

Identifikacija bakterijskih kolonij in difuzijski antibiogram

Šola: **Gimnazija Celje - Center**

Identifikacija bakterijskih kolonij in difuzijski antibiogram

Gimnazija Celje – Center 2010

1. UVOD

Definicija bakterijske kolonije:

Bakterijska kolonija (bacterial colony; Bakterienkolonie) je skupek posameznih bakterijskih celic, ki so potomke enega samega prednika.

Cepljivke ali bakterije so najpreprostejši živi enocelični organizmi.

Celica cepljivke je izjemno preprosta in se razlikuje od celic živali, gliv in rastlin po tem, da nima pravega celičnega jedra. Ves dedni material je zbran v prosto ležeči, krožni nukleinski kislini (molekuli DNA). Telo celice obdaja celična stena. Bakterije so pogosto porasle z nitastimi izrastki (bički, migetalkami), ki jim omogočajo premikanje po vodnem okolju.

Poznamo več osnovnih oblik bakterij:

- okrogle imenujemo koki,
- spiralasto zavite imenujemo spirile,
- ukrivljene vibriji,
- paličaste bakterije pa bacili.

Veliko bakterij povzroča bolezni, proti katerim se borimo z antibiotiki (to so sredstva, s katerimi zatiramo rast in razmnoževanje bakterij).

Številne bakterije lahko preživijo v okolju kjer ni zraka (anaerobno okolje), mnoge pa sodelujejo pri naravnih procesih kot sta vrenje in fotosinteza.

V naravi so cepljivke pomembni organizmi, ki sodelujejo pri procesih razkroja tako organskih, kot tudi anorganskih snovi.

Cepljivke delimo na preprostejše:

- arheobakterije
- bakterije
- modrozeleni cepljivke

Bakterije se ne razmnožujejo spolno, temveč z enostavno mitotsko delitvijo. Najprej se podvoji dedni material, nato se celica cepi na dvoje (zato cepljivke). Bakterije imajo izjemno sposobnost razmnoževanja, saj se v kratkem času namnožijo tudi do 100.000 osebkov.

Cepljivke so najpogostejši organizem v procesih gnitja, kar pomeni, da so cepljivke tisti organizmi, ki omogočajo kroženje snovi v naravi, saj s svojim delovanjem razkrojujejo org. molekule na anorganske molekule, katere pa so rastline sposobne asimilirati in ponovno vgraditi v organske snovi.

Veliko vrst je patogenih (bolezenskih) in lahko povzročajo hude bolezni kot so kolera, tifus, tetanus in botulizem. Takšne bolezni zdravimo s antibiotiki. Prvi odkrit antibiotik je bil penicilini. Penicilini so skupina antibiotikov, ki so naravni produkti nekaterih gliv in delujejo večinoma na grampozitivne bakterije.

NAMEN VAJE

Po opravljenem laboratorijskem delu bom poznala pomen bakterijskih gojišč ter sestavo. Znala bom pripraviti bakterijsko gojišče in prenašati bakterije iz enega gojišča na drugega. Naučila se bom primerjati število bakterij na površinah okrog mene in kakšne te bakterije so morfološko gledano. Znala bom narediti difuzijski antibiogram in bom razumela njegov pomen. Lahko bom določila učinkovitost določenega antibiotika in zobne paste.

2. MATERIAL

- o petrijevke
- o hranilni agar
- o epruvete
- o stojala za epruvete
- o cepilna zanka (eza)
- o plinski gorilnik
- o erlenmajerica
- o alkohol
- o alkoholni flomaster
- o sterilne vatirane palčke
- o lupa
- o pinceta
- o diski z antibiotiki
- o različne vrste zobnih past

2. METODE DELA oz. POSTOPKI

Priprava osnovnega gojišča iz agarja in nanos vzorcev bakterij:

1. V dve sterilni petrijevki vlijemo tekoč agar. To storimo tako, da pokrov petrijevke privzdignemo pod kotom 45° in tekoči agar iz epruvete hitro vlijemo v petrijevko in pustimo, da se agar strdi.
2. Ko se agar strdi, eno petrijevko odpremo in pustimo odprto na zraku 15 minut. Drugo petrijevko z alkoholnim flomastrom razdelimo na 4 kvadrante in jih označimo. Nato petrijevko odpremo pod kotom 45° in z vatiranimi palčkami naneseemo različne vzorce bakterij (vzorci iz katedra, garderobe, stranišča, kljuke) na površino agarja z vijugami. Obe petrijevki zapremo in pustimo, da se razvijejo bakterijske kolonije.
3. Čez en teden si ogledamo razvite kolonije in jim določimo morfološke značilnosti.

Prenos bakterij s poševnega gojišča v tekoče gojišče:

1. Imamo dve epruveti. Eno epruveto z narejenim poševnim gojiščem in drugo z mesno juho. Obe epruveti vzamemo v levo roko in ju držimo nagnjeni pod kotom 45° . V drugi roki držimo cepilno zanko ali ezo, s katero bomo naredili prenos bakterij.
2. Najprej cepilno zanko držimo nad plamenom tako dolgo, da zažari. Potem odpremo epruveto s poševnim gojiščem in ustje epruvete potegnemo čez plamen, da jo steriliziramo. Enako naredimo tudi z epruveto, v kateri je mesna juha. Nato s cepilno zanko prenesemo bakterije v mesno juho.
3. Po prenosu obe epruveti še enkrat deflamiramo, prav tako cepilno zanko.

Priprava difuzijskega antibiograma:

1. Vzamemo dve sterilni petrijevki. Na dnu obeh petrijevok z alkoholnim flomastrom naredimo tri točke in jih oštevilčimo. V eno petrijevko vlijemo še tekoč agar (da ne poškodujemo bakterij), v katerem so že zmešane bakterije, ki smo jih v agar prenesli z cepilno zanko. V drugo petrijevko pa vlijemo sam agar.
2. Ko se agar strdi, v petrijevko, v kateri še ni bakterij, prenesemo bakterije iz poševnega gojišča. Z zanko naredimo vijuge po celi površini (»križem kražem«).

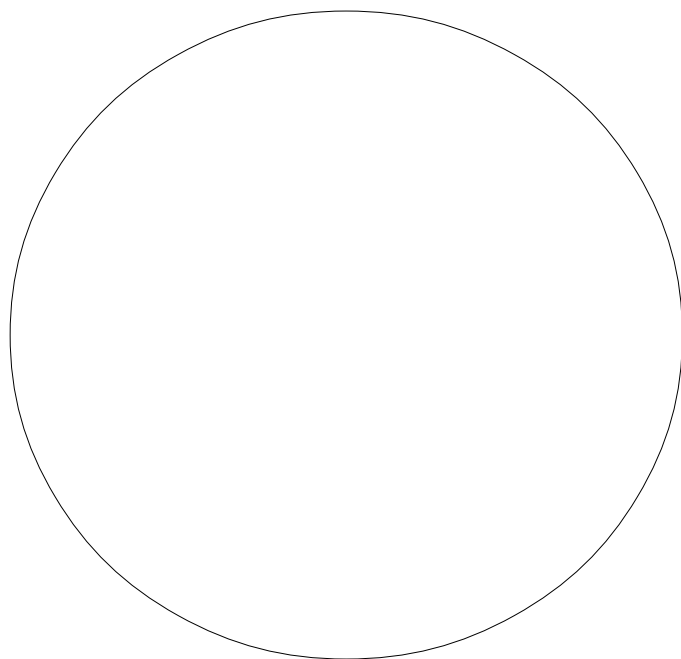
Identifikacija bakterijskih kolonij in difuzijski antibiogram Gimnazija Celje – Center 2010

3. Nato na označena mesta v obe petrijevki s pinceto nanese disk z antibiotiki. Pinceto pred tem steriliziramo tako, da jo namočimo v alkohol in potegnemo skozi plamen. Na vsako označeno mesto položimo drug disk. Zapremo. Označimo položaje antibiotičnih diskov.
4. Ko se pokažejo bakterijske kolonije in inhibicijske cone, rezultate analiziramo.
5. Pripravimo še en difuzijski antibiogram z vzorci zobnih past, ki jih na označena mesta nanese s sterilno vatirano palčko. Rezultate analiziramo na enak način.

Barvanje po Gramu

1. Jogurt razredčimo z vodo in naredimo razmaz ter ga posušimo na zraku in fiksiramo (objektno stekelce potegnemo čez ogenj)
2. Dodamo kristal vijolično barvo (cel vzorec namočimo) in ga v barvilu pustimo 30 sekund. Barvilo odlijemo, speremo s destilirano vodo,
3. Dodamo jodovico in jo na vzorcu pustimo 30 sekund, barvilo speremo in prelijemo z alkoholom (gram pozitivne bakterije ostanejo modre, gram negativne bakterije se razbarvajo)
4. Dodamo safranin(30 sekund), nato odlijemo in speremo. Počakamo da se posuši
Gram pozitivne so temno modre, gram negativne pa so rdeče.

4. REZULTATI



Legenda

- plesni
- kolonije

Število kolonij: 38

Število plesni: 2

Slika 1: Petrijevka z vzorcem bakterij iz zraka

Tabela 1: Morfološke značilnosti bakterijskih kolonij iz zraka

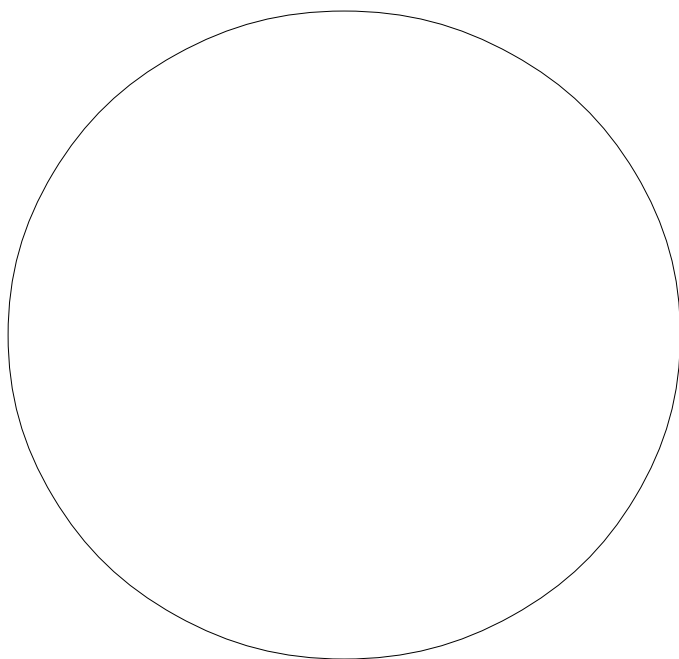
št. kolonij	oblika	robovi	vzdignjenost	struktura	barva	velikost
1	nepravilna	resast	bradavičasta	vlaknasta	rumeno-oranžna	6 mm
2	nepravilna	valovit	bradavičasta	vlaknasta	rumeno-oranžna	3 mm
1	nepravilna	valovit	ploščata	vlaknasta	belo-rumena	7 mm
1	kroglasta	raven	zelo izbočena	zrnasta	bela	2 mm

Identifikacija bakterijskih kolonij in difuzijski antibiogram
Gimnazija Celje – Center 2010

Slika 2: Epruveta s poševnim gojiščem

Tabela 2: Morfološke značilnosti bakterij v poševnem gojišču

št. kolonij	oblika	robovi	vzdignjenost	struktura	barva	velikost
3	vretenasta	raven	konkavna	enotna	belo-rumena	3 mm



Št. kolonij: 80
Število plesni: 1

Legenda:

Vzorec:

- 1- kateder
- 2- kljuka
- 3- garderoba
- 4- sranišče

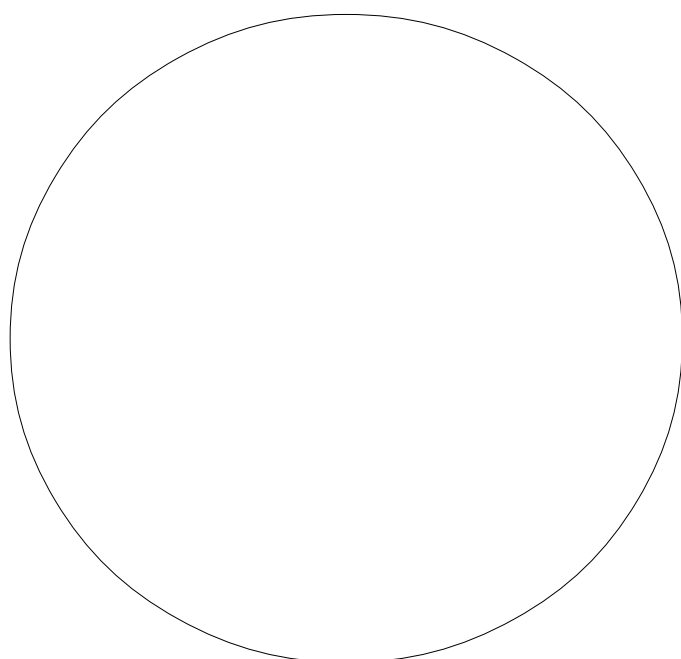
- kolonija

Slika 3: Kolonije bakterij z različnih površin

Identifikacija bakterijskih kolonij in difuzijski antibiogram
Gimnazija Celje – Center 2010

Tabela 3: Morfološke značilnosti bakterijskih kolonij z različnih površin

št. kolonije	oblika	robovi	vzdignjenost	struktura	barva	velikost
1.	kroglasta	raven	rahlo izbočena	enotna	rumena	4 mm
2.	kroglasta	raven	zelo izbočena	enotna	bela	2 mm
3.	kroglasta	raven	zelo izbočena	enotna	bela	1 mm
4.	kroglasta	raven	rahlo izbočena	enotna	oranžna	2 mm



Legenda:

Vrste antibiotikov:

1 – E15

2 – CFR 30

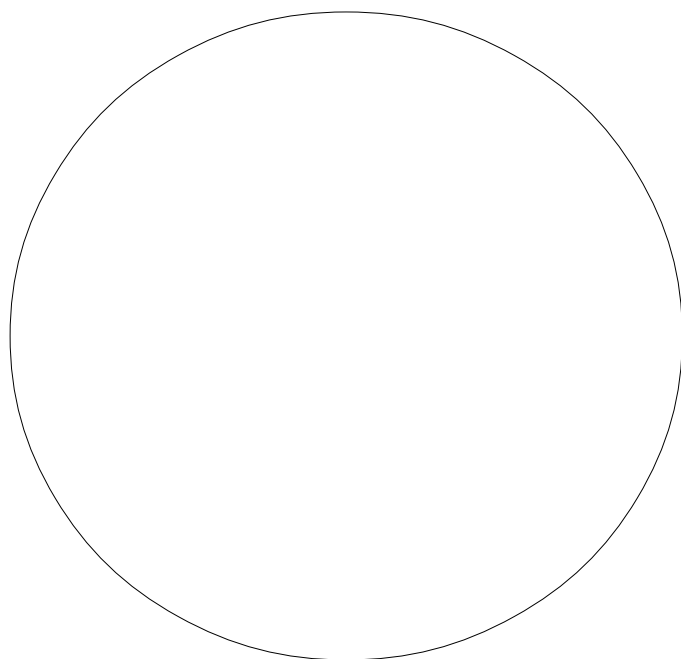
3 – AMP 25

- kolonija

- inhibicijska cona

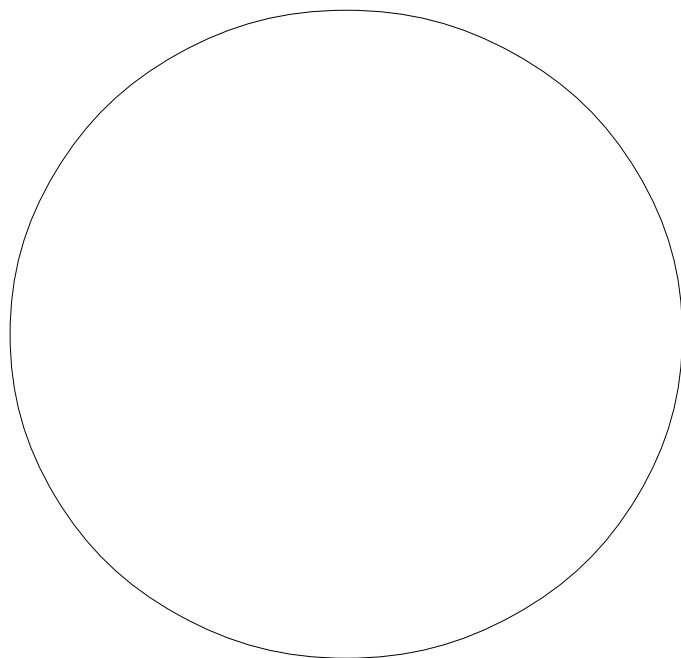
Slika 4: Difuzijski antibiogram z antibiotičnimi diski (bakterije v agarju)

Identifikacija bakterijskih kolonij in difuzijski antibiogram
Gimnazija Celje - Center 2010



Legenda:
Vrsta antibiotikov:
1 – E15
2 – CFR 30
3 – AMP 25

Slika 5: Difuzijski antibiogram z antibiotičnimi diski (bakterije na površini agarja)



Legenda:
1 – Dentamed
2 – Vademecum
3 – Signal

Slika 6: Difuzijski antibiogram z zobnimi pastami (bakterije iz ustne votline)

5. RAZPRAVA

Ugotovili smo, da se je v zraku, ki ga dihamo veliko število bakterij z različnimi morfološki značilnostmi. Razvile so se tudi dve plesni, ki so imele drugačno obliko in zgradbo.

Največ bakterij se je razvilo na kvadrantu petrijevke, kjer smo nanесли bakterije iz straniščne školjke. Na kvadrantu, kjer so bile bakterije iz katedra in kljuka se je razvilo manj bakterij, najmanj se jih je razvilo na kvadrantu z bakterijam iz garderobne omarice, kjer niso ugodni pogoji za razvoj.

Bolj učinkovit je bil antibiogram, ki je imel bakterije že vmešane v agar kakor antibiogram kateremu smo dodali bakterije na površino agarja. Najbolj učinkovit je bil antibiotik E15 (ki je imel največjo inhibicijsko cono), najmanj pa AMP25.

Difuzijski antibiogram zobnih past nam ni uspel. Verjetno smo nanесли premalo količino bakterij iz ustne votline in se bakterije niso mogle namnožiti v kolonije.

Gram pozitivne bakterije so se obarvale temno modro (so občutljive na naravne antibiotike), gram negativne pa rdečo (so občutljive na pòlsintetske in sintetske antibiotike)

Pri tej lab. vaji smo se poučili o morfoloških značilnostih bakterij po katerih jih lahko identificiramo. Naučili smo se tudi priprave in analize difuzijskega antibograma ter barvanja po Gramu, s čimer določimo kateri antibiotik je najbolj primeren za kakšno bakterijo.

6. LITERATURA

- <http://www2.arnes.si/~ssnmcrnom5/sola/011132.htm>
- http://www.bfro.uni-lj.si/zoo/publikacije/katalogznanj/vsebina/b/b_bam.htm
- http://www.svarog.si/biologija/index.php?page_id=7591
- <http://sl.wikipedia.org/wiki/Penicilini>
- Maja Božič et.al.: Mikrobiologija – delovni zvezek za mikrobiološke vaje, DZS, Ljubljana, 2004
- lastni zapiski (ustni vir prof. Saše Ogrizek v šolskem letu 2008/2009)