

MIKROBIOLOGIJA

Uvod

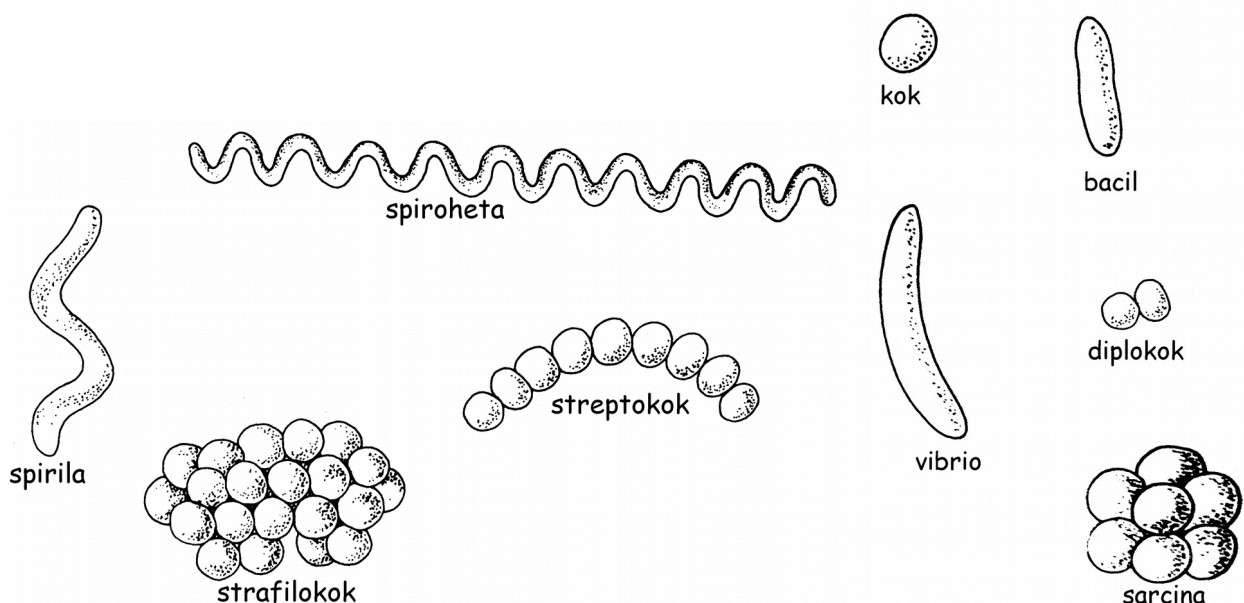
Bakterije

Bakterije (znanstveno ime »*Bacteria*«) ali cepljivke so prokarioti s celično steno iz mureina. S prostim očesom so nevidne, razen ko so združene v kolonije - velike skupine (več trilionov) klonov prvotne celice, ki ostanejo na istem mestu. So kozmopoliti (*kozmoplit* = organizem, ki je ekološko gledano generalist, sposoben preživeti v zelo raznolikih okoljih), najdemo jih skoraj povsod, celo v vročih vrelih in v ledenikih, kjer si življenje zaradi ekstremnih razmer težko predstavljamo. V neugodnih razmerah številne bakterije tvorijo endospore. To so obstojne celice oz. stadij, ki se razvijejo znotraj aktivne celice. Zgrajene so iz majhne količine citoplazme, molekule DNK in debele celične stene.

DNK bakterij ni razpršena v citoplazmi, temveč je urejena v obliki kroglastega nukleoida (genofora), ki ni obdan z jedro ovojnico. Poleg v nukleoidu je dednina še plazmidu. Delijo se s cepitvijo. Preprosta zgradba, majhnost in enostavna delitev jim omogočajo zelo hitro razmnoževanje, kadar so za to ugodne razmere. Spolnega razmnoževanja pri bakterijah ne poznamo. Kljub temu se tudi pri njih dedni zapis različnih osebkov med seboj kombinirajo, tako da deli molekule DNK prehajajo iz ene celice v drugo, marsikdaj tudi med nesorodnimi vrstami. Tak način rekombiniranja dednega materiala imenujemo parasexualno/paspolno razmnoževanje.

Nomenklatura bakterij je podobno kot pri rastlinah in živalih, zasnoval jo je C. Linné (1707-1778) in je binominalna, grško-latinska. Imena vseh taksonov nad ravni vrste so enoimenska, pisana z veliko začetnico. Imena rodov so enoimenska, pisana z veliko začetnico. Vrstna imena so dvoimenska, sestavljena iz imena rodu in vrstnega pridevka za oznako vrste, na koncu sledi kratica avtorja imena. Imena taksonov pod ravni vrste so troimenska, pišejo se z malo začetnico. Poimenovanje bakterij ureja Kodeks poimenovanja bakterij (Code of Nomenclature of Bacteria (ICNB)).

Oblike bakterij



Grampozitivne in gramnegativne bakterije

Bakterije razvrščamo glede na barvanje po Gramu na gramnegativne in grampozitivne. Če se celična stena obarva z anilinskim modrilom so grampozitivne, če ne pa gramnegativne. Pri skupinah brez celične stene ta kriterij ne moremo uporabiti.

Celotna skupina grampozitivnih bakterij (*Posibacteriota*) nima sposobnosti fotosinteze. Pri bacilastih oblikah te skupine je poznana tvorba endospor. Večplastni mureinski sakulus, ki predstavlja 30 do 70 % suhe snovi celične stene se z anilinskim barvilom trajno obarva. Sistem grampozitivnih bakterij je v celoti umeten in temelji na morfoloških oblikah celic.

Pri gramnegativnih bakterijah (*Negibacteriota*) je mureinski sakulus tanek, enoplasten in predstavlja le 10 % suhe snovi celične stene. Anilinsko barvilo se zato pri barvanju zlahka spere iz stene. Po energetski preskrbi so kemotrofi in fotoavtotrofi. Za razliko od grampozitivnih bakterij so nekatere sposobne fotosinteze, pri kateri pa **ne** nastaja kisik kot pri evkariontskih fotoavtotrofih in cianobakterijah. Sistematika skupine je še v razvoju, trenutni sistem je delno umeten – po morfologiji celic in načinu presnove in delno filogenetski glede na sorodnost v zgradbi DNK in tRNK.

Kako se izognemo bakterijam

Razkuževanje (dezinfekcija) je postopek, pri katerem uničimo aktivne bakterije (ne uničimo endospor!), ki povzročajo bolezni, z razkužilom (kemikalijami). Je temeljni higienski ukrep, ki se uporablja tako v industriji, gostinstvu, turizmu kot v gospodinjstvu.

Pasterizacija je postopek toplotne obdelave živila, s katerim zmanjšamo število mikroorganizmov. Uporablja se predvsem v živilski industriji, pri živilih kot so mleko, pivo, sokovi ... Odmrejo bolj občutljivi mikrobi npr. patogeni, ostalim pa se zmanjša število do take stopnje, da se kvarjenje močno upočasni ali tudi prepreči.. Izvaja se pri različnih temperaturah in različno dolgo (manjša kot je temperatura, daljši je čas segrevanja).

Sterilizacija je postopek, pri katerem uničimo živost mikroorganizmov ali odstranimo vse žive celice in spore.

- vlažna toplota: uničenje mikrobov z razkrojem nukleinskih kislin, denaturacijo encimov in drugih beljakovin ter poškodbo celičnih membran.
- suha toplota: sterilizacijo z vročim zrakom, izvajamo jo v pečeh (sterilizatorjih) pri 140-170°C od 2 do 3 uri. Mikrobo uničimo z oksidacijo celičnih sestavin in denaturacijo beljakovin.
- avtoklaviranje: za sterilizacijo z vodno paro uporabljamo avtoklav, kjer lahko s povečanim tlakom dosežemo temperature nad 100°C.

Filtracija je postopek, ki se uporablja za zmanjševanje oz. odstranjevanje mikrobne populacije iz raztopin toplotno občutljivih snovi in plinov.

Antiseptiki so kemijska sredstva, ki preprečujejo infekcije tkiva

Aseptična tehnika je preprečevanje vstopa mikroorganizmov iz okolja.

Sevanje, ki je lahko ionizirajoče (delci (β ali elektroni) ali elektromagnetno sevanje (X ali γ žarki)) ali neionizirajoče (infrardeče, ultravijolično in ultrazvočno sevanje).

Druge metodo: zamrzovanje, izsušitev, sprememba pH, s plamenom, ...

Navodila za delo v mikrobiološkem laboratoriju

Delo v večini mikrobioloških laboratorijev zahteva uporabo živih organizmov, zato je aseptična tehnika pomembna tako zaradi osebne varnosti kot tudi zaradi varovanja okolja. Paziti moramo na to, da preprečimo okužbo z mikroorganizmi.

Osnovna pravila za delo v mikrobiološkem laboratoriju:

- Plašček in torb ne odlagamo na laboratorijske mize.
- Okna in vrata naj bodo med vajami zaprta.
- Na začetku in koncu vaj obrišemo mizo z dezinfekcijskim sredstvom.
- Ne odlagamo okuženega pribora na mizo, zanke prej prežarimo, pipete odlagamo v posode z razkužilom.
- Ob koncu vaje odložimo vse kulture in material na določeno mesto.
- Operemo si roke s tekočim milom pred in po vajah.
- Dolge lase si spnemo zadaj
- Pri delu v laboratoriju nosimo zaščitna oblačila, rokavice.
- V laboratoriju ne jemo in pijemo.
- Gojišč se ne dotikamo z rokami
- Za prenos uporabljamo bakteriološko zanko (ezo)

Gojišča

Za proučevanje biokemijskih in fizioloških lastnosti mikroorganizmov jih je potrebno gojiti v laboratoriju. Za to uporabljamo različna gojišča, pri čemer moramo poznati prehranske zahteve posameznega mikroorganizma in okoljske pogoje kot so pH, temperatura ter prisotnost oz. odsotnost kisika. Pogojem, ki so ustvarjeni na mikrobioloških gojiščih, rečemo optimalni pogoji. Hranljivi agar je sestavljen iz vode, soli, agarja (tj. posebna želatinasta snov iz azijskih alg Agar agar) – vira ogljikovih hidratov in bujona (mesnega ekstrakta) – vira beljakovin in aminokislin. Poznamo tudi krvni agar, ki ga uporabljajo v bolnicah.

Po fizikalnem stanju delimo gojišča v tekoča, poltrdna in trdna. Po obliki delimo gojišča na gojišča v petrijevki in poševna gojišča v epruveti.

Antibiogram

Tiste bakterije, ki povzročajo bolezni, imenujemo patogene. Zdravimo jih z antibiotiki (grško; *anti* – proti, *bios* – življenje). To je skupina zdravil proti bakterijam, ki bakterije premagujejo tako, da jih neposredno uničijo (baktericidni antibiotiki), ali preprečijo njihovo rast ali razmnoževanje (bakterostatični antibiotiki). Prvi odkriti antibiotik je bil penicilin, ki ga je odkril Alexander Fleming leta 1928.

Antibiogram je metoda, s katero ugotavljamo učinkovitost določenega antibiotika. Na območju, kjer deluje antibiotik, bakterij ni. To območje imenujemo cona inhibicije. Pri bolj učinkovitih antibiotikih je polmer te cone večji, pri manj učinkovitih pa manjši. Posamezne bakterije, ki jih najdemo v tem območju, so razvile rezistenco na ta antibiotik. Rezistenca bakterij na antibiotike je sposobnost bakterije, da sčasoma postane odporna na določeno vrsto antibiotika. Poglobljanje odpornosti bakterij proti antibiotikom je zaskrbljujoče dejstvo, vzrok le-tega pa je v množični uporabi antibiotikov v medicini in veterini. Antibiotike ne smemo pretirano uporabljati tudi zato, ker nam uničijo črevesno floro.

Namen in cilji

Cilji vaje:

- da spoznamo, da se bakterije nahajajo povsod okoli nas
- ugotavljanje, kje v našem okolju je več in kje manj bakterij
- seznanitev z delom v mikrobiološkem laboratoriju
- seznanitev z mikrobiološkimi tehnikami

Delovne hipoteze:

- v čevljih in na kljuki vrat učilnice bo več bakterij kot na mobitelu in v WC-ju
- v petrijevki pri vratih bo več bakterij kot v petrijevki pri rožah
- česen je antibiotik.

Postopek

Material:

- avtoklav
- eza
- inkubator
- gorilnik
- petrijevke z gojiščem
- epruveta z zamaškom
- palčke za uho

Porazdelitev mikrobov

Petrijevko s hranilnim agarjem, ki je bila prej sterilizirana v avtoklavu, smo razdelili na 4 dele, tako da smo z vodoodpornim flomastrom potegnili črte po spodnji strani petrijevke in dele oštevilčili. Na dele smo z vatirano palčko nanesti bris iz:

- 1.) WC-ja (kotliček)
- 2.) kljuke na vratih učilnice U28
- 3.) notranjosti čevljev
- 4.) mobitela

Petrijevko smo držali čim manj časa odprto, da ne bi padle na gojišče bakterije iz zraka.

Z bakteriološko zanko, ki smo jo predhodno razkužili na plamenu gorilnika, smo vzeli bris pod nohti in ga nanesti v sterilizirano poševno gojišče v epruveti z zamaškom.

Petrijevko in epruveto smo inkubirali v inkubatorji 48 ur pri 37°C (optimalna temperatura za razvoj bakterij). Nato smo prešteli, koliko kolonij in koliko različnih vrst se je razvilo v petrijevki in v epruveti. Proti pričakovanjem je bilo največ kolonij in največ različnih vrst v brisu iz WC-ja, na kljuki pa najmanj. Ne petrijevke ne epruvete nismo odpirali, saj so lahko bile med bakterijami tudi patogene bakterije.

Mikrobi v zraku

2 petrijevki s hranilnim agarjem, ki sta bili predhodno sterilizirana v avtoklavu, smo postavili na 2 različna konca učilnice – eno pri vratih, drugo pri rožah – in ju pustili odprti 5 minut. Po 5 minutah smo ju zaprli, zalepili z lepilnim trakom, da bakterije iz zraka ne pridejo na gojišče, in ju dali v inkubator za 48 ur pri 37°C skupaj s tretjo petrijevko, ki je nismo odprli, ampak smo jo pustili zaprto, da jo uporabimo za kontrolni poskus, s katerim smo preverjali, če je bilo gojišče res sterilno. Ko smo dali petrijevke ven iz inkubatorja ne da bi jih odpirali, smo ugotovili, da na kontrolni petrijevki se niso razvile kolonije, na ostalih dveh petrijevkah pa smo prešteli število kolonij in različne vrste bakterij. Več in več različnih bakterij je bilo v petrijevki, ki je bila pri vratih.

Izračunali smo, koliko bakterij pade na tla učilnice v 1 minuti po formuli:

$$\frac{\text{površina učilnice}}{\text{površina petrijevke pri vratih}} \cdot \frac{\text{število kolonij}}{\text{čas (5 minut)}}$$

in dobili rezultat 102074,928

Površino petrijevke smo izračunali tako, da smo izmerili njen premer (4,7 cm) in po formuli $\pi \times r^2$ izračunali, da je njena površina 0,00694 m², površino učilnice pa smo izmerili na 77 m².

Antibiogram

Sterilno petrijevko z gojiščem smo okužili in na njeni spodnji strani z vodoodpornim flomastrom narisali 5 krogov in jih oštevilčili. Na kroge 1-4 smo dali naslednje antibiotike:

- 1.) bivacin
- 2.) neomicyn
- 3.) orbenin
- 4.) tobrex

na peti krog pa košček česna. Petrijevko smo dali v inkubator za 48 ur pri 37°C. Ker je bila petrijevka vsa preraščena z bakterijami in plesnimi, smo antibiogram ponovili.

Ponovno smo vzeli sterilno petrijevko in jo okužili s 3 vrstami bakterij. Tokrat smo jo razdelili na 6 delov in jih oštevilčili, na dele 1-4 smo dali enaki antibiotike v enakem vestnem redu kot v prejšnjem poskusu, na 5. del smo dali Immunal (zdravilo z izvlečkom ameriškega slamnika) in na 6. del česen. Po 48ih urah v inkubatorji pri 37°C smo petrijevko vzeli ven iz inkubatorja in izmerili premer kroga, kjer ni bilo bakterij (cona inhibicije). Ugotovili smo, da je bil najbolj učinkovit antibiotik neomicyn, česen in Immunal pa nista imela učinka.

Rezultati

tabela 1: porazdelitev mikrobov

Mesto izvora bakterij	Število kolonij	Število različnih vrst
WC (kotliček)	92	6
Kljuka na vratih U28	4	2
Notranjost čevljev	39	5
Mobitel	78	4
Pod nohti	89	6

tabela 2: mikrobi v zraku

Mesto petrijevke	Število kolonij	Število različnih vrst
Pri vratih	46	4
Pri rožah	21	3

V 1 minuti pade na tla učilnice 102074,928 bakterij.

tabela 3: antibiogram

Antibiotik/snov	Premier cone inhibicije
bivacin	1,8 cm
neomicyn	2 cm*
orbenin	0,9 cm
tobrex	2 cm*
Immunal	0
česen	0

*Opomba: kljub enakemu premeru cone inhibicije, je bil neomicyn bolj učinkovit od tobrea. Neomicyn je torej najbolj učinkovit od danih antibiotikov za bakterije, ki smo jih testirali

Razprava

Bakterije so povsod okoli nas, ne moremo jim ubežati, lahko pa s higienskimi ukrepi zmanjšamo možnost razmnoževanja in prenašanja patogenih bakterij. Sicer pa (pre)mnogokrat pozabljamo, da bakterije niso samo škodljive, ampak jih je ogromno koristnih, tako za naravo kot za človeka, saj sodelujejo pri kroženju snovi v naravi, živijo simbiotsko v prebavilih živalih in konec koncev - brez bakterij si ne bi mogli privoščiti niti jogurta za zajtrk.

Pri delu z bakterijami moramo biti zelo previdni, tako zaradi sebe kot zaradi okolice. Pogosto ne vemo, če imamo opraviti s patogenimi bakterijami, poleg tega pa lahko bakterija, ki ena sama ni škodljiva, postane škodljiva, ko se jih veliko namnoži.

Število bakterijskih kolonij sovpada s številom bakterij v brisu, saj se kolonija bakterij razvije iz ene same celice s cepitvijo, zato so vse bakterije v koloniji genetsko enake. Kot kolonija so sicer mikroskopsko mahne bakterije vidne tudi s prostim očesom.

Zaradi vse večje rezistence bakterij na sintetične antibiotike je vedno več bakterij odpornih na že znane antibiotike in je zdravstvo primorano ves čas iskati nove. Čeprav je antibiogram zelo učinkovita metoda in čeprav ne povečuje rezistenco bakterij, ga v zdravstvu uporabljajo le redko zaradi visokih stroškov.

Tudi v zraku je veliko bakterij, ki plavajo po njem. Ker tam seveda ni ugodnih pogojev, okoli sebe razvijejo endosporo. Ko pridejo nekam, kjer so ugodni pogoji (v našem primeru na gojišče), spet zaživijo.

Potrdili smo le eno od svojih hipotez in sicer hipotezo, da bo v petrijevki pri vratih več bakterij kot v petrijevki pri rožah, kar je logično, saj pri vratih hodi več ljudi mimo in tako prinaša s sabo bakterije od drugod. S poskusom nismo dokazali, da česen je antibiotik, nismo pa niti dokazali, da ni, saj mogoče deluje kot antibiotik na kakšno drugo vrsto bakterij, ki jo nismo testirali.

Pri vaji je lahko zelo hitro prišlo do napak. Prva taka možnost je, da petrijevka ne bi bila dovolj sterilizirana, zato smo izvajali tudi kontrolni poskus. Ker se na kontrolni petrijevki niso razvile bakterije sklepamo, da je bilo gojišče ustrezno sterilno. Druga taka napaka je, da nismo mogli preprečiti, da so ob jemanju brisa padle na gojišče še druge bakterije in sicer bakterije iz zraka, iz palčke za uho, ...

Zaključek

Bakterije so povsod okoli nas. S higienskimi ukrepi lahko zmanjšamo možnost razmnoževanja in prenašanja patogenih bakterij.

Pri delu z bakterijami moramo biti zelo previdni.

Število bakterijskih kolonij sovpada s številom bakterij v brisu.

V zraku je veliko bakterij.

Pri taki vaji lahko zelo hitro pride do napak.

Z vajo smo dosegli namene in cilje dela.

Literatura

- Bakterije [online]. Dostopno na: <http://sl.wikipedia.org/wiki/Bakterije>
- Drašler, Jože. 1980. Biologija 1 – laboratorijsko delo. Ljubljana: DZS.
- Devetak, Dušan, in Podobnik, Andrej. 2004. Biologija – raznolikost živih bitij. Ljubljana: DZS. ISBN 86-341-1898-3
- Kozmopolit [online]. Dostopno na: http://sl.wikipedia.org/wiki/Kozmopolit_%28biogeografija%29
- Čadež, Polonca, in Mahne, Ivan. 2005. Praktikum iz fiziologije mikroorganizmov [online]. Dostopno na: <http://web.bf.uni-lj.si/zt/mikro/homepage/Praktikumfiziologija.pdf>
- Batič, Franc, Šircelj, Helena, in Turk, Boris. 2004. Pregled rastlinskega sistema [online]. Dostopno na: http://web.bf.uni-lj.si/ag/botanika/gradiva/AGR_ZOO_VET_Pregled_%20sistema_Skripta.pdf