

UM, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo

Trajnostna biotehnologija

Navodila za laboratorijske vaje (zbrano gradivo)

Maja Leitgeb, Mateja Primožič in Katja Vasić

Študenti:

Maribor, 2023

Izolacija bakterij iz vod iz različnih virov na selektivnih agarjih

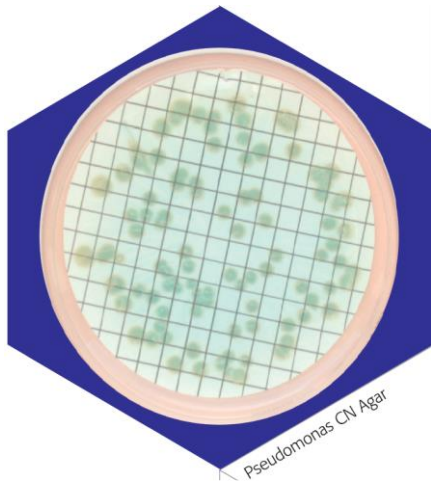
Teoretske osnove:

Zaradi možnih akutnih posledic, je obvladovanje mikroorganizmov v pitni vodi na prvem mestu po pomenu za zdravje. Mikrobiološki parametri nam pokažejo obseg in stopnjo fekalne ali druge onesnaženosti pitne vode z mikroorganizmi. V pitni vodi se rutinsko določajo fekalne bakterije (*Escherichia coli*, enterokoki), ki imajo izvor v človeških in/ali živalskih iztrebkih in indikatorske bakterije (*Clostridium perfringens* s sporami, koliformne bakterije, število kolonij pri 22 °C in pri 37 °C), v embalirani pitni vodi pa še bakterije *Pseudomonas aeruginosa*.

Za določevanje njihove prisotnosti v vodah so potrebna različna gojišča. Po uporabnosti delimo gojišča na splošna ali univerzalna, selektivna in diferencialna. Hranljiva juha (PKE) ali triptični soja bujon (TSB) sta splošni gojišči, ker omogočata rast zelo širokemu spektru heterotrofnih mikrobov. Za rast nekaterih bolj zahtevnih mikrobov se v gojišča dodaja kri, ekstrakti živalskih ali rastlinskih tkiv in taka gojišča imenujemo obogatena gojišča.

Selektivna gojišča omogočajo rast le določenim mikroorganizmom. Žolčna kislina, bazični fuksin in kristal vijolično favorizirajo rast Gram-negativnih bakterij in inhibirajo rast Gram-pozitivnih bakterij. Določene bakterije lahko iz mešane populacije selektivno namnožimo, če dodamo v gojišče hranilo, ki ga samo te bakterije lahko izkoriščajo (škrob - amilolitični mikrobi, mineralno gojišče z virom energije brez N - fiksatorji dušika, mineralno gojišče z amonijem - nitrifikatorji). Primer: gojišča, ki vsebujejo telurit, natrijev azid ali talijev acetat (s koncentracijami od 0,1 – 0,5 g/L) bodo inhibirala rast Gram-negativnih bakterij. Gojišča, ki vsebujejo penicilin (5 – 50 U/mL) ali kristal vijolično (2 mg/L) bodo inhibirala rast Gram-pozitivnih bakterij.

Diferencialna gojišča omogočajo razlikovanje med različnimi vrstami bakterij. Dodatek določene snovi povzroči spremembo načina rasti ali kako drugače omogoči razlikovanje (krvni agar - hemolitični, nehemolitični mikrobi; MacConkey agar z laktozo in barvilom nevtral rdeče - fermentativne koliformne enterobakterije se obarvajo rdeče; eozin in metilensko modro (EMB) - kovinsko obarvane kolonije *E. coli*, ker inkorporirajo barvilo).

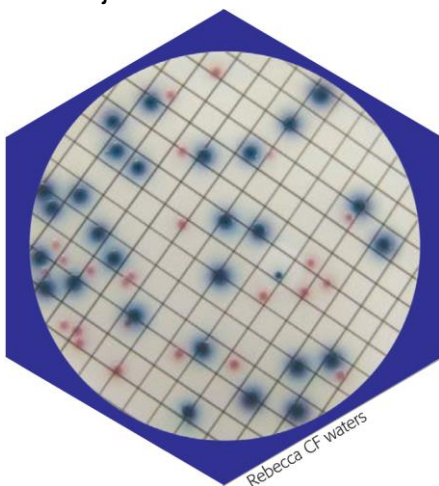


Gojišča

- ❖ *Pseudomonas aeruginosa*: **Pseudomonas CN Agar**

Pseudomonas CN je selektivno gojišče za izolacijo in štetje bakterij *Pseudomonas aeruginosa* v ustekleničeni vodi, bazenih in vseh vodah, namenjenih človeškemu prehranjevanju. Gojišče vsebuje visoke vrednosti peptonov za povečanje rasti *Pseudomonas* ter nalidixinsko kislino in cetrimid, ki zavirata rast moteče flore.

Detekcija:



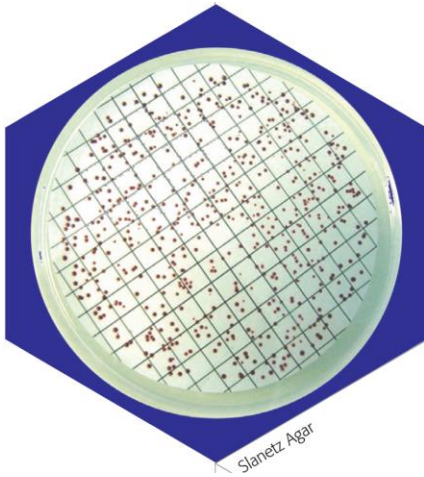
- modro-zelene kolonije: *P. aeruginosa*
- fluorescentne kolonije pod UV: z nadaljnjim dokazovanjem: *P. aeruginosa*
- rjavo-rdeče kolonije: z nadaljnjim dokazovanjem: *P. aeruginosa*

- ❖ *Escherichia coli* in koliformne bakterije: **Rebecca CF waters**

Rebecca™ CF waters je selektivno gojišče, ki se uporablja za direktno detekcijo bakterij *E. coli* in koliformnih bakterij v vodi. Detekcijo omogoča β -D-glukoronidaza, ki *E. coli* obarva modro. Koliformne bakterije se bodo s svojim izražanjem β -D-galaktozidaze obarvale roza-vijolično. Mešanica selektivnih agentov pa zavira rast moteče flore.

Detekcija:

- modre kolonije: *E. coli*
- roza-vijolične kolonije: druge koliformne bakterije



❖ Enterokoki: **Slanetz Agar**

Slanetz agar je selektivno gojišče za izolacijo in štetje streptokokov v vodi. Dodatek natrijevega azida zavira rast Gram-negativnih bakterij, TTC (trifenil 2,3,5-tetrazolium klorid) pa je indikator bakterijske rasti. Ko se pretvori v formazan, obarva kolonije v rdeče-rjavo barvo.

Detekcija:

- rdeče-rjave kolonije: *Enterococcus*

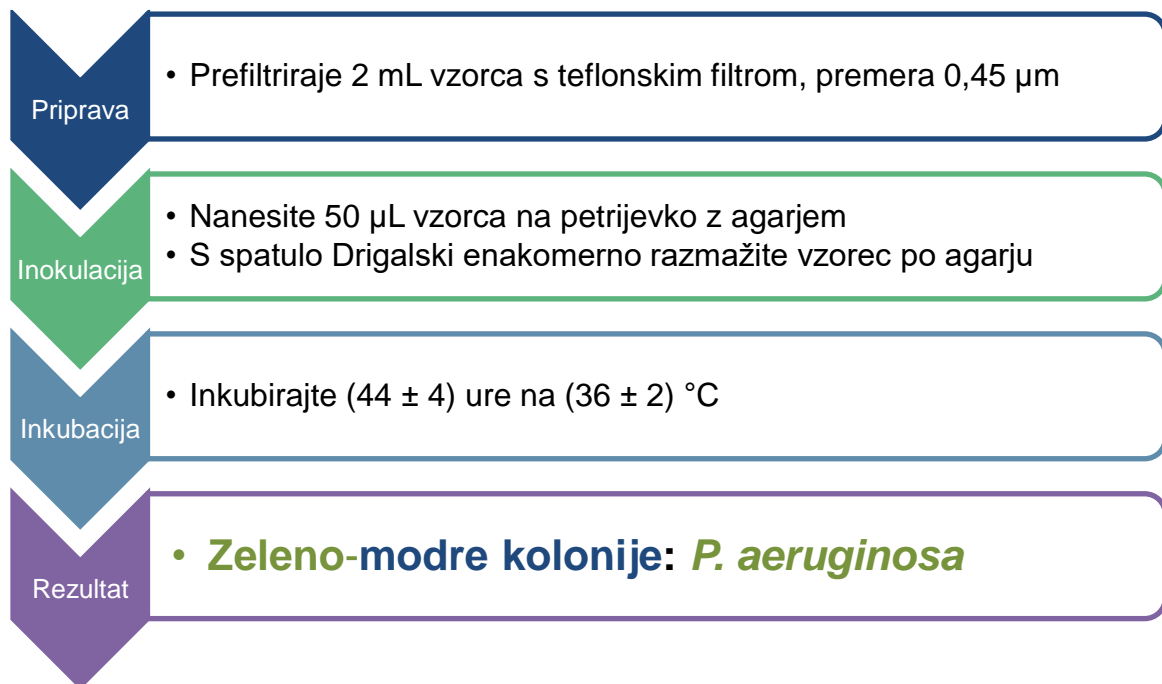
1. vaja: Določevanje prisotnosti *Pseudomonas aeruginosa* v vodah iz različnih virov

Pseudomonas aeruginosa je splošno prisotne v okolju. Je Gram-negativna paličasta bakterija s kapsulo, ki lahko povzroči bolezni pri rastlinah in živalih, vključno s človekom. Odporna je proti številnim antibiotikom, je zelo razširjena ter lahko povzroča hude oblike bolezni, na primer bolnišnične okužbe (kot je pljučnica zaradi umetnega predihavanja) in sindrome, povezane s sepsom. V vlažnem okolju lahko kolonije tvorijo biofilme in so zelo odporne na dodana dezinfekcijska sredstva.

Mejna vrednost za *P. aeruginosa* v pitni vodi je: 0 /250 ml.

Postopek:

- *P. aeruginosa*: **PSEUDOMONAS CN AGAR**



Rezultati:

a) filtrirani vzorci

IME VZORCA:			
Inkubiranje pri 37 °C, po 48 urah			
Pseudomonas CN Agar	število kolonij/mL	število kolonij/mL	število kolonij/mL

b) nefiltrirani vzorci

IME VZORCA:			
Inkubiranje pri 37 °C, po 48 urah			
Pseudomonas CN Agar	število kolonij/mL	število kolonij/mL	število kolonij/mL

Izračuni:

Opažanja:

2. vaja: Določevanje prisotnosti *Escherichia coli* in koliformnih bakterij v vodah iz različnih virov

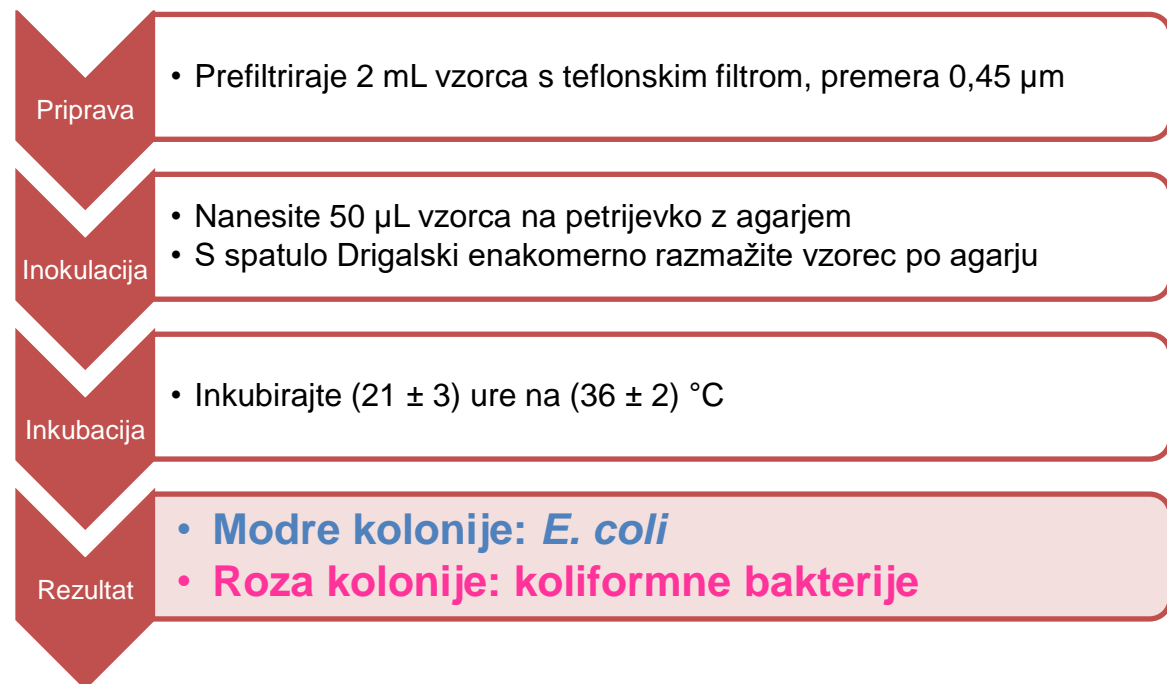
Escherichia coli je Gram-negativna bakterija in torej ni sposobna tvorbe spor. Prisotna je v človeškem in živalskem blatu (feces) v velikem številu ter posledično v odplakah in vodah, ki so onesnažene s fekalijami (človeka, domačih in divjih živali, uporaba v poljedelstvu). Prisotnost *E. coli* v pitni vodi zanesljivo dokazuje, da je bila voda fekalno onesnažena.

Mejna vrednost za *E. coli* v pitni vodi je: 0 /100 ml.

Koliformne bakterije so razširjene v naravnem okolju (prst, površinske vode). Navadno jih najdemo v večjem številu v primeru slabo vzdrževanih vodovodnih sistemov, vodnjakov, zajetij. Prisotnost le-teh v pitni vodi govori o splošnem higienskem stanju vodovodnega sistema in v primeru dezinfekcije o njeni učinkovitosti.

Postopek:

***E. coli* in koliformne bakterije: REBECCA CF WATERS**



Rezultati:

a) filtrirani vzorci

IME VZORCA:			
Inkubiranje pri 37 °C, po 24 urah			
Rebecca waters Agar	število kolonij/mL	število kolonij/mL	število kolonij/mL

b) nefiltrirani vzorci

IME VZORCA:			
Inkubiranje pri 37 °C, po 24 urah			
Rebecca waters Agar	število kolonij/mL	število kolonij/mL	število kolonij/mL

Izračuni:

Opažanja:

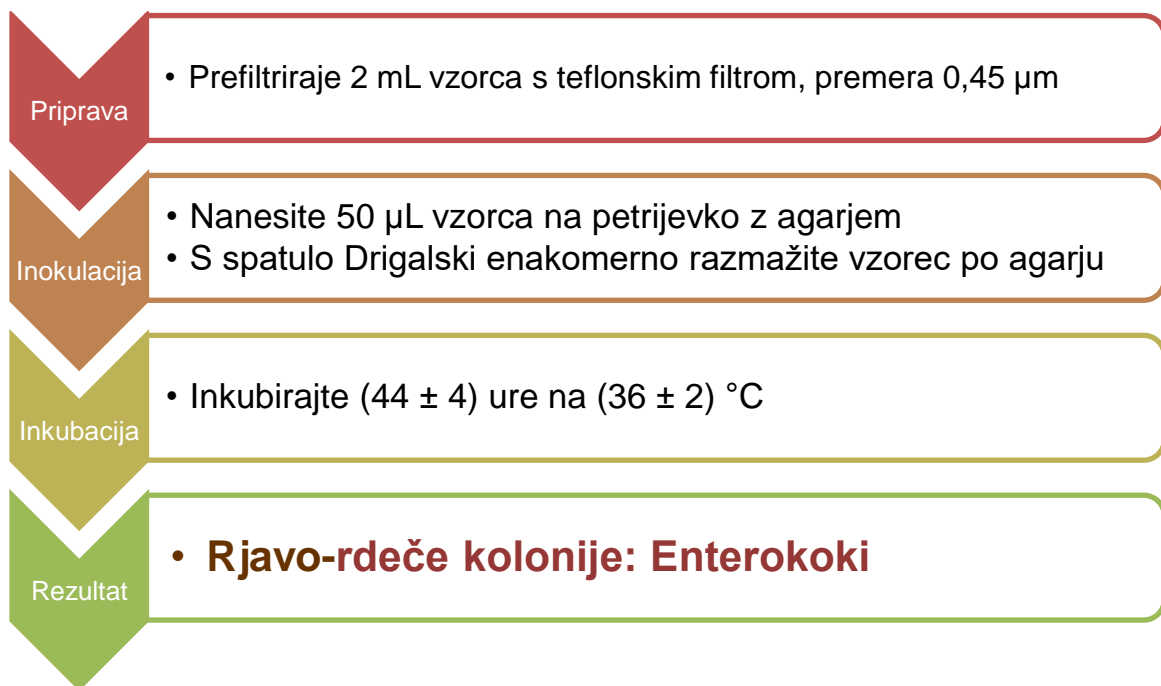
3. vaja: Določevanje prisotnosti enterokokov v vodah iz različnih virov

Enterokoki so prisotni v črevesju oz. v blatu ljudi in živali. So Gram-pozitivne okroglaste bakterije. Upoštevamo jih kot zanesljive fekalne indikatorje. V vodi se ohranijo dlje časa kot *E. coli*, zato njihovo prisotnost v pitni vodi, v kateri drugih bakterij nismo ugotovili, ocenjujemo kot starejše fekalno onesnaženje.

Mejna vrednost za enterokoke v pitni vodi je: 0 /100 ml.

Postopek:

Enterokoki: SLANETZ AGAR



Rezultati:

a) filtrirani vzorci

IME VZORCA:			
Inkubiranje pri 37 °C, po 48 urah			
SLANETZ Agar	število kolonij/mL	število kolonij/mL	število kolonij/mL

b) nefiltrirani vzorci

IME VZORCA:			
Inkubiranje pri 37 °C, po 48 urah			
SLANETZ Agar	število kolonij/mL	število kolonij/mL	število kolonij/mL

Izračuni:

Opažanja: