

Ekološke analize in monitoring

Praktični pouk iz bioloških analiz za program naravovarstveni tehnik



Naslov: Ekološke analize in monitoring

Podnaslov: Praktični pouk iz bioloških analiz za program naravovarstveni tehnik

Avtorice: Alenka Sedlar Špehar, Mateja Okleščen, Alenka Mavrič Čefarin, Urška Kleč, Natalija Horvat, Marija Drešček

Besedilo je uredila: Natalija Horvat

Strokovni pregled: Mojca Strgar, Rozalka Mohorič

Jezikovni pregled: Center RS za poklicno izobraževanje

Slike: Alenka Sedlar Špehar, Alenka Mavrič-Čefarin, Urška Kleč, splet

Oblikovanje: Silveco d.o.o.

Založnik: Center RS za poklicno izobraževanje

Elektronska izdaja

Ljubljana 2024

Publikacija je v elektronski obliki dostopna na spletni strani Centra RS za poklicno izobraževanje www.cpi.si

Nosilec avtorskih pravic: Center RS za poklicno izobraževanje

Delovni zvezek je nastal v okviru izvajanja ukrepa Podnebni cilji v vzgoji in izobraževanju, ki ga financira Ministrstvo za okolje, podnebje in energijo, s sredstvi Sklada za podnebne spremembe.

Publikacija je brezplačna.

CIP

COBISS ID 184174595

Kataložni zapis o publikaciji (CIP) pripravili v Narodni in univerzitetni knjižnici v Ljubljani

COBISS.SI-ID 184174595

ISBN 978-961-7139-41-9 (PDF)

KAZALO VSEBINE

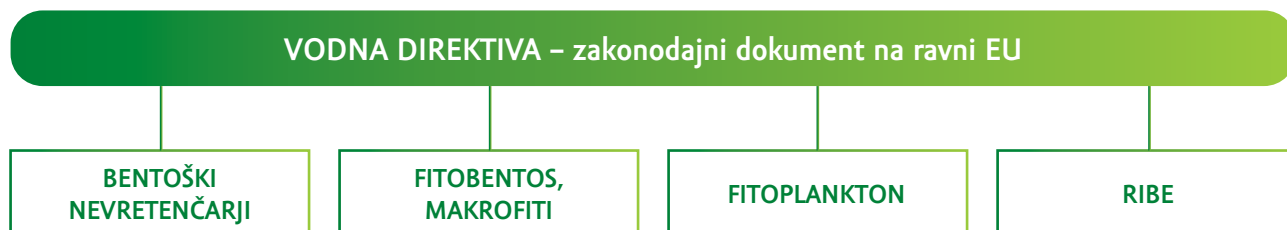
1	UVOD	5
2	MIKROBIOLOŠKI KAZALNIKI	6
2.1	Priprava laboratorijskega inventarja	9
	Sterilizacija laboratorijskega inventarja.....	9
2.2	Priprava hranilnih podlag za mikroorganizme	10
	Priprava različnih gojišč.....	11
2.3	Bris z različnih površin	15
	Bris z različnih površin	17
2.4	Razmaz do posameznih kolonij	19
	Razmaz do posameznih kolonij.....	20
2.5	Določevanje celokupnega števila mikroorganizmov iz vodnih vzorcev	22
	Določevanje celokupnega števila mikroorganizmov iz vodnih vzorcev.....	23
2.6	Določevanje koliformnih organizmov	26
	Določevanje koliformnih organizmov	27
2.7	Določevanje prisotnosti E. coli	28
	Določevanje prisotnosti E. coli.....	29
2.8	Določevanje mikrobiološke kvalitete zraka	31
	Določevanje mikrobiološke kvalitete zraka.....	32
2.9	Izolacija gliv iz tal	33
	Izolacija gliv iz tal	34
3	RASTLINSKI KAZALNIKI	36
3.1	Vzorčenje onesnaženosti zraka preko epifitskih lišajev	36
	Določanje indeksa zračne čistosti (Index of Atmospheric Purity – IAP).....	38
3.2	Vzorčenje fitobentosa	42
	Določanje ekološkega stanja vodotoka s kremenastimi algami.....	42
3.3	Vzorčenje makrofitov	44
	Določanje ekološkega stanja vodotoka z makrofiti.....	45
3.4	Vzorčenje višje razvitih rastlin	49
	Določevanje biotske pestrosti na travnikih.....	49
	Določevanje pokrovnosti posameznih vrst na izbrani površini	55
	Določevanje gostote posameznih vrst.....	59
3.5	Vzorčenje gozda	61
	Popis osnovnih podatkov vzorčnega mesta gozdne inventure.....	62
	Popis znakov, ki so vezani na odmrlo maso	66

4 ŽIVALSKI KAZALNIKI	69
4.1 Spremljanje stanja ptic okoli nas	69
Spremljanje stanja ptic okoli nas.....	69
4.2 Vzorčenje dvoživk.....	72
Analiza mresta	74
Analiza juvenilnih in odraslih dvoživk.....	77
4.3 Vzorčenje bentoških nevretenčarjev	80
Vzorčenje bentoških nevretenčarjev z mrežo	80
Vzorčenje bentoških nevretenčarjev s pastmi	85
4.4 Vzorčenje talne favne	87
Vzorčenje talne favne	87
Določevanje talne favne v substratu z lijakom.....	90
5 TUJERODNE VRSTE	93
Popis tujerodnih vrst	94
5.1 Herbarij.....	96
Izdelava herbarija	96
6 LITERATURA	98
7 PRILOGE.....	99
8 VIRI SLIK	101

1 UVOD

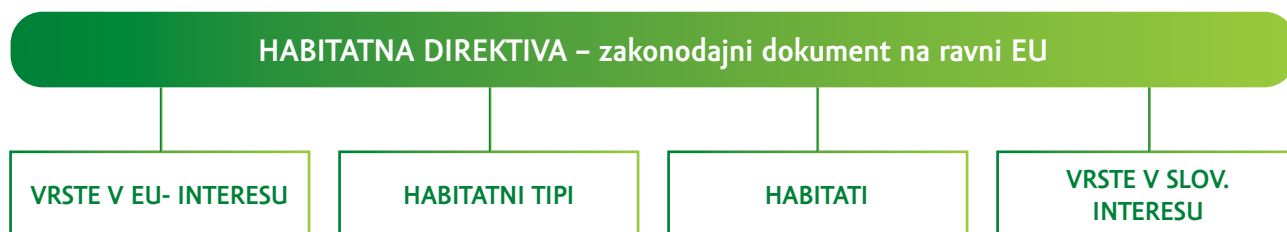
Ekološki kazalniki kvalitete okolja nam podajo zanimive informacije o tem, kako močno vplivamo na okolje. Ta vpliv je pogosto uničujoč. Z monitoringom lahko izboljšamo stanje v okolju.

Najbolj proučevan sistem je vodni sistem. Ščiti ga Direktiva o določitvi okvira za ukrepe Skupnosti na področju vodne politike – na kratko Vodna direktiva, ki narekuje izvajanje biološkega monitoringa.



Slika 1: Spremljanje bioloških parametrov po Vodni direktivi

Kopenske ekosisteme varujemo s pravnimi akti. Eden takih je Direktiva o varovanju habitatov ter prosto živečih živalskih in rastlinskih vrst – na kratko Habitatna direktiva.



Slika 2: Spremljanje stanja organizmov in habitatov na račun Habitatne direktive

2 MIKROBIOLOŠKI KAZALNIKI

V mikrobiološkem laboratoriju delamo z živimi organizmi ali z njihovimi produkti. Zato moramo ravnati tako, da **zaščitimo sebe, druge in okolje**. Temu rečemo varnostni ukrepi. Ukrepi so odvisni od rokovanja s kužnimi povzročitelji bolezni.

Tabela 1: Razvrstitev kužnih povzročiteljev bolezni po stopnjah nevarnosti, ki ga je razpisala Evropska skupnost

Stopnja nevarnosti	Opis mikroorganizmov, s katerimi rokujemo	Primer mikroorganizmov
1	Mikroorganizmi ne povzročajo bolezni pri človeku.	Laktobacili
2	Mikroorganizmi povzročajo bolezen pri človeku, zato rokovanje z njimi lahko predstavlja nevarnost. Širjenje v okolje pa ni nevarno, saj obstajata učinkovita preventiva in zdravljenje.	E. coli
3	Mikroorganizmi povzročajo hudo bolezensko stanje pri človeku. Možno je širjenje v okolje. Običajno obstajata preventiva in zdravljenje.	Salmonela
4	Mikroorganizmi povzročajo hudo bolezensko stanje, rokovanje z njimi predstavlja resno nevarnost za delavca. Učinkovitega zdravljenja še ni.	Brucella

Pri svojem delu se moramo držati principa biološke varnosti. Tako pred začetkom dela najprej preverimo, ali smo ustrezno zaščiteni.

Tabela 2: Bariere biološke varnosti

Primarna bariera	Obvezna uporaba osebne zaščitne opreme: - oprana in zlikana bela halja - speti lasje - po potrebi zaščita za oči, obraz ali roke - uporaba varnostne komore (npr. laminarij)
Sekundarna bariera	Izvajanje dela v posebnem laboratoriju, ki je ločen od ostalega dela stavbe tako, da ne prihaja do izmenjave zraka. Poskrbimo za čisto in pospravljeno delovno površino. Uporabljamo le robustno pohištvo.
Terciarna bariera	Zgradba mora imeti ustrezno ventilacijo preko prezračevalnega filtra.

Šele ko smo prepričani, da smo poskrbeli za varnost, lahko začnemo z delom. Ker se med delom lahko pripetijo nesreče, postopamo po naslednjem protokolu.

1. Takoj obvestimo vodjo laboratorija in svoje sodelavce.
2. Razlito mikrobno kulturo polijemo z razkužilom, pokrijemo z robčkom in po 30 min delovanja odvržemo vse v varni zabojnik.
3. Kontaminirano mesto očistimo in razkužimo.
4. Umijemo si roke in nadaljujemo z delom.

V primeru, da nam mikrobna kultura brizgne v oko, temeljito speremo. Če se zbodemo ali urežemo, pustimo, da kri kratek čas teče, nato umijemo rano z milom, razkužimo z etanolom in sterilno obvežemo. **O incidentu vedno napišemo zapisnik.**

Delo v mikrobiološkem laboratoriju zahteva **aseptično tehniko**. Vse mikrobiološke preiskave, od odvzema vzorca in do končne identifikacije mikrobov, morajo biti opravljene aseptično.

To pomeni, da s kužnino ali kulturami mikroorganizmov delamo tako, da:

- onemogočimo dostop nezaželenim mikroorganizmom, ki bi kontaminirali naše kulture in zaradi katerih bi bili rezultati poskusov napačni;
- pazimo, da mikroorganizmov ne razširjamo, kajti utegnili bi okužiti sebe ali druge.

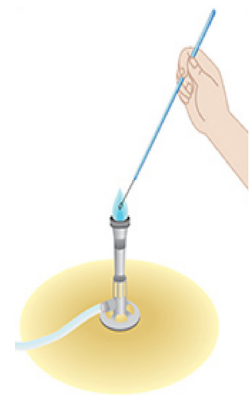
Material, ki ga uporabljamo pri mikrobiološkem delu, mora biti steril. To pomeni, da moramo odstraniti vse vegetativne in žive oblike celic. To lahko naredimo na več načinov, odvisno od lastnosti materialov.

NAČINI STERILIZACIJE

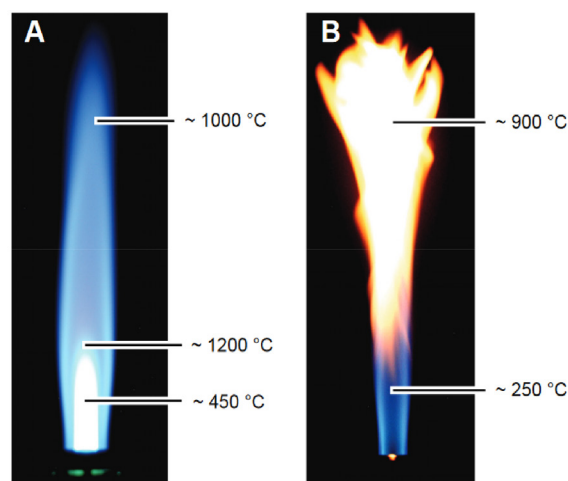
• Toplotna sterilizacija

Gre za proces, kjer s pomočjo povišane temperature uničimo celice in spore. Zelo primerna je za stekleni in kovinski material. Poznamo več postopkov.

- » **Vlažna sterilizacija** poteka v avtoklavu, kjer z vodno paro pod pritiskom 1,2 atm pri 121 °C za 15-20 min uničimo vse mikroorganizme.
- » **Suha sterilizacija** poteka v sterilizatorju pri 160 °C za 3 ure ali pri 170°C za 2 uri ali pri 180 °C za 1 uro.
- » **Tindalizacija** je tridnevni postopek, kjer material zapremo v ekonom loncu in vsebino 3-krat segrevamo 30 min pri 100 °C s 24-urnim presledkom.
- » **Obžiganje** cepilnih zank do zažaritve pred uporabo skrajša postopek sterilizacije. Včasih spatulo namočimo v etanol in nato potegnemo skozi plamen, da zgorejo razkužilo in celice.



Slika 3: Aseptično delo običajno poteka ob gorilniku znotraj rumenega območja¹



Slika 4: Pri obžiganju moramo imeti močan plin²

• Sterilizacija s filtracijo

Gre za postopek steriliziranja tekočin, občutljivih na temperaturo. Običajno to počnemo pri manjšem volumnu antibiotikov, vitaminov in drugih dodatkov.

- Filtracija skozi 0,45µm pore zadrži večji del mikroorganizmov.
- Filtracija skozi 0,22 µm pore zadrži vse bakterije, praživali in glive.

¹ Sanders, 2012

² Ike, 2011



Slika 5: Filter papir se zelo hitro zamaši ali pa strga³

- **Sterilizacija s sevanjem**

Primerna je pri razkuževanju prostora, redkeje za sterilizacijo inventarja. Poznamo ionizirajoče in neionizirajoče sevanje.

- » **Ionizirajoče sevanje**

Uporaba gama žarkov je primerna za sterilizacijo plastike, brizge, gumijastih rokavic, hrane ... Tovrstno elektromagnetno sevanje namreč prodre globoko v material.

- » **Neionizirajoče sevanje**

Uporaba UV svetlobe je primerna za razkuževanje prostorov in laminarijev. Tovrstno elektromagnetno sevanje vpliva le na številčnost mikroorganizmov na površini materiala.

- **Sterilizacija s plini**

Je skrajni primer, ko ni možno drugače sterilizirati prostorov in materialov.

- » **Etilenoksid** uporabljamo v posebni komori pri 50-60 °C, saj je nevaren za zdravje. Uporabljamo ga le za toplotno neodporne materiale.

- » **Formaldehid** uporabljamo v bolnišnicah za sterilizacijo toplotno neodpornih materialov. Tudi tukaj potrebujemo posebno komoro, ki zagotavlja neprodušnost, temperaturo 60-75 °C in 80-100 % vlažnost.

Poznamo tudi druge načine uničevanja mikroorganizmov, kot sta pasterizacija in razkuževanje.

- **Pasterizacija**

Gre za uničevanje patogenih organizmov.

- Dolgotrajna pasterizacija poteka 30 min pri 62–65 °C.
- Kratkotrajna pasterizacija poteka 15-45 sekund pri 72–75 °C.
- Trenutna pasterizacija poteka 5-15 sekund pri 85 °C.

- **Razkuževanje**

Gre za odstranjevanje oziroma zmanjševanje števila mikroorganizmov na neki površini. Pri tem lahko uporabljamo bakterioide, bakteriostatike ali bakteriolitike.

2.1 Priprava laboratorijskega inventarja



PRAKTIČNA VAJA

Sterilizacija laboratorijskega inventarja

MATERIAL IN PRIPOMOČKI

- vatirane palčke,
- steklene čaše,
- 100-mililitrske bučke,
- epruvete,
- fiziološko raztopino,
- steklene palčke.

METODA DELA

- Vatirano palčko trdno zavijte v alu folijo, nakar vse palčke postavite v večjo čašo in avtoklavirajte (*eno na dijaka*).
- Steklene čaše pokrijte z alu folijo in jih sterilizirajte s suho toploto (*dve na dijaka*).
- Pri 100-mililitrski bučki s pokrovom vrhnji del ovijte z alu folijo in jo sterilizirajte s suho toploto (*eno na dijaka*).
- Pri epruveh s pokrovom preverite trdnost pokrovov. Ti ne smejo sami pasti z epruvete, če jo obrnemo na glavo, in hkrati ne smejo biti preveč čvrsto zataknjeni. Epruvete zložite v večjo čašo, pokrijte z alu folijo in avtoklavirajte (*pet na dijaka*).
- Pripravite fiziološko raztopino tako, da 9 g NaCl raztopite v 1 l destilirane vode. Raztopino zaprete v stekleno steklenico in avtoklavirajte (*250 ml na dijaka*).
- Steklena palčko zavijte v alu folijo tako kot vatirane palčke in avtoklavirajte (*eno na dijaka*).



NALOGE

1. Navedite laboratorijske pripomočke, ki so primerni za:
 - avtoklaviranje,
 - suho sterilizacijo,
 - filtriranje,
 - obžiganje.
2. Zakaj je potrebno določen laboratorijski material sterilizirati?
3. Kakšna je razlika med pasterizacijo in sterilizacijo?
4. Kdaj uporabljamo razkuževanje?

2.2 Priprava hranilnih podlag za mikroorganizme

Za gojenje mikroorganizmov v laboratorijih potrebujemo hranilne podlage ali substrate, iz katerih mikroorganizmi črpajo hranilne snovi in vodo. Gojišča lahko uporabimo tudi za shranjevanje in transport. Pred uporabo morajo biti sterilna.

Za gojenje bakterij uporabljamo po **konsistenci** različne hranilne podlage. Tako poznamo: tekoča gojišča, poltrda gojišča, trda gojišča.

- **Tekoča gojišča** ne vsebujejo sredstva za strjevanje gojišč. Pogosto jih uporabljamo pri redčitveni tehniki ali pri hitrem namnoževanju mikroorganizmov.
- **Poltrda gojišča** vsebujejo nižji delež agar agarja ali želatine. Pogosto imamo pripravljena poševna gojišča v epruvetah, primernih za shranjevanje kultur.
- **Trda gojišča** vsebujejo približno 20 g agar agarja na 1 l gojišča. Trda gojišča so primerna za raziskovalne naloge, namnoževanje mikroorganizmov, transport ali shrambo.

Sestava gojišča je odvisna od vrste, ki jo želimo namnoževati. Tako ločimo gojišča na:

- **naravna**: nestandardizirano gojišče (mleko, korenje, riž, krompir ...),
- **sintetična**: umetni substrati imajo zmesi različnih hranil, ki omogočajo rast in razmnoževanje mikroorganizmov v umetnih pogojih.

Glede na uporabo in način delovanja uporabljamo različne **tipe gojišč**: minimalna, obogatena, selektivna in diferencialna gojišča.

- **Minimalna gojišča** vsebujejo le najnujnejše sestavine za rast večine heterotrofnih mikroorganizmov. Vir ogljika je saharid (mono-, di-), ostalo pa so anorganske soli.
- **Obogatena gojišča** vsebujejo snovi, ki spodbujajo rast določenih vrst. Tako lahko dodamo kri, serum, ostanke izločkov ali živalska tkiva.
- **Selektivna gojišča** onemogočajo rast enim vrstam in spodbujajo rast drugih. Tako lahko npr. kot vir ogljika dodamo celulozo.
- **Diferencialna gojišča** vsebujejo snovi / reagente, ki omogočajo ločevanje različnih vrst med seboj, npr. glede na obarvanost kolonij.



PRAKTIČNA VAJA

Priprava različnih gojišč

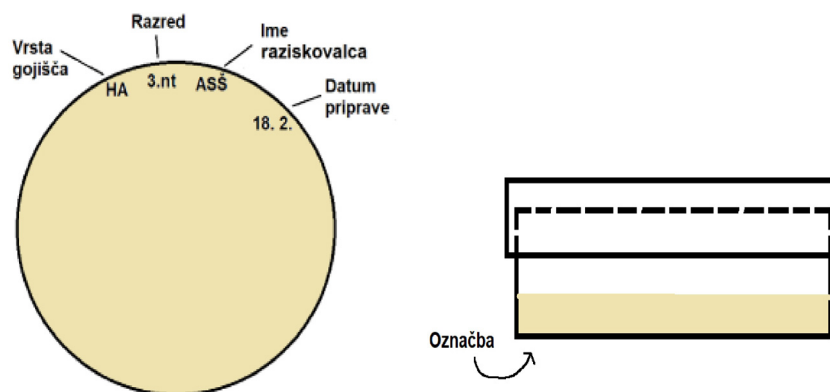
MATERIAL IN PRIPOMOČKI

- dehidrirana gojišča in destilirana voda
- žlička
- erlenmajerica
- steklena palčka in oprijemalne škarje/klešče
- trinožno stojalo s keramično mrežico
- epruveta s pokrovom v stojalu za epruvete
- krpa
- Durhmanova cevka
- vata in alu folija
- sterilne petri plošče

METODA DELA

1. PRIPRAVA HRANILNE PODLAGE

- Sterilne petri plošče označite z osnovnimi podatki: vrsta gojišča, razred, ime raziskovalca, datum priprave.

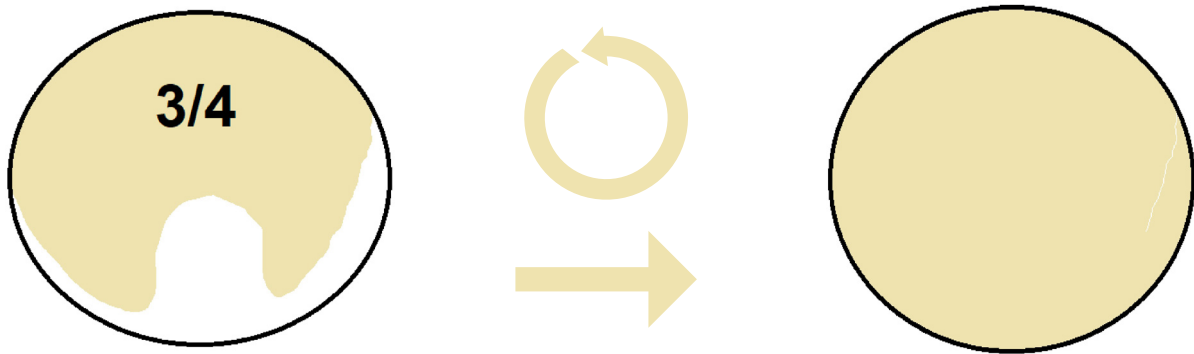


Slika 6: Petri ploščo označimo z osnovnimi podatki

- Nato stehtajte dehidrirano gojišče, ga dajte v erlenmajerico s širokim vratom in dodajte ustrezno količino destilirane vode (23 g HA ...1000 ml dH₂O).
- Gojišče sterilizirajte: Na zmernem ognju naj vre 10 min, pri tem konstantno mešajte. Paziti morate, da se gojišče ne zapeni ali pa da ne uide iz erlenmajerice.
- Ob prižganem gorilniku postavite gojišče in počakajte, da se ohladi na 40 °C.

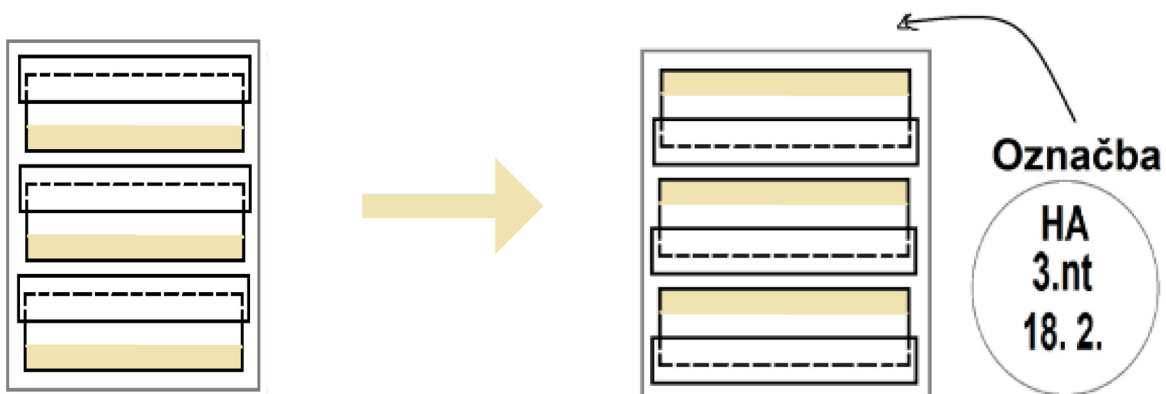


- Gojišče razlijte v petri plošče aseptično ob plamenu gorilnika in ga s krožnimi gibi enakomerno porazdelite.



Slika 7: V petri plošče nalijemo do 15 ml gojišča

- Ko se gojišče strdi, petri plošče zavijte v alu folijo in shranite v hladilnik.



Slika 8: Gojišča morajo biti shranjena tako, da so obrnjena na glavo

2. PRIPRAVA BRILLA ZELENEGA BUJONA

- Najprej izberite prave epruvete s pokrovom, ki so dovolj tesno oprijeti. Epruvete označite (BB, 3.nt, 18. 2.).
- Stehajte ustrezno količino dehidriranega gojišča, ga dajte v erlenmajerico s širokim vratom in dodajte ustrezno količino destilirane vode (40 g BB ...1000 ml dH₂O). Dodajte magnetno mešalo in gojišče na topli magnetni plošči mešajte 5 minut.
- S polavtomatsko pipeto prenesite v vsako epruveto 4,5 ml gojišča. Previdno dodajte Durhmanovo cevko, ki naj bo obrnjena z odprtino navzdol. Pomagajte si s stekleno palčko. Če cevka s silo prileti v dno epruvete, se lahko poškoduje.
- Epruvete s pokrovom prenesite v večjo čašo in jih nato avtoklavirajte.



Slika 9: Gojišče Brillia zeleni bujon



3. PRIPRAVA YGC AGARJA

- Stehtajte dehidrirano gojišče, ga dajte v erlenmajerico s širokim vratom in dodajte ustrezno količino destilirane vode (40 g YGC ...1000 ml dH₂O).
- Iz vate pripravite zamašek, ga namestite na erlenmajerico in pokrijte z alu folijo.
- Gojišče avtoklavirajte.
- Naslednjič gojišče segrejete (45–50 °C), da se utekočini in nato aseptično razlijte v sterilne petri plošče.
- Ko se gojišče strdi, označite plošče z osnovnimi podatki (YGC, 3.nt, ASŠ, 18. 2.).
- Gojišče pripravite za shrambo v hladilniku.



Slika 10: Preden razlijemo gojišče, moramo vrat erlenmajerice ali steklene posode ožgati⁴

4. PRIPRAVA PCA AGARJA

- Stehtajte dehidrirano gojišče, ga dajte v erlenmajerico s širokim vratom in dodajte ustrezno količino destilirane vode (23,5 g PCA ...1000 ml dH₂O).
- Gojišče segrejete do vrelišča in raztopite mešanico.
- Iz vate pripravite zamašek, ga namestite na erlenmajerico in pokrijte z alu folijo.
- Gojišče avtoklavirajte.
- Naslednjič gojišče segrejete, da se utekočini (45–50°C) in nato aseptično razlijte v sterilne petri plošče.
- Ko se gojišče strdi, označite plošče z osnovnimi podatki (PCA, 3.nt, ASŠ, 18. 2.).
- Gojišče pripravite za shrambo v hladilniku.



NALOGE

1. Na shematski način narišite potek priprave agarja.
2. Aseptično delo preverimo tako, da pripravljena gojišča inkubiramo pri sobni temperaturi za 48 h. Kako uspešni ste bili pri svojem delu?
3. Kje vse se lahko zgodijo napake pri aseptičnem delu?
4. Kaj naredimo s kontaminiranimi gojišči?
5. Kako bi pripravili 1,4 l fiziološke raztopine?
6. Raziščite, katera snov je to in zakaj se jo uporablja:
 - pepton,
 - agar agar,
 - kvasni ekstrakt,
 - mesni ekstrakt.
7. Zapišite sestavo štirih različnih dehidriranih gojišč in način priprave po navodilih proizvajalca.

Tabela 3: Glavne značilnosti najbolj uporabljenih hranilnih podlag

	HA	BB	YGC	PCA
polno ime				
glede na uporabo, gre za ...				
konsistenca				
sestava				
način priprave				

2.3 Bris z različnih površin

Večino okolij naseljujejo mikroorganizmi in vsaka vrsta ima določene fiziološke in morfološke značilnosti. Te karakteristike lahko opišemo le, če kultiviramo mikroorganizme na gojiščih.

Ena od tehnik izolacije mikroorganizmov je bris s površine. Na vajah si bomo pogledali biotsko raznovrstnost na naši koži. Tako lahko izberemo odvzem vzorca z:

- dlani, kjer preverjamo čistost in razkuženost rok,
- pod prstani, verižicami in zapestnicami, kjer preverjamo higieno nakita,
- pod pazduho, kjer preverjamo, kako pot vpliva na prisotnost mikroorganizmov,
- brade ali lasišča, kjer preverjamo higieno ...

Bris lahko izvedemo tudi na različnih površinah:

- na laboratorijskih mizah, kjer preverjamo razkuženost delovne površine,
- na denarju, kjer preverjamo mikrobiološko onesnaženost,
- ali na kakšnih drugih zanimivih površinah.



Slika 11: Odtis otroške dlani prikazuje biotsko pestrost na njej⁵



Slika 12: Prepoznavanje bakterij in gliv temelji na morfoloških značilnosti na gojiščih⁶

Na gojišču bo zrasla mikrobiološka kultura. To so mikroorganizmi, ki rastejo v gojišču ali na njem. Lahko je mešana ali čista. V čisti kulturi je samo ena vrsta mikroorganizmov, v mešani pa več različnih vrst mikroorganizmov (pestrost mikroorganizmov). Za določanje morfoloških značilnosti je nujno potrebno mikroorganizme najprej izolirati, da dobimo čisto kulturo, kjer so kolonije (skupek celic kot potomk ene same celice) lepo ločene. Za opis morfoloških značilnosti uporabljamo trdna gojišča, ker je rast v kolonijah primerna za opazovanje in opisovanje.

Kriteriji določevanja morfoloških značilnosti kolonij mikroorganizmov so: pigmentiranost, prosojnost, oblika, robovi, profil, tekstura oz. površina, ustroj, vonj.

5 Fessenden, 2015

6 Reynolds, 2020

Pigmentiranost oziroma obarvanost kolonij



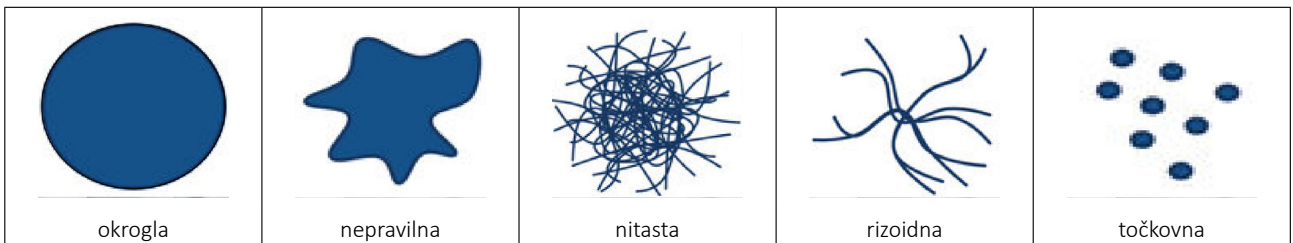
Prosojnost

neprosojne	polprosojne	prosojne
------------	-------------	----------

Velikost

točka	majhna kolonija	srednja kolonija	velika kolonija
-------	-----------------	------------------	-----------------

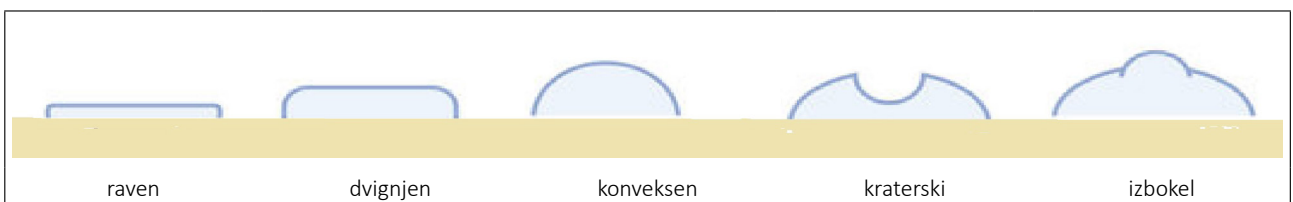
Oblika



Robovi



Profil



Tekstura oziroma površina

suha	gladka	viskozna	sluzasta
------	--------	----------	----------

Ustroj

krhke kolonije	mazave kolonije	sluzaste kolonije	trde kolonije
----------------	-----------------	-------------------	---------------

Vonj

se določuje le, če je kultura čista in če ta kultura ne proizvaja spor.



PRAKTIČNA VAJA

Bris z različnih površin

MATERIAL IN PRIPOMOČKI

- sterilna hranljiva trda gojiščca
- sterilna vatirana palčka in sterilna fiziološka raztopina
- gorilnik

METODA DELA

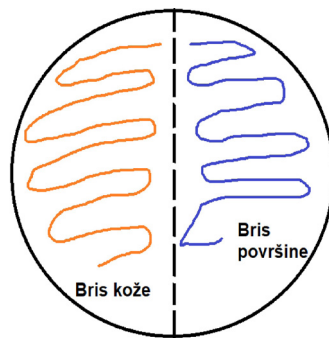
1. Bris s kože

- Ob prižganem gorilniku namočite vatirano palčko v sterilno fiziološko raztopino.
- Z vatirano palčko večkrat podrgnite po koži.

2. Bris s površine

- Ob prižganem gorilniku namočite vatirano palčko v sterilno fiziološko raztopino.
- Z vatirano palčko večkrat podrgnite po željeni površini.

- Ob gorilniku nanesite vzorec z vatirane palčke na sterilno gojišče po zik-zak metodi.



- Inokulirano (nacepljeno) gojišče označite in zavijte v folijo.
- Na folijo zabeležite osnovne podatke: BRIS, 3.nt, datum.
- Sledi inkubacija mikroorganizmov na 22 °C za 48 h.
- Petrijevke po inkubaciji shranite v hladilniku do nadaljnjega dela, ko pregledate čistost kulture in morfološke značilnosti izbrane kolonije ter izpolnite spodnje tabele.
- Odsluženo gojišče zavijte v alu folijo, avtoklavirajte in nato zavržite.

REZULTATI

Preden se lotite izpolnjevanja tabel si postavite hipoteze, ki jih boste poskušali z eksperimentom potrditi.

- Kdo v razredu bo imel najbolj mikrobiološko umazano mesto na koži?

- Kdo v razredu bo imel največjo mikrobiološko pestrost na dlaneh?

- Katera površina bo najbolj mikrobiološko kontaminirana?



REZULTATI

V spodnje tabele vnesite naslednje podatke:

- morfološke značilnosti kolonij brisa kože in izbrane površine,
- rezultate različnih vzorcev brisov kože in površine od vseh dijakov.

Mesto odvzema brisa je _____.

Tabela 4: Morfološke značilnosti kolonij brisa kože

Karakteristike	Popis 1. kolonije	Popis 2. kolonije	...
pigmentiranost			
prosojnost			
velikost			
oblika			
rob			
profil			
tekstura			
ustroj			
številčnost			

Tabela 5: Primerjava različnih vzorcev brisa kože

Vzorec	Biotska pestrost	Številčnost kolonij
med prsti		
pod pazduha		
lasje		

Mesto odvzema brisa je _____.

Tabela 6: Morfološke značilnosti kolonij brisa z izbrane površine

Karakteristike	Popis 1. kolonije	Popis 2. kolonije	...
pigmentiranost			
prosojnost			
velikost			
oblika			
rob			
profil			
tekstura			
ustroj			
številčnost			



REZULTATI

Tabela 7: Primerjava različnih vzorcev brisa s površine

Vzorec	Biotska pestrost	Številčnost kolonij
laboratorijska miza		
umivalnik		
denar		



NALOGE

1. Kaj pomeni mešana/čista kultura?
2. Kaj je to aseptično delo in kako poteka?
3. Metodo dela narišite na shematski način.
4. Ali lahko primerjamo številčnost kolonij z različnih plošč?
5. Kaj vpliva na pestrost mikroorganizmov?
6. Zakaj neprestano razkuževanje rok ni dobro za našo kožo in mikrobno floro?
7. Kaj izloča koža, da prepreči vdor nezaželenim mikroorganizmom?

2.4 Razmaz do posameznih kolonij

Če želimo določiti vrste mikroorganizmov iz danega vzorca, moramo najprej pridobiti čisto kulturo. Šele potem lahko uporabljamo identifikacijska gojišča, ki so nam v pomoč pri določanju organizmov do vrste natančno. Gre za tako imenovane API teste.



Slika 13: API testi vsebujejo različna dehidrirana gojišča, ki nam pomagajo pri identifikaciji mikroorganizmov⁷



PRAKTIČNA VAJA

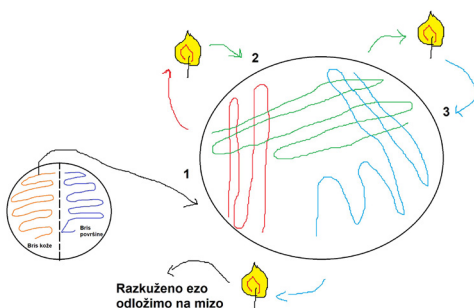
Razmaz do posameznih kolonij

MATERIAL IN PRIPOMOČKI

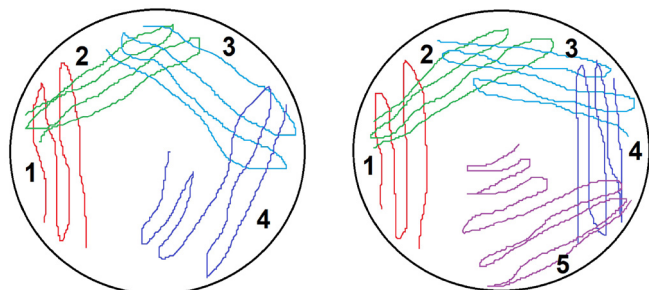
- eza–cepilna zanka
- gojišče z brisi z različnih površin
- sterilna gojišča

METODA DELA

- Prižgite gorilnik in nastavite močan plamen.
- Petrijevko z brisom z različnih površin odpirajte le, če je nujno in vedno proti plamenu (20 cm od ognja).
- Izberite eno izmed kolonij na plošči z mešano kulturo in jo izolirajte v čisti kulturi tako, da jo redko cepite na svežo ploščo do posameznih kolonij.
- Posamezne kolonije dobite, če kulturo zasejete tako, da jo »redčite« na trdem gojišču v petrijevki.
- Kulturo s sterilno ezo nanesite na majhno površino ob robu sterilnega gojišča (1/8 gojišča). Vsako naslednjo serijo potez, označenih s številkami, začnete z ohlajeno sterilno zanko. Potek nanosa prikazuje slika spodaj.
- Drugič potegnite po gojišču tako, da zajamete prvi nanos in ga raznesete do ¼ gojišča.
- Postopek še enkrat ponovite tako, da tretjič zajamete drugi nanos in ga raznesete na preostali del gojišča.



Slika 14: Prikaz izolacije čiste kulture z redčenjem



Slika 15: Prikaz več zaporednih razredčitev

- Na drugo gojišče poskusite razredčiti štirikrat ter na tretje gojišče petkrat kot prikazuje Slika 15.



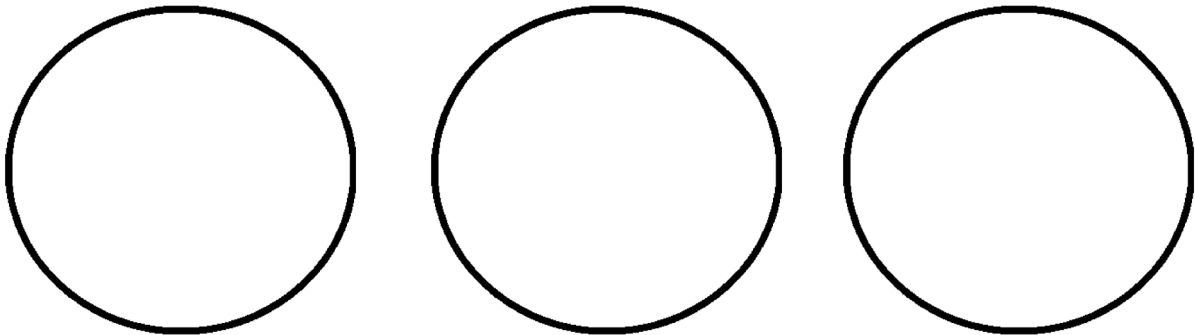
- Ustrezno označene petrijevke inkubirajte na 22 °C za 48 ur.
- Prihodnjič preverite čistost kulture in morfološke značilnosti izbrane kolonije.
- Po končanem delu gojišča zavijte v alu folijo, jih avtoklavirajte in zavržite.
- Pod rezultate narišite debeline kolonij, ki so nastale po inkubaciji.

REZULTATI

Nacepila se je kolonija iz: _____.

Njene morfološke značilnosti so bile:

Dobili smo čisto/mešano kulturo.



Slika 16: Razmaz do posameznih kolonij s cepilno zanko



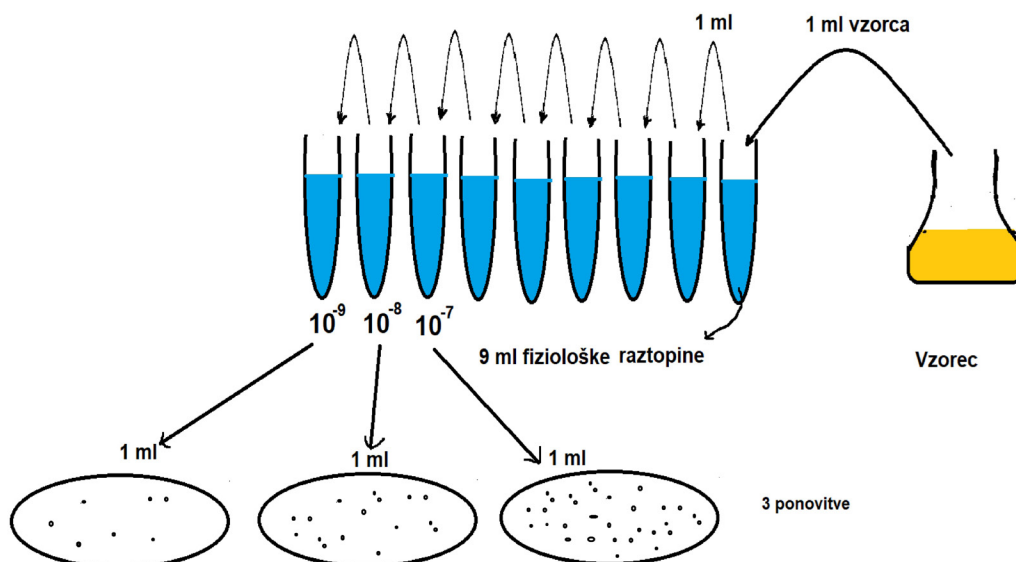
NALOGE

1. Na spletu raziščite, kaj so to API testi in iz česa so sestavljeni.
2. Opišite postopek sterilizacije cepilne zanke.
3. Ali smo delo (redčitev do posameznih kolonij) opravili aseptično? Kako to preverite?
4. Pri kateri metodi smo prišli do posameznih kolonij (pri 3-kratnem, 4-kratnem ali 5-kratnem redčenju)?
5. Od česa je odvisno, kako hitro bomo prišli do posameznih kolonij?
6. Ali so vse kolonije z enakimi lastnostmi? Odgovor utemeljite.
7. Na kaj nakazuje kolonija, ki ni na črti, ki ste jo opravili s cepilno zanko?
8. Kaj bi naredili, če kultura še vedno ni/ ne bi bila čista?

2.5 Določevanje celokupnega števila mikroorganizmov iz vodnih vzorcev

V vzorcih (voda, zemlja ...) je lahko zelo veliko ali zelo malo bakterij. Kadar predvidevamo, da bo bakterij veliko, moramo vzorec pred nanosom na gojišče redčiti. Če je rast posameznih kolonij pregosta ali pa kolonije prerastejo celotno gojišče, takih kolonij ne moremo popisati. V mikrobiologiji po navadi uporabljamo 10-kratne razredčitve.

Pripravimo redčitev vzorca vse do 10^{-7} , 10^{-8} in 10^{-9} redčitve. Na gojišče damo 1 ml razredčine iz vsake redčitvene epruvete in po inkubaciji preštejemo kolonije.



Slika 17: Redčenje vzorca v fiziološki raztopini

Tabela 8: Določitev števila bakterij s štetjem na ploščah

Končna redčenja na ploščah	1. plošča Št. kolonij	2. plošča Št. kolonij	3. plošča Št. kolonij
10^{-7}	210	187	223
10^{-8}	17	25	19
10^{-9}	3	1	2

Iz dobljenih rezultatov najprej izračunamo povprečje za vsako razredčino posebej:

- za razredčino 10^{-7} : vsota vseh kolonij/število paralelk = $620/3 = 207 * 10^7$ CFU/ml,
- za razredčino 10^{-8} : vsota vseh kolonij/število paralelk = $61/3 = 20,3 * 10^8$ CFU/ml,
- za razredčino 10^{-9} : vsota vseh kolonij/število paralelk = $6/3 = 2 * 10^9$ CFU/ml.

- CFU (colony forming units)

CFU/ml je enota, ki jo izračunamo:

št. kolonij x faktor redčitve / volumen inokuluma (ml)

Izračunamo povprečje vseh razredčin:

vsota vseh razredčin/št.razredčin = $(207 * 10^7 + 203 * 10^7 + 200 * 10^7)/3 = 203 * 10^7$ CFU/ml.



PRAKTIČNA VAJA

Določevanje celokupnega števila mikroorganizmov iz vodnih vzorcev

MATERIAL IN PRIPOMOČKI

- sterilne epruvete s pokrovom na stojalu
- sterilna fiziološka raztopina
- polavtomatska pipeta s sterilnimi nastavki (tipsi)
- spatula v čaši z etanolom
- sterilna gojišča

METODA DELA

- V stojalo si pripravite sterilne epruvete s pokrovom tako, da jih označite s števkami od 1 do 6.
- Na spodnji strani petri plošče si z alkoholnim flomastrom označite redčitev, temperaturo inkubacije, datum, razred, kratico raziskovalca in ime vzorca.
- Prižgite gorilnik na močno jakost.
- Ob plamenu gorilnika prenesite 9 ml sterilne fiziološke raztopine s polavtomatsko pipeto z nastavki v epruvete.
- Nato prenesite 1 ml vzorca vode v prvo epruveto in premešajte. *S pomočjo pipete premešajte razredčino, tako da dvakrat napolnite in izpraznite pipeto.* Z isto pipeto odpipetirajte 1 ml razredčine iz prve epruvete ter prenesite v naslednjo in tako nadaljujete do konca.
- Glede na to, koliko mikroorganizmov pričakujemo v začetnem vzorcu, prenesite 1 ml razredčine na sterilno gojišče (3 gojišča, 3 različne razredčine). Delajte v dveh paralelkah.
- Vzamite spatulo iz etanola in previdno potegnite čez plamen. Ob gorilniku počakajte, da plamen na spatuli ugasne, nato 20 sek razmazujete razredčino po gojišču. Zaključite tako, da spatulo odložite v etanol.



- Inokulirana gojišča preverite, če imajo pravilno označeno vrednost razredčine in ime vzorca. V alu folijo zavijte gojišča tako, da je vsaka paralelka zavita posebej. Nanj zapišite osnovne podatke (ime gojišča, razred, vzorec, temperatura inkubacije) in vsako paralelko inkubirajte pri svoji temperaturi: 22 in 37 °C za 24 oziroma 48 ur.
- Po končani inkubaciji popišite morfološke značilnosti kulture, preštete število kolonij in izračunajte, koliko mikroorganizmov je v 1 ml začetnega vzorca (št. kolonij x razredčitev = CFU/ml). Rezultate vpišite v spodnje tabele.
- Odslužena gojišča avtoklavirajte in zavržite.

REZULTATI

Tabela 9: Osnovni podatki vzorca vode za določevanje celokupnega števila

Datum vzorčenja vode		Vzorčevalec
Kraj vzorčenja	Mesto zajema	
Način konzerviranja	Čas, ki je pretekel od vzorčenja do laboratorijskih vaj	

Tabela 10: Morfološke značilnosti mikroorganizmov, inkubiranih pri 22 °C

Karakteristike	Popis 1. kolonije	Popis 2. kolonije	...
pigmentiranost			
prosojnost			
velikost			
oblika			
rob			
profil			
tekstura			
ustroj			
številčnost			

Izračun indeksa biotske pestrosti



Tabela 11: Morfološke značilnosti mikroorganizmov, inkubiranih pri 37 °C

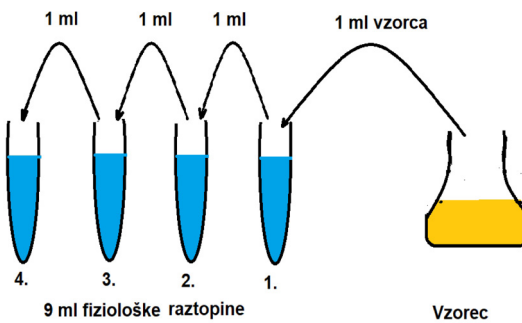
Karakteristike	Popis 1. kolonije	Popis 2. kolonije	...
pigmentiranost			
prosojnost			
velikost			
oblika			
rob			
profil			
tekstura			
ustroj			
številčnost			

Izračun indeksa biotske pestrosti

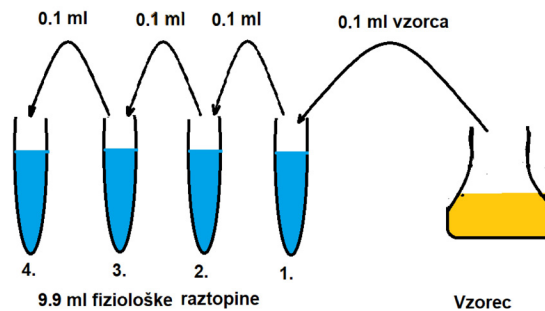


NALOGE

1. Naravovarstveni tehniki so pripravili redčitev vzorca. Kolikokrat je bil vzorec razredčen v 2., 3. in 4. epruveti?



2. Naravovarstveni tehniki so pripravili redčitev vzorca. Kolikokrat je bil vzorec razredčen v 2., 3. in 4. epruveti?





3. Določite število bakterij v začetnem vzorcu z gojitveno metodo, če smo dobili naslednji rezultat.

Končna redčenja na ploščah	1. plošča Št. kolonij	2. plošča Št. kolonij	3. plošča Št. kolonij
10^{-6}	301	257	273
10^{-7}	26	27	32
10^{-8}	4	2	2

4. Iz vzorca smo prenesli 1 ml na gojišče, razmazali in inkubirali. Izračunajte začetno koncentracijo bakterij iz petih paralelk: 150, 203, 167, 209 in 197 kolonij.

5. Zakaj pri nanosu vzorca na gojišče na paralelkah ne dobimo enakega števila kolonij?

6. Spoznali smo indirektno metodo. Zakaj ji tako pravimo?

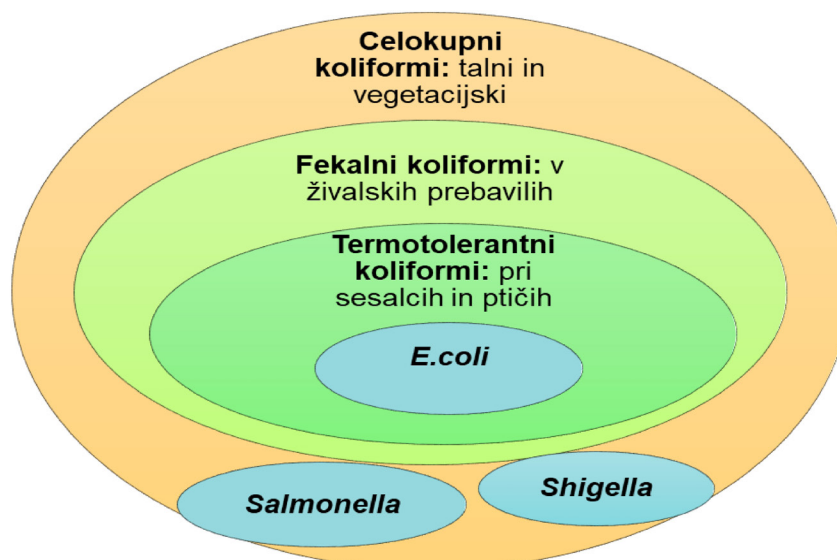
7. Zakaj moramo inkubirati vzorce razredčin pri dveh različnih temperaturah?

8. Kateri vzorec vode ima največje število mikroorganizmov in zakaj?

9. Zakaj ne dobimo identičnih vrednosti, čeprav delamo paralelke?

2.6 Določevanje koliformnih organizmov

Za določanje kakovosti pitne vode se najpogosteje ugotavlja prisotnost indikatorskih bakterij, ti. koliformnih bakterij, ki jih prištevamo v družino enterobakterij. To so po Gramu negativne paličaste bakterije, ki fermentirajo laktozo do kisline in plina (CO_2).



Slika 18: Podskupine koliformnih bakterij

Prisotnost koliformnih bakterij v vodi kaže na onesnaženje s fekalnimi odplakami, ki so najpogosteje vir patogenih mikroorganizmov. V blatu bolnih ljudi in živali so prisotni povzročitelji črevesnih nalezljivih bolezni (kolera, tifus ...).

Koliformne bakterije so primeren indikator tudi zato, ker v vodi preživijo dlje časa kot drugi patogeni mikroorganizmi. Če v vodi ne najdemo koliformnih bakterij, lahko predpostavimo, da v vodi verjetno ni ostalih patogenih bakterij.

Za ugotavljanje koliformnih mikroorganizmov v vodi se uporabljajo različna tekoča in trdna gojišča (Brilliant Green Bile Broth, Coliform Agar, MacConkey Agar, VRB Agar ...), ki ustrezajo koliformnim bakterijam. Pri 30 °C razkrajajo laktozo in proizvajajo CO₂.



PRAKTIČNA VAJA

Določevanje koliformnih organizmov

MATERIAL IN PRIPOMOČKI

- vzorec vode
- sterilni briljant zeleni bujon
- polavtomatska pipeta s sterilnimi nastavki

METODA DELA

- Vzorec vode premešajte.
- Ob gorilniku prenesite 1 ml vzorca v sterilen briljant zeleni bujon z Durchmanovo cevko.
- Na epruveto zapišite osnovne podatke: ime vzorca, razred, datum.
- Vzorce inkubirajte pri 37 °C za 24 ur.
- Po inkubaciji zabeležite spremembo v barvi gojišča in prisotnosti plina v Durchmanovi cevki.
- Po končanem delu gojišče avtoklavirajte in pomijte laboratorijske pripomočke.
- Rezultate vaje vpišite v spodnji tabeli.

REZULTATI

Tabela 12: Osnovni podatki vzorca vode za določevanje koliformnih organizmov

Datum vzorčenja vode		Vzorčevalec
Kraj vzorčenja	Mesto zajema	Raba vode
Način konzerviranja	Čas, ki je pretekel od vzorčenja do laboratorijskih vaj	
Prisotnost koliformov		



REZULTATI

Tabela 13: Primerjava koliformnih organizmov iz različnih vzorcev vode

Lokacija	Rast (+/-)	Prisotnost plina (+/-)
reka		
čistilna naprava		



NALOGE

- 1.. Katere organizme ste pričakovali na selektivnem gojišču glede na lokacijo nabranega vzorca vode?
2. Ali je vzorec vode pokazal pozitivne rezultate in kako so se ti odražali?
3. Kateri izmed danih vzorcev je vseboval koliforme?
4. Kaj je vzrok za prisotnost koliformov v vašem vzorcu vode?
5. Ali ste uporabili kvalitativno ali kvantitativno metodo? Odgovor utemeljite.
6. Na kaj ste morali paziti pri delu?

2.7 Določevanje prisotnosti *E. coli*

Fekalno onesnaženje lahko dokazujemo s prisotnostjo bakterij indikatorjev fekalnega onesnaženja. Najpomembnejši indikatorji fekalnega onesnaženja so bakterije *E. coli* in enterokoki. Prisotnost *E. coli* in enterokokov v vodi zanesljivo kaže na fekalno onesnaženje. Bakterije so tudi indikatorji za učinkovitosti postopkov čiščenja in dezinfekcije pitne vode.

Priporočena gojišča za identifikacijo so: *E. coli* Direct Agar, VRBD Agar, VRB Agar, Brilliant Green Bile Broth .



Slika 19: VRB agar kolonije *E.coli* obarva **vijolično, roza** kolonije so *Salmonella*, **prozorne** kolonije pa *Yersinia* ali *Shigella*

PRAKTIČNA VAJA



Določevanje prisotnosti *E. coli*

MATERIAL IN PRIPOMOČKI

- dehidrirano gojišče vrb in destilirana voda
- erlenmajerica s stekleno palčko
- oprijemalne kleščice
- kuhinjska krpa
- trinožno stojalo s keramično mrežico
- sterilne petri plošče
- polavtomatska pipeta s sterilnimi nastavki in odlagalnik
- alu folija

METODA DELA

- Sterilne petri plošče označite z osnovnimi podatki: ime gojišča, razred, datum, ime vzorca, kratica laboranta.
- Nato stehtajte dehidrirano gojišče, ga dajte v erlenmajerico s širokim vratom in dodajte ustrezno količino destilirane vode (41,5 g VRB 1000 ml dH₂O).
- Gojišče naj zavre na gorilniku, vendar ne sme vreti več kot 2 min. Nato ga ob prižganem gorilniku pustite, da se ohladi na 40-45 °C.
- Ob odprtem gorilniku premešajte vzorec vode in odpipetirajte 1 ml vzorca v sterilno petri ploščo.
- Ko je gojišče dovolj ohlajeno, prilijte inokulum (15 ml) in z nežnimi krožnimi gibi zmešajte vzorec in gojišče med seboj.



- Ko se gojišče strdi, ga zavijte v alu folijo in zapišite osnovne podatke: ime gojišča, vzorec, razred, datum.
- Nacepljene plošče inkubirajte pri 37 °C za 24–48 ur.
- Popišite morfološke značilnosti kolonij.
- Opravite primerjavo pestrosti mikroorganizmov med različnimi vodnimi vzorci.
- Gojišča, ki jih ne potrebujete več, avtoklavirajte in zavržite.

REZULTATI

Tabela 14: Morfološke značilnosti mikroorganizmov po inkubaciji na VRB agarju

Karakteristike	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i>	drugi MO
pigmentiranost			
prosojnost			
velikost			
oblika			
rob			
profil			
tekstura			
ustroj			
številčnost			

Tabela 15: Primerjava pestrosti mikroorganizmov na VRB agarju v odvisnosti od vzorca vode

Karakteristike	<i>E. coli</i> - število	<i>Salmonella</i> - število	število drugih MO
reka			
bajer			
čistilna naprava			



NALOGE

1. Zapišite osnovne podatke uporabljenega gojišča:

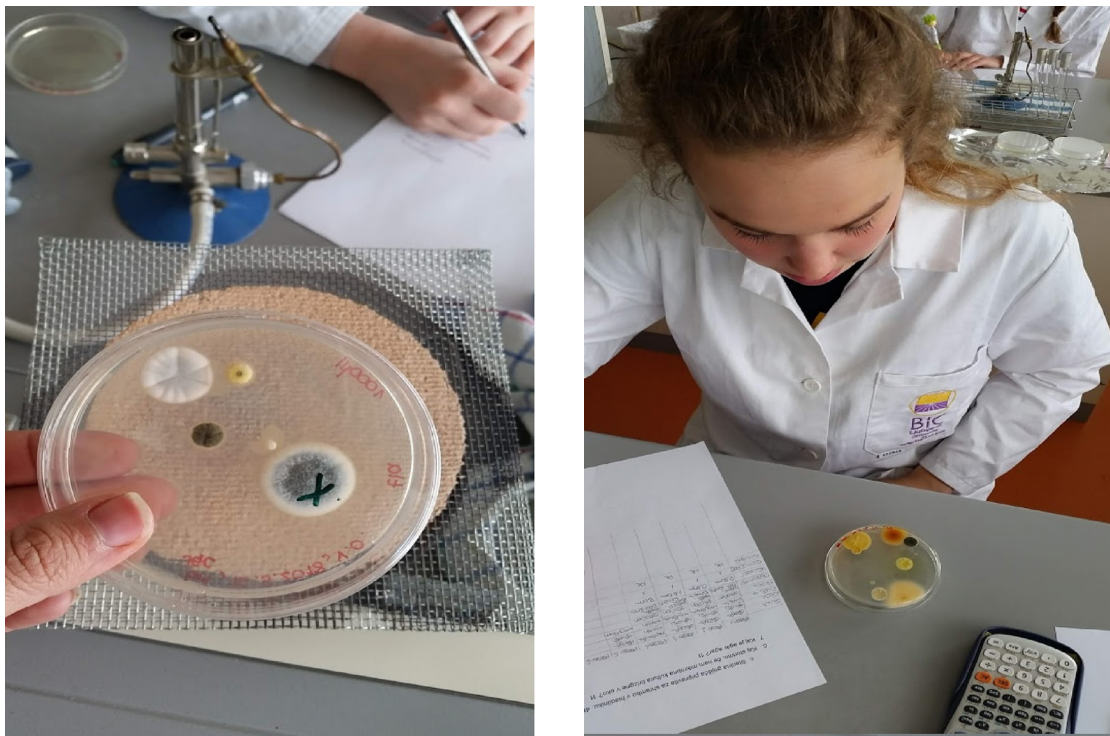
- polno ime gojišča,
- glede na uporabo gre za ...,
- konsistenca gojišča,
- sestava gojišča,
- priprava gojišča.



2. Ali je prisotnost *E. coli* glede na izbran vzorec vode potrjena?
3. Kje bi potrdili največjo število *E. coli* glede na uporabljene vzorce vode?
4. Ali so na izbranem gojišču zrasli nepatogeni mikroorganizmi? Odgovor utemeljite.
5. Tokrat ste delali z nevarnimi mikroorganizmi. Kakšne bolezenske znake bi lahko razvili, če bi bili nepazljivi?
6. Opišite varstvene ukrepe pri izvajanju mikrobioloških analiz.

2.8 Določevanje mikrobiološke kvalitete zraka

Zrak ima lahko vlogo rezervoarja za mikroorganizme (bakterije, glive in virusi). Zato je v nadzorovanih okoljih (operacijske sobe, sobe s hudo obolelimi osebami ...) nujno potrebno mikrobiološko spremljanje. Na ta način določimo kakovost zraka in prepoznavamo kritične situacije.



Slika 20: V zraku pogosto najdemo plesni, ki so nevarne za naša dihala

Namen današnje vaje je oceniti stopnjo mikrobne kontaminacije v različnih prostorih na šoli. Uporabili bomo pasivno metodo vzorčenja.



PRAKTIČNA VAJA

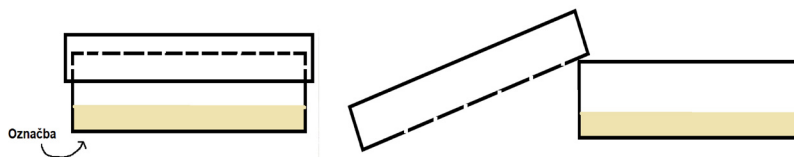
Določevanje mikrobiološke kvalitete zraka

MATERIAL IN PRIPOMOČKI

- sterilna osnovna trda gojišča

METODA DELA

- Izberite si različna vzorčna mesta (toaleti, hodniki, učilnice, knjižnica, vrt ...). V izbranih prostorih boste nastavili dve gojišči (dve paralelki).
- Sterilna gojišča postavite na odmaknjeno mesto, kjer ne bo prišlo do motnje eksperimenta.
- Gojišče odprete tako, da pokrov naslonite na spodnji del petri plošče.



- Po 20 min gojišče previdno zaprete in pripravite za inkubacijo na 22 °C za 48 ur. Ne pozabite zapisati osnovnih podatkov na petri ploščo in alu folijo.
- Popišite morfološke značilnosti kulture in izračunajte povprečje iz paralelnih vzorcev istih vzorčnih prostorov.
- Izvedite primerjavo med vzorci zraka v različnih okoljih.
- Po popisu rezultatov gojišča avtoklavirajte in odvrzite.

REZULTATI

Tabela 16: Osnovni podatki zračnega vzorca

Datum vzorčenja vode		Vzorčevalec
Mesto vzorčenja	Raba/namen prostora	Pogostost rabe
Čas izpostavitve	Čas inkubacije	Prezračevanje prostora

Tabela 17: Morfološke značilnosti mikroorganizmov po inkubaciji

Karakteristike	Popis 1. kolonije	Popis 2. kolonije	...
pigmentiranost			
prosojnost			
velikost			
oblika			
rob			
profil			
tekstura			
ustroj			
številčnost			



REZULTATI

Tabela 18: Primerjava vsebnosti mikroorganizmov iz različnih zračnih prostorov

Vzorčno mesto	Št. kolonij bakterij	Št. kolonij plesni	Biotska pestrost
toaleta			
učilnica			
knjižnica			



NALOGE

1. Kateri mikroorganizmi se nahajajo v zaprtih prostorih (zrak)?
2. Kaj pomeni kvaliteten zrak?
3. Kako mikroorganizmi vplivajo na naše dihalne poti?
4. Kateri prostor je glede na izbrane vzorčne prostore vseboval največ mikroorganizmov?
5. Zakaj prihaja do razlik v številčnosti kolonij?
6. Zakaj prihaja do razlik v pestrosti kolonij?
7. Navedite različne ukrepe zmanjševanja števila mikroorganizmov v zaprtih prostorih.

2.9 Izolacija gliv iz tal

Glive so evkariontski organizmi, ki imajo lahko enocelično obliko (kvasovke) ali filamentozno obliko (micelij). V naravi so pomembni

- **dekompozitorji**, ki vračajo hranila v takšno obliko, da so ponovno dostopna za rastlinski in bakterijski svet,
- **simbionti**, ki prispevajo mikroelemente za boljšo rast in
- **paraziti**, ki regulirajo številčnost drugih osebkov.

Številčnost in raznolikost gliv napovedujeta rodovitnost in zdravstveno stanje tal. Izolacija gliv iz okolja poteka s pomočjo selektivnega gojišča. Gre za gojišče, ki vsebuje antibiotik za zaviranje rasti bakterij. Pri delu z glivami se moramo zavedati produkcije prašnih spor, ki se z lahkoto prenašajo po zraku. Zato petri plošče s plesnimi odpiramo skrajno previdno.



PRAKTIČNA VAJA

Izolacija gliv iz tal

MATERIAL IN PRIPOMOČKI

- sterilna terilnica s pestilom
- sterilizirana fiziološka raztopina
- sterilne bučke s pokrovom
- sterilna žlička, ovita v alu folijo
- sterilno gojišče za kultiviranje gliv
- spatula v čaši z etanolom
- polavtomatska pipeta s sterilnimi nastavki in odlagalnikom
- različni vzorci tal

METODA DELA

- Na spodnjo stran petri plošče s selektivnim gojiščem zapišite osnovne podatke.
- Ob odprtem gorilniku prenesite eno žličko vzorca tal v sterilno terilnico in vzorec homogenizirajte.
- 0,1 g homogeniziranega vzorca prenesite v sterilno bučko in dopolnite s sterilno fiziološko raztopino do znaka (100 ml). Zamašite in stresajte 15-30 min.
- Aseptično prenesite 0,1 ml vzorca na sterilno gojišče tako, da ne zajamete trdnih delcev.
- Spatulo potegnite čez plamen in počakajte, da plamen ugasne in se spatula ohladi. Nato 20 sek. razmazujete vzorec po gojišču.
- Nacepljeno gojišče pripravite na inkubacijo pri 25 °C za 48 ur.
- Popišite morfološke značilnosti kulture.
- Kontaminirane plošče avtoklavirajte in odvržite v odpad.

REZULTATI

Tabela 19: Osnovni podatki vzorca tal

Datum vzorčenja		Vzorčevalec
Mesto vzorčenja	Raba prostora	Čas transporta



REZULTATI

Tabela 20: Morfološke značilnosti gliv po inkubaciji na selektivnem agarju

Karakteristike			
pigmentiranost			
prosojnost			
velikost			
oblika			
rob			
profil			
tekstura			
ustroj			
številčnost			



NALOGE

1. Zakaj smo uporabili gojišče, ki vsebuje antibiotik?
2. Od česa je odvisna biotska pestrost tal?
3. V katerem vzorcu tal je bila biotska pestrost največja?

3 RASTLINSKI KAZALNIKI

Terenske meritve so drugačno delo kot delo v laboratoriju. Predvsem nam grozijo drugačne nevarnosti:

- **nevarne rastline:** ubranimo se z dolgimi hlačami,
- **nevarne živali:** uporaba repelentov je zelo zaželena, ko pa pridemo domov, se moramo nujno pregledati, da se nas ni prijel kakšen klop,
- **zdrsi in zvini:** obutev mora biti primerna terenskim vajam, z narebrenimi podplati in zaščito nad gležnjem (pohodni čevlji),
- **sončarica in dehidracija:** če je vreme sončno, je pomembno, da veliko pijemo in se predhodno zaščitimo pred sončnim sevanjem s sončno kremo in klobukom,
- **terenska umazanija:** pri zagnanem delu se pogosto tudi umažemo z blatom, prstjo, vodo ... zato nam rezervna oblačila pridejo prav, še posebej, če pademo v vodo.

Na terenu bodimo pozorni na okolico in spremljajmo dogajanje okoli sebe. Če bomo mirni, bomo lahko dobili obisk srnjačka, fazana ali kakšne druge divje živali. Če bomo pozorno gledali, kje hodimo, ne bomo poteptali orhideje, modre stožke ali tavžentrože.

Glavno vodilo je, da naravo pustimo takšno, kot smo jo dobili, preden smo stopili vanjo. To ne velja v primeru, ko tam najdemo odpadke. Te je zaželeno pobrati in odnesti s seboj. Smeti morda res niso naše, je pa naš planet.

3.1 Vzorčenje onesnaženosti zraka preko epifitskih lišajev

Struktura lišajev nam poda koristne informacije o kvaliteti zraka. Njihova vrstna sestava v okolju je odvisna od koncentracije žvepovega dioksida, dušikovih oksidov in drugih onesnaževal v zraku. Na podlagi tega lahko izračunamo indeks zračne čistosti–IAP.

Lišaj kot organizem

- Organizem je sestavljen iz enocelične zelene alge ali cianobakterije ter glive, ki živita v sožitju ali simbiozi.
- V primerjavi z rastlino nima pravih tkiv in organov. Nima korenin, listnih rež in zaščitne kutikule. Njegovo telo imenujemo steljka. Vodo, hranila ter zrak privzema skozi celotno površino steljke.
- Je epifit, saj raste na drugih rastlinah, deblih in vejah dreves in grmov oz. epilit, ko raste na zemlji in skalah.



Slika 21: Struktura lišaja⁸

Bolj kot je površina steljke zrasla s površino, manjši del steljke je izpostavljen okoliškemu zraku in onesnažilom – manjša je občutljivost na zračna onesnažila.

Manj kot je površina steljke zrasla s površino, večji del steljke je izpostavljen okoliškemu zraku in onesnažilom – večja je občutljivost na zračna onesnažila.

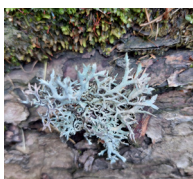
SKORJASTI



LISTASTI



GRMIČASTI



Ločevanje od
rastne podlage

Razraslost
steljke

Površina steljke, ki je v stiku
z zrakom in onesnažili

ZAHTEVNO

MAJHNA

ENOSTAVNO

VELIKA

Slika 22: Lišaji imajo 3 tipične rastne oblike

Lišaji kot bioindikatorji

- Steljka lišajev je občutljiva na koncentracije plinskih onesnažil v zraku, predvsem na koncentracije žveplovega dioksida (SO_2) in dušikovih oksidov (NO_x). Ti nastanejo pri izgorevanju fosilnih goriv v prometu in industriji.

Večja kot je koncentracija žveplovega dioksida (SO_2) in dušikovih oksidov (NO_x) v zraku, bolj so prisotni lišaji s preprostimi steljkami, oz. lišajev sploh ni, kar imenujemo LIŠAJSKA PRAZNINA.

- V steljki lišaja se kopičijo tudi prašni delci in težke kovine. Njihovo koncentracijo lahko določamo z analiznimi metodami v laboratoriju.

V bioindikatorjih se lahko snovi kopičijo, kar ni vidno navzven - AKUMULACIJSKI BIOINDIKATOR.

Spremembe bioindikatorja so vidne - REAKCIJSKI BIOINDIKATOR.



PRAKTIČNA VAJA

Določanje indeksa zračne čistosti (Index of Atmospheric Purity – IAP)

MATERIAL IN PRIPOMOČKI

- povečevalno steklo
- Določevalni ključ epifitskih lišajev Slovenije- SiiT
- telefon s fotoaparatom
- pisalo, popisni list in podloga za pisanje
- vrečka in nož
- kreda
- meter
- kovinska vzorčna mreža oz. ravnilo



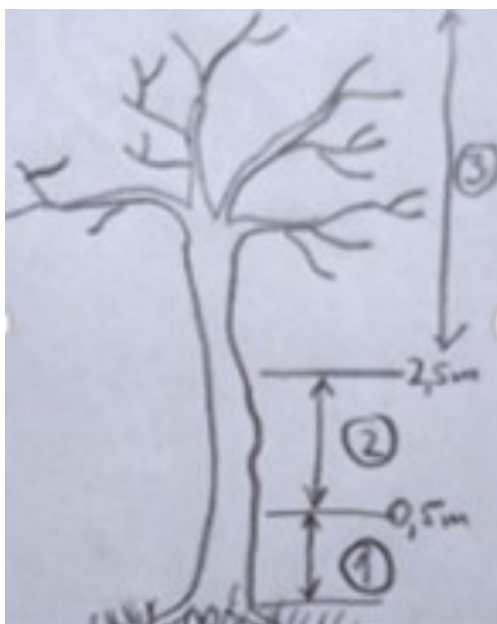
Slika 23: Ravnilo, velikosti 10 cm x 10 cm ter mreža velikosti 20 cm x 50 cm, ki jo narišemo s kredo na drevo⁹

METODA DELA

- Na posamezni lokaciji si izberite 6 dreves iste vrste. Izberite listavce, vendar ne tujerodnih vrst. Drevesa naj bodo po območju enakomerno razporejena in naj bodo približno enake višine. V nižinah je najprimernejši hrast, v gorskem pasu bukev in jelka, v subalpinskem pa smreka in macesen.
- Za popis se izbere stran, ki je najbolj obrasla z lišaji. Če je drevo poraslo z mahovi, se vzorčno mesto postavi tako, da je znotraj mreže prisotnega čim manj mahu.
- S pomočjo določevalnega ključa določite vrste dreves in tipe steljk lišajev, ki rastejo na njih. Naredite tudi herbarij lišajev. V prilogi 2 je ovitek zbirke.
- Vzorčna mreža ima velikost 20 cm x 50 cm ter je razdeljena na 10 manjših kvadratov, velikosti 10 cm x 10 cm. Lahko je kovinska, ki jo pritrdite na drevo, ali pa jo narišite na drevo s kredo.



- Vzorčno mrežo boste postavili na 3 različne višine:
 - višina 1 1–0,5 m višine debla,
 - višina 2 0,5–2,5 m višine debla,
 - višina 3 od 2,5 m višine in na vejah.



Slika 24: Shema opazovanja lišajev na 3 višinah

- Grobo oceno številčnosti in pokrovnosti boste naredili z opazovanjem enega kvadrata velikosti 10 cm x 10 cm. Če rezultati v drugih kvadratih mreže odstopajo, vpišite povprečno stanje pokrovnosti in številčnosti.
- V vsakem kvadratu, velikosti 10 cm x 10 cm, določite pokrovnost in številčnost lišajev po spodaj napisanih kriterijih. Določite jih posebej za skorjaste, listaste in grmičaste lišaje. Rezultate popisa lišajev beležite v terenski list. (Glejte naprej.)

Tabela 21: Ocena številčnosti in pokrovnosti epifitskih lišajev

Številčnost – določamo število steljk posameznega tipa lišajev v kvadratu	Pokrovnost – določamo površino steljk posameznega tipa lišajev v kvadratu
0 Ni lišajev.	0 Ni lišajev.
1 1 do 5 steljk	1 Posamezen tip steljke pokriva do 10 % opazovane površine.
2 5 do 10 steljk	2 Posamezen tip steljke pokriva od 10 % do 50 % opazovane površine.
3 nad 10 steljk	3 Posamezen tip steljke pokriva nad 50 % opazovane površine.



- Izračunajte indeks IAP za posamezno drevo – seštejte vse vrednosti številčnosti in pokrovnosti za vse 3 tipe steljk na treh višinah.
- Nato izračunajte povprečje za vseh 6 dreves. Seštejte vse indekse IAP posameznih dreves in jih delite s 6.
- Na podlagi povprečne vrednosti indeksa IAP določite lišajski pas po spodnji tabeli.

Tabela 22: IAP vrednost lišajskega pasu

Vrednost indeksa	Razred	Lišajski pas (od A do E)	Prisotnost posameznih tipov lišajev	Koncentracije SO ₂ in NO _x
0	5	LIŠAJSKA PRAZNINA E	ni lišajev.	
1–13,5	4	OBMOČJE BORBE D	skorjasti	
13,6–27	3	OBMOČJE BORBE C	skorjasti in listasti	
27,1–40,5	2	OBMOČJE BORBE B	skorjasti, listasti in malo grmičastih	
40,6–54,0	1	ČISTA CONA A	skorjasti, listasti, grmičasti, zelo številni in lepo razviti	

REZULTATI

Tabela 23: Osnovni podatki mesta vzorčenja

Nadmorska višina	Koordinate	Datum	Popisovalec
Ocena okolice			

POPISNI LIST: DOLOČANJE INDEKSA ZRAČNE ČISTOSTI- IAP

Vrsta drevesa _____

1. Katere vrste lišajev ste določili na drevesih z ravnilom 10 x 10 cm?

skorjasti	
listasti	
grmičasti	



REZULTATI

2. Določite vrednost indeksa zračne čistosti. Pomagajte si s tabelo 21 in mrežo 20 x 50.

Tabela 24: Rezultati popisa lišajev in izračun indeksa zračne čistosti

OPIS STANJA LIŠAJEV																				
Številka drevesa		1			2			3			4			5			6			
Tip lišajev	Višina na drevesu	0-0,5 m	0,5-1,5 m	1,5-2 m	0-0,5 m	0,5-1,5 m	1,5-2 m	0-0,5 m	0,5-1,5 m	1,5-2 m	0-0,5 m	0,5-1,5 m	1,5-2 m	0-0,5 m	0,5-1,5 m	1,5-2 m	0-0,5 m	0,5-1,5 m	1,5-2 m	
SKORJASTI	številčnost																			
	pokrovnost																			
LISTASTI	številčnost																			
	pokrovnost																			
GRMIČASTI	številčnost																			
	pokrovnost																			
INDEKS IAP za posamezno drevo (Sešteje vse vpisane vrednosti za posamezno drevo.)		Povprečje			Povprečje			Povprečje			Povprečje			Povprečje			Povprečje			
INDEKS IAP (povprečje)																				
LIŠAJSKI PAS (od A do E)																				

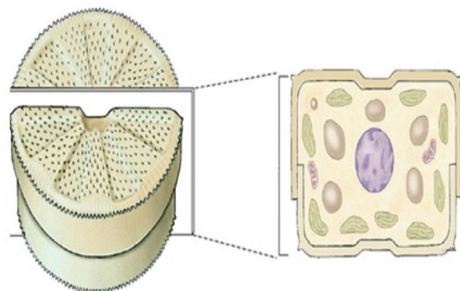
NALOGE

- Pojasnite, kaj vam pove določen lišajski pas o koncentracijah žveplovega dioksida in dušikovih oksidov v okolju, v katerem ste vzorčili?
- Koliko je vaše mesto vzorčenja oddaljeno od:
 - hitre ceste, avtoceste: _____ km,
 - večjih industrijskih obratov: _____ km.
- Ali se rezultat sklada s stanjem v okolju?
- Kako bi izboljšali vrednost indeksa?

3.2 Vzorčenje fitobentosa

Fitobentos so alge, ki so pritrjene na rečno, jezersko dno ali drugo podlago. Kot bioindikatorje ekološkega stanja vode vrednotimo zgolj **KREMENASTE ALGE** ali **DIATOMEJE**. Te so običajno zgrajene iz celične stene, ki vsebuje kremen, in so sestavljene iz dveh delov: celična stena in kremenasta lupinica iz dveh delov.

Celična stena vsebuje kremen. Kremenasta lupinica je iz 2 delov.



zgornji del
kremenaste lupinice

spodnji del
kremenaste lupinice

Slika 25: Zgradba fitobentosa¹⁰

Izbira kremenastih alg za bioindikatorje je uporabna predvsem zaradi naslednjih lastnosti.

- Obstaja veliko število vrst, ki se pogosto pojavljajo v vodnih telesih in so dovolj pogoste za določanje.
- Imajo raznolike lupinice, ki jih lahko vrstno določamo z določevalnimi ključi.
- Kratka življenjska doba- z njimi spremljamo razmere v krajšem časovnem obdobju.



PRAKTIČNA VAJA

Določanje ekološkega stanja vodotoka s kremenastimi algami

MATERIAL IN PRIPOMOČKI

- zobna ščetka
- plastična epruvetka s pokrovom- fiolce
- krovno in objektno steklo
- plastična kapalka
- mikroskop

METODA DELA

- Vzorčno mesto izberite tako, da vsebuje čim več različnih mikrohabitatov.
- Vpišite podatke o vzorčenju in vzorčnem mestu, določite organoleptične lastnosti vode, izmerite fizikalno-kemijske parametre v vodi in rezultate zapišite v terenski popisni list.
- Vzorce naberite tako, da podrgnete po podlagi s ščetko, nožem ali žličko in vsebino shranite v fiolce. Zraven dodajte tudi nekaj vzorčne vode.
- Razdelite se v tri skupine, kjer bo prva skupina vzorčila s kamnov (iz različnih globlin), druga z naplavnega lesa, tretja pa iz rastlin.
- Nabrani material v laboratoriju dobro pretresite.
- Pripravite nativni preparat in vsebino pregledajte z mikroskopom s 400-kratno povečavo.
- V vsakem vzorcu pregledajte vsaj 200 lupinic. Različne vrste kremenastih alg narišite in ste pri tem pozorni na podrobnosti (vzorci na kremenastih lupinicah). Poskušajte jih določiti z določevalnim ključem.



REZULTATI

POPISNI LIST: DOLOČANJE EKOLOŠKEGA STANJA VODOTOKA S KREMENASTIMI ALGAMI

Tabela 25: Osnovni podatki vzorčnega mesta za izvedbo analiz fitobentosa

popisovalec			
ime vodotoka			
datum in ura vzorčenja			
mesto vzorčenja			
koordinate mesta vzorčenja			
najbližje naselje			
dolžina odseka			
trenutni vodostaj	nizek	srednji	visok
kalnost	bistra	srednje kalna	močno kalna
struga	regulirana		naravna
vidnost dna	da		ne
globina vodnega telesa (v preseku)	1–10 cm- _____ % 10–30 cm- _____ % 30–60 cm- _____ % nad 60 cm- _____ %		
hitrost vodnega toka (skozi celoten presek)	1–10 cm/s- _____ % 10–30 cm/s- _____ % 30–60 cm/s- _____ % nad 60 cm/s- _____ %		
Kakšen mikrohabitat bo zajet v vzorcu?	kamenje lesni ostanki rastline drugo _____		

Tabela 26: Rezultati kemijsko-fizikalnega stanja vode, kjer vzorčimo fitobentos

temperatura zraka (°C)		temperatura vode (°C)	
električna prevodnost (μS/cm)		pH-vrednost	
koncentracija nitratov (mg/l)		koncentracija fosfatov (mg/l)	

Slike vsaj 10 kremenastih alg (400-kratna povečava). Primerki naj bodo čim bolj raznoliki.



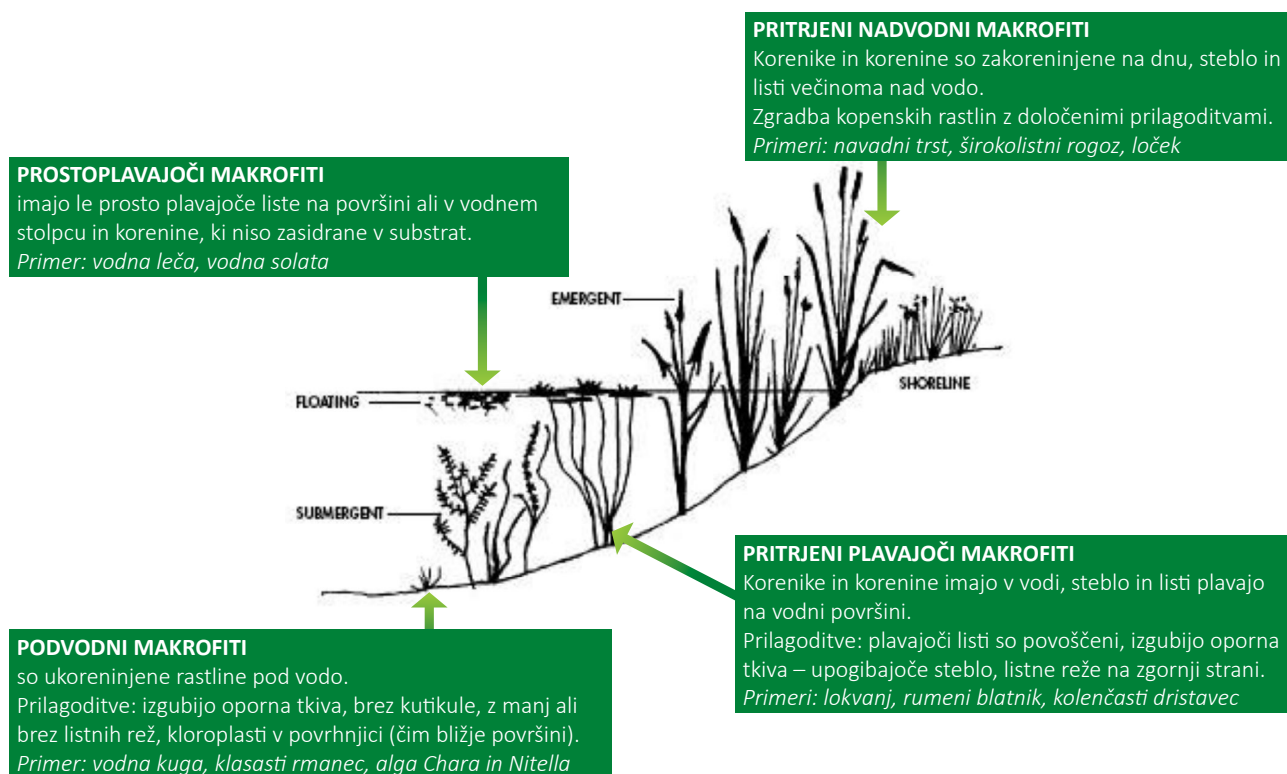
NALOGE

1. Kako pogosto se izvaja vzorčenje fitobentosa v Sloveniji?
2. Kdaj je najprimernejši čas vzorčenja fitobentosa?
3. Od česa je odvisna dolžina vzorčnega mesta?
4. Ali bomo dobili podobne rezultate fitobentosa iz istega vodnega telesa, kljub temu da smo vzorčili z različnih podlag? Odgovor utemeljite.
5. Opišite postopek, kako pridemo do velike povečave na mikroskopu.

3.3 Vzorčenje makrofitov

Makrofiti

- so vodne rastline, ki jih opazimo s prostim očesom. V to skupino sodijo semenke, praprotnice, makroskopske alge in mahovi.
- Nahajajo se v vseh tipih sladkih vod: reke, jezera, ribniki, kanali.
- Vloga v ekosistemih:
 - predstavljajo življenjski prostor različnim organizmom (nevretenčarji, ribe, ptice),
 - utrjujejo rečne bregove in struge,
 - obogatijo okolje s hranili (prevzemajo jih iz sedimenta in jih vračajo v okolje s svojim propadanjem),
 - povečujejo samočistilno sposobnost vode,
 - bogatijo vodo s kisikom.

Slika 26: Rastne oblike makrofitov¹¹

Makrofiti kot bioindikatorji so eni od številnih bioloških elementov, s katerimi določamo ekološko stanje vode.

- Odzivajo se na lokalne spremembe okolja.
- Živijo več let – z njimi spremljamo razmere v daljšem časovnem obdobju.
- So pokazatelj za eutrofikacijo, zakisanje, hidromorfološke spremembe ...

PRAKTIČNA VAJA

Določanje ekološkega stanja vodotoka z makrofiti

MATERIAL IN PRIPOMOČKI


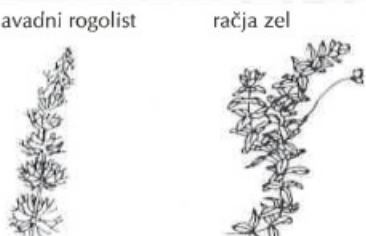
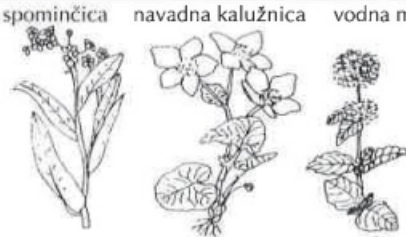

- teleskopska palica s kavljem (grablje)
- nožek
- ročna lopa (10-kratna povečava)
- določevalni ključi
- mobilni aparat – telefon
- kadičke
- čaše
- Vernierjevi senzori (termometer, konduktometer)
- kovček za določanje kemijskih parametrov v vodi (koncentracije nitratov, fosfatov, pH-vrednost)





METODA DELA

- Na terenu določite transekte v dolžini 10 m.
- Določite organoleptične lastnosti vode, izmerite fizikalno-kemijske parametre v vodi in rezultate zapišite v terenski popisni list.
- Makrofite s pomočjo določevalnih ključev popišite na obrežju, v vodi – opazujte njihovo raznovrstnost. Pri tem si pomagajte z grabljami, teleskopsko palico s kavljem in pazite, da jih ne poškodujete.
- Prek popisanih makrofitov določite ekološko stanje vodotoka – kakovostni razred.

Stopnja onesnaženja	Vodne rastline (bioindikatorski organizmi*)	Kakovostni razred
čista ali malo onesnažena voda	vodna zlatica klasasti rmanec 	1 (prvi) ali A
zmerno onesnažena voda	navadni rogoлист račja zel 	2 (drugi) ali B
srednje onesnažena voda	močvirna spominčica navadna kalužnica vodna meta 	3 (tretji) ali C
močno onesnažena voda	navadni repuh plazeča lakota velika kopriva močvirski oslad 	4 (četrti) ali D
zelo močno onesnažena voda		5 (peti) ali E

Slika 27: Določevalni ključ makrofitov¹²



REZULTATI

POPISNI LIST: DOLOČANJE EKOLOŠKEGA STANJA VODOTOKA Z MAKROFITI

Tabela 27: Osnovni podatki vzorčnega mesta za vzorčenje makrofitov

popisovalec				datum in čas	
ime vodotoka					
skupno število vseh transektov			številka transekta, za vzorčenje		
koordinate na sredini vzorčenega transekta					
dolžina vzorčnega transekta					
trenutni vodostaj	nizek		srednji		visok
kalnost	bistra		srednje kalna		močno kalna
strmina brega nad vodo	položen	srednje strm	zelo strm	pravokoten- utrjen	
osončenost	popolnoma osončen		delno osončen		popolnoma osončen
spremembe brega	<ul style="list-style-type: none"> - brez sprememb - les - kamen oz. kamniti bloki - beton - izpusti, cevi 				
rastline obrežnega pasu	<ul style="list-style-type: none"> - gozd - močvirska vegetacija (trstišča) - pionirske lesnate rastline (vrbe, topoli, jelše) - zelnate rastline (visoke in nizke zeli) - tujerodne rastline - drugo: _____ 				
izraba tal za obrežnim pasom	<ul style="list-style-type: none"> - gozd - mokrišča - mozaik košenih travnikov/pašnikov/mokrišč - obdelovalne površine, posamezne hiše - strnjeno urbano naselje (hiše, tovarne) 				

Tabela 28: Rezultati kemijsko-fizikalnega stanja vode, kjer vzorčimo makrofite

temperatura zraka (°C)		temperatura vode (°C)	
električna prevodnost (μS/cm)		pH-vrednost	
koncentracija nitratov (mg/l)		koncentracija fosfatov (mg/l)	



REZULTATI

Tabela 29: Popis makrofitov na vzorčni ploskvi

Vrsta rastline	Kakovostni razred (od A do E)	Vrsta rastline	Kakovostni razred (od A do E)

Najbolj pogosto določen razred kakovosti: _____



NALOGE

1. Na kaj morate biti pozorni na terenu pri vzorčenju makrofitov?
2. Obrazložite, ali se ekološko stanje vodnega telesa sklada s kemijskimi rezultati.
3. Kako bi še podrobneje določili ekološko stanje vodnega telesa?
4. Kateri kakovostni razred ste določili na podlagi makrofitov?

3.4 Vzorčenje višje razvitih rastlin

Travnik je ekosistem, ki mu podoba dajejo trave in cvetlice. Prisotne so tudi številne živalske vrste, predvsem metulji in druge žuželke. Vrsto bogati travniki so za ohranjanje narave zelo pomembni, saj na njih najdemo tudi nekatere redke in ogrožene rastlinske in živalske vrste. Nekatere vrste na površini travnika prevladujejo in je njihova gostota večja, nekatere vrste pa se na travniku pojavljajo posamično in izginejo s travnika, takoj ko spremenimo način upravljanja. Prisotnost pozitivnih **indikatorskih vrst** (npr. orhideje) nam kaže, da je način upravljanja s travnikom primeren. **Negativne indikatorske vrste** (npr. navadni regrat, plazeča detelja, enoletna suholetnica) pa nas opozarjajo na neprimerno upravljanje travnika zaradi prekomernega gnojenja, opuščanja rabe travnika ...



PRAKTIČNA VAJA

Določevanje biotske pestrosti na travnikih

Biotska pestrost predstavlja številčnost in spremenljivost vseh življenjskih oblik na nekem območju. Nanjo vpliva mnogo dejavnikov. Izražamo jo s številom vrst na območju in s številom organizmov posamezne vrste. Večja je pestrost, bolj je ekosistem stabilen.

Glavni namen vaje je spoznavanje biodiverzitete in razlik v biodiverziteti med različnimi tipi travnišč in primerjava različnih travnatih habitatov ter uporaba različnih metod vzorčenja.

MATERIAL IN PRIPOMOČKI

- določevalni ključ:
 - Mala flora Slovenije
 - Slikovni rastlinski ključ
 - Rastlinski vodnik
 - Kaj neki tu cveti
 - PlantNet Plant Identification
- pisalo in popisni list
- primerna oblačila in obutev
- telefon s fotoaparatom
- lupa
- karton, lepilni trak, meter, škarje za izdelavo okvirja dimenzije 50 x 50 cm

PREDEN SE LOTITE DELA, JE POTREBNO VEDETI ...

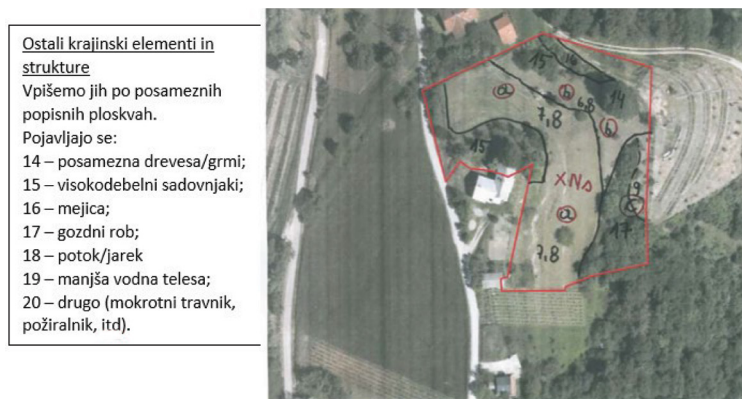
- Rastline popisujete na mestu, ne da jih odtrgate.
- Posebej morate biti pozorni na zaščitene vrste, ki jih nikoli ne trgate ali kakorkoli poškodujete. Lahko jih skicirate ali jih fotografirate za arhiv.
- Pazite! Vse kukavičevke oziroma divje orhideje so zavarovane.
- Vrsto bogata travnišča so v Sloveniji varovana kot območja Natura 2000. Pogosto so del zavarovanih območij, najvrednejši deli travnišč pa so zaščiteni kot naravne vrednote. Mnoge travniške vrste so uvrščene na rdeči seznam ogroženih vrst.
- Če niso zaščitene, rastline lahko naberete in izdelate herbarij.



- Kadar izvajate popis rastlin na nekem območju, morate zajeti vse oz. čim večje število vrst, ki se nahajajo na obravnavanem območju.
- Pri tem lahko obravnavano območje razdelite z diagonalo in določite vse rastline ob njej. Druga možnost je, da izberete nekaj naključnih kvadratov (po 1 m²) in v njih določite vse rastline. Na obravnavanem kvadratu preštete število osebkov iste vrste ter ocenite biodiverzitetu. Postopek lahko ponovite v različnih ekosistemih, ki jih potem primerjate med seboj.

METODA DELA

- Na spletni strani <https://www.naravovarstveni-atlas.si/web/profile.aspx?id=NV@ZRSVNJ> si izdelajte in natisnite DOF posnetek, na katerem bo označena površina (npr. gnojen travnik, travniški sadovnjak ...), ki jo boste preučili.
- Sprehodite se čez opazovano površino ali ob njej in na DOF posnetku označite različne strukture (vidni posegi človeka) opazovane površine, ki jih opazite na ali ob njej. Mejice, dominantna drevesa, nasipi, ceste, potoki, nekošeni pasovi travnika, travniški sadovnjaki, kamniti zidovi, skale ... močno vplivajo na biotsko pestrost. Na posnetku si to tudi označite in dodajte legendo kot kaže spodnja slika.

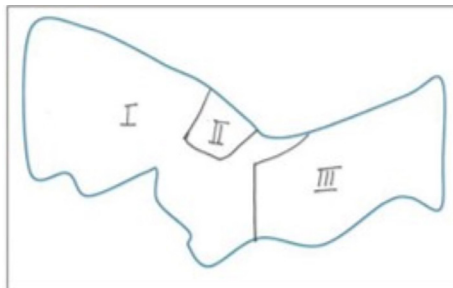


Slika 28: Habitatno kartiranje¹³

- Opazovano površino npr. gojeni travnik tudi fotografirajte.
- Popis rastlin boste izvedli na treh različnih lokacijah opazovane površine.
- Okvir, ki ste ga izdelali iz kartona (50 x 50 cm), previdno postavite na naključno izbrano površino npr. travnika. Okvir položite tako, da ne poškodujete rastlin.
- Popišite rastline znotraj okvirja do taksonomske stopnje, ki jo z razpoložljivo literaturo (slikovni ključ, aplikacije) in znanjem še lahko zanesljivo določite. Predstavnike posamezne vrste tudi preštete.
- Rastline lahko fotografirate ali naberete in herbarijsko posušite. Rastline, ki jih niste mogli določiti, lahko naberete in s pomočjo domače ali tuje literature skušate določiti v šoli.



- Skicirajte opazovano površino npr. gojeni travnik, na kateri označite popisne ploskve (I., II., III.)



Slika 29: Skica opazovane površine z vzorčnimi ploskvami¹⁴

- Popišite travniške rastline in število primerkov, ki pripadajo posamezni vrsti, na prvi vzorčni ploskvi in podatke vnesite v spodnjo tabelo.
- Postopek ponovite še na drugih dveh lokacijah.
- Izračunajte ekološko gostoto.

Izračun ekološke gostote populacije je izražen s številom osebkov, ki živijo na enoti površine.

- gostota na 1 m² za popisno polje 50 x 50 cm = št. vseh osebkov x 4/m²
- gostota na 1 ha = št. vseh osebkov x 4 x 10000/ha
- povprečna gostota = $\frac{\text{št.vseh osebkov} \cdot 4}{\text{št.lokacij}}$ /m²

Stopnja biodiverzitete:

- visoka: več kot 50 rastlinskih vrst/m²
- nizka: bistveno manj kot 50 rastlinskih vrst/m²

REZULTATI

POPISNI LIST ZA VZORČENJE RASTLIN NA IZBRANI POVRŠINI

Tabela 30: Popisni list za vzorčenje višje razvitih rastlin

Datum opazovanja	Ura opazovanja
Člani delovne skupine (ime in priimek)	
Nadmorska višina	Temperatura zraka
Vreme	Tip travnika



REZULTATI

DOF posnetek z označeno opazovano površino z okolico

Fotografija opazovane površine

Skica opazovane površine z označenimi popisnimi ploskvami



REZULTATI

Tabela 31: Prva vzorčna ploskev popisa višje razvitih rastlin na opazovani površini

Zap. št.	Rastlina		Št. osebkov na 0,25 m ²
	Slovensko ime	Strokovno ime	
1.			
2.			
3.			
4.			
5.			
6.			
7.			
8.			
9.			
10.			
skupno število osebkov			

Tabela 32: Druga vzorčna ploskev popisa višje razvitih rastlin na opazovani površini

Zap. št.	Rastlina		Št. osebkov na 0,25 m ²
	Slovensko ime	Strokovno ime	
1.			
2.			
3.			
4.			
5.			
6.			
7.			
8.			
9.			
10.			
skupno število osebkov			

Tabela 33: Tretja vzorčna ploskev popisa višje razvitih rastlin na opazovani površini

Zap. št.	Rastlina		Št. osebkov na 0,25 m ²
	Slovensko ime	Strokovno ime	
1.			
2.			
3.			
4.			
5.			
6.			
7.			
8.			
9.			
10.			
skupno število osebkov			

Izračun ekološke gostote populacij



NALOGE

1. Raziščite značilnosti naslednjih travšč in navedite po en primer.

naravna travšča	
polnaravna travšča	
gnojena/obogatena travšča	

2. Kakšna je razlika med naslednjimi travšči?

ekstenzivna suha in polsuha travšča na karbonatnih ali silikatnih kamninah	visokodebelni sadovnjaki
mokrotni in vlažni travniki	
nižinsko ekstenzivno gojeni travniki	

3. V Sloveniji travšča prekrivajo okrog 30 % površine in predstavljajo vir enega najvišjih deležev biodiverzitete pri nas. Naštejte še druge ekosistemske funkcije travnika.

4. Na katerem delu travnika se zdi biotska pestrost največja?

5. Zakaj se pojavlja vrstna raznolikost na različnih predelih travnika?

6. Kaj se zgodi s travnikom, ki se ga ne kosi in na njem ne pase živine? Ali je to za ohranjanje biotske pestrosti travnika pozitivno? Obrazložite.

7. Ali se vam zdi obravnavani travnik naravovarstveno (za ohranjanje biotske pestrosti) pomemben?

8. Kateri so razlogi za visoko oz. nizko stopnjo biodiverzitete opazovanega travnika?

9. Naštejte, zakaj so travšča eno izmed najbolj ogroženih življenjskih okolij z največjim upadom biotske raznovrstnosti?

10. Na kakšen način bi gospodarili s travnikom, da bi ohranili rastline in živali, ki na njem bivajo?



PRAKTIČNA VAJA

Določevanje pokrovnosti posameznih vrst na izbrani površini

Namen vaje je praktično spoznati slučajno sistematično vzorčenje trpotca (regrata), ocenitev pokrovnosti trpotca (regrata) na izbrani površini (npr. travniku) in uporaba ter izdelava denzometra.

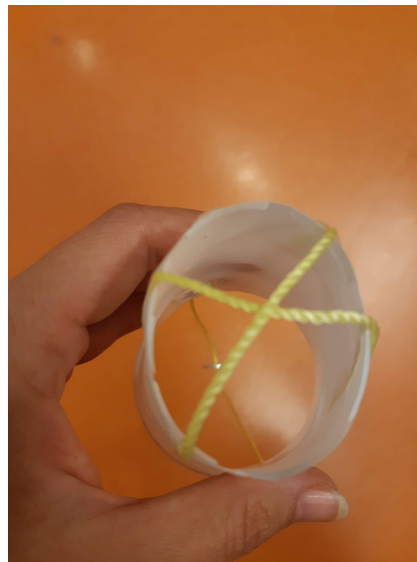
MATERIAL IN PRIPOMOČKI

- volna
- utež (matica)
- rolica toaletnega papirja
- lepilni trak
- popisni list
- ...

METODA DELA

Izdelava denzometra

1. Na eni strani rollice iz volne naredite križ in pritrдите z lepilnim trakom.
2. Na drugi strani rollice na volno obesite utež in pritrдите na rollico z lepilnim trakom.

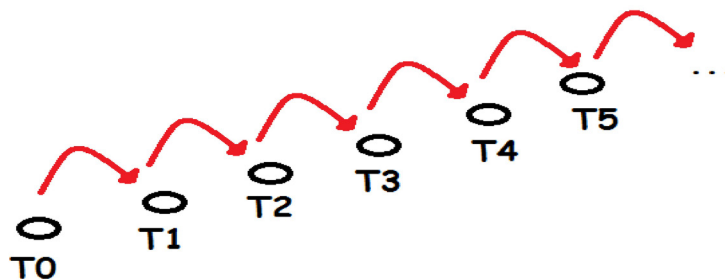


Slika 30: Prikaz zgornjega in spodnjega dela denzometra



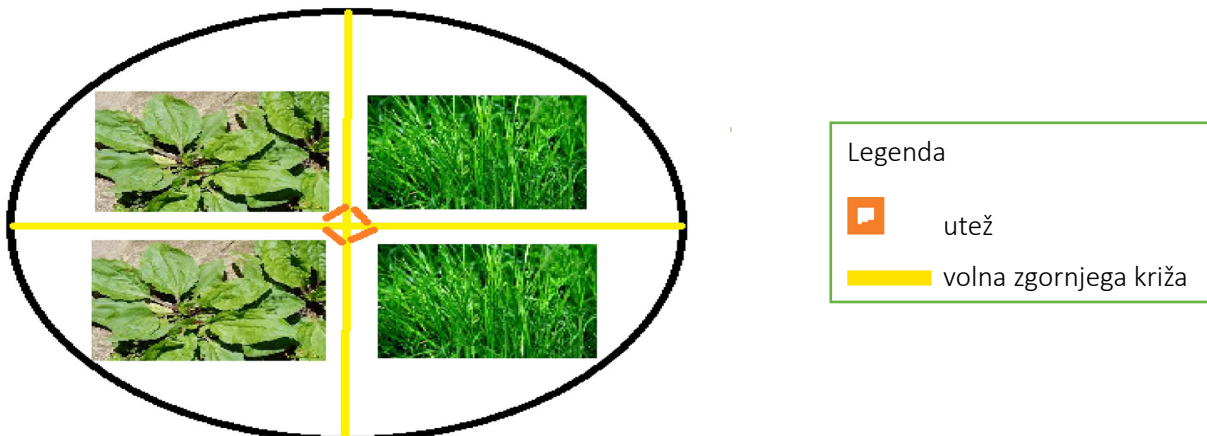
MERITVE

- Izberite si površino (travnik), kjer zagotovo raste trpotec (regrat ali marjetica).
- Vzorčili boste na treh različnih lokacijah izbrane površine.
- Naključno izberite začetno točko na parceli, kjer boste začeli šteti. To bo ničelna točka T₀.
- Sistematično vzorčenje boste nadaljevali tako, da boste v ravni liniji vzorčili podvzorce na vsake tri korake.



Slika 31: Slučajno sistematično vzorčenje

- Vzorčite tako, da denzometer postavite predse in pazite, da je utež točno na sečišču vrvic, ki sta na zgornji strani cevi, ko pogledate podse.



Slika 32: Primer slike, vidne z denzometrom

- Na vsaki točki preštejete, koliko predelov vidnega polja prekrivajo izbrane rastline. Rezultate si zapišite v tabelo.
- S pomočjo dobljenih rezultatov izračunajte pokrovnost izbrane rastline.

$$\text{pokrovnost rastline} = \frac{\text{število vseh naštetih primerkov trpotca (regrata)}}{\text{skupno število vseh vrst + ni vegetacije}} \cdot 100 \%$$

**REZULTATI**

Tabela 34: Osnovni podatki pokrovnosti izbrane rastlinske vrste

Ime in priimek vzorčevalca	Datum
Vreme	Velikost opazovanega rastišča
Opis rastišča	Nadmorska višina Koordinate

Fotografija denzometra

DOF posnetek z označenim travnikom in koordinatami lokacije

Fotografija lokacije in vzorčevalca v akciji



REZULTATI

Tabela 35: Delež pokritosti tal z izbrano vrsto

	T ₀	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆	T ₇	T ₈	T ₉	Povprečje pokrovnosti
1. vzorčno mesto											
izbrana vrsta											
druge vrste											
brez vegetacije											
2. vzorčno mesto											
izbrana vrsta											
druge vrste											
brez vegetacije											
3. vzorčno mesto											
izbrana vrsta											
druge vrste											
brez vegetacije											

Izračun povprečne vrednosti pokrovnosti izbrane vrste



NALOGE

1. Izračunajte velikost vzorčne ploskve.
2. Narišite grafični prikaz, kako se delež pokrovnosti izbrane vrste spreminja z oddaljevanjem od ničelne točke.
3. Kaj vpliva na rast izbrane rastline?
4. Kakšne so značilnosti rastišča izbrane rastline? Poiščite na spletu.
5. Kako bi povečali številčnost izbrane rastline?
6. S katerimi nevarnimi in nezaželenimi organizmi bi lahko prišli v stik na izbrani lokaciji?
7. Kakšni sta primerna obleka in obutev za tovrstno vzorčenje? Navedite zaščitno opremo za travniško vzorčenje.



PRAKTIČNA VAJA

Določevanje gostote posameznih vrst

Gostota rastlin in njihova neenakomerna porazdelitev sta odraz konkurence. Ko govorimo o gostoti, imamo v mislih število osebkov na neko površino. Včasih je težko določiti posamezne organizme (jagoda z viticami). Zato večkrat ovrednotimo gostoto kot preštete enote na neko površino. Z njo opisujemo odnos med rastlinami in zasedenostjo prostora. Z gostoto ocenjujemo stabilnost populacije in napovedujemo trend.

MATERIAL IN PRIPOMOČKI

- vzorčna mreža 1 x 1 m z 0,1 x 0,1 m velikimi odprtini
- vrv

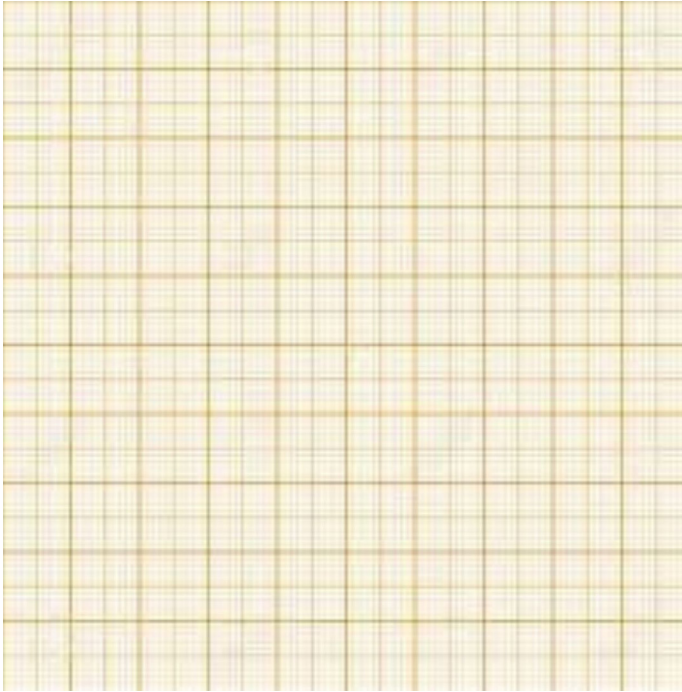
METODA DELA

- Če mreže še nimate, jo lahko naredite s štirimi palicami, ki jih zbijete skupaj, nanje pa povlečete vrv v mrežo 10 x 10 cm.
- Na terenu povlečete vrv v dolžini 10 metrov. Transekt naj sledi plastnicam ali pa naj bo pravokotno na plastnice. V nadaljevanju boste preverili, ali ima to kakšen vpliv.
- Začetna točka vzorčenja je na začetku vrvi, kamor postavite leseno mrežo 1 x 1 m ter popišete število posameznih izbranih osebkov (marjetice, regrat, trpotci, zlata rozga ...). Podatke zabeležite.
- Nato mrežo premaknite po transektu za 3 m in vajo ponovite.
- Po opravljenih meritvah ponovno premaknite mrežo za 3 m in vajo ponovite.
- Izračunajte gostoto.
- Rezultate primerjajte med seboj.

REZULTATI

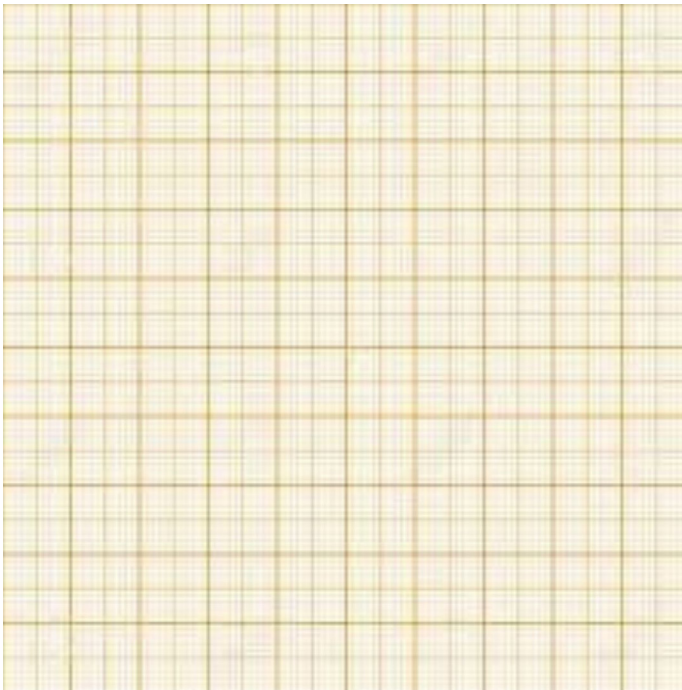
Tabela 36: Osnovni podatki gostote izbrane rastlinske vrste

Ime in priimek vzorčevalca	Datum
Vreme	Velikost opazovanega rastišča
Opis rastišča	Nadmorska višina Koordinate

**REZULTATI**

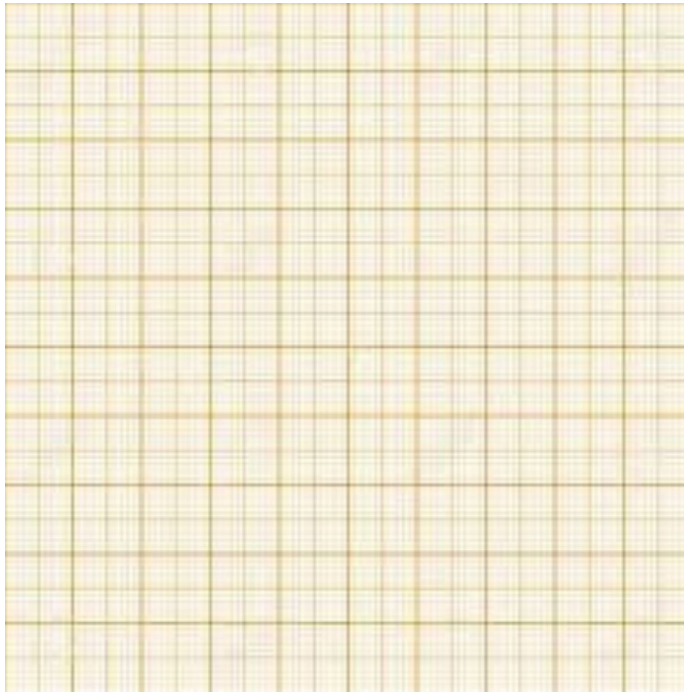
Izračun gostote

Slika 33: Popis osebkov na vzorčni ploskvi za določitev gostote



Izračun gostote

Slika 34: Popis osebkov na vzorčni ploskvi za določitev gostote

**REZULTATI**

Izračun gostote

Slika 35: Popis osebkov na vzorčni ploskvi za določitev gostote**NALOGE**

1. Kaj se dogaja z gostoto?
2. Kakšna je povprečna vrednost izmerjene gostote?
3. Ali lahko povprečno vrednost posplošimo za celotno območje, odgovor obrazložite.
4. Od česa je odvisna gostota izbrane vrste?

3.5 Vzorčenje gozda

Pri vajah bomo tudi mi izvedli del gozdne inventure. Dolgoročno bomo lahko spremljali vpliv podnebnih sprememb in človekovega delovanja na izbranem območju.



PRAKTIČNA VAJA

Popis osnovnih podatkov vzorčnega mesta gozdne inventure

MATERIAL IN PRIPOMOČKI

- meter

METODA DELA

- Gozdno inventuro pričnite s popisom osnovnih podatkov na izbrani lokaciji.
- Ko opravite vpogled v gozd, se osredotočite na popis znakov, ki so povezani s posameznim drevesom. Naključno sistematično izberite 10 dreves in popišite lastnosti. Podatke zabeležite v tabelo (Glejte naprej.)
- Izračunajte povprečje obsega dreves in določite razvojno fazo gozda.

REZULTATI

Tabela 37: Osnovni podatki vzorčnega mesta gozdne inventure¹⁵

1.	Lokacija GPS-koordinate	Ime in priimek popisovalca	Datum Ura	Vreme Vidljivost a. normalna b. poslabšana
2.	Podatki o gozdu	Lastništvo 1- državno 2- zasebno 3- neznano 4- lokalne skupnosti * podatkovna zbirka Zavoda za gozdove Slovenije	Relief 1- ravnina 2- vrh hriba, greben 3- dno kotanje 4- pobočje 5- konveksni prelom pobočja 6- konkavni prelom pobočja 7- jarek	
3.	Skalovitost in kamnitost	Skalovitost je delež površine, ki ga zavzemajo skale – kos matične kamnine večji kot 30cm*30cm*30cm. 1- brez skal 2- posamične skale < 5 % 3- majhna skalovitost: 5-26 % 4- srednja skalovitost: 26–50 % 5- velika skalovitost: 51 – 76 % 6- izjemna skalovitost > 76 %	Kamnitost je delež površine, ki ga zavzema kamenje – kos matične kamnine manjši kot 30cm*30cm*30cm. 1- brez kamnov 2- posamični kamni < 5 % 3- majhna kamnitost: 5-26 % 4- srednja kamnitost: 26 – 50 % 5- velika kamnitost: 5 –76 % 6- izjemna kamnitost > 76 %	

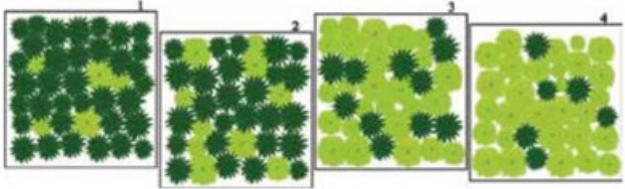



REZULTATI

<p>4.</p>	<p>Slojevitost sestoja - združba</p>	<p>1 in 2- prebiralna 3 – enakomerna (visoki gozd) 4 in 5 – raznodobna 6 – dvoslojna 7 – panjevec 8 – grmičast gozd</p>
<p>5.</p>	<p>Razvojna faza gozda</p> <p>Debeljak – 100 dreves/ha</p> <p>* Na kateri višini se meri obseg gozda?</p>	<p>1 – mladovje – obseg manj kot 31 cm 2 – tanjši drogovnjak – 31 cm < obseg < 62 cm 3 – močnejši drigovnjak – 62 cm < obseg < 94 cm 4 – tanjši debeljak – 94 cm < obseg < 126 cm 5 – srednji debeljak – 126 cm < obseg < 157 cm 6 – močnejši debeljak- obseg več kot 157 cm</p>
<p>6.</p>	<p>Bodi pozoren, kako meriš obseg drevesa.</p>	



REZULTATI

7.	Mešanost sestoja	<p>* Mešanost sestoja je opredeljena kot pokrovnost iglavcev oz. listavcev v strehi sestoja.</p> <p>iglavci – $P_{igl} > 75 \%$ iglavci z listavci – $50\% < P_{igl} < 75 \%$ listavci z iglavci – $25\% < P_{igl} < 50 \%$ listavci- $P_{igl} < 25 \%$</p> 
8.	Socialni položaj drevesa	<p>1 – nadvladajoče drevo; izjemno razvita krošnja, močno nad sestojno streho</p> <p>2 – vladajoče drevo; dobro razvita krošnja, v vrhu sestojne strehe</p> <p>3 – sovladajoče drevo; nekoliko slabše razvita krošnja, spodnji del sestojne strehe</p> <p>4 – potisnjeno in obvladovano drevo – utesnjeno z več strani, porinjeno v spodnji del sestojne strehe</p> <p>5 – podstojno drevo – pogosto brez možnosti socialnega vzpona in odmrlo prej kot ostala drevesa</p> 



REZULTATI

Tabela 38: Popis značilnosti 10 dreves na naključno izbrani točki gozda

	Vrste	Obseg	Približna starost (obseg = cm / 1,5 cm)	Socialni položaj drevesa	Osutost, porumenelost
1.					
2.					
3.					
4.					
5.					
6.					
7.					
8.					
9.					
10.					

Izračun povprečja obsega 10 dreves: _____

Razvojna faza gozda je (Glejte 6. točko.) _____

Kaj se bo zgodilo s tem gozdom v prihodnosti?
(Pogovor o trajnostni tehnici: sonaravno gospodarjenje z gozdom/posekom in vprašanje dobička)



NALOGE

Oglejte si film: Ugriznimo znanost – Gozdna inventura: <https://4d.rtvsllo.si/arhiv/ugriznimo-znanost/174595305> in odgovorite na vprašanja.

1. Koliko dreves imamo v Sloveniji (skupaj bukve, smreke, jelke, hrast)?
2. V katerih letih se je izvedla moderna inventura gozda (4-krat)?
3. Kako smo določili vzorčne ploskve in koliko jih je? Koliko jih leži v gozdu in so bile na koncu dejansko vzorčene? Koliko od njih je nedostopnih- kje ležijo in kaj storiti v tem primeru?
4. Kako smo iz rezultatov vzorčenja prišli do rezultatov za celotno Slovenijo?
5. Kaj vse morajo popisati tisti, ki izvajajo monitoring? Naštejte posamezne kategorije.
6. Na kaj bodo rezultati vplivali?



PRAKTIČNA VAJA

Popis znakov, ki so vezani na odmrlo maso

V gozdu mora biti vedno vsaj 5 % odmrle biomase. V to skupino uvrščamo:

- ležeče odmrlo drevo,
- štrleče odmrlo drevo – sušico,
- panj ali štor ...

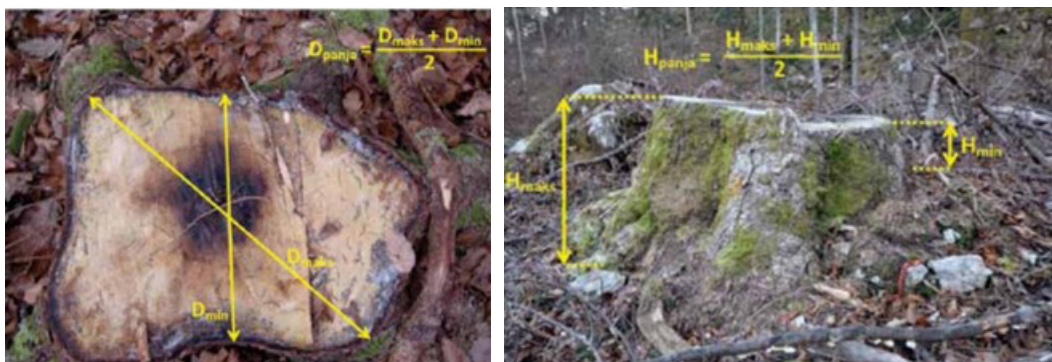
Štor se meri, če je srednji premer večji kot 10 cm in njegova višina večja kot 20 cm.

MATERIAL IN PRIPOMOČKI

- meter
- štori dreves

METODA DELA

- V naravi najdete 3 štorje in jih izmerite po principu kot kaže spodnja slika.



Slika 36: Meritve panja za izračun odmrle biomase¹⁶

- Rezultate meritev vpišite v spodnjo tabelo.
- Najdite tudi posekano ali padlo deblo. Fotografirajte ga in na posnetku **označite: skorjo, živo lubje, beljavo, črnjavo, stržen, braniko in letnico.**

Pri označbi si pomagajte s Sliko 37.

- Deblu izmerite osnovne meritve in ocenite starost debla.



Mlajši deli lesa so BELI, zato jih imenujemo BELJAVA. Deli so mokri, saj se po njih pretaka voda z anorganskimi snovmi.

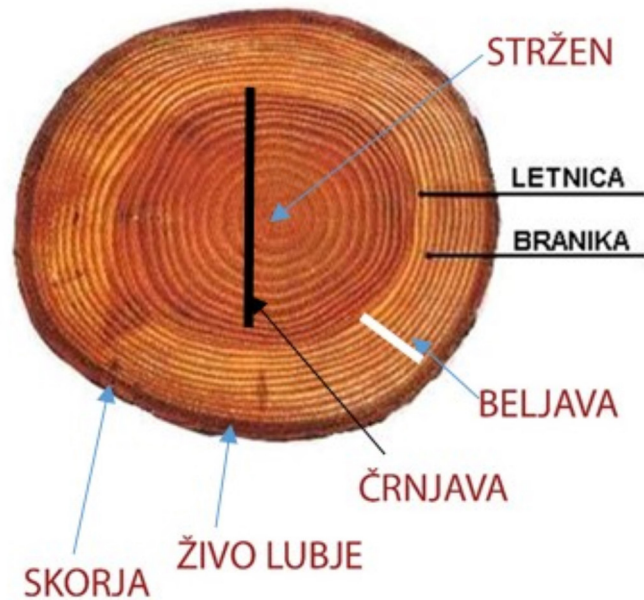
Starejši deli so TEMNEJŠI, zato jim pravimo ČRNJAVA. Ne prevajajo več snovi, temveč le dajejo oporo. Po navadi vsebujejo tudi OBRAMBNE SNOVI, ki so temnejše obarvane.

BRANIKA je pas lesa, ki priraste v eni vegetacijski dobi (v enem letu). Najbolj nov je les, ki leži tik pod lubjem.

Spomladi, ko je rast bujnejša, nastaja redkejši les, ki je bolj svetel.

Pozno poleti in jeseni se rast ustavi, takrat je les bolj gost in temnejše barve- to vidimo kot značilno črto, ki loči braniko od branike – LETNICA.

Branike so različno široke. Tako vemo, katero leto je bilo sušno (ožje branike) in v katerem je bilo vode dovolj (širše branike).



Slika 37: Prečni prerez debla z označenimi deli¹⁷

REZULTATI

Tabela 39: Meritve panja za izračun odmrle biomase

	1. panj	2. panj	3. panj
srednji premer			
srednja višina			



REZULTATI

Tabela 40: Osnovne meritve debla in določitev starosti

Premer debla je _____ cm

Obseg debla je _____ cm

Starost debla

- po letnicah: _____

- po izračunu:

obseg na 1,3m (v cm) /1,5 cm =

Na deblu najdete tudi:

- 1. rojstni dan drevesa.

To je _____ na drevesu.

- braniko drevesa, ki nakazuje vašo starost.

To je _____ na drevesu.

- braniko, ki nakazuje abrahama.

To je _____ na drevesu.

- leto, ko se je začela 2. svetovna vojna.

To je _____ na drevesu.

NALOGE

1. Oglejte si filma o podnebnih spremembah v gozdu;
<https://4d.rtvsllo.si/arhiv/dokumentarni-filmi-in-oddaje-izobrazevalni-program/174685900>
2. V dnevnik zapišite povzetke videnega.
3. Kako se kažejo podnebne spremembe v slov. gozdovih? Naštejte jih in obrazložite.
4. Navedite ukrepe/odzive.
5. Obrazložite, kakšno je sonaravno gospodarjenje z gozdom.

4 ŽIVALSKI KAZALNIKI

4.1 Spremljanje stanja ptic okoli nas

Ptice so naravni regulatorji škodljivcev. Njihovo ohranjanje je bistveno za ohranjanje ekosistemskih storitev narave. Hkrati so tudi pokazateljice ekološkega stanja okolja.

V zimskem času se pogosto ugotavlja število najpogostejših vrtnih ptic v naši bližini z metodo neposrednega štetja.



PRAKTIČNA VAJA

Spremljanje stanja ptic okoli nas

MATERIAL IN PRIPOMOČKI

- opazovalni karton
- mobilni telefon
- beležka
- fotoaparatuspektiv
- nevpadljiva obleka
- daljnogled

METODA DELA

- Popis ptic boste izvedli v dveh korakih.
 - o V prvem tednu pred glavnim opazovanjem boste izbirali pravi čas vzorčenja in lokacijo ter poskušali določiti prevladujoče vrste. Pri tem lahko vrste fotografirate ali skicirate. To bodo vaše začetne ptice.
 - o V drugem tednu boste izvedli glavno opazovanje. **(Glejte časovnico DOPPS-a.)**
- Najprimernejši čas opazovanja je v intervalu prvih treh ur po sončnem vzhodu in zvečer (tudi čas najintenzivnejšega oglašanja).
- Vaši gibi pri opazovanju naj bodo umirjeni in počasni.
- Okolico opazujete vsaj pol ure in si zabeležite vse ptice, ki jih opazite.
- Na vzorčnem mestu bodite pozorni na:
 - o **barvo**: barva na posameznih delih telesa, vzorci – glava, rep, peruti,
 - o **velikost**: za primerjavo vzamete vam znano ptico npr. velikost kosa,
 - o **obliko** telesa in kljuna,
 - o **vedenje** ptice: se premika po tleh ali v krošnji, poskakuje, kako leti, je sama ali v jati.
- Pri identifikaciji ptice si pomagajte s skico ali fotografijo.



- Pri popisu ptic si lahko pomagate tudi:
 - z letakom za opazovanje:
https://www.ptice.si/wp-content/uploads/2016/01/ptice_okoli_nas_letak_splosen.pdf,
 - z določevalnim kotičkom:
<https://www.ptice.si/ptice-in-ljudje/opazovanje-ptic/dolocevalni-koticek/>,
 - s koristnimi nasveti: https://www.ptice.si/wp-content/uploads/2014/03/brosure_2016_ptice_slovenije_mali_prirocnik.pdf.
- Ptice določamo tudi po **petju in oglašanju**, pri čemer si lahko pomagate s posnetki.
Ključ za določanje vrtnih ptic po oglašanju
- V rezultate prilepite zemljevid, kjer naj bodo označena mesta vzorčevalca in lokacija spremljanja. Ne pozabite na merilo zemljevida in legendo.
- Podatke o popisu ptic vnesite na spodnji obrazec, lahko pa jih vnesete tudi v spletni obrazec, ki ga najdete na: <https://www.ptice.si/oznaka/ptice-okoli-doma/>
- Tri najpogosteje opažene ptice podrobneje opišite v tabeli.

REZULTATI

Posnetek zemljevida vzorčne ploskve za popis ptic



REZULTATI

Tabela 41: Primerjava prvega in drugega popisa ptic

	1. teden opazovanja	2. teden opazovanja
datum opazovanja		
ura:		
lokacija (kraj/ npr. krmilnica pred hišo)		
habitatni tip		
vrsta ptic/število		
skupaj vseh ptic		

Tabela 42: Podrobnejši popis opazovanih lastnosti ptic

Opazovane vrste ptic	Vrsta	Vrsta	Vrsta
čas opazovanja			
barva			
velikost: v primerjavi s kosom			
oblika telesa			
oblika kljuna			
vedenje ptice			
način oglašanja			

4.2 Vzorčenje dvoživk

Dvoživke so pomembni ekološki kazalniki stanja okolja, saj so zelo občutljive na okoljske spremembe, so dobro poznane in splošno razširjene.

S poznavanjem njihovih bioloških in ekoloških značilnosti lažje izvedemo populacijski monitoring ali monitoring razširjenosti. Na podlagi dobljenih rezultatov lahko sklepamo o varstvenih usmeritvah.



NALOGE

1. Za varstvo dvoživk danes uporabljamo usmeritveno ograjo proti podhodu. Navedite značilnosti take gradnje.
















Usmeritvena ograja	Podhod

2. Dvoživke delimo na dve skupini, navedite njihove značilnosti.

	Repate dvoživke	Nerepate dvoživke
prisotnost repa		
telo		
okončine		
gibanje		
oploditev		

3. Katere dvoživke smo dolžni spremljati po Habitatni direktivi?
4. S pomočjo določevalnega ključa na spletni strani: <https://www.lifeamphicon.eu/wp-content/uploads/2020/12/E.3-Določevalni-kljuc-dvozivk-Slovenije.pdf> določite do vrste natančno osebk v spodnji tabeli.

Tabela 43: Vrste dvoživk



PRAKTIČNA VAJA

Analiza mresta

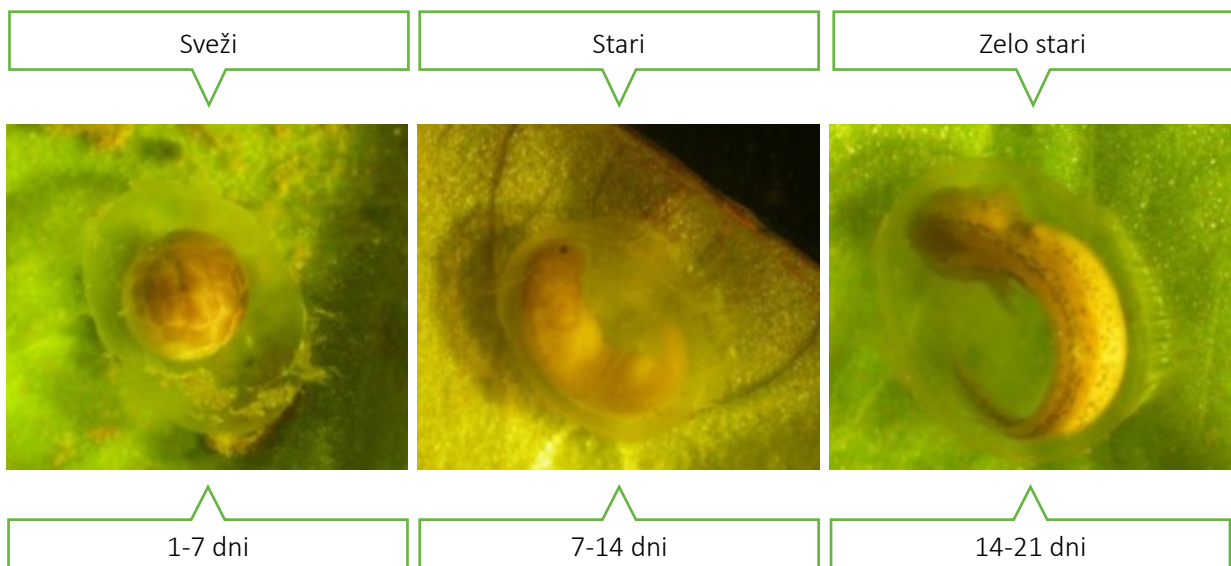
Štetje in analiza mresta dvoživk je splošno uporabljena tehnika za določitev prisotnosti vrst ter za spremljanje velikosti in razmnoževalnega trenda populacij dvoživk. Pri tem je zelo pomembno, da to izvajamo v času, ko je večina mresta odloženega in so je še dovolj svež, da je določitev vrste zanesljiva.

MATERIAL IN PRIPOMOČKI

- različne mreže na držalih
- banjice
- škornji in rezervne obleke

METODA DELA

- Poiščite vodonosnik (mlaka, kal, mrtvica ...) in pregledjte različne mikrohabitate. Pri tem izmerite osnovne parametre in jih vpišite v tabelo.
- Če najdete mrest, ga z mrežo ulovite in postavite v banjico, v nasprotnem primeru pa poiščite drug vodonosnik.
- S pomočjo določevalnega ključa določite do vrste natančno, rezultate pa zabeležite med rezultate.
- Poskusite določiti starost mresta glede na razvitost ploda, nato pa osebke vrnite nazaj v vodo.



Slika 38: Določevanje starosti mresta glede na razvitost ploda¹⁸



REZULTATI






Tabela 44: Osnovni podatki vzorčnega mesta mresta

Datum in čas vzorčenja		Vzorčevalec	
Vreme	T zraka T vode	Način vzorčenja: • transekt • točke	
Območje popisa	GPS-koordinate	Dolžina vzorčnega mesta	
Lokacija: • mlaka • tolmun • depresija • izvir • kolesnica • mrtvica • ribnik • bajer • _____	Tip substrata: • skale • beton • veliki kamni • prod • gramoz • pesek • mulj • glina	Brežina: • naravna • umetna	Povprečna globina vodnega telesa
Opis najdišča • prevladujoči rastlinski taksoni v 5-metrskem pasu od najdišča • vir onesnaženja in grožnje			
Fizikalno-kemijski parametri vode			
pH	el. prevodnost	raztopljen kisik	nitrat



REZULTATI

Tabela 45: Številčnost posameznega mresta na vzorčnem mestu¹⁹

Posnetek mresta	Vrsta	Številčnost	Starost mresta
	krastače dolge vrvice (6 m) 10–12000 jajčec marec-junij		
	urhi manjši skupki 15–30 jajc april-avgust		
	česnovke nitasti mrest nepravilno nameščenih jajčec marec-april		
	prave žabe večja kepa jajčec		
	rege majhna kepica do 100 jajc april-junij		



PRAKTIČNA VAJA

Analiza juvenilnih in odraslih dvoživk

V času selitve dvoživk na obremenjenih mestih postavljamo varovalne ograje. S tem preprečimo povoz žab. Prav na teh mestih se izvaja popis dvoživk in hkrati tudi varno selitev na drugo stran cestišča.

MATERIAL IN PRIPOMOČKI

- mreža
- fotoaparata (mobilni telefon)
- ključ za določanje (mrest, vrste)
- beli pladnji
- vzorčni lončki
- viscor kovček za analizo vode

METODA DELA

- Popis se izvede v razmnoževalnem obdobju – zgodaj spomladi.
- Na izbrani lokaciji opravite popis dvoživk. Izvedete popolno štetje osebkov z neselektivno metodo: neposredno štetje.
- Dvoživke ulovite z mrežo, jih narišite v zvezek, popišite in izpustite nazaj v naravo. Pri tem poskušate čim manj vznemirjati živali. Zelo pomembno je, da se dvoživke dotikate z vlažnimi rokami.
- Ko najdete primerke, poskušajte ugotoviti, ali gre za mlad ali star osebek, za dupleks (parček) ali posamezni osebek. Prav tako bodite potrpežljivi in poskušajte ujeti zvoke oglašanja.
- Na isti lokaciji izvedite tudi lov s pastmi tako, da na znani lokaciji prekinete selitveno pot s pastjo. Naslednji dan obvezno pogledajte ulov.



REZULTATI

Tabela 46: Osnovni podatki vzorčnega mesta vzorčenja dvoživk

Datum in čas vzorčenja		Vzorčevalec
Vreme	T zraka T vode	Način vzorčenja: • transekt • točke
Območje popisa	GPS-koordinate	Velikost vzorčnega mesta
Habitat		
Opis najdišča • prevladujoči rastlinski taksoni v 5-metrskem pasu od najdišča • vir onesnaženja in grožnje		

**REZULTATI**

- Skice najdenih primerkov

vrsta starost oglašanje številčnost		
vrsta starost oglašanje številčnost		

**NALOGE**

1. V literaturi preglejte vzorčne lokacije habitata laške žabe ali nižinskega, hribskega urha ter velikega pupka.
2. Kakšna je bila gostota dvoživk na hektar izbranega območja?

4.3 Vzorčenje bentoških nevretenčarjev

Bentoški nevretenčarji so biološki kazalniki kvalitete vode. Metoda temelji na različni občutljivosti vodnih nevretenčarjev na onesnaženje in na različni pestrosti njihovih združb. Prav tako kakovost vode kaže tudi pestrost drugih vodnih živali in rastlin, vendar se največkrat zanašamo prav na bioindikatorske vrste, saj so te najbolj občutljive na spremembe kakovosti vode. Biološka analiza vode je zanesljiva metoda, ki ne pokaže samo trenutnih rezultatov kakovosti, kot na primer kemijska analiza vode. Priporočljivo je, da izvajamo obe analizi hkrati, da dobimo čim bolj natančne rezultate.



PRAKTIČNA VAJA

Vzorčenje bentoških nevretenčarjev z mrežo

MATERIAL IN PRIPOMOČKI

- določevalni ključi
- mreža za vodne nevretenčarje
- kadičke
- lupe
- posodice s pokrovom
- etanol (za spravilo organizmov v učilnici, za kasnejšo analizo)

METODA DELA

- Na izbranem vzorčnem mestu izmerite dva transekta v dolžini 100 m.
- S pomočjo mreže vzorčite znotraj transekta tako, da preiščete čim več mikrohabitatov. To počnete tako, da greste proti toku.
- Nabrane vzorce prenesite v bele banjice.
- Iz banjice organizme sortirajte tako, da je vsaka vrsta v svoji embalaži.
- S pomočjo določevalnega ključa popišite in preštejte vse bentoške nevretenčarje.
- V rezultate zabeležite opravljene meritve.
- Izračunajte saprobni indeks vodnega telesa.
- Določite obremenjenost izbranega vodnega telesa.
- Po končani vaji nevretenčarje izpustite v naravo.

REZULTATI

Posnetek zemljevida vzorčne ploskve bentoških nevretenčarjev



REZULTATI

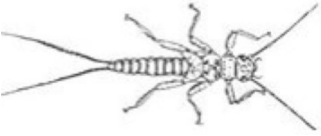







Tabela 47: Osnovni podatki vzorčnega mesta vzorčenja bentoških nevretenčarjev z mrežo

Datum in čas vzorčenja		Vzorčevalec
Vreme	T zraka T vode	Način vzorčenja: • transekt • točke
Območje popisa	GPS-koordinate	Velikost vzorčnega mesta
Habitat		
Opis najdišča • prevladujoči rastlinski taksoni v 5-metrskem pasu od najdišča • vir onesnaženja in grožnje		





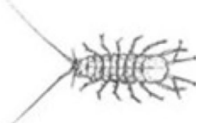
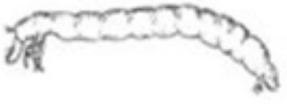



REZULTATI

Tabela 48: Popis bentoških nevretenčarjev s pomočjo mreže²⁰

Skupine	Število na prvi lokaciji	Število na drugi lokaciji
1. skupina: najobčutljivejša skupina na onesnaževanje		
ličinke vrbnic 		
ličinke enodnevnice 		
2. skupina: zmerno občutljiva na onesnaženje		
školjke 		
polži 		
potočni raki 		
mladoletnice 		
potočne postrance 		
ličinke kačjih pastirjev 		



REZULTATI

Skupine	Število na prvi lokaciji	Število na drugi lokaciji
3.skupina: tolerantna na onesnaženje		
ličinke komarja 		
pijavke 		
vodni osliček 		
ličinka trzače 		
4.skupina: najodpornejša na onesnaženje		
polž mlakar 		
tubifeksi 		
ličinke kalnice 		



REZULTATI

Tabela 49: Izračun saprobnega indeksa bentoških nevretenčarjev, ulovljenih z mrežo

Najdene živali	Število živali	Faktor	Zmnožek
ličinke vrbnic		x 1,3	=
sploščene in velike ličinke enodnevnice		x 1,5	=
okrogle in majhne ličinke enodnevnice		x 2,0	=
ličinke mladoletnic s hiškami		x 1,5	=
ličinke mladoletnic brez hišk		x 1,8	=
ličinke kačjih pastirjev		x 2,0	=
postranice		x 2,0	=
vodni oslički		x 2,7	=
pijavke		x 2,5	=
rdeče ličinke komarjev		x 3,3	=
rdeči maloščetinci		x 3,5	=
ličinke muh trepetavk		x 4,0	=
SKUPAJ =		SKUPAJ =	

Izračun saprobnega indeksa bentoških nevretenčarjev po obrazcu:

Vsoto stolpca *Zmnožek* delite z vsoto stolpca *Število živali*.

Vrednost saprobnega indeksa je _____

Tabela 50: Preglednica obremenjenosti vodnega ekosistema za saprobní indeks

1,0-1,4	1,5-2,2	2,3-2,6	2,7-3,1	3,2-4,0
neobremenjen	zmerno obremenjen	kritično obremenjen	močno obremenjen	prekomerno obremenjen

Obremenjenost raziskovanega vodnega telesa za saprobní indeks je

_____.



PRAKTIČNA VAJA

Vzorčenje bentoških nevretenčarjev s pastmi

MATERIAL IN PRIPOMOČKI

- določevalni ključi
- plastične vrečke za pomaranče in različni prodniki
- laks
- kadičke
- lupe
- posodice s pokrovom
- etanol (za spravilo organizmov v učilnici, za kasnejšo analizo)

METODA DELA

- V plastično vrečko za pomaranče dajte substrat (samo kamenje, kombinacija kamenje in les ali samo les).
- Vrečko na kraju dogajanja splahnite z vodo in nato položite v vodonosnik/vodotok na varno mesto (pazite na premočan vodni tok, sabotažo ...). Vrečke ne pozabite zavezati z laksom.
- Po 3 tednih vrečko prenesite v vedro in v laboratorij.
- Organizme iz vedra sortirajte tako, da je vsaka vrsta v svoji embalaži.
- S pomočjo določevalnega ključa popišite in preštejte vse bentoške nevretenčarje.
- Vzorec dobro raziščite in dobljene osebke označite v spodnji tabeli.
- Za posamezno skupino preštejte pestrost taksonov in pomnožite z nosilno vrednostjo taksonov (x 4, x 3, x 2 ali x 1).
- Vse štiri vrednosti seštejte in dobite indeks onesnaženosti vode.
- Po končani vaji nevretenčarje izpustite v naravo.

REZULTATI

Posnetek zemljevida vzorčne ploskve bentoških nevretenčarjev



PRAKTIČNA VAJA

REZULTATI

Tabela 51: Osnovni podatki vzorčnega mesta postavitve pasti za bentoške nevretenčarje

Datum postavitve	Datum odvzema	Vzorčevalec
Območje vzorčenja	GPS-koordinate	Temperatura vode
Lastnosti struge	Substrat	Obrežna vegetacija

Tabela 52: Prisotnost taksonov v pasti za bentoške nevretenčarje

1. skupina		2. skupina		3. skupina		4. skupina	
	vrbnica		kačji pastir		pijavka		vodni črvi
	enodnevnica		postranica		vrtničar		kalnice
	desnosučni polži		školjka		vodni osliček		levosučni polži
			potočni rak		rdeči maloščetinci		trepetalke
			mladoletnica		trzače		
	Vsota taksonov		Vsota taksonov		Vsota taksonov		Vsota taksonov
	X 4		X 3		X 2		X 1

Tabela 53: Preglednica onesnaženosti vodnega ekosistema

23 ali več	17-22	11-16	5-10	0-4
neobremenjen	zmerno obremenjen	kritično obremenjen	močno obremenjen	prekomerno obremenjen

Stopnja onesnaženosti izbranega vodnega telesa je _____.



NALOGE

1. Ali bomo dobili enak rezultat, če bentoške nevretenčarje lovimo z mrežo ali s pastmi? Odgovor utemeljite.
2. Kaj menite, ali substrat v pasti vpliva na biotsko pestrost? Odgovor utemeljite.

4.4 Vzorčenje talne favne

Vedno bolj se zavedamo, da je pestrost talne favne v prehranjevalnih spletih pomembna. Velika pestrost povečuje rodovitnost tal, omogoča lažje in hitrejše kroženje geokemijskih snovi in ohranja samočistilno sposobnost tal.

Tabela 54: Vpliv lastnosti tal na talno favno

Značilnost tal	Organizmi	Primer organizma
1. Visoka gostota	Mikroskopske dimenzije, burniranje okončin, zmožnost spreminjanja debeline telesa, močni sekalci, zaokrožena oblika črvičastega telesa	Alge, glive, protozoi, bakterije, krtice, medvedi, podzemni črvi, ličinke žuželk, melipede
2. Grudasta struktura	Močne in prožne prevleke telesa (zaščita pred poškodbami)	Hrošči, klopi, mravlje
3. Pomankanje svetlobe v skoraj vseh obzorjih	Zmanjšanje vidnih organov, izginitje pigmentacije (barve) pri nekaterih rastlinah in živalih	Moli, krtne podgane, mikroorganizmi
4. Vdolbine, napolnjene s plini in raztopinami	Prisotnost goste, za vodo neprepustne in plinske lupine- kutikule	Talne žuželke
5. Pomankanje kisika, presežek ogljikovega dioksida	Dihanje kože (uporaba zraka, raztopljenega v vodi)	Deževniki, ličinke žuželk, in drugi nevretenčarji
6. Veliko število mrtvih organizmov	Razvoj saprofagije- prehrana z razpadlimi ostanki	Deževniki, bakterije, glive

Določevanje talne favne s pastmi je:

- primerno za nevretenčarje, ki lazijo po površini,
- učinkovitost lova je povečana z vabo – gnilo meso v vabi,
- boljše je, če v past damo fiksirno tekočino (NaCl, etanol).

PRAKTIČNA VAJA

Vzorčenje talne favne

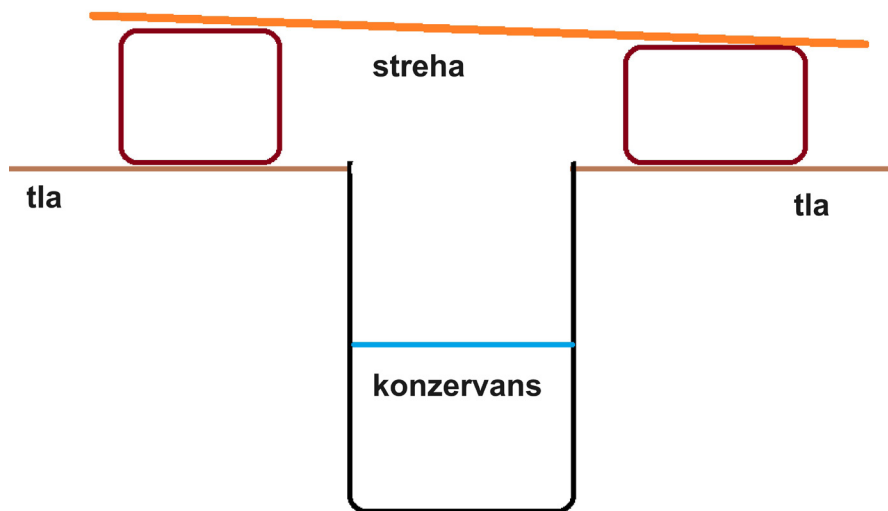
MATERIAL IN PRIPOMOČKI

- ustrezno velika posoda, lonček
- vrhnja zaščita na posodi – pred dežjem
- orodje za izkop – manjša motika
- fiksativ (kis)

METODA DELA

- Pripravili boste Barberjeve talne pasti, ki so primerne za organizme, ki lezejo po površini tal.
- V posodo dodajte atraktant in konzervans (kis, vino, etanol ... gnilo meso, salamo ...).
- Izberite si primerno lokacijo in posodo zakopljite v tla. Nanjo postavite zaščito pred plenilci ali dežjem, kot kaže Slika 39.





Slika 39: Barberjeva talna past

- Po 24 urah pregledajte pasti. Organizme poskusite določiti s pomočjo lupe ali mikroskopa.
- Narišite skice organizmov in zabeležite njihovo številčnost.

REZULTATI

Tabela 55: Osnovne lastnosti območja talnih pasti

Datum in čas vzorčenja		Vzorčevalec
Vreme	T zraka	Čas izpostavljenosti
Območje	GPS-koordinate	Habitat

- Posnetek zemljevida lokacije talnih pasti

**REZULTATI**

- Skice organizmov in njihova številčnost

**NALOGE**

1. Zakaj je pomembno, da postavimo nad talnimi pastmi še streho?
2. Zakaj je pomembno, da v past postavimo konzervans?
3. Zakaj je pomembno, kakšen atraktant bomo uporabili?



PRAKTIČNA VAJA

Določevanje talne favne v substratu z lijakom

Organski substrat na tleh skriva v sebi ogromno različnih vrst: od producentov, potrošnikov do razkrojevalcev. Določene organizme na terenu težko opazimo, saj moramo uporabiti lupo ali mikroskop. Nabiranje tovrstnih vzorcev si bomo pogledali z današnjo vajo.

MATERIAL IN PRIPOMOČKI

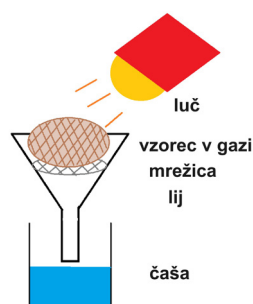
- gaza
- lij
- kovinska mrežica
- 10-centimetrska cev s sponko
- čaša z etanolom
- svetilka
- alu folija
- vzorec zemlje

METODA DELA

- Najboljši vzorec tal je iz O horizonta. Globlje kot greste, manj bo talnih organizmov. Zato naberite humusno zemljo.
- Vzorec tal zavežite v gazo.
- Gazo postavite na mrežico, ki je v lijku. Lij pripnete na stojalo s prižemo.

Tullgrenov suhi lijak

- Pod lijem postavite čašo z etanolom.



Bermannov mikro lijak

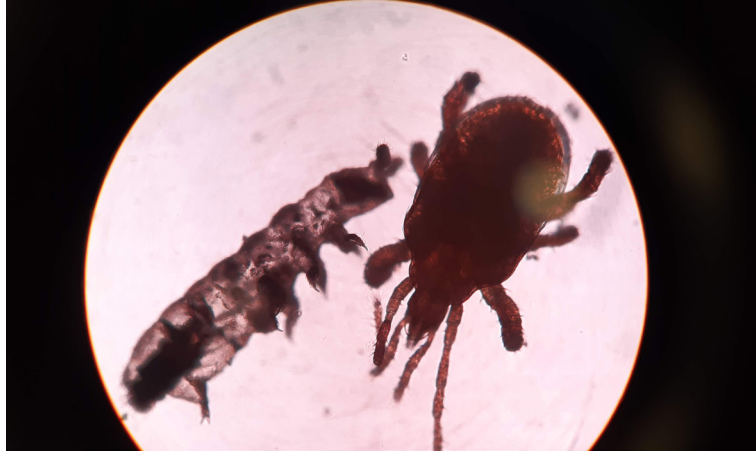
- Na lij namestite cev s sponko.
- V lij nalijte fiziološko tekočino tako, da se dotika gaze.



- Nad gazo postavite svetilko, ki jo ovijete z alu folijo. Tako bo toplota usmerjena v vaš vzorec.
- Po enem tednu pregledajte, kaj se je ujelo v čaši oziroma v cevi.



- Pod mikroskopom ali lupo poiščite talne organizme in jih narišite ali fotografirajte.



Slika 40: Talni organizmi pod mikroskopom

- Z določevalnimi ključi poskusite določiti organizme čim bolj natančno.

REZULTATI

Tabela 56: Osnovne lastnosti tal

Datum in čas vzorčenja		Vzorčevalec
Vreme	T zraka	Način vzorčenja: <ul style="list-style-type: none"> • transekt • točke
Območje popisa	GPS-koordinate	Velikost vzorčnega mesta

- Posnetek zemljevida vzorčnega mesta



REZULTATI

- Fotografije ali slike talnih organizmov







NALOGE

1. Na spletu poiščite, kateri organizmi živijo v tleh.
2. Zgoraj navedene organizme razvrstite med stalne in začasne prebivalce tal.
3. Skozi čas so se talne živali prilagodile na lastnosti tal. Navedite nekaj prilagoditev.

5 TUJERODNE VRSTE

Ocenjuje se, da postane invazivnih približno en odstotek tujerodnih vrst, ki jih je človek hote ali nehote prinesel na neko območje.

Na slikah je prikazanih nekaj invazivnih vrst.

	
<p>japonski dresnik (<i>Fallopia japonica</i>)</p>	<p>žlezava nedotka (<i>Impatiens glandulifera</i>)</p>
	
<p>orjaška in kanadska zlata rozga (<i>Solidago gigantea</i> in <i>Solidago canadensis</i>)</p>	<p>pelinolistna žvrklja, ambrozija (<i>Ambrosia artemisiifolia</i>)</p>

Slika 41: Invazivne vrste²¹



PRAKTIČNA VAJA

Popis tujerodnih vrst

MATERIAL IN PRIPOMOČKI

- določevalni ključ na <https://www.tujerodne-vrste.info>
- rokavice
- meter

METODA DELA

- Na izbrani lokaciji popišite tujerodne vrste in jih zabeležite v tabelo.
- Izberite si štiri merilna mesta tako, da uporabite sistematično vzorčenje. Na lokacijah ovrednotite lastnosti po Kriteriju ocenjevanja vdora tujerodnih vrst (Glejte tabelo spodaj.).

REZULTATI

Tabela 57: Osnovni podatki o izbrani lokaciji

Ime in priimek popisovalca	
Datum popisa	
Koordinate lokacije in nadmorska višina	
Opišite ekosistem, kjer boste izvajali popis invazivnih vrst.	

Tabela 58: Kriterij ocenjevanja vdora tujerodnih vrst

A KRITERIJ OCENJEVANJA ŠTEVILČNOSTI POJAVLJANJA INVAZIVNIH VRST	0: opažena v okolici 1: posamič, verjetno prehodno ali le gojeno 2: raztreseno, verjetno ustaljeno 3: mestoma množično (vsaj z nekaj deset primerki, pri trajnicah primerki različne starosti) 4: splošno razširjeno in množično
B OCENA VELIKOSTI SESTOJA	MAJHEN SESTOJ – le posamične rastline (rdeči poganjki) SREDNJE VELIK SESTOJ – nekaj m ² velik sestoj ZELO VELIK SESTOJ – več kot 100 m ²
C KRITERIJ OCENJEVANJA VPLIVA INVAZIVNIH VRST NA AVTOHTONE VRSTE RASTLIN NA POSAMEZNEM POPISNEM MESTU	0: brez vpliva 1: vpliv invazivnih vrst rastline zanemarljiv 2: vpliv zmerno opazen pri pogostosti pojavljanja, velikosti rastlin ... 3: spremembe zelo vidne – celi sestoji rastlin
D ZDRAVSTVENO STANJE	1. rastline zdrave, brez pegavosti, brez sušečih se listov, brez znakov objedanja 2. pegavost, sušeči se listi 3. objedanje



REZULTATI

Tabela 59: Popis tujerodnih vrst na izbrani lokaciji

	Mesto 1 Koordinate				Mesto 2 Koordinate				Mesto 3 Koordinate				Mesto 4 Koordinate			
	a.	b.	c.	d.	a.	b.	c.	d.	a.	b.	c.	d.	a.	b.	c.	d.
japonski dresnik																
žlezava nedotika																
zlata rozga																
ambrozija																

NALOGE

1. Kaj so tujerodne vrste?
2. Na kakšen način so prišle v okolje?
3. Kaj so invazivne vrste?
4. Obkrožite in dopolnite, kaj je značilno za invazivne vrste rastlin?
 - Imajo MALO/VELIKO semen oz. plodov.
 - Semena se po zraku POČASI/HITRO razširjajo.
 - So za rast zelo _____ rastline: _____.
5. Naštete vzroke, zakaj so invazivne vrste problematične?
6. Kako vemo, da je določena vrsta invazivna?
7. Navedite nekaj metod zatiranja rastlinskih, živalskih in glivnih tujerodnih vrst.
8. Ali je smiselno zatiranje vseh tujerodnih vrst v naravi?

5.1 Herbarij

Iz opazovanih rastlin na travniku lahko izdelate tudi svojo knjigo rastlin oz. herbarij.

Herbarij je urejena in s podatki opremljena zbirka stisnjenih in posušenih rastlin ali delov rastlin. Strokovnjaki, kot so botaniki in klimatologi, z njihovo pomočjo opazujejo spremembe v rasti in razvoju rastlin skozi čas.



PRAKTIČNA VAJA

Izdelava herbarija

MATERIAL IN PRIPOMOČKI

- določevalni ključ
- vrečka za shranjevanje nabranih rastlin
- lopatka za lažje izkopavanje rastlin s koreninami
- zvezek in svinčnik
- pregibne herbarijske pole (risalni listi, ki jih prepogneš po sredini, da dobiš velikost A3)
- bele etikete
- dve trdi platnici in trak
- časopisni papir

METODA DELA

- Naberite 20 rastlin in jih pripravite za izdelavo herbarija.
- Na teren se odpravite v suhem in sončnem vremenu, saj se bodo takrat nabrane rastline hitreje posušile, cvetovi pa bodo najlepše odprti.
- Naberite le zdrave in nepoškodovane rastline s podzemnimi deli vred (koreninami, gomolji, čebulicami) in naj ne bodo večje od herbarijske pole.
- Rastline se hrani v vrečke.
- Rastline določite na terenu ali pa v učilnici, pri čemer si po potrebi pomagajte z laboratorijsko lupo.
- Rastline doma vložite med plasti časopisnega papirja in obtežite s težjimi predmeti (knjigami), da preprečite nastanek plesni ter zgladite nagubane liste.
- K vsaki rastlini dodajte listek s podatki o rastlini – herbarijsko etiketo. (Glejte Sliko 42.)
- Časopisni papir med rastlinami menjajte vsakih nekaj dni, dokler rastline niso suhe.
- Posušene rastline vstavite v pregibno herbarijsko polo. Za lažje sušenje čebulic jih vzdolžno prerežite na pol.
- Herbarij s posušeni rastlinami hranite v suhem prostoru.



ZNANSTVENO IME: *Ranunculus bulbosus*

SLOVENSKO IME: gomoljasta zlatica

LOKACIJA: SLO, Haloze, Leskovec

RASTIŠČE: suh travnik

DATUM: 9. 5. 2018

NABRAL IN DOLOČIL: Arnika Travniška

Slika 42: Herbarijski primerek²²

6 LITERATURA

- Artač, S. 2011. Biologija – Praktikum za terensko delo. Mohorjeva založba. Celovec, str. 40.
- Aryal, S. 2019. API (Analytical Profile Index) 20E Test – Procedure, Uses and Interpretation. Microbiology Info.com. <https://microbiologyinfo.com/api-20e-test/> (21. 2. 2021).
- Bacterial Colony Morphologies! PathElective. <https://www.pathelective.com/micromeded/bacterial-colony-morphologies> (19. 2. 2021).
- Basic Morphology. Canada's Arctic published by nonnow. <http://www.arctic.uoguelph.ca/cpl/organisms/plants/terrestrial/lichens/basicmorph.htm> (12. 2. 2021).
- Bizjak Mali, L. 2016. Gradivo za vaje pri predmetu biologija dvoživk. Izbirni predmet za študente 2. bolonjske stopnje. Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani. <https://repozitorij.uni-lj.si/Dokument.php?lang=slv&id=107800> (1. 2. 2021).
- Božič, M., Predin, R., Trehtar, M. 2018 Mikrobiologija. Delovni zvezek za mikrobiološke vaje. DZS. Ljubljana
- Brand. 2006. Whatman 6886-2512 GD/X 25 Syringe Filter. Amazon published by Brand. <https://www.amazon.com/Whatman-6886-2512-Syringe-Filter-Micron/dp/B000FN0NJA> (12. 2. 2021).
- Crawford, K in sod. 2016. Basic Practical Microbiology. A Manual published by Microbiology Society. <https://microbiologyonline.org/file/fa3f7a18b16eef6c8eb80069a17c4bcc.pdf> (19. 2. 2021).
- Fessenden, M. 2015. Here's What Happens When You Culture the Bacteria on an Eight – Year – Old's Hand: Lots of cooties grow. Smart News. <https://www.smithsonianmag.com/smart-news/what-happens-when-you-culture-bacteria-eight-year-olds-hand-180955528/> (21. 2. 2021).
- Ike. 2011. Interga: Modern Bunsen burners, vol. 1. Studylab published by Ike. <https://studylab.net/doc/18231667/modern-bunsen-burners> (12. 2. 2021).
- Kakšna je voda v mojem okolju? Ključ za hitro določevanje stopnje onesaženosti vode. Pedagoška fakulteta, Univerza v Ljubljani. <http://www.pef.uni-lj.si/narteh/narspi/pages/popoldne/popoldne3.html> (1. 2. 2021).
- Kovač, M. in sod. 2014. Monitoring gozdov in gozdnih ekosistemov – priročnik za terensko snemanje podatkov. Gozdarski inštitut Slovenije, Založba Silva Slovenika, 2014. http://eprints.gozdis.si/566/1/prirocnik_24.11.14varovan1.pdf Kovač% C4% 8D. pdf (2. 2. 2021).
- Les Animaux du sol. Svtweb published by Candusso. http://www.svtweb.net/cred/segpa/animaux_sol.htm (1. 2. 2021).
- Lichen, Fungus, cross section slide under the microscope view for education biology. 123RF published by Puntasit Choksawatdikorn. https://www.123rf.com/photo_137074051_lichen-fungus-cross-section-slide-under-the-microscope-view-for-education-biology-.html (12. 2. 2021).
- Life to Grasslands. Life Ohranjanje in upravljanje suhih travnišč v Vzhodni Sloveniji. Haloze. Slika Visokodebelni sadovnjak v Dobrni. <https://www.lifetograsslands.si/fotogalerija/haloze/>, <http://www.lifetograsslands.si/wp-content/uploads/2017/10/Program-delavnic-na-temo-suih-travi%C5%A1%C4%8D-%E2%80%93-za-tretje-triletje-osnovnih-%C5%A1ol.pdf> (2.2.2021)
- Oblike bakterij in sterilizacija. 2009. Portal za izobraževanje iz zdravstvene nege. <https://www.zdravstvena.info/vszi/oblike-bakterij-in-sterilizacija-koki-bacili-spiralne-bakterije-sterilizacija-fizikalna-sterilizacija-kemicna-sterilizacija/> (12. 2. 2021).
- Pintarest: Enviromental Education: Macroinvertebrate identification key.. Uploaded by Coal Creek Watershed Coalition. <https://www.pinterest.com/pin/376683956306794070/> (1. 2. 2021).
- Reynolds, J. 2020. Bacterial Colony Morfology. BiologyLibreText. https://bio.libretexts.org/Learning_Objects/Laboratory_Experiments/Microbiology_Labs/Microbiology_Labs_/08%3A_Bacterial_Colony_Morphology (19. 2. 2021).
- Root River and Wimmer Wetland Earthcacher. Geocaching published by Hoppe2findyou. https://www.geocaching.com/geocache/GC1CDJZ_root-river-and-wimmer-wetland-earthcache?guid=4ee15246-5a6a-41a2-bc7b-c751d90a94d1 (12. 2. 2021).
- Rudolf, B. 2014. Spremembe v lišajski flori na Goriškem in preizkušanje interaktivnega določevalnega ključa. Diplomsko delo. <https://www2.ung.si/~library/diplome/OKOLJE/145Rudolf.pdf> (2.2.2021)
- Sanders, E.R. 2012. Aseptic Laboratory Techniques: Plant Methods. Jove Jurnal: Biology. <https://www.jove.com/t/3064/aseptic-laboratory-techniques-plating-methods> (12. 2. 2021).
- Škornik, S. 2019. Kazalniki za spremljanje dogajanja naravovarstvenih ciljev na vrstno bogastvo suhih travnišč v Sloveniji. Mednarodna konferenca – Izzivi in priložnosti multifunkcijskega upravljanja travnišč. Life to Grasslands published by Škornik. http://www.lifetograsslands.si/wp-content/uploads/2018/07/Skornik_presentation.pdf (2. 2. 2021).
- The Microbial World – Presentation transcript. SlidPlayer published by Sage Maul. <https://slideplayer.com/slide/4171360/> (2. 2. 2021).
- University of Wisconsin – Extension in cooperation with the Wisconsin Dept. Of Natural Resources.
- Vall, de Tim. Microscope Diagram Labeled, Unlabeled and Blank, Parts of a Microscope. Tim's Printtables published by Tim van de Vall. <https://www.timvandevall.com/microscope-diagram-parts-of-a-microscope/> (12. 2. 2021).
- Vovk Krože, A. in sod..2021. Delovni zvezek za poletno šolo. Ekoremediacije v jugovzhodni Sloveniji. <https://www.rc-nm.si/wp-content/uploads/2017/02/JVS-DELOVNI-ZVEZEK.pdf>

7 PRILOGE

Priloga 1: Mejne vrednosti mikroorganizmov v različnih vzorcih voda

Vzorec	Mikroorganizem	Število celic
pitna voda iz vodovoda	totalne koliformne bakterije	0/100 ml vzorca
	fekalne koliformne bakterije	0/100 ml vzorca
	<i>E. coli</i>	0/100 ml vzorca
ustekleničena pitna voda	totalne koliformne bakterije	0/100 ml vzorca
	fekalne koliformne bakterije	0/100 ml vzorca
	<i>E. coli</i>	0/100 ml vzorca
	preštete mikrobne kolonije pri inkubaciji 22 °C	100/ml
	preštete mikrobne kolonije pri inkubaciji 37 °C	20/ml
kopalni bazeni	totalne koliformne bakterije	<10/100 ml vzorca
	<i>E. coli</i>	0/100 ml vzorca
	preštete mikrobne kolonije pri inkubaciji 37 °C	<100/ml
kopalna voda na plaži (morje, reke, jezera)	totalne koliformne bakterije	<10 000/100 ml vzorca
	fekalne koliformne bakterije	<2 000/100 ml vzorca
	<i>E. coli</i>	<500/100 ml vzorca

Priloga 2: Ovitek lišajskega herbarija

Lišajski herbarij

Ime vrste:

Tip steljke:

Lokacija najdbe:

Substrat:

Habitatni tip:

Raziskovalec:

Leto najdbe:

8 VIRI SLIK

Whatman, 2006. Syringe Filter Collection. Superior performance and choice. GE Healthcare Life Sciences. Printtables published by Fisher Scientific.

https://beta-static.fishersci.com/content/dam/fishersci/en_US/documents/programs/scientific/brochures-and-catalogs/brochures/ge-healthcare-whatman-syringe-filter-collection-brochure.pdf (8. 10. 2023).

https://www.ckff.si/projekti/interreg/dvozivke_salamandra_salamandra.php (24.10.2023)

<https://www.gov.si/zbirke/seznami/seznam-invazivnih-tujerodnih-vrst-rastlin-in-zivali/zlezava-nedotika-lat-impatiens-glandulifera/>

<https://www.tujerodne-vrste.info/vrste/>

<https://zrsvn-varstvonarave.si/odstranjevanje-invativnih-tujerodnih-vrst-na-bobovku-pri-kranju/>

