

VETERINARSKA FAKULTETA
Inštitut za mikrobiologijo in parazitologijo

PROTOKOL pri vajah iz predmeta Mikrobiologija z
imunologijo

2. letnik, veterinarstvo

**GOJITEV IN IZOLACIJA BAKTERIJ TER
PRIPRAVA MIKROSKOPSKIH
PREPARATOV**

VODJA VAJ
dr. Tadej Malovrh, dr. vet. med.

Pri prvih treh vajah iz predmeta splošna mikrobiologija z imunologijo smo študenti veterinarstva spoznavali tehnike za izolacijo in gojitev mikrobov iz različnih vrst kužnin ter pripravo mikroskopskih preparatov.

Posamezne bakterije vidimo samo pod največjimi povečavami, bakterijske kolonije pa lahko zaznamo s prostim očesom. Bakterije v laboratorijih namensko gojimo na ustreznih bakterijskih gojiščih. Za opazovanje s svetlobnim mikroskopom so potrebni bakterijski preparati (nebarvni in obarvani). V mikrobiologiji se za obarvane preparate največ uporabljajo bazična barvila. Eno izmed njih je metilvijolično modrilo za barvanje po Gramu. Diferencialno barvanje po Gramu se celične stene bakterij obarvajo rožnato (Gram negativne bakterije) ali modrovijolično (Gram pozitivne bakterije).

Za izolacijo bakterij so potrebne bakterijske kolonije, ki zrastejo na ustreznem gojišču iz kužnin. Petrijevko s trdnim gojiščem (krvni agar) sem razdelil na štiri enake dele za nanos kužnin. Material sem odvzel s podplata čevljev, z očesne veznice, z umazanih prstov in z umitih prstov. Z nežnim podrgnjenem prstov (najprej z umazanimi in nato s čistimi) po površini gojišča sem prenesel mikroorganizme s prstov na krvni agar. S sterilnima vatiranima palčkama sem odvzel material z očesne sluznice (s postrganjem epitelijskega medialnega očesnega kota) in s čevlja ter prenesel na gojišče.

Po nanosu kužnin na specifično gojišče sem petrijevko prekril z večjo petrijevko, ki je nato bila v inkubatorju 24 ur na 37°C. V času inkubacije so iz nekaterih kužnin zrastle bakterijske kolonije. Največja gostota bakterij je bila pri brisu s čevlja, nato pri umazanih prstih. Malo bakterij je bilo pri čistih prsti, saj razkužilo zmanjša število bakterij. Na področju gojišča z odvzemnim materialom očesne sluznice je bilo brez bakterij, kar dokazuje sterilnost sluznice. Če pa se na tem področju pojavi kolonija bakterij je lahko znak infekcije ali pa je kontaminant kot posledica nepravilnega dela.

Na celotni površini gojišča z mešano kulturo sem izbral štiri različne bakterijske kolonije za izolacijo bakterij v čisti kulturi. Robovi izbranih kolonij se niso dotikali robov drugih kolonij kar je pomembno za natančnejšo izolacijo bakterij. Izbranim kolonijam sem določil morfološke lastnosti pred izolacijo.

Tabela 1: Morfološke značilnosti bakterijskih kolonij z makroskopskim opazovanjem.

	velikost	oblika	rob	profil	barva	površina	konsistenca	število
A kolonija	1 mm	okrogla	gladek	konveksen	sivo bela	gladka	vlečljiva	10, 1 večja
B kolonija	0,5 mm	okrogla	gladek	konveksen	bela	gladka	vlečljiva	1
C kolonija	1,5 mm	okrogla	gladek	konveksen	prozorno siva	mokro svetleča	mehka	neštevno (veliko majhnih)
D kolonija	1 mm	okrogla	gladek	dvignjen	sivo bela	gladka	trda	- -

Izolacija posaneznih vrst bakterij v čisti kulturi je pomemben del za identifikacijo bakterij. Iz mešane kulture dobimo čisto kulturo tako da eno bakterijsko kolonijo prenesemo na novo gojišče in jo razmnožimo. Novo gojišče krvnega agarja sem razdelil na štiri enake dele za izolacijo štirih kolonij. S sterilno mikrobiološko zanko sem izbrane kolonije prenesel na novo površino s postopkom cepljenja z redčenjem.

Po cepitvi četrte kolonije sem petrijevko s čistimi kulturami dal v inkubator za 24 ur na 37°C, kjer so zrasle bakterijske kolonije. Po inkubaciji sem določil morfološke lastnosti izoliranim kolonijam.

Tabela 3: Morfološke značilnosti bakterij čistih kultur z makroskopskim opazovanjem.

	velikost	oblika	rob	profil	barva	površina	konsistenca	število
A kolonija	1mm	okrogla	gladek	konveksen	sivo bela	gladka, svetleča	vlečljiva	13
B kolonija	1 mm	okrogla	gladek	konveksen	bela	gladka	trda	2
C kolonija	1mm	okrogla	gladek	konveksen	prozorno siva	mokro svetleča	vlečljiva	neštevna
D kolonija	0,5mm	okrogla	gladek	dvignjen	sivo bela	gladka	trda	neštevno

Za mikroskopsko morfološko opazovanje bakterij s svetlobnim mikroskopom sem naredil bakterijski nebarvni (visečo in pokrito kapljo) in barvni (barvanje po Gramu) preparat iz čistih kultur. Na predmetno steklice sem kanil kapljico fiziološke raztopine. Z mikrobiološko zanko sem odvzel kapljico tekiče kulture in jo prenesel na predmetno steklice ob kapljici in jo vmešal v fiziološko raztopino. Pod mikroskopom so bili vidni koki oziroma okrogle bakterije.

Za pripravo viseče kapljice sem na krovno steklice kanil kapljico suspenzije bakterijskih celic. Pod mikroskopom je bilo možno opazovati le pod najmanjšo povečavo, zato se opazil samo premikanje bakterij in ne njihove oblike.

Za barvanje po Gramsem najprej pripravil naravni preparat iz druge kolonije, ki se je nekajčasa sušil na zraku. Preparat sem fiksiral s plamenom, ga pokril s filtrirnim papirjem in po treh minutah preli s karbol gencian vijoličnim barvilom. Po odstranitvi filtrirnega papirja sem odlil barvo in za dve minuti preli preparat z lugom. Nato sem spral preparat z 96% etanolom do razbarvanja in nato še pod tekočo vodo. Za trideset sekund sem preli preparat z 1% raztopino karbolnega fuksina in ga ponovno spral z vodo, posušil na zraku in mikroskopiral pod imerzijo. S pomočjo svetlobnega mikroskopa sem določil obliko bakterij (diplokoki in stafilokoki) in po vijolični barvi, da so Gram pozitivne bakterije oziroma pordeči (rožnato), da so Gram negativne bakterije.

Tabela 3: Podatki o izolaciji iz kužnine, z mikroskopskim opazovanjem.

kužnina:					
pimarna izolacija		izolacija v čisti kulturi			
morfološke značilnosti bakterijskih kolonij	število kolonij	vzorci kolonij (original se je izgubil)	število kolonij	mikroskopsko	
				oblika	Gram
1) premer 1cm, trda konsistenca, suha hrapova površina, rob nazobčen, nepravilne oblike	1	neznane: se gibljejo	1	okrogle	+
2)a) premer 1.5mm, okrogla, hrapov bel rob s temnejšo sredino, privzdignjene	2	Aureus: negibljuje		okrogle	
2)b) premer 1mm, gladka površina, trda konsistenca, odbijajo svetlobo, okrogla		Proteus sp.: gibljive		paličaste	
3) preraslo gojišče, motna površina	1				
4) ista kolonija kot v 1. primeru	1				
5) premer 0,5-1mm, bele barve	5				

LITERATURA:

1. Malovrh T, Hostnik P. Mikrobiologija z imunologijo. Navodila za vaje.

Ljubljana: Veterinarska fakulteta, 2003.