

MODUL:

Kemija v medicini: Mikroorganizmi v/na vsakodnevnih predmetih in difuzijski antibiogram

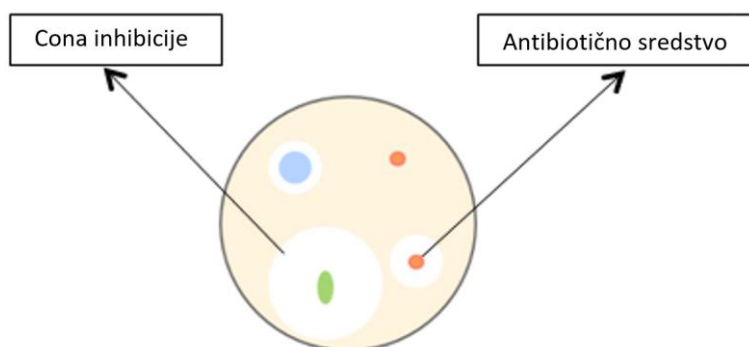
OPIS VAJE:

Mikrobna kultura vsebuje mikroorganizme, ki se razrastejo v gojišču ali na njem. Mikrobna kultura je lahko mešana ali čista. V čisti kulturi je samo ena vrsta mikroorganizmov in zato so lastnosti (npr. produkcija antibiotika, povzročanje bolezni) te kulture hkrati tudi lastnosti te vrste mikroorganizma. Lastnosti mešane kulture pa ni mogoče pripisati samo eni vrsti bakterij. Mikroorganizmi v mešani kulturi lahko tudi vplivajo drug na drugega in si tako med sabo olajšajo ali ovirajo rast. Potomke ene same bakterije oz. celice, ki je rasla in se je delila na trdnem gojišču, imenujemo kolonija – to je gruča celic, vidna s prostim očesom. V mikrobiologiji lahko preučujemo delovanje mešanih kultur, kakršne so večinoma v naravi, kadar pa želimo proučevati lastnosti posamezne vrste, pripravimo čisto kulturo.

Gojenje mikroorganizmov je osnova za njihovo proučevanje. Rast mikroorganizmov pomeni rast celic in povečevanje števila celic. Za rast moramo zagotoviti hranila, vir energije in ustrezne fizikalno-kemijske razmere, vse naštetu pa mora čim bolj posnemati naravno okolje. Vsak mikroorganizem pa ima tudi optimalno, minimalno in maksimalno rastno temperaturo. Gojišča so raztopine hranil za gojenje mikroorganizmov v laboratorijskih razmerah, sestavo gojišča in njegov pH pa prilagajamo potrebam mikroorganizma, ki ga gojimo. Vsako gojišče lahko pripravimo kot tekoče, trdno ali poltrdno glede na količino agarja, ki ga v gojišče dodamo. Agar namreč povzroča strjevanje gojišča. Za nacepljanje – tj. dodajanje mikroorganizmov v/na gojišče – uporabljamo cepilno zanko (eza), lahko pa tudi vatenko ali pipeto.

Difuzijski antibiogram je preprost način ugotavljanja odpornost bakterij proti antibiotikom. Antibiotična sredstva naneseemo na okuženo agarno ploščo (tj. trdno gojišče v petrijevki). Okoli mesta nanosa se pojavi območje, kjer bakterije niso zrastle - imenujemo ga inhibicijska cona. Premer inhibicijske cone izmerimo z ravnilom. Sredstvo, ki ima največjo inhibicijsko cono, je najbolj učinkovito pri uničevanju te vrste bakterij.

Shematski prikaz difuzijskega antibiograma:



MATERIAL:

- steklenice s plastičnim pokrovom
- petrijevke
- epruvete
- hranilni agar
- sterilne vatenke
- sterilna fiziološka raztopina
- dezinfekcijsko milo
- razkužilo
- 70% etanol
- gorilniki
- ekonom lonec ali avtoklav
- česen
- ingver
- med
- zobna pasta
- poljubni predmeti za testiranje prisotnosti mikroorganizmov

METODE DELA:

Priprava agarne plošč:

Uporabite sterilizirane (nove) petrijevke. Pripravite agar in ga še tekočega nalijete v steklenice s plastičnim pokrovom. Pazite, da bo agar čim bolj raztopljen, da se enakomerno porazdeli v steklenicah – med pripravo raztopino segrevajte. Nato steklenice z agarjem položite v ekonom lonec (v katerem naj bo približno 3 cm vode) in segrevajte tako, da v približno 15 minutah dosežete maksimalni tlak. Sterilizacija pri teh pogojih naj poteka nadaljnjih 15 minut. Priporočljivo je, da so steklenice podložene tako, da se direktno ne dotikajo dna lonca. Pazite, da pokrovi steklenic niso do konca priviti, sicer lahko steklenice počijo zaradi prevelikega pritiska. Če s pripravljenim agarjem ne boste delali takoj, po sterilizaciji privijte pokrove in agar shranite. Naslednjič ga boste morali pred uporabo segreti, da se bo utekočnil. Po sterilizaciji počakajte, da se agar ohladi na temperaturo, ko steklenico že lahko držimo v roki, vendar ne čakajte predolgo, saj se bo agar strdil in ga ne bo mogoče vli v petrijevke (če se to zgodi, ga ponovno segrejte do utekočinjenja). V nekaj petrijevkih vlijte agar, ki ga predhodno niste sterilizirali v ekonom loncu, torej hranilni agar samo zmešajte z vodo, segrejte, da se raztopi, in ga vlijte v petrijevko. Te plošče boste uporabljali pri vaji za testiranje učinkovitosti antibiotikov.

Odpiranje steklenice in prenos agarja v sterilne petrijevke počnite ob ognju (prižganem gorilniku), da s tem zagotovite aseptično delo. Poleg tega bodite pozorni, da kasnejše odpiranje petrijevkih prav tako izvajate ob ognju, razen kadar boste testirali mikroorganizme v zraku.

Učinkovitost umivanja rok:

1. Petrijevke z agarjem razdelite na polovico in ju označite. Ena polovica bo služila za odtis prstov pred umivanjem in ena po umivanju. Bodite pozorni, da vedno na eno polovico odtisnete prste pred umivanjem za primerjavo.

2. Na prvi petrijevki odtisnite blazinice prstov, nato pa roke umivajte pod tekočo vodo 1 minuto in zopet odtisnite blazinice prstov iste roke, vendar umite, kot prej, na ploščo.
3. Eksperiment na drugi petrijevki ponovite na enak način z dezinfekcijskim milom, kjer si pod tekočo vodo z dezinfekcijskim milom umivate roke 2-3 minute. Posebno pozornost posvetite predelom med prsti, pod nohti in na površini dlani. Bodite pozorni, da vedno na eno polovico petrijevke odtisnete prste pred umivanjem za primerjavo.
4. Na tretjo petrijevko odtisnite blazinice prstov, razkužene s razkužilom tako, da ga približno 5 ml nanese na dlani in jih toliko časa drgnete, da se posuši (ponovno posebno pozornost posvetite predelom med prsti, pod nohti in na površini dlani).
5. Za četrto petrijevko pa si razkužite roke s 70% etanolom tako, da približno 5 ml etanola nanese na dlani in jih drgnete toliko časa, da se etanol posuši, pri tem zopet posebno pozornost namenite predelom med prsti, pod nohti in na površini dlani. Z etanolom v bližini ognja ravnajte previdno!
6. Petrijevke inkubirajte pri temperaturi od 25 - 37 °C nekaj dni (če je le možno pri 37 °C, saj ta temperatura zagotavlja maksimalno rast mikroorganizmov).

Mikroorganizmi v zraku in na vsakodnevnih predmetih:

1. Petrijevko z agarjem označite, jo odprite in v odprto petrijevko govorite 5 minut z razdalje 10 cm in jo nato nazaj pokrijte.
2. Drugo petrijevko z agarjem odprite in vanjo zakašljajte ali kihnite.
3. Tretjo petrijevko z agarjem pustite odprto 10 minut.
4. Za vsako izbrano površino ali predmet (mobitel, šminka, WC školjka, kljuka, tla, denar, ...) označite petrijevko. Ob prižganem gorilniku namočite vatenko v fiziološko raztopino in z njo naredite bris izbrane površine in nato razmažite po petrijevki.
5. Vse petrijevke inkubirajte pri 25 - 37 °C nekaj dni.

Testiranje učinkovitost naravnih antibiotikov:

1. Petrijevko z agarjem, ki ste jo okužili že med vlivanjem (agarja niste sterilizirali in niste delali aseptično), označite in na sredino položite oz. kanite izbrano antibiotično sredstvo (česen, ingver, med, zobna pasta, razkužilo, ...).
2. Petrijevke inkubirajte pri 25 - 37 °C nekaj dni.
3. Vsak dan pogledajte in izmerite velikost morebitne inhibicijske cone okoli rezine ali kaplje.

REZULTATI:

Opazujte eksperiment in opišite kaj se zgodi in zakaj.

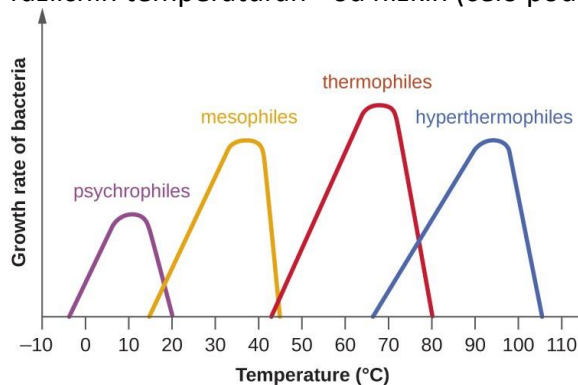
POROČILO:

1. Opazujte rasti na ploščah in primerjajte učinkovitosti različnih načinov umivanja rok. Opazujte ne samo število kolonij pač pa tudi različne tipe kolonij. Kaj lahko zaključite? Na podlagi rezultatov. Teorija: uporaba razkužila/etanola bo povzročila najmanjše število zraslih kolonij.

2. Kaj lahko zaključite na osnovi primerjave plošč, v katero ste govorili in v katero ste kihnili/kašljali? Kaj pa za tisto, ki ste jo pustili 10 minut odprto?
Na vprašanje boste lahko odgovorili po opravljeni vaji.
3. Primerjajte agarne plošče z brisi iz različnih vsakodnevnih stvari. Kje jih je več in kje manj. Zakaj?
Več jih je tam, kjer je večja mikrobiotska pestrost in večje število mikroorganizmov.
4. Primerjajte izmerjene inhibicijske cone različnih morebitnih antibiotičnih sredstev. Kaj lahko sklepate? Ali se je zgodilo, da katero ni imelo cone inhibicije?
Tam, kjer je večja cona inhibicij, je antibiotično sredstvo bolj učinkovito. Načeloma bi morala vsaka kolonija imeti cono inhibicije, če smo uporabili dovolj močno antibiotično sredstvo (razkužilo). Pomanjkanje cone inhibicije nakazuje na šibkost antibiotičnega sredstva oz. odpornost mikroorganizma.

PREIZKUS PRIDOBLENEGA ZNANJA:

1. Kaj pomeni aseptično delo?
Aseptično delo (tehnika) je niz postopkov (npr. delo v laminariju ali v bližini ognja), ki preprečujejo kontaminacijo (okužbo) opreme in reagentov (npr. gojišča, plošče) z neželenimi mikroorganizmi.
2. Kako preverimo čistost mikrobne kulture?
Za preverjanje čistosti mikrobne kulture najprej vizualno pregledamo kolonije (npr. njihovo barvo, velikost, površino), saj morajo vse kolonije videti enako. V naslednjem koraku "vzgojimo" mikroorganizme na selektivnih gojiščih, na katerih lahko rastejo samo kolonije izbranih mikroorganizmov. Čistost je mogoče preveriti tudi z metodami PCR, ki primerjajo sekvence DNA med različnimi mikroorganizmi.
3. Kako temperatura vpliva na rast mikroorganizmov? Ponazorite z grafom.
Temperatura vpliva na hitrost rasti, ker so različni mikroorganizmi sposobni rasti pri različnih temperaturah - od nizkih (celo pod 0 °C) do zelo visokih (celo okoli 100 °C).



4. Kaj je antibiogram?

Antibiogram je preprost test za določitev bakterijske odpornosti proti antibiotikom in ga je mogoče uporabiti za testiranje učinkovitosti različnih antibiotikov proti izbranemu mikroorganizmu.

5. Kaj je antibiotična rezistenca in kateri vrsti rezistence poznamo?

Rezistenca oz. odpornost proti antibiotikom je sposobnost bakterij, da izničijo učinke antibiotikov, ki so se prej uporabljali za zdravljenje. Poznamo tri vrste odpornosti: naravne (naravno odporne bakterije), mutacijske (rezultat mutacije v genih) in pridobljene (posledica prenosa genskega materiala med dvema vrstama bakterij).

USPEŠNOST OPRAVLJANJA VAJE:

Pripravljenost na vajo:	
Eksperimentalna izvedba vaje:	
Rezultati in naloge:	
Upoštevanje pravil varnostnega reda:	
Datum pregleda:	Podpis mentorja: