

Forsøgsvejledning- Dyrkning af svampe fra ost

Svampe laver din ost

Forord

Velkommen til øvelsen *Dyrkning af svampe fra ost* der hører til undervisningsmaterialet *Svampe laver din ost*. Øvelsen er udarbejdet af Julie Mahler Nilsson med uundværlig hjælp fra lektor Kristian Fog Nielsen og lektor Thomas Ostenfeld Larsen begge fra DTU Systembiologi. Der skal desuden lyde en tak til Arla Foods, med hvem Biotech Academy har samarbejdet om dette materiale.

Introduktion

Som I kan læse i undervisningsmaterialet "Svampe laver din ost", er det yderst vigtigt for osteproducenten Arla Foods, at der ikke er kontaminanter på de oste, der sælges i butikkerne. I skal derfor undersøge, hvilke svampe I kan finde på en ganske almindelig blåskimmelost. Det skal gøres ved at vokse dem i petriskåle og derefter undersøge deres farve, størrelse og sporer.

Der er forskel på, hvor godt svampe vokser på forskellige medier. Derfor skal I prøve at dyrke svampene på to forskellige medier, og finde ud af, om svampene gror bedre på det ene end på det andet, og hvorfor.

Hvis du har spørgsmål af enhver art til øvelsen, er du meget velkommen til at kontakte forfatteren ved at sende en mail på biotech@bio.dtu.dk. Så vil vi hurtigst muligt forsøge at hjælpe bedst muligt.

Rigtig god fornøjelse!

Formål

Formålet med forsøget er:

- at undersøge hvilke svampe der findes på en blåskimmelost gennem undersøgelse af svampenes udseende
- dyrkning af svampene på forskellige medier, og bestemmelse af grunden til en eventuel forskel i vækst.

Vækstmedie

Til forsøget skal bruges CYA og YES medie, opskrifterne kan ses her nedenfor, bestanddelene blandes og autoklaveres eller gives et kraftigt opkog i mikroovnen, hvorefter det hældes i petriskåle:

Yeast extract - sucrose agar YES

Yeast extract..... 20.0 g [DIFCO, 0127-01-7]
Sucrose..... 150 g [BDH, 10274]
MgSO₄·7H₂O..... 0.50 g [MERCK, 5886]
Agar..... 20.0 g [Bie & Berntsen, BBB 10030, SO-BI-Gel, Agar-Agar]
Spor metaller..... 1.0 ml
Destilleret vand..... 885 ml
Reguler pH til 6.5 ± 0.1

Czapek yeast extract agar CYA

Yeast extract..... 5.0 g [DIFCO, 0127-01-7]
Czapek Dox Broth (se nedenfor)..... 35.0 g [DIFCO, 0338-01-2]
Agar..... 15.0 g [Bie & Berntsen, BBB 10030, SO-BI-Gel, Agar-Agar]
Spor metaller..... 1.0 ml
Destilleret vand..... 1000 ml

Czapek dox broth (til 1L)

Sucrose..... 30.0 g [BDH, 10274]
NaNO₃..... 3.0 g [MERCK, 6537]
K₂HPO₄..... 1.0 g [MERCK, 5099]
KCl..... 0.50 g [MERCK, 4936]
MgSO₄·7H₂O..... 0.50 g [MERCK, 5886]
FeSO₄·7H₂O 0.010 g [MERCK, 3965]

NB! Spormetaller:

Vi kommer altid 1 ml spormetalopløsning i vores medier, så svampene udvikler sig normalt. Dette gør vi fordi man ofte bruger dobbeltdestilleret vand. Derfor tilsættes lidt kobbersulfat og zinksulfat. Det var ikke nødvendigt i gamle dage, da man brugte vand med kobber- og zink-ioner i pga. brugen af kobberrør og forzinkede rør i vandledningssystemet. Svampe har brug for bl.a. kobber ioner for at katalysere polymeriseringen af 1,8-dihydroxynaphthol til melanin, der er det grønne pigment, der beskytter sporerne mod UV lys.

Spormetallerne er som følger:

I 100 ml vand opløses 0.5 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ og 1 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Af denne opløsning bruge 1 ml til hver liter agar medium.

Indkøbes af underviseren

Blåskimmeloste, én pr. 4 hold

Andet laboratorieudstyr

Bægerglas

Bunsenbrænder

Mikroskop

Ethanol

Sikkerhedskrav

Almindelige laboratoriesikkerhedsregler.

Observér følgende Risiko/Sikkerhedssætninger for de anvendte kemikalier:**Ethanol**

R11: Meget brandfarlig

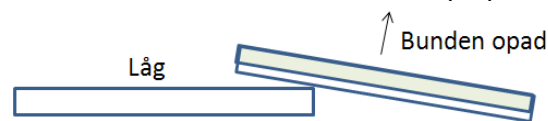
S7: Emballagen skal holdes lukket

S16: Holdes væk fra antændelseskilder - Rygning forbudt

GENERELT OM MIKROBIOLOGISKE TEKNIKKER

Når man arbejder med svampe, er det vigtigt at arbejde sterilt, da der ellers kan komme uønskede svampe og bakterier på pladerne. Alt udstyr (pipetter, pudenåle, agarplader mm.) skal derfor holdes væk fra andre bakterie- og svampekilder. Pladerne skal opbevares i lukkede poser, og man skal kun røre på steder, der ikke kommer i kontakt med anvendte svampe og medier.

Før man benytter agarplader er det vigtigt, at de er tørre. Alle agarplader skal derfor sættes ind i et varmeskab (30 °C) i 20-30 minutter inden brug. Pladerne sættes med bunden opad på skrå hen over låget, så bakterier i luften ikke falder ned på pladen.



Pladerne stilles ved 30 °C i 20-30 minutter før brug

Når pladerne inkuberes, er det vigtigt, at de stilles med bunden i vejret, så eventuel kondensvand ikke løber ned på agaren.

HUSK at skrive navn og dato på alle anvendte glas, plader mm. På pladerne skrives der langs kanten på bunden, da lågene kan byttes om.

Det er vigtigt ikke at indtage mad og drikkevarer, når der arbejdes med bakterierne. Husk at vaske hænder grundigt med sæbe, inden I starter. Sprit bordet af, og sørg for kun at have de ting fremme, som I skal bruge.

Alle laboratorietimer afsluttes med at I vasker hænderne grundigt med sæbe.

Fremgangsmåde

Dyrkning af svampe (Dag 1)

Materialer

- 1 petriskål med Yeast Extract Sucrose agar medie (YES)
- 1 petriskål med Czapek Yeast extract Agar medie (CYA)
- 1 mikroperforeret pose til opbevaring af de podede petriskåle
- 2 sterile podenåle
- 1 blåskimmelost
- 1 bægerglas
- Ethanol
- Bunsenbrænder

Forberedelse:

Sprit såvel jeres arbejdsplads som jeres fingre grundigt af med ethanol. Fyld et bægerglas med ethanol, og tænd bunsenbrænderen. **Bunsenbrænderen må under ingen omstændigheder komme for tæt på bægerglasset med ethanol!!**

En almindelig kniv steriliseres ved først at dyppe den i ethanol, og herefter holde den kortvarigt ind i flammen. Lad den køle af. Osten skæres igennem med kniven, således at I får adgang til svampe både på ydersiden af osten og indeni. Sørg for hele tiden at arbejde lige ved siden af bunsenbrænderen, da dette forhindrer bakterier og andre kontaminanter i at falde ned på det, I arbejder med.

Fremgangsmåde:

1. Podenålen tages ud af den sterile pose, og med spidsen af denne tages en lille prøve af svampen på osten. Undgå så vidt muligt at få ostemasse på nålen.
2. Tag den første petriskål med YES-medie hen til bunsenbrænderen, og åben den lige ved siden af bunsenbrænderen. Stik podenålen ned i mediet tre steder, og sæt igen låget på petriskålen.
3. Marker petriskålen i bunden med holdnavn/nummer, samt prøves nummer. Notér samtidig på et stykke papir, hvordan svampen så ud, og hvor i osten den befandt sig. Sæt petriskålen til at vokse ved 30 °C i en uge, pakket ind i en mikroperforeret pose.
4. Gentag pkt. 1-3 med en ny podenål på samme sted i osten, men nu benyttes CYA-mediet.

Punkterne 1-4 gentages et nyt sted på osten, hvor I mener at kunne se en anden svamp eller ved at skrabe podenålen lidt hen over ostens overflade, i håb om at fange en kontaminant-svamp.

Resultbehandling (Dag 2)

Tag svampene ud af varmeskabet, og læg dem ud på bordet – behold låget på! Notér i nedenstående skema svampenes farve og diameter.

Svamp 1	Podning 1			Podning 2			Podning 3			
	Medie	Farve	Diameter	Sporetype	Farve	Diameter	Sporetype	Farve	Diameter	Sporetype
CYA										
YES										
Svamp 2	Podning 1			Podning 2			Podning 3			
	Medie	Farve	Diameter	Sporetype	Farve	Diameter	Sporetype	Farve	Diameter	Sporetype
CYA										
YES										

Tag en smule af svampen over på glaspladen til mikroskopet, og kig på svampen i mikroskopet. Notér i skemaet ovenfor, hvordan svampens sporer ser ud – er de runde, ovale, aflange eller noget helt fjerde?

Når du har noteret alle disse ting, går du ind på www.biotechacademy.dk under øvelsen til *Svampe laver din ost*, hvor du finder en oversigt over svampe og deres udseende og størrelse. Her kan du sammenligne med de noterede karakteristika, og identificere, hvilke svampe du har isoleret fra osten. Vær opmærksom på, at diameteren på jeres svampe godt kan variere fra de opgivne, da svampen vokser mere eller mindre, afhængig af hvor god jeres podning har været.

Spørgsmål I kan overveje til jeres rapport:

- Vokser svampen bedre på det ene medie end på det andet? Hvis ja, hvorfor? På www.biotechacademy.dk under øvelsen til *Svampe laver din ost* kan I se hvad medierne er lavet af.
- Har svampen samme farve over det hele? Hvorfor/hvorfor ikke?
- Hvilke fejlkilder er der ved at vokse svampen frem på denne måde?
- Kan I finde på bedre metoder til at identificere svampe, end ved at kigge på deres udseende?

RAPPORTVEJLEDNING

Opbygning af rapporten

- Formål med øvelsen
- Kort teori
- Resultaterne fra jeres analyser
- Behandling af resultaterne som angivet ovenfor (sammenligning med andre analyseresultater)
- Diskussion af ovenstående spørgsmål
- Kort konklusion