriranje DNA, ki je vstavljena v zbiralno epruveto.
7. Vzorec centrifugiramo 1 min hitrosti 13.400 obr./min in tekočo fazo zavržemo.
8. Spiranje in sušenje silikonske membrane z vezanimi molekulami DNA v koloni za koncentriranje DNA:
 1. spiranje: v kolono za koncentriranje DNA dodamo 400 μ l pufru CQW, centrifugiramo 1 min pri 12.000 obr./min in zavržemo tekočo fazo,
 2. spiranje: v kolono za koncentriranje DNA dodamo 700 μ l pufru C5, centrifugiramo 1 min pri 12.000 obr./min in zavržemo tekočo fazo,
 3. spiranje: v kolono za koncentriranje DNA dodamo 200 μ l pufru C5, centrifugiramo 2 min pri 12.000 obr./min in zavržemo tekočo fazo.
9. Kolono za koncentriranje DNA vstavimo v novo zbiralno epruveto.
10. Dodamo 100 μ l pufru CE vnaprej segretega na 70 °C, inkubiramo 5 min pri sobni temperaturi in nato centrifugiramo 1 min pri 12.000 obr./min.
11. Ves tekoči del (100 μ l) prenesemo v novo 1,5 ml-epruveto in raztopine DNA hranimo pri -20 °C.

5. Spektrofotometrična določitev koncentracije izolirane DNA

DNA razredčimo tako, da v 200 μ l-epruvetko k 135 μ l H₂O_{KEM} dodamo 15 μ l DNA (razredčitev 10⁻¹). Od te razredčene DNA 100 μ l prenesemo v posebno mikrotitersko ploščico za merjenje absorbance v UV-območju (označite vzorce v shemi 2.1 med materiali). Na ploščico dodamo tudi 100 μ l H₂O_{KEM} kot slepi vzorec. Absorbanco izmerimo na pri 260 nm (maksimum za DNA) in pri 280 nm (maksimum za proteine). Koncentracijo DNA izračunamo:

$$C \text{ (DNA)} = (A_{260} \text{ vzorec} - A_{260} \text{ slepi vzorec}) \times 50 \quad (\text{ng} / \mu\text{l})$$

Nato izračunamo še čistost izolirane DNA:

$$A_{260}/A_{280} = (A_{260} \text{ vzorec} - A_{260} \text{ slepi vzorec}) / (A_{280} \text{ vzorec} - A_{280} \text{ slepi vzorec})$$

O čisti DNA govorimo takrat, ko je A_{260}/A_{280} med 1,7 do 2,0.

6. Normalizacija DNA za izvedbo qPCR

Normalizacija DNA pomeni pripravo določene koncentracije DNA vseh vzorcev (standardni vzorci in vzorci živil) za qPCR. Izbira koncentracije je empirično določena glede na učinkovitost izolacije DNA.

Za določanje oreha kot alergena v živilu mora biti v reakcijski mešanici za qPCR vedno npr. 30 ng DNA/ μl ali 20 ng DNA/ μl .

Glede na spektrofotometrično določeno koncentracijo DNA za vsak vzorec izračunamo, kakšen volumen DNA moramo razredčiti za 100 μl raztopine s koncentracijo 30 ng/ μl (uporabimo enačbo $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$).

Če smo na primer določili, da je koncentracija izolirane DNA 125 ng/ μl , potem moramo za 100 μl raztopine s koncentracijo 30 ng/ μl v novo 1,5-ml epruveto dodati 24 μl raztopine s koncentracijo 125 ng/ μl in 76 μl H_2O .

7. qPCR za določanje oreha

7.1 Priprava reakcijske mešanice za qPCR:

Reakcijsko mešanico pripravimo za standardne vzorce, vzorce živil, negativni kontrolni vzorec (NTC) in t.i. rezervni vzorec (zaradi pipetiranja) – skupno za N vzorcev. Reakcijska mešanica vsebuje vse komponente potrebne za encimsko reakcijo (brez DNA!) in jo vedno pripravimo kot eno mešanico, ki jo pred dodatkom DNA razdelimo v epruvete za PCR.

qPCR s specifično sondo ali t.i. Taq Man-kemijo:

Glede na skupno število vzorcev (N), izračunamo volumne posameznih sestavin encimske reakcije in pri tem upoštevamo, da je v reakcijski mešanici za 1 vzorec, če uporabljamo **specifično sondo**:

- Univerzalna mešanica (TaqMan Universal MasterMix 2x): 12,5 μl
- par oligonukleotidnih začetnikov za oreh:

- oligonukleotidni začetnik JuglF: 2,25 µl (900 nmol)
- oligonukleotidni začetnik JuglR: 2,25 µl (900 nmol)
- sonda za oreh: JuglP: 0,125 µl (50 nmol)
- H₂O_{PCR}: izračunamo (skupen volumen je 25 µl, od tega je 5 µl DNA)

qPCR z nespecifičnim barvilom SybrGreen:

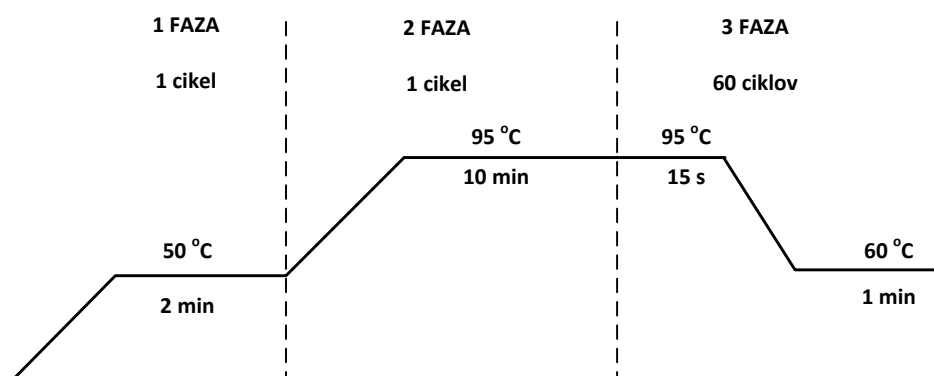
Če uporabljamo **nespecifično barvilo SybrGreen** je reakcijski mešanici za 1 vzorec:

- Univerzalna mešanica s SybrGreen (2x): 12,5 µl
- par oligonukleotidnih začetnikov za oreh:
 - oligonukleotidni začetnik JuglF: 2,25 µl (900 nmol)
 - oligonukleotidni začetnik JuglR: 2,25 µl (900 nmol)
- H₂O_{PCR}: izračunamo (skupen volumen je 25 µl, od tega je 5 µl DNA)

Reakcijsko mešanico za qPCR nato razdelimo po 20 µl v reakcijske epruvete, trakove ali ploščice. Nato v razdeljeno reakcijsko mešanico dodamo vzorce normalizirane DNA (vzorci standardnih orehovitih mešanic, vzorci živil, in NTC) po 5 µl. Vzorce označimo v razpredelnici med materiali – točka 5.3.

7.2 Izvedba qPCR

PCR izvedemo s standardnim programov aparata za PCR ABI Prism 7500 (slika 4 za izvedbo s specifično sondo ali slika 6 za izvedbo z nespecifičnim barvilom SybrGreen).



Slika 4: Časovno-temperaturni program za določanje oreha s qPCR

7.3 Vrednotenje rezultatov qPCR

Po zaključku encimske reakcije za vrednotenje rezultatov nastavimo sledeče parametre:

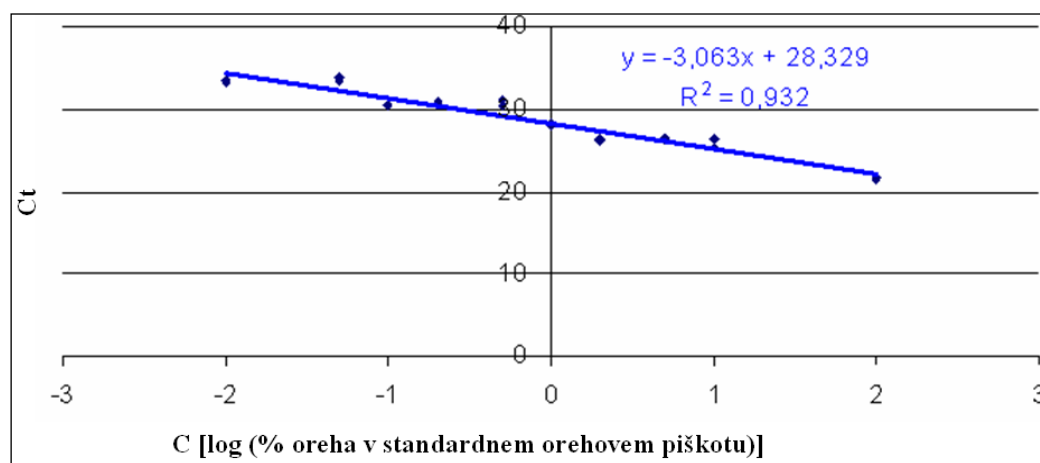
- meja zaznavanja: ročno nastavimo na vrednost 0,02
- izhodišče: avtomatska nastavitve

zato, da lahko primerjamo rezultate različnih qPCR.

Nato za posamezen vzorec določimo vrednost Ct. Vrednost Ct pove, koliko ciklov je potrebnih, da aparatura zazna normaliziran fluorescentni signal (ΔRn), in pomeni, da se pri določenih razmerah fluorescenca vzorca poveča nad fluorescenco ozadja.

7.4 Umeritvena krivulja

Iz dobljenih vrednosti Ct za standardne orehove mešanice narišemo standardno krivuljo kot odvisnost vrednosti Ct od relativne koncentracije oreha v orehovi mešanici izražene kot log (% oreha) (primer slika 5).



Slika 5: Odvisnost vrednosti Ct od desetiškega logaritma odstotka oreha v standardnem orehovem piškotu (Terpin, 2010)

7.5 Relativna kvantifikacija oreha v živilih

Glede na določene vrednosti Ct za posamezen vzorec živila (točka 7.3) iz standardne krivulje (točka 7.4) ocenimo koncentracijo oreha v vzorcih živil.

DELOVNI ZVEZEK

IZVEDBA

Narišite shemo eksperimentalnega dela

MATERIAL, POTEK DELA IN REZULTATI

1. Priprava standardnih orehovitih mešanic

2. Priprava vzorcev živil

3. Spektrofotometrična določitev koncentracije izolirane DNA in priprava izbrane koncentracije DNA (30 ng/μl) za qPCR

3.1 Vzorci standardnih orehovitih mešanic

OZNAKA VZORCA	Koncentracija izolirane DNA C ₁ (ng/μl)	Čistost DNA A ₂₆₀ /A ₂₈₀	Priprava DNA s C ₂ 30 ng/μl	
			V ₁ DNA (μl)	V H ₂ O (μl)
A				
B				
C				
D				
E				
F				
G				
H				
I				
J				
K				

3.2 Vzorci živil

OZNAKA VZORCA	Koncentracija izolirane DNA C ₁ (ng/μl)	Čistost DNA A ₂₆₀ /A ₂₈₀	Priprava DNA s C ₂ 30 ng/μl	
			V ₁ DNA (μl)	V H ₂ O (μl)
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				

4. Priprava reakcijske mešanice za qPCR– izračun

Število vzorcev N:

Reakcijska mešanica s specifično sondo JuglP	SESTAVINA	V za 1 vzorec (μl)	V za N vzorcev (μl)
	UMM	12,5 μl	
	JuglR	2,25 μl	
	JuglF	2,25 μl	
	JuglP	0,125 μl	
	H ₂ O _{PCR}		

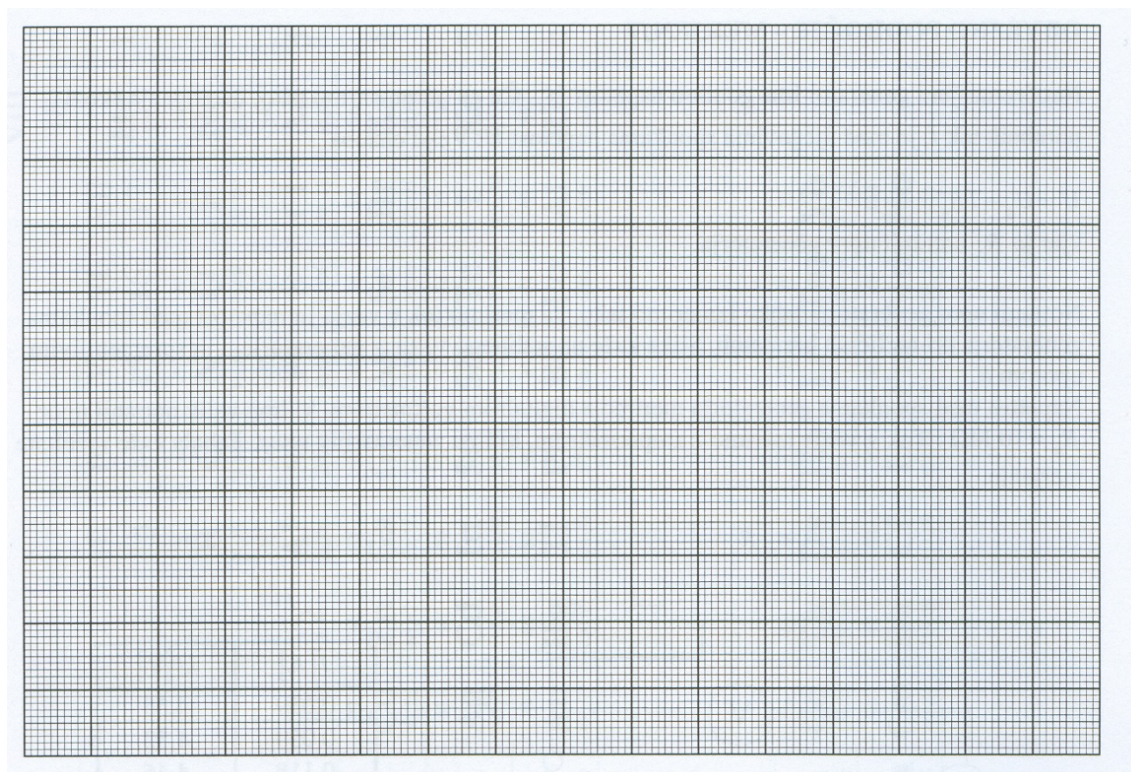
ALI:

Reakcijska mešanica z barvilom SybrGreen	SESTAVINA	V za 1 vzorec (μl)	V za N vzorcev (μl)
	UMSybrGreen	12,5 μl	
	JuglR	2,25 μl	
	JuglF	2,25 μl	
	H ₂ O _{PCR}		

5. Vrednosti Ct standardnih orehovitih mešanic določene s qPCR

OZNAKA VZORCA	% (ut.) oreha	Ct
A	0	
B	0,001	
C	0,005	
D	0,01	
E	0,05	
F	0,1	
G	0,5	
H	1	
I	5	
J	10	
K	100	

6. Umeritvena krivulja kot odvisnost vrednosti Ct od relativne koncentracije oreha v orehovi mešanici izražene kot log (% oreha)



7. Vrednosti Ct vzorcev živil določene s qPCR

OZNAKA VZORCA	Ime vzorca	Opis vzorca	Ct	% oreha

8. Komentirajte rezultate glede na namen vaje

STAFILOKOKNI ENTEROTOKSINI

NAMEN

V vzorcu živila določite stafilokokni enterotoksin A (SEA).

POTEK EKSPERIMENTALNEGA DELA

- V vzorcu živila določite bakterije vrste *Staphylococcus aureus*
- Vzporedno nacepite tipski sev bakterij vrste *S. aureus*, ki tvori SEA
- Izolirajte DNA iz kolonij bakterij vrste *S. aureus* dobljenih iz živila
- Izolirajte DNA iz kolonij tipskega seva bakterij vrste *S. aureus*
- Izvedite PCR za določitev bakterij vrste *S. aureus* (gen *femB*)
- Izvedite PCR za določitev SEA (gen *Sea*)

NAVODILA

1. Določitev bakterij vrste *S. aureus* s klasično mikrobiološko metodo ISO/DIS 6888 – 1 (1999) v živilu

Priprava živila: matična raztopina (MR) tako, da 10 g (ml) živila v vrečki za gnetilnik dodate 90 ml sterilne fiziološke raztopine (FR). Tako dobite prvo, 10x razredčitev vzorca ($R 10^{-1}$) in homogenizirate v gnetilniku (1 min, srednja hitrost). Nato naredite razredčitve MR tako, da 1 ml MR prenesete v 9 ml FR ($R 10^{-2}$) in homogenizirate, potem 1 ml $R 10^{-2}$ prenesete v 9 ml FR ($R 10^{-3}$) in homogenizirate. Postopek nadaljujte do razredčitve $R 10^{-7}$. Po 0,1 ml posamezne razredčitve prenesete na selektivno gojišče BP (Baird-Parker) za izolacijo koagulaza pozitivnih stafilokokov. Gojišča inkubirate 24-48 ur pri 37 °C in odčitajte rezultate.

Gojišče BP vsebuje pepton, goveji in kvasni ekstrakt kot vira dušikovih spojin, ogljika, žvepla, vitaminov in elementov v sledovih. Natrijev piruvat je dodan zato, da vzpodbudi rast bakterij vrste *S. aureus*. Dodan je tudi telurit, ki deluje toksično na druge stafilokoke, medtem ko kolonije bakterij vrste *S. aureus* obarva črno. V gojišču je tudi jajčni rumenjaki, ki ga bakterije vrste *S. aureus* s svojo lecitinazno aktivnostjo razgradijo. Glicin in litijev klorid sta dodana kot snovi z inhibitorno aktivnostjo proti drugim bakterijam.

Značilen izgled kolonij bakterij vrste *S. aureus* je črna svetleča barva, konveksna oblika, velikost 1-3 mm in okrog kolonij je prosojna in bela

cona. Koagulaza negativni stafilokoki so deloma inhibirani, lahko zrastejo kot rjave kolonije ali kot kolonije brez cone. Na gojišču BP lahko zrastejo tudi druge bakterije in zato je za identifikacijo bakterij vrste *S. aureus* potrebno pregledati mikroskopski razmaz pobarvan po Gramu in narediti biokemijske teste za identifikacijo. Kot alternativno metodo lahko uporabimo QPCR za določanje bakterij vrste *S. aureus*.

Po inkubaciji gojišč BP poleg izgleda kolonij, rezultate tudi kvantificirajte.

2. Tipski sev bakterij vrste *S. aureus*

Na gojišče BP precepitate tipski sev bakterij vrste *S. aureus* NCTC 10652, gojišče inkubirajte 24 do 48 ur pri 37 °C. Po inkubaciji določite in opišite izgled kolonij.

3. Izolacija DNA bakterij vrste *S. aureus* iz kolonij izoliranih iz vzorcev živila ter izolacija DNA tipskega seva *S. aureus*

Glede na rezultate izolacije bakterij vrste *S. aureus* iz vzorcev surovega mleka določite vzorce – kolonije za izolacijo DNA in jih označite. DNA izolirate tudi iz kolonije tipskega seva bakterij vrste *S. aureus*.

Potek izolacije DNA s kompletom PrepMan™ Ultra sample preparation reagent:

1. V 1,5 ml epruveto dodamo 500 µl H₂O_{KEM} in vanjo 1 kolonijo ter vsebino 30 s mešamo na vrtničnem mešalu
2. Vsebino centrifugiramo 3 min pri 13.000 x g, supernatant odstranimo
3. Dodamo 100 µl reagenta PrepMan ter vsebino 30 s mešamo na vrtničnem mešalu
4. Vzorec segrevamo 10 min v termo bloku pri 95 °C
5. Vsebino centrifugiramo 3 min pri 13.000 x g
6. Supernatant prenesemo v svežo 1,5 ml epruveto
7. Supernatant do uporabe hranimo pri 4 °C (do 1 meseca)

4. PCR za identifikacijo bakterij vrste *S. aureus*

Za identifikacijo bakterij vrste *S. aureus* določimo gen površinskega proteina *femB*.

4.1. Priprava reakcijske mešanice za določitev bakterij vrste *S. aureus* s qPCR

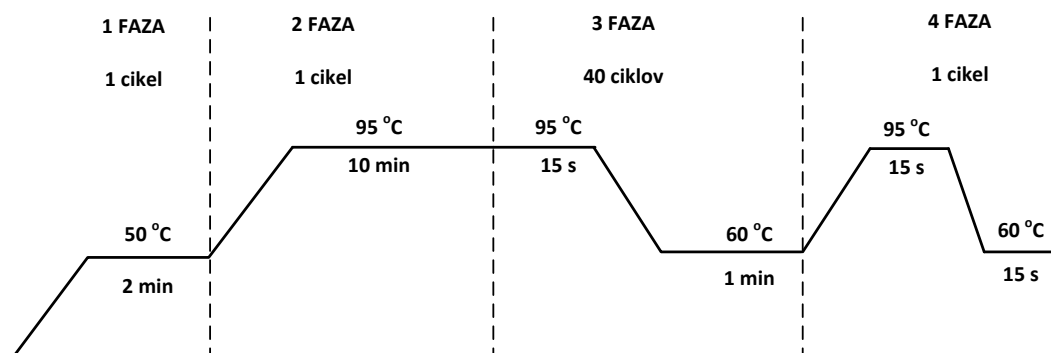
Reakcijsko mešanico pripravimo za vse vzorce skupaj – to je (N vzorcev živil + 1 pozitivna kontrola = tipski sev + 1 negativna kontrola = H₂O_{PCR} + 1 rezervni vzorec zaradi pipetiranja) x 2 (vsak vzorec naredimo v dveh paralelkah). V reakcijski mešanici je za 1 vzorec:

- Univerzalna mešanica (Power SybrGreen PCR master mix 2x): 12,5 µl
- par oligonukleotidnih začetnikov za *femB*:
 - *femB*-F: 0,75 µl (300 nmol)
 - *femB*-R: 0,75 µl (300 nmol)
- H₂O_{PCR}: izračunamo (skupen volumen je 25 µl, od tega je 2,5 µl DNA)

Reakcijsko mešanico razdelimo v PCR-epruvetke po 22,5 µl, Nato v reakcijske epruvetke v mešanico za PCR dodamo vzorce pripravljene DNA.

4.2 Izvedba qPCR za identifikacijo bakterij vrste *S. aureus*

PCR izvedemo s standardnim programov aparata za PCR ABI Prism 7500 in dodamo 4. fazo disociacije pomnožkov (slika 6).



Slika 6: Časovno-temperaturni program za določanje gena *femB* s qPCR

4.3 Vrednotenje rezultatov qPCR

Po zaključku encimske reakcije za vrednotenje rezultatov nastavimo sledeče parametre:

- meja zaznavanja: ročno nastavimo na vrednost 0,02
- izhodišče: avtomatska nastavitvev

zato, da lahko primerjamo rezultate različnih qPCR.

Nato za posamezen vzorec določimo vrednost Ct. Vrednost Ct pove, koliko ciklov je potrebnih, da aparatura zazna normaliziran fluorescentni signal (ΔRn), in pomeni, da se pri določenih razmerah fluorescenca vzorca poveča nad fluorescenco ozadja. Specifičnost pomnoževanja preverimo s temperaturo denaturacije pomnožkov. Hkrati preverimo tudi rezultate za pozitivno in negativno kontrolo pomnoževanja.

5. PCR za določitev SEA

Za določitev stafilokoknega enterotoksina A (SEA) izvedemo qPCR za določitev gena *Sea*. Vzorce izberemo glede na pozitivne rezultate določanja bakterij vrste *S. aureus* s qPCR za določitev gena *femB*.

5.1. Priprava reakcijske mešanice za določitev SEA

Reakcijsko mešanico pripravimo za vse izbrane vzorce skupaj (N vzorcev + 1 pozitivna kontrola = tipski sev + 1 negativna kontrola = H_2O_{PCR} + 1

rezervni vzorec) in jo nato razdelimo v reakcijske epruvetke. V reakcijski mešanici je za 1 vzorec:

- Univerzalna mešanica (Power SybrGreen PCR master mix 2x):
12,5 µl
- par oligonukleotidnih začetnikov za femB:
 - Sea-F: 0,75 µl (300 nM)
 - Sea-R: 0,75 µl (300 nM)
- H₂O_{PCR}: izračunamo (skupen volumen je 25 µl, od tega je 2,5 µl DNA)

K v reakcijske epruvetke razdeljeni mešanici za PCR dodamo v posamezno reakcijsko epruvetko vzorec DNA.

5.2 Izvedba qPCR za določitev SEA

PCR izvedemo s standardnim programov aparata za PCR ABI Prism 7500 in dodamo 4. fazo disociacije pomnožkov (slika 6).

5.3 Vrednotenje rezultatov qPCR

Rezultate vrednotimo kot je opisano pri točki 4.3.

DELOVNI ZVEZEK

IZVEDBA

Narišite shemo eksperimentalnega dela!

MATERIAL, POTEK DELA IN REZULTATI

1. Opišite vzorce živila

2. Izolacija in kvantifikacija bakterij vrste *S. aureus* iz živila – v spodnjo preglednico napišite rezultate

Oznaka vzorca	N (cfu/ml)	Makro-morfološke lastnosti
A		
B		
C		
D		
<i>S. aureus</i> NCTC 10652		

3. Izolacija DNA iz kolonij – vpišite oznake kolonij

Oznaka vzorca	Oznake izbranih kolonij
A	
B	
C	
D	
<i>S. aureus</i> NCTC 10652	

**4. Priprava reakcijske mešanice za qPCR za določitev bakterij
vrste *S. aureus* – opis vzorcev, število vzorcev, izračun**

5. Rezultati qPCR za določitev bakterij vrste *S. aureus*

Oznaka izbranih kolonij	Vrednost Ct	Tm (°C)	Identifikacija

6. Priprava reakcijske mešanice za qPCR za določitev SEA - opis vzorcev, število vzorcev, izračun

7. Rezultati qPCR za določitev SEA

Oznaka izbranih kolonij	Vrednost Ct	Tm (°C)	SEA

8. Komentirajte rezultate glede na namen vaje

OKOLJSKI ONESNAŽEVALCI

NAMEN

V vzorcu živila (na primer pitna voda, stekleničena voda, mineralna voda), čisti kemijski snovi ali mešanici (na primer rastlinski ekstrakt, eterično olje, konzervans) ocenite splošno toksičnost in nivo genotoksičnosti.

POTEK EKSPERIMENTALNEGA DELA

- Priprava čebulic
- Priprava kontrolnih raztopin
- Izpostavitve čebulic kontrolnim raztopinam in testnim vzorcem, inkubacija
- Priprava mikroskopskih preparatov
- Določitev mikromorfoloških lastnosti
- Določitev makromorfoloških lastnosti
- Vrednotenje rezultatov

NAVODILA

1. Priprava čebulic

Za izvedbo čebulnega testa (*Allium* test) potrebujemo za vsak vzorec vode 12 čebulic (*Allium cepa* L). Za negativno kontrolo (negativna kontrola pomeni, da ni toksičnega odziva) uporabimo 12 čebulic in enako 12 čebulic za pozitivno kontrolo (pozitivna kontrola pomeni, da je v določenem deležu poznan toksičen odziv); v vsaki seriji je lahko 20 % slabih čebulic in te zavržemo. Čebulice morajo biti enake velikosti (premera 1,5 do 2,0 cm), stare največ do 6 mesecev (hranjene pri 10 - 14 °C v suhem in zračnem prostoru z do 50 % RV). Čebulice, ki so presušene, plesnive ali imajo zelene poganjke, niso primerne za čebulni test. Čebulicam odstranimo zunanje luskoliste, rjavkast spodnji del in pazimo, da pri tem ne poškodujemo primordialnega koreninskega obroča. Kadar gre za večje število čebulic, jih do uporabe shranimo v čisti vodi.

2. Priprava kontrolnih raztopin

Kot negativno kontrolo uporabimo hranilno raztopino. Hranilna raztopina (Preglednica 1) je pitna voda z dodatkom hranil, ki kontrolni seriji čebulic omogočijo optimalno rast. Iz osnovne raztopine pripravimo hranilno raztopino in jo razdelimo v 12 epruvet. Osnovne raztopine pripravimo z destilirano vodo, nato hranilno raztopino pripravimo z razredčevanjem osnovnih raztopin z destilirano vodo. Če namesto hranilne raztopine uporabimo pitno vodo moramo preveriti, da ima nevtralen pH, je relativno trda voda ($\text{Ca} + \text{Mg}$: 50 -70 mg l^{-1}) in da ne vsebuje toksičnih snovi (na primer $\text{Cu}^{2+} < 0,05 \text{ mg l}^{-1}$). Vodo pred testom filtriramo preko filtra (0,2 μm). Če testiramo v vodi netopne kemijske spojine jih moramo raztopiti v ustreznem topilu (na primer etanol, metanol, aceton) in v takem primeru moramo preračunano vsebnost topila dodati tudi v hranilno raztopino. Paziti moramo, da končna vsebnost topila ne presega 1 % vol..

Preglednica 1: Sestavine hranilne raztopine

Hranilo	Koncentracija v osnovni raztopini	Koncentracija v hranilni raztopini
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1,0 mM	0,1 mM
KNO_3	2,0 mM	0,2 mM
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,0 mM	0,1 mM
KH_2PO_4	1,0 mM	0,1 mM
$\text{Fe-EDTA} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	0,2 mM	0,02 mM
Elementi v sledovih		
MnSO_4	3,64 μM	0,364 μM
CuCl_2	0,48 μM	0,048 μM
Na_2MoO_4	0,0078 μM	0,00078 μM
ZnSO_4	0,0042 μM	0,00042 μM
H_3BO_3	3,7 μM	0,37 μM

Kot pozitivno kontrolo uporabimo raztopino metil-metan sulfonata (MMS; Sigma M4016; 1 mg l^{-1} oz. 10 mg l^{-1}), ki spada med alkilirajoče snovi katere citotoksičen in /ali mutagen učinek je posledica predvsem metilacije DNA. Za vsak test uporabimo 12 epruvet z raztopino MMS in jim dodamo čebulice.

3. Izpostavitvev čebulic testnim vzorcem

Čebulice hitro in previdno osušimo na papirnati brisači in jih postavimo v epruvete, v katere smo dodali hranilno raztopino (negativna kontrola) – 12 epruvet, raztopino MMS (pozitivna kontrola) - 12 epruvet in v epruvete s testnimi vzorci – 12 epruvet tako, da se spodnji del čebulice dotika hranilne raztopine, raztopine MMS oziroma testnega vzorca. Inkubacija je do 6 dni pri sobni temperaturi (20 °C) tako, da so vzorci zaščiteni pred direktno sončno svetlobo.

4. Priprava mikroskopskih preparatov

Po 2 dneh inkubacije iz koreninic pripravimo mikroskopski preparat. Vzorčimo 5 čebulic (drugih 5 čebulic pustimo na nadaljnji inkubaciji) iz skupine negativne kontrole, 5 čebulic iz skupine pozitivne kontrole in 5 čebulic iz skupne testnega vzorca.

Postopek priprave mikroskopskega preparata:

- Fiksiranje: V Al-posodico (vsaka čebulica, svoja Al-posodica!) dodamo približno 0,5 ml raztopine za fiksiranje (9 vol. enote CH_3COOH (45 %) in 1 vol. enote 1 M HCl). Nato z ostrimi škarjami odrežemo 2 do 4 koreninske vršičke (do 2 mm) in jih takoj prenesemo v Al-posodico ter 10 min segrevamo v vodni kopeli pri 55 °C.
- Barvanje: Na objektno steklce dodamo barvilo orcein (2 % orcein v CH_3COOH (45 %)). Koreninske vršičke (brez fiksativa!) prenesemo v barvilo na objektnem steklcu in s skalpelom naredimo t.i. mečkanec. Preparat pokrijemo s krovnim steklcem, koščkom papirnate brisače in preparat previdno stisnemo, da razporedimo celice v eno ravnino. Odvečno barvilo popivnamo s papirnatimi brisačo. Če krovno steklce zalepimo lahko preparat hranimo 2 meseca pri 4 °C.

5. Določitev mikromorfoloških lastnosti

Mikroskopske preparate koreninic mikroskopiramo pri 400x (100x, 1000x) povečavi. Najprej pregledamo mikroskopske preparate kontrolnih čebulic (negativna kontrola, pozitivna kontrola) in nato preparate čebulic, ki so bile izpostavljene testnim vzorcem. Določimo:

- Mitotski indeks (MI, %): pregledamo 50 celic in določimo število delečih se celic. Nato izračunamo mitotski indeks:

$$MI = \frac{(\text{št. delečih se celic})}{\text{št. opazovanih celic (50)}} \times 100$$

- Če je MI vzorca veliko manjši ali veliko večji od MI negativne kontrole (NK), lahko ocenimo citotoksičnost (%):

$$\text{Ocena citotoksičnosti} = \frac{MI (\text{vzorec})}{MI (\text{negativna kontrola})}$$

- Na preparatih čebulic, ki so bile izpostavljene različnim vzorcem (negativna kontrola, pozitivna kontrola, testni vzorec) opazujemo spremembe na kromosomih (predvsem v anafazi in metafazi) ter zabeležimo število ter vrsto poškodb:
 - Pojav zlepljenosti kromosomov – indikator zelo toksičnega, največkrat ireverzibilnega delovanja, ki vodi v celično smrt
 - Klastogen učinek: je genotoksičen učinek na kromosome – pridobitev, preureditev ali izguba dela kromosoma (najbolje vidno v metafazi kot kromosomski fragmenti ali mostički) – je indikator mutagenega delovanja
 - Podaljšani in ločeni kromosomi

Glede na dobljene rezultate izračunamo odstotek poškodovanih celic in ocenimo raven genotoksičnosti.

$$\text{Ocena genotoksičnosti} = \frac{\text{št. poškodovanih celic (kromosomov)}}{\text{št. opazovanih celic}} \times 100$$

6. Določitev makromorfoloških lastnosti

Po 4-6 dneh inkubacije preostalim petim čebulicam izmerimo dolžino korenin in opišemo izgled korenin pri kontrolnih čebulicah in čebulicah, ki so bile izpostavljene testni snovi. Natančnejše je merjenje dolžine, če koreninice odrežemo in izmerimo, vendar je v tem primeru čebulica neuporabna za nadaljnjo inkubacijo. Glede na meritve izračunamo povprečno dolžino korenin vsak čebulice in delež dolžine glede na kontrolne čebulice. Pri izgledu korenin je pomembna predvsem barva, saj se le ta lahko spremeni na primer, če gre za odmrlo tkivo (močno

toksičen učinek) postanejo koreninice bolj ali manj rjavo obarvane ali če so v vodi ioni bakrovega sulfata so modro zelene barve.

S testom ANOVA primerjamo dolžine koreninic testih vzorcev in kontrolnih vzorcev in če je $p \leq 0,05$ lahko določimo nivo splošne toksičnosti:

Ocena splošne toksičnosti

$$= \frac{\text{povprečna dolžina koreninic pri vzorcu}}{\text{povprečna dolžina koreninic pri negativni kontroli}} \times 100$$

7. Modifikacije osnovne metode

Obnovljivost – reverzibilnost poškodb:

Za to izvedbo potrebujemo 20 čebulic, in s prvimi 10 postopamo kot je opisano od 1. do 6. Po štirih dnevih inkubacije zamenjamo tesno tekočino s hranilno raztopino pri petih čebulicah in nato zopet zamenjamo hranilno raztopino peti dan in šesti dan izmerimo dolžino koreninic. Če je bilo toksično delovanje v prvih štirih dneh reverzibilno, bodo imele te čebulice nove koreninice ali pa bodo daljše kot pri testnih čebulicah, ki so bile izpostavljene testni tekočini.

Tretiranje s kolcihinom

Za podrobnejše študije kromosomskih poškodb (lomov) namesto 10 čebulic testiramo 12-13 čebulic. Te dodatne 2 – 3 čebulice pred pripravo mikroskopskega preparata inkubiramo v 0,1 % raztopini kolcihina, naprej izvajamo preiskavo po točkah 1 – 6.

DELOVNI ZVEZEK

IZVEDBA

Narišite shemo eksperimentalnega dela!

MATERIAL, POTEK DELA IN REZULTATI

1. Opišite vzorec (izgled, priprava, število paralelk, oznake), ki mu določate splošno toksičnost in genotoksičnost

2. Opišite kontrolne vzorce (priprava, število paralelk, oznake)

Negativna kontrola (NK):

Pozitivna kontrola (PK):

3. Mikromorfološke lastnosti čebulic negativne kontrole – skice

Čas inkubacije:

Oznaka paralelke:

Povečava: 1000x

Profaza

Metafaza

Anafaza

Telofaza

Interfaza

4. Mikromorfološke lastnosti čebulic negativne kontrole

Čas inkubacije:

Oznaka paralelke:

Oznaka kontrolne čebulice	Število celic	Število delečih se celic			
	Inter-faza	Pro-faza	Meta-faza	Ana- faza	Telo-faza
NK1					
NK2					
NK3					
NK4					
NK5					

Izračun mitotskega indeksa (MI) za NK:

5. Mikromorfološke lastnosti čebulic pozitivne kontrole - skice

Čas inkubacije:

Oznaka paralelke:

Povečava: 1000x

Profaza

Metafaza

Anafaza

Telofaza

Interfaza

6. Mikromorfološke lastnosti čebulic pozitivne kontrole

Čas inkubacije:

Oznaka paralelke:

Oznaka kontrolne čebulice	Število celic	Število delečih se celic			
	Inter-faza	Pro-faza	Meta-faza	Ana- faza	Telo-faza
PK1					
PK2					
PK3					
PK4					
PK5					

Izračun mitotskega indeksa (MI) za PK:

7. Mikromorfološke lastnosti testnih (vzorca) čebulic - skice

Čas inkubacije:

Oznaka paralelke:

Povečava: 1000x

Profaza

Metafaza

Anafaza

Telofaza

Interfaza

8. Mikromorfološke lastnosti testnih čebulic

Čas inkubacije:

Oznaka paralelke:

Oznaka kontrolne čebulice	Število celic	Število delečih se celic			
	Inter-faza	Pro-faza	Meta-faza	Ana- faza	Telo-faza
VZ1					
VZ2					
VZ3					
VZ4					
VZ5					

Izračun mitotskega indeksa (MI) za VZ:

Ocena citotoksičnosti vzorca:

Ocena genotoksičnosti vzorca:

9. Makromorfološke lastnosti čebulic negativne kontrole

Čas inkubacije:

Oznaka čebulice	Dolžina koreninic (mm)	Opis koreninic
NK1		
NK2		
NK3		
NK4		
NK5		
Povprečje		

10. Makromorfološke lastnosti čebulic pozitivne kontrole

Čas inkubacije:

Oznaka čebulice	Dolžina koreninic (mm)	Opis koreninic
PK1		
PK2		
PK3		
PK4		
PK5		
Povprečje		

11. Makromorfološke lastnosti testnih čebulic

Čas inkubacije:

Oznaka čebulice	Dolžina koreninic (mm)	Opis koreninic
Povprečje		

12. Zbir rezultatov – splošna toksičnost– izračun s testom ANOVA

Čebulice	Povprečna dolžina koreninic	Splošna toksičnost
Negativna kontrola		/
Pozitivna kontrola		
Vzorec 1		
Vzorec 2		
Vzorec 3		
Vzorec 4		
Vzorec 5		

13. Zbir rezultatov – raven genotoksičnosti – izračun s testom ANOVA

Čebulice	Povprečno število delečih se celic		Raven ogroženosti – ocena tveganja (%)*
	Vseh	Poškodovanih	
Negativna kontrola			
Pozitivna kontrola			
Vzorec 1			
Vzorec 2			
Vzorec 3			
Vzorec 4			
Vzorec 5			

*Ocena tveganja: <2 %: /; 3-5 %: nizka; 6-11 %: srednja; 12-15 %: visoka; >16 %: kritična

14. Komentirajte rezultate glede na namen vaje

VIRI

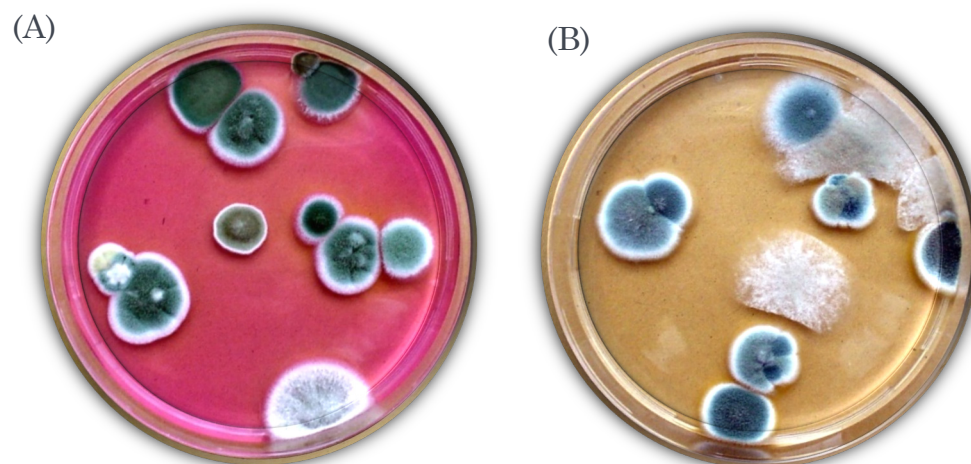
- Edwards, K. Logan, J., Saunders, N. 2004. Real-time PCR An Essential Guide. Horizon Bioscience, Wymondham. 239 str.
- Firbas P. 2013. Uporaba Allium metafaznega testa za določanje kakovosti okolja. Laboratorij za rastlinsko aplikativno citogenetiko. 5 str.
- Fiskesjo G. Allium test. 1995. V: *In vitro* Toxicity Testing Protocols. OHare S. in Atterwill C. K. (Ur.), New Jersey, Humana Press, 119-128
- International standard. ISO 6887-1. 1999. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination. Part 1, General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions. - 1st ed. - Geneva: International Organization for Standardization, 5 str.
- Jeršek, B., Poklar Ulrih, N., Skrt, M., Gavrič, N., Božin, B., Smole Možina, S. 2014. Effects of selected essential oils on the growth and production of ochratoxin A by *Penicillium verrucosum*. Arhiv za higijenu rada i toksikologiju, 65, 2, 199-208
- Jeršek, B. 2023. Mikrobiološka preiskava živil. Navodila in delovni zvezek za laboratorijske vaje. <https://repozitorij.uni-lj.si/IzpisGradiva.php?id=144953>
- Klančar, A. 2015. Ugotavljanje potvorb kozjih in ovčjih sirov s kravjim mlekom : magistrsko delo. Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, Ljubljana, Magistrsko delo magistrskega študija-2. stopnja Živilstvo, 19. http://www.digitalna-knjiznica.bf.uni-lj.si/zivilstvo/du2_klancar_ana.pdf, <https://repozitorij.uni-lj.si/IzpisGradiva.php?id=118780>
- Klančnik, A., Kovač, M., Toplak, N., Piskernik, S., Jeršek, B. 2012. PCR in food analysis. V: Hernandez-Rodrigues, P. (ur.), Ramirez Gomez, A. P. (ur.). Polymerase chain reaction. Rijeka: Intech, cop., str. 195-220
- Kuchta, T., Drahovska, H., Pangallo, D., Siekel, P. 2006. Application of polymerase chain reaction to food analysis. Bratislava, Vyskumny ustav potravinarsky, 107 str.
- Sampson, H. A., Simon, R. A. 2008. Food allergy : adverse reactions to foods and food additives. 4th ed., Malden (Mass.): Blackwell Publishing, 613 str.
- Slovenski standard. SIST EN ISO 6888-1:1999, Mikrobiologija živil in krme - Horizontalna metoda štetja koagulaza pozitivnih stafilokokov (*Staphylococcus aureus* in drugih vrst) - 1. del: Tehnika uporabe Baird - Parkerjevega agarja (ISO 6888-1:1999), Ljubljana, Slovenski inštitut za standardizacijo, 1999, 11 str.
- Pitt, J.I., Hocking, A. D. 1985. Fungi and food spoilage. 1st ed. London [etc.] : Blackie Academic & Professional, cop. 1997. 445 str.
- Ribič, U., Polak, T., Lušnic Polak, M., Klančnik, A., Jeršek, B. 2020 Adaptation response mechanisms of *Staphylococcus epidermidis* strains exposed to

- increasing concentrations of didecyldimethylammonium chloride. Microbial drug resistance. 2020, 26, 6, str. 583-593. DOI: 10.1089/mdr.2019.0064
- Samson, R. A., Hoekstra, E. S., Frisvad, J. C., Filtenborg, O. 2000. Introduction to food- and airborne fungi. 6th ed., Utrecht, Centraalbureau voor Schimmelcultures, cop., 389 str.
- Terpin P. 2010. Določanje oreha kot alergena v živilih s PCR v realnem času: diplomsko delo, univerzitetni študij. Biotehniška fakulteta, Ljubljana, 66 str.
- Trnčíkova, T., Piskernik, S., Kacčíkova, E., Smole Možina, S., Kuchta, T., Jeršek, B. 2010. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from food produced in Slovakia and Slovenia with regard to the presence of genes encoding for enterotoxins. Journal of food and nutrition research. 49, 4, 215-220.
- Zahija I., Jeršek B., Demšar L., Lušnic Polak M., Polak T. 2023. Production of aflatoxin B1 by *Aspergillus parasiticus* grown on a novel meat-based media. Toxins, 15: 25, <https://doi.org/10.3390/toxins15010025>
- Zahija Jazbec I., Demšar L., Jeršek B., Polak T. 2024. Meat starter culture reduces *Aspergillus parasiticus* production of aflatoxins on meat-based and salami model media. Toxins, 16: 173, <https://doi.org/10.3390/toxins16040173>

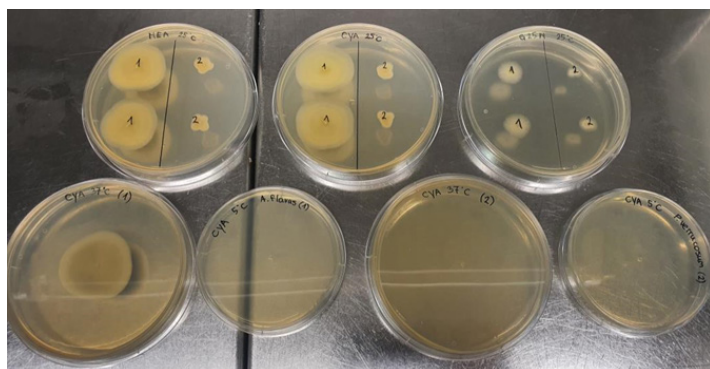
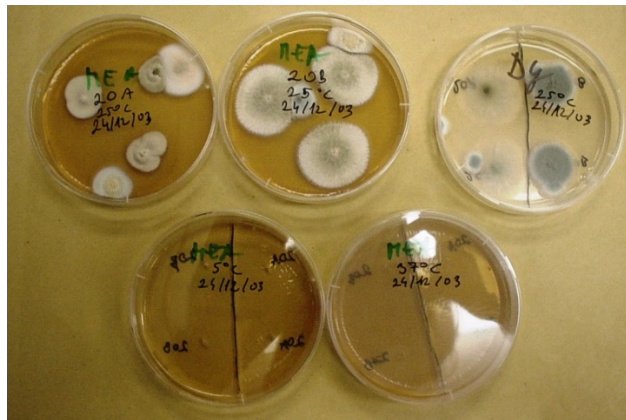
PRILOGA

MIKOTOKSINI

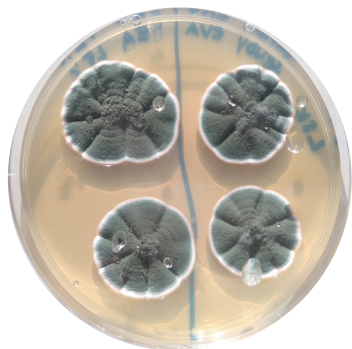
Priloga 1: Izolacija plesni na gojišču DRBC (A) in gojišču DG18 (B)



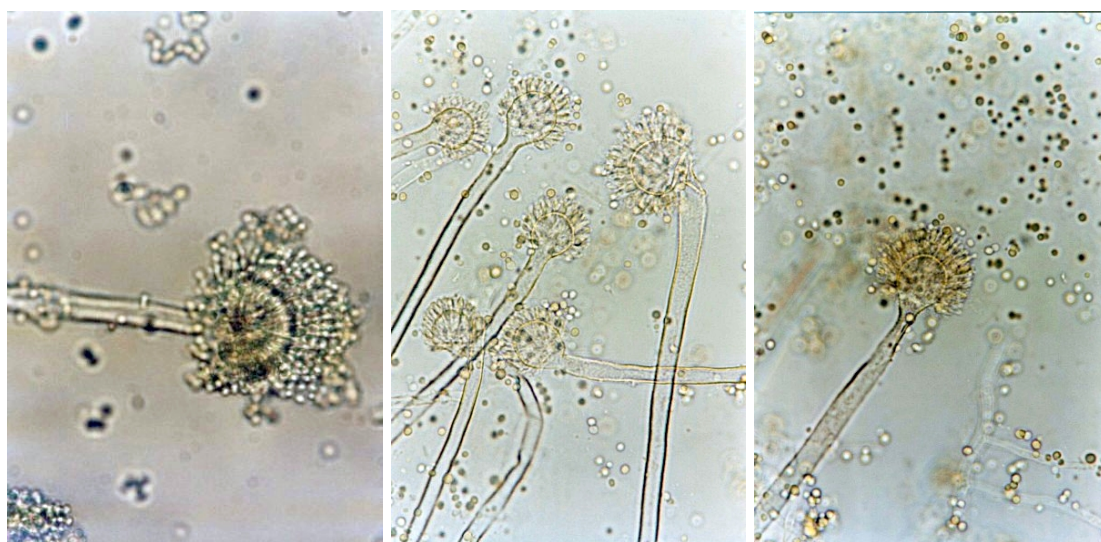
Priloga 2: Primera identifikacije plesni po Pitt in Hocking (1985)



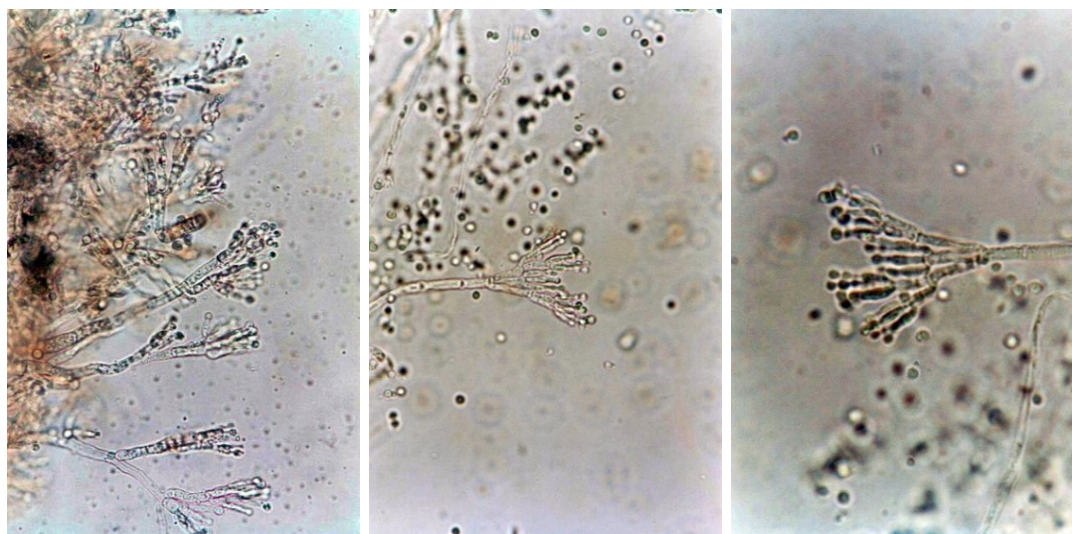
Priloga 3: Eksudat na koloniji plesni viden s prostim očesom



Priloga 4: Plesni rodu *Aspergillus* (400x povečava)

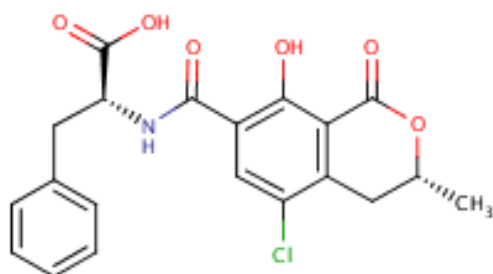


Priloga 5: Plesni rodu *Penicillium* (400x povečava)

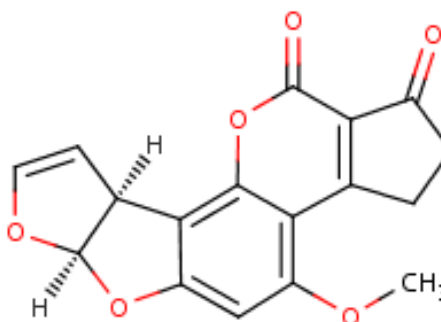


Priloga 6: Ohratoksin A (OTA) in aflatoksin B1 (AFB1)

OTA

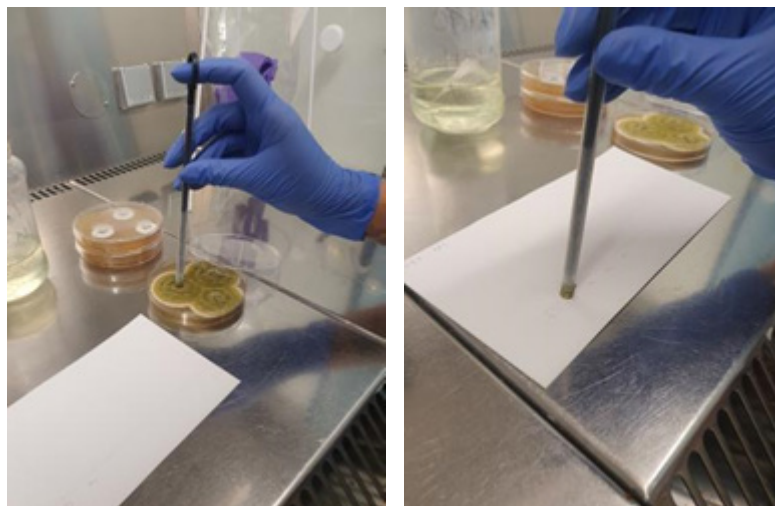


AFB1

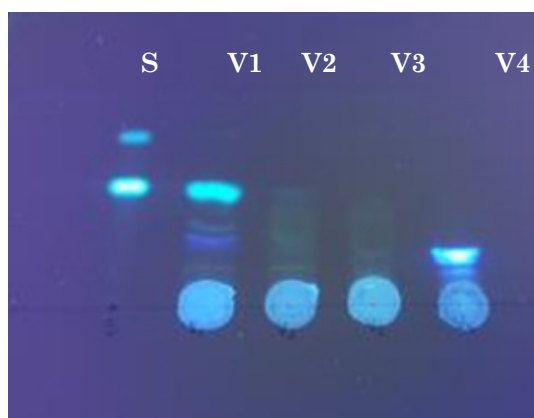


(<http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/a?dbs+hsdb:@term+@DOCNO+4305>;
<http://toxnet.nlm.nih.gov/cpdb/chempages/AFLATOXIN%20B1.html>)

Priloga 7: Nanos vzorcev plesni na ploščo za TLC



Priloga 8: TLC-plošča za določanje AFB1 osvetljena z UV-svetlobo



Legenda: S: standard AFB1 (1 µg/ml), V1- V4: vzorci plesni

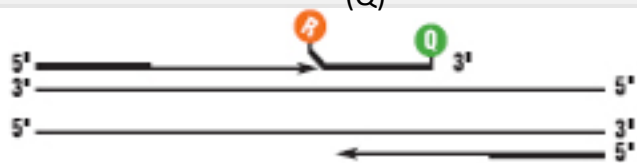
ALERGENI

Priloga 9: Princip določitve pomnožkov pri qPCR s specifično sondo

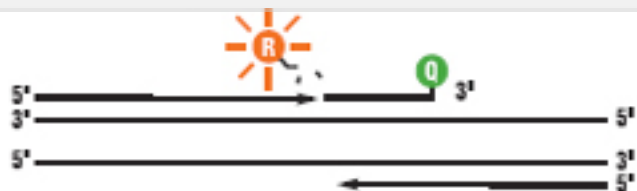
Določitev pomnožkov s TaqMan-sondo:



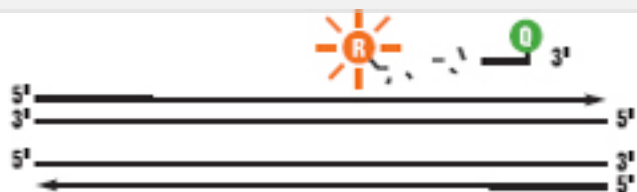
1. Prileganje začetnih oligonukleotidnih začetnikov in sonde, ki ima vezana reportersko (R) in zaviralno barvilo (Q)



2. Podaljševanje oligonukleotidnih začetnikov in eksonukleazna aktivnost *Taq*-polimeraze



3. Sprostitev reporterskega barvila - fluorescenca



<http://www.lifetechnologies.com/si/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/qpcr-education/taqman-assays-vs-sybr-green-dye-for-qpcr.html>

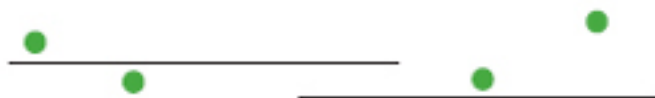
STAFILOKOKNI ENTEROTOKSINI

Priloga 10: Princip določitve pomnožkov pri qPCR z nespecifično metodo

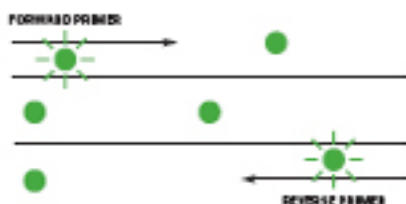
Določitev pomnožkov s fluorescentnim barvilom
SybrGreen:



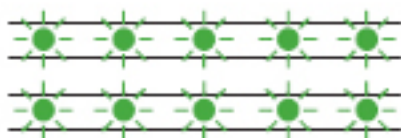
Barvilo SyberGreen ne fluorescira kadar ni vezano v
dvovijačni DNA



Podaljševanje oligonukleotidnih začetnikov in vezava
barvila SyberGreen v dvovijačno DNA



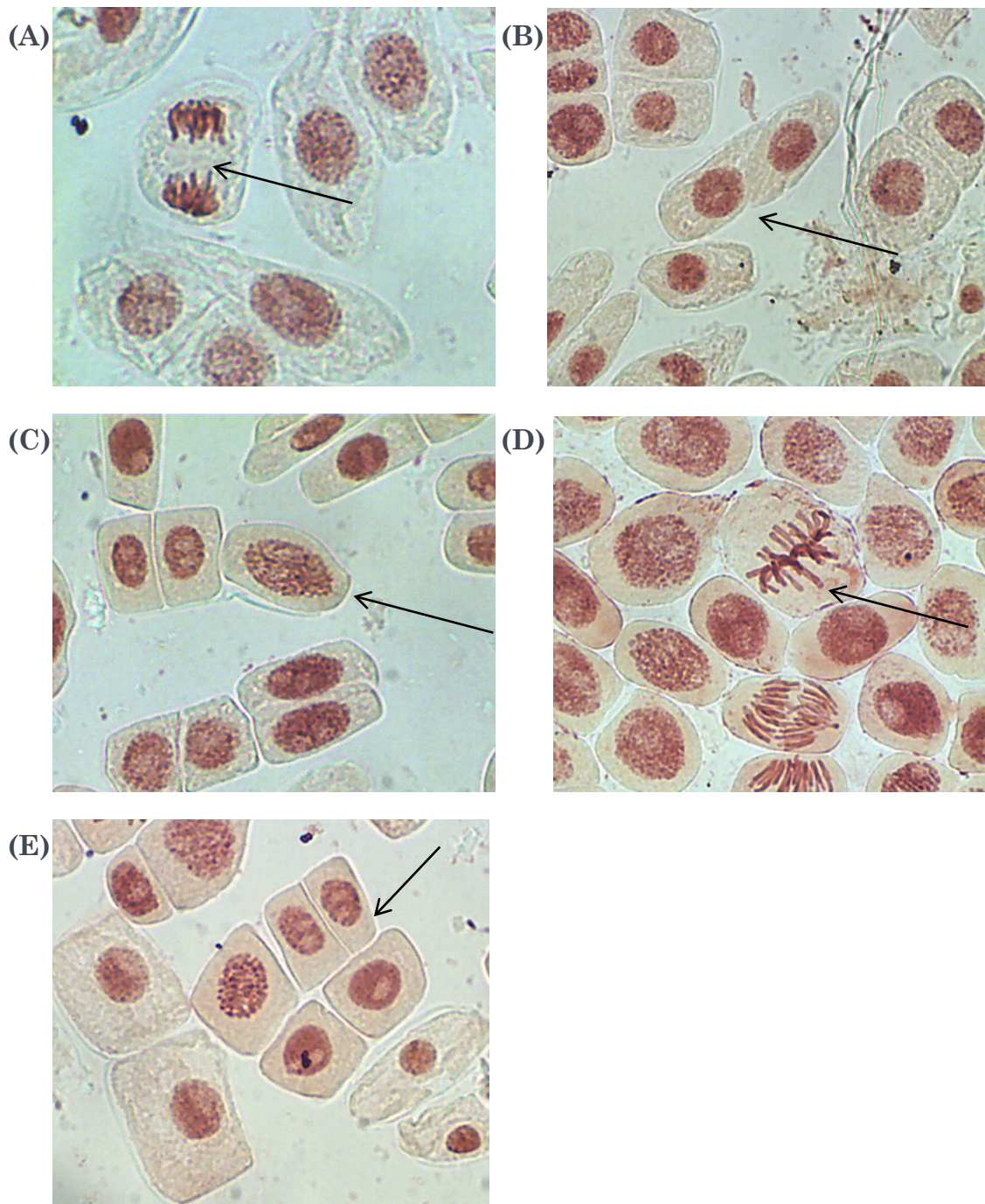
Vezava barvila SybrGreen v pomožke - fluorescenca



<http://www.lifetechnologies.com/si/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/qpcr-education/taqman-assays-vs-sybr-green-dye-for-qpcr.html>

OKOLJSKI ONESNAŽEVALCI

Priloga 11: Mikroskopske slike čebulnih celic: (A) anafaza, (B) telofaza, (C) profaza, (D) metafaza, (E) interfaza



Priloga 12: Mikroskopske slike čebulnih celic z različnimi poškodbami v metafazi in anafazi

(A) nepravilna metafaza z nepravilno razporejenimi kromosomi in lomi, (B) podaljšani metafazni kromosomi, (C) anafazni mikromostički, (D) anafazni mostički, (E) lomi kromosomov, (F) nepravilna razvrstitev, zlepljenost kromosomov

