

# Identifikacija bakterijskih kultur

# Identifikacija bakterijskih kultur

## 1. UVOD

Bakterije so starejše od človeka, od dinosavrov ... Nastale so zelo zgodaj v zgodovini zemlje in živijo še danes, takšne kot so bile pred milijoni let.

Kot vemo vsi, nas mali, mikroskopsko majhni organizmi obdajajo povsod, koder živimo in se gibljemo. Tu organizmi so v zraku, na tleh, na pohištvu... Ti organizmi nam ne škodijo, ker je naše telo na njih odporno. Naš imunski sistem se uspešno bojuje z večino teh organizmov, vendar so nekateri organizmi nam vseeno škodljivi. Ti so tako imenovane patogene bakterije, ki pri človeku in tudi živalih povzročajo razne bolezni. Ti organizmi so tako majhni da jih ne moremo videti s prostim očesom. Opazovati jih moramo z mikroskopom. Če pa jih želimo opazovati s prostim očesom se mora razviti veliko bakterij, tako da nastanejo bakterijske kolonije. To lahko nastane ko imajo bakterije dovolj hrane za cepitev, se pravi ob ugodnih pogojih. Tem pa spada še ugodna temperatura, ki pa je odvisna od posameznih bakterij.

## 2. Vrste bakterijskih kolonij (premer večji od 1mm):

### OBLIKA

točkaste                      kroglaste                      vretenaste                      nitaste                      koreninaste

### ROBOVI KOLONIJ

Raven                      valovit                      koničast                      resast                      nazobčan

### VZDIGNJENOST (Profil) KOLONIJ

Ploščata                      konveksna                      bradavičasta                      vzdignjena                      zelo izbočena                      konkavna

### STRUKTURA KOLONIJ

Enotna (amorfná)                      zrnasta (granulirana)                      vlaknasta

## Identifikacija bakterijskih kultur

- BARVA KOLONIJ (rumena, oranžna, zelena, bela, črna, rdeča...)

- PROSOJNOST (optične lastnosti kolonij); prozorne, prozorne, motne.

### 3. Bakteriološka gojišča

so različne mešanice hranilnih snovi, ki jih potrebujemo za gojenje mikroorganizmov. Sestavimo jih tako da jih prilagodimo potrebam posameznih bakterij. Glavne sestavine gojišč so:

- Voda
- Peptoni
- Mesna voda (juha)
- Mesni ekstrakti
- Kvasni ekstrakti
- Anorganske snovi
- Agar (pridobivamo ga iz morskih alg in je ester galaktona in žveplove kisline)
- Ogljikovi hidrati

Glede na vsebnost agarja ločimo trdnost gojišča:

- Tekoča gojišča (tem ne dodamo agarja)
- Poltekoča g. (tem dodamo od 0,1 - 0,5% agarja)
- Trdna g. (dodamo 1 - 2% agarja):
  - o Globoki agar
  - o Poševni agar
  - o Gojišča v petrijevki

Glede na sestavo:

- Naravna gojišča (mleko, kri, krvni serum)
- Polsintetična g. (kombiniramo naravne snovi in sintetične)
- Sintetična g. (tu poznamo kemično sestavo gojišča)

Glede na uporabnost:

- Osnovna g. (tekoča ali trdna): peptonska voda, navadni bujon, navadni agar, želatina in mleko
- Obogatena g. (če osnovnim dodamo kri, krvni serum...)
- Bogatitvena g. (tekoča g., ki pospešuje razvoj posameznih vrst bakterij, ki smo jih izolirali)
- Diferencialna g. (vsebujejo snovi, ki omogočajo, da se kolonije ene vrste razlikujejo od drugih)
- Selektivna g. (zavirajo razvoj enih in pospešujejo razvoj tistih, ki ji želimo izolirati)
- Gojišča za ugotavljanje biokemičnih lastnosti bakterij (pri njihovi identifikaciji vsebuje različne dodatke, ki jih bakterije presnavljajo)

## Identifikacija bakterijskih kultur

Hranilna gojišča uporabljamo za zasajevanje bakterijskih kultur. To je postopek prenašanja mikroorganizmov iz njihovega življenjskega okolja na hranilno gojišče ali iz enega gojišča na drugo. Bakterije, ki zrastejo na gojišču po zasajanju vzorca, tvorijo **primarno kulturo**. Kulture, ki jih dobimo s presajanjem kolonij z gojišča na gojišče, imenujemo **subkulture**.

Ko zasejemo vzorec na gojišče, ponavadi zrastejo različne vrste bakterij, ki so bile v določenem vzorcu. Tako kulturo imenujemo **mešana kultura** (torej skupek kolonij dveh ali več vrst).

Kadar je v materialu le ena bakterijska vrsta, bo na gojišču zrasla **čista kultura** (skupek kolonij ene vrste)

Za zasajevanje uporabljamo sterilna gojišča in tudi vsi pripomoči morajo biti sterilni. Če pa niso jih moramo sterilizirati.

## 4. Sterilizacija

je postopek, s katerim popolnoma uničimo vse bakterije.

Načini sterilizacije:

- Sterilizacija (so postopki, s katerim uničimo vse bakterije)
  - Dezinfekcija (namenjeni za uničenje patogenih bakterij)
  - Pasterizacija (segrevamo do 80 stopinj celzija in uničimo večino bakterij, ne uničimo pa njihovih endospor)
- 
- Sterilizacija poteka s suho toploto - sežiganje, segrevanje do žarenja, deflambiranje, sterilizacija v suhem sterilizatorju (temp. do 180 stopinj celzija) in sterilizacija z infrardečimi žarki (do 200 stopinj celzija) .
  - Sterilizacija z vlažno toploto – segrevanje pod in nad 100 stopinj celzija.
  - Sterilizacija z UV žarki in ionizacijskimi žarki.

### 5. VAJA

Glavni namen pri tej vaji je bil, da spoznamo bakterije, koliko jih je kje vse se nahajajo (WC, tla v laboratoriju, pipa, kljuka, miza v menzi...) oz. v tekočinah (voda s pipe, akvarijska voda, mineralna voda). Poleg tega pa smo hoteli spoznati tudi postopek identifikacije bakterijskih kolonij v mešanih kulturah, ki so se razvile na gojiščih, pasterio poskus in nekatere vrste sterilizacije.

#### 5.1 POSTOPEK

##### a) Material in pripomočki

- Petrijevka s hranilnim agarjem
- Erlenmajerice
- Eza
- Gorilnik
- Baby palčka
- Sterilne pipete
- Vzorci (bris)
- Voda iz pipe
- Voda iz akvarija
- Mineralna voda

##### b) Postopek

Najprej smo naredili pasterio poizkus, pri katerem smo najprej pripravili juho, ki smo jo različno obdelali. Ta je bila na začetku bistra in rumena, nato smo jo nalili v 8 erlenmajeric ter jo različno pokrili.

Priprava posameznih erlenmajeric:

1. v prvo erlenmajerico smo natočili juho in jo pustili odprto;
2. v drugo smo nalili prekuhano juho (pasterizacija) in jo pokrili z zamaškom iz vate;
3. v tretjo smo nalili prekuhano juho in jo pusti odprto;
4. v četrto smo nalili prekuhano juho in jo pokrili z plutovinastim zamaškom;
5. v peto smo nalili sterilizirano juho in jo pustili odprto;
6. v šesto smo nalili sterilizirano juho ter jo pokrili z vato in alu folijo;
7. V sedmo smo nalili sterilizirano juho ter jo pokrili z zamaškom iz vate, vanjo pa smo dali tudi ravno cevko;
8. v osmo pa smo nalili sterilizirano juho ter jo pokrili z zamaškom iz vate, vanjo pa smo dali zavito cevko.

Ko smo vse to pripravili smo počakali nekaj dni in potem zapisali rezultate.

## Identifikacija bakterijskih kultur

V drugem delu smo na bakteriološka gojišča prenašali vzorce bakterij iz različnih površin. Najprej smo petrijevko razdelili na štiri dele, nanjo zapisali vse potrebne informacije (ime delovne površine, razred, datum) ter sterilno prenesli bakterije iz okolja v petrijevko. Vzoredno pa smo pripravili tudi kontrolno petrijevko, da smo se prepričali, da so petrijevke res sterilne. Prenos smo naredili tako, da smo z baby palčko vzeli vzorce iz različnih površin on jih vijugasto prenesli na gojišča. Tako smo vzeli vzorce iz tal v garderobi, iz WC pipe, kljuke v učilnici ter mize v menzi. Dve petrijevke pa smo pustili odprte na zraku 10 min, nato smo jih zaprli in počakali nekaj dni da so se razvile kolonije. Podatke smo si potem zapisali.

V tretjem delu vaje smo uporabili tekoče brise. Tu smo s pipeto prenesli nekaj kapljic mineralne vode, vode iz pipe in akvarijske vode na gojišče, nato pa jih s sterilno stekleno palčko cikcakasto razmazali po površini (palčko smo namočili v alkohol in jo zažgali ter jo tako sterilizirali). Čez teden dni smo podatke ogledali in zapisali rezultate.

V zadnjem, četrtem delu smo naredili še poševna gojišča. Ta smo pripravili tako, da smo sterilni agar skuhal v ekonom loncu in še tekočega prelili v erlenmajerice. Te pa smo postavili poševno da se je ta strdil. Poševnemu se je povečala površina. Nato sme naredili prenos in počakali teden dni. Podatke smo zabeležili.

## 5.2 REZULTATI

**Pasterio poizkus** (motnost označena s številkami od 1 – 6; 1 – čisto, 6 – zelo motno)

1. erlenmajerica: 6
2. erlenmajerica: 2
3. erlenmajerica: 4
4. erlenmajerica: 3
5. erlenmajerica: 5
6. erlenmajerica: 1
7. erlenmajerica: ?
8. erlenmajerica: 1

Tam kjer je motnost visoka, pomeni, da se je tam razvilo veliko bakterij, ki so bile v juhi in jih nismo uničili.

## Identifikacija bakterijskih kultur

### Identifikacija bakterijskih kolonij različnih suhih vzorcev:

Tabela 1: Identifikacija bakterijskih kultur na WC-pipi

Barva	Bela	Bela	Rumena	Rdeča
Število bakterij	Ni mogoče določiti	Ni mogoče določiti	Ni mogoče določiti	Ni mogoče določiti
Oblika	Kroglaste	Nepravilnih oblik	Kroglaste	Točkaste
Rob	Gladek	Valovit	Gladek	Gladek
Vzdignjenost	Rahlo izbočena	Zelo izbočene	Zelo izbočene	Ploščate
Struktura	Enotna	Enotna	Enotna	Enotna
Velikost (mm)	1-3	2-4	1-4	< 1
Prosojnost (da,ne)	da	ne	ne	ne

Tabela 2: Identifikacija bakterijskih kultur na tleh v garderobi

Barva	Bela	Rumena
Število bakterij	4	3
Oblika	Kroglaste	Kroglaste
Rob	Gladek	Gladek
Vzdignjenost	Zelo izbočene	Zelo izbočene
Struktura	Enotna	Enotna
Velikost (mm)	1- 3	1 – 2
Prosojnost (da,ne)	da	ne

Tabela 3: Identifikacija kolonij na kljuki

Barva	Bela	Bela	Bež	Rumena
Število bakterij	1	1	1	2
Oblika	Točkaste	Kroglaste	Kroglaste	Kroglaste
Rob	Gladek	Gladek	Gladek	Gladek
Vzdignjenost	Ploščate	Zelo izbočene	Zelo izbočene	Zelo izbočene
Struktura	Enotna	Enotna	Enotna	Enotna
Velikost (mm)	< 1	2	3	1- 2
Prosojnost (da,ne)	Da	Ne	Ne	Ne
Število plesni	3	-	-	.

## Identifikacija bakterijskih kultur

Tabela 4: Identifikacija bakterijskih kultur na mizi

<b>Barva</b>	bela	bela	Svetlo rumena	Svetlo rumena	Temno rumena	Bež	Oranžna
<b>Število bakterij</b>	6	3	13	2	3	7	1
<b>Oblika</b>	Točkaste	Kroglaste	Kroglaste	Nepravilnih oblik	Kroglaste	Kroglaste	Kroglaste
<b>Rob</b>	Gladek	Gladek	Gladek	Valovit	Gladek	Gladek	Gladek
<b>Vzdignjenost</b>	Rahlo izbočene	Zelo izbočene	Zelo izbočene	Zelo izbočene	Zelo izbočene	Rahlo izbočene	Rahlo izbočene
<b>Struktura</b>	Enotna	Enotna	Enotna	Enotna	Enotna	Enotna	Enotna
<b>Velikost (mm)</b>	< 1	1- 2	1- 3	2 - 4	2- 3	1 - 2	2
<b>Prosojnost (da,ne)</b>	Da	Ne	Ne	Ne	Ne	Da	Ne

Tabela 5: Identifikacija bakterijskih kultur v zraku v garderobi

<b>Barva</b>	bela	bela	Svetlo rumena	Svetlo rumena	Temno rumena	Bež	Oranžna
<b>Število bakterij</b>	6	3	13	2	3	7	1
<b>Oblika</b>	Točkaste	Kroglaste	Kroglaste	Nepravilnih oblik	Kroglaste	Kroglaste	Kroglaste
<b>Rob</b>	Gladek	Gladek	Gladek	Valovit	Gladek	Gladek	Gladek
<b>Vzdignjenost</b>	Rahlo izbočene	Zelo izbočene	Zelo izbočene	Zelo izbočene	Zelo izbočene	Rahlo izbočene	Rahlo izbočene
<b>Struktura</b>	Enotna	Enotna	Enotna	Enotna	Enotna	Enotna	Enotna
<b>Velikost (mm)</b>	< 1	1- 2	1- 3	2 - 4	2- 3	1 - 2	2
<b>Prosojnost (da,ne)</b>	Da	Ne	Ne	Ne	Ne	Da	Ne

<b>Barva</b>	Bela	Bela	Svetlo rumena	Rumena	Bež	Oranžna	Oranžna	Oranžna
<b>Število bakterij</b>	2	3	1	3	1	1	2	1
<b>Oblika</b>	Nepravilnih oblik	Kroglaste	Kroglaste	Kroglaste	Kroglaste	Nepravilnih oblik	Nepravilnih oblik	Kroglaste
<b>Rob</b>	Valovit	Gladek	Gladek	Gladek	Gladek	Nazobčana	Valovit	Gladek
<b>Vzdignjenost</b>	Zelo izbočene	Zelo izbočene	Zelo izbočene	Zelo izbočene	Rahlo izbočene	Bradavičasta	Zelo izbočene	Zelo izbočene



## Identifikacija bakterijskih kultur

<b>Struktura</b>	Enotna	Enotna	Enotna	Enotna	Enotna	Enotna	Enotna	Enotna
<b>Velikost (mm)</b>	2 – 3	1 – 3	2	1-2	3	6	4-5	3
<b>Prosojnost (da,ne)</b>	Ne	Ne	Ne	Ne	Da	Ne	Ne	Ne

<b>Barva</b>	bela	bela	<b>Svetlo rumena</b>	<b>Svetlo rumena</b>	<b>Temno rumena</b>	Bež	<b>Oranžna</b>
<b>Število bakterij</b>	6	3	13	2	3	7	1
<b>Oblika</b>	Točkaste	Kroglaste	Kroglaste	Nepравilnih oblik	Kroglaste	Kroglaste	Kroglaste
<b>Rob</b>	Gladek	Gladek	Gladek	Valovit	Gladek	Gladek	Gladek
<b>Vzdignjenost</b>	Rahlo izbočene	Zelo izbočene	Zelo izbočene	Zelo izbočene	Zelo izbočene	Rahlo izbočene	Rahlo izbočene
<b>Struktura</b>	Enotna	Enotna	Enotna	Enotna	Enotna	Enotna	Enotna
<b>Velikost (mm)</b>	< 1	1- 2	1- 3	2 - 4	2- 3	1 - 2	2
<b>Prosojnost (da,ne)</b>	Da	Ne	Ne	Ne	Ne	Da	Ne

## Identifikacija bakterijskih kultur

Tabela 6: Identifikacija bakterijskih kultur v zraku v laboratoriju

<b>Barva</b>	<b>Bela</b>	<b>Bela</b>	<b>Bela</b>	<b>Oranžna</b>	<b>Oranžna</b>	<b>Oranžna</b>
<b>Število bakterij</b>	8 + 38 plesni	23	1	1	3	7
<b>Oblika</b>	Nepravilnih oblik	Kroglaste	Nepravilnih oblik	Nepravilnih oblik	Nepravilnih oblik	Kroglaste
<b>Rob</b>	Valovit	Gladek	Valovit	Valovit	Valovit	Gladek
<b>Vzdignjenost</b>	Rahlo izbočena	Rahlo izbočena	Bravičasta	bradavičasta	Zelo izbočena	Rahlo izbočena
<b>Struktura</b>	Enotna	Enotna	Enotna	Enotna	Enotna	Enotna
<b>Velikost (mm)</b>	2 –3	1-3	5	6	3	1-2
<b>Prosojnost (da,ne)</b>	Da	Da	Ne	Ne	Ne	Ne

## Identifikacija bakterijskih kultur

### Identifikacija bakterijskih kolonij različnih mokrih vzorcev:

Tabela 7: Identifikacija bakterijskih kultur v vodi iz pipe

Barva	Bela	Svetlo rumena
Število bakterij	2	1
Oblika	Nepravilnih oblik	Kroglaste
Rob	valovit	Gladek
Vzdignjenost	Rahlo izbočena	Rahlo izbočena
Struktura	Enotna	Enotna
Velikost (mm)	1 – 2	1 – 2
Prosojnost (da,ne)	Da	Da

Tabela 8: Identifikacija bakterijskih kultur v akvarijski vodi

Barva	Bež	Bež	Oranžna
Število bakterij	1	10	45
Oblika	Nepravilnih oblik	Nepravilnih oblik	Kraglaste
Rob	Valovit	Valovit	Gladek
Vzdignjenost	Ploščata	Rahlo izbočena	Močno izbočena
Struktura	Zrnasta	Enotna	Enotna
Velikost (mm)	50	1 – 3	1- 2
Prosojnost (da,ne)	Da	Da	ne

V vzorcu z mineralno vodo pa se ni razvila nobena kolonija. To pomeni, da v mineralni vodi ni niso bile prisotne bakterije.

### 6. RAZPRAVA

V prvem delu vaje smo delali pasterio poizkus. Največ bakterij je bilo v prvi erlenmajerici v katero smo nalili juho in jo pustili odprto. Ta vzorec je bil namreč najbolj moten, zato smo skleпали, da jih je tam največ. Juha se je tu pokvarila tudi zato, ker je nismo prej posebej obdelali (je segreli). Tej je sledila številka 5, nato 3,4,2, najčistejši pa sta bila vzorca 6 in 8, saj sta bili juhi prej sterilizirani, nato pa še pokriti. Šesta z vato in alu folijo, osma pa z vato in zavito cevko, po kateri pa bakterije niso morale potovati, tako kot v sedmem primeru, ko smo imeli ravno cevko, po kateri so bakterije zlahka potovale.

V drugem delu smo jemali vzorce iz različnih površin. Ugotovili smo da se največ bakterij nahaja na tleh v garderobi, kjer jih nismo morali prešteti, saj je prišlo do zraščanja kolonij, najmanj bakterij pa je bilo na kljuki (5). Kljuki je sledila wc-pipa s 7 bakterijam, nato zrak v garderobi (14), na mizi v jedilnici smo identificirali 35 bakterij, zelo veliko pa je bilo bakterij tudi v zraku v laboratoriju (43). V laboratoriju smo zabeležili tudi največ plesni (38). Največ različnih bakterij pa se je nahajalo na mizi (7) in v zraku v garderobi (8). Pričakovali bi lahko več bakterij na kljuki, a so rezultati pokazali drugače.

Temu delu so sledili poizkus z vzorci vode. Največ bakterij (56) razvilo iz vzorca vode iz akvarija. Tej je sledila voda iz pipe (3). V mineralni vodi pa ni bilo prisotnih bakterij. Mineralna voda je najbolj primerna za pitje, medtem ko je akvarijska voda neuporabna za pitje.

Na koncu smo rezultate primerjali med seboj in popravili napake, se pravi prevelika odstopanja od drugih smo zgladili.

Napake ki so močne pri rezultatih so:

Material ni bil sterilen med prenosi snovi, nismo jemali pravilno vzorce z različnih površin, napačen prenos bakterij...

### 7. ZAKLJUČEK

Prišli smo do nekaj zanimivih ugotovitev. Juho je treba vedno pokrit, saj se drugače not prikraejo različne bakterije in se močno razmnožijo in pokvarijo juho in nam želodce, če juho ne ponovno pregrejemo.

Pri identifikaciji smo ugotovili da se največ bakterij nahaja v garderobi, kjer je pozimi veliko vlage in postane pravi raj za bakterije.

Ugotovili smo da akvarijska voda ni primerna za človeka.

Z metodo zasajevanja smo prišli do objektivnih rezultatov o bakterijah, le če smo dosledno sledili sterilne postopke.

Tudi s kulturami mikroorganizmov moramo ravnati aseptično, tako da med zasajevanjem onemogočimo dostop nezaželenim bakterijam do gojišče ter da pri vsem tem ne okužimo sebe ter druge ljudi v okolici.