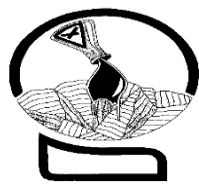


Prenos znanja v kmetijstvu
kot dodana vrednost
v varovanju okolja

Javni razpis/ AGRI - KNOWS/ Prenos znanja v kmetijstvu kot doda
vrednost pri zasciti okolja
Javni razpis/ AGRI - KNOWS/Trasferimento delle conoscenze in
agricoltura come valore aggiunto per la tutela dell'ambiente

VPLIV PENICILINA NA RAST MIKROORGANIZMOV V VODI IN V TLEH

Šempeter pri Gorici, 22.10.2014



Mentorji:
Karmen Goljevšček Čargo
Ivana Poša



2007-2013

cooperazione territoriale europea
programma per la cooperazione
transfrontaliera

Italia-Slovenia

evropsko teritorialno sodelovanje
program čezmejnega sodelovanja

Slovenija-Italija



Investiamo nel
vostro futuro!

Naložba v vašo
prihodnost!

www.ita-slo.eu

Progetto cofinanziato dal Fondo europeo di
sviluppo regionale

Projekt sofinancira Evropski sklad
za regionalni razvoj

PENICILIN

- Je antibiotik, ki se uporablja za zdravljenje bakterijskih okužb.
- Izloča se v okolje preko iztrebkov živali in človeka, človek pa ga vnaša tudi z odpadki iz farmacije in kmetijstva.



OPREDELITEV PROBLEMA IN NAMEN RAZISKOVALNE NALOGE

Za uspešno rast vsake rastline sta potrebna kvalitetna tla in voda.

V zadnjem času so tla, površinske in podtalne vode vedno bolj onesnažene s penicilinom.

- *Odločili smo se, da najprej ugotovimo, kako penicilin sploh deluje, nato pa s pomočjo simuliranega ekosistema spoznati, kako le ta vpliva na mikroorganizme v zemlji in vodi, ki pronica skozi njo.*

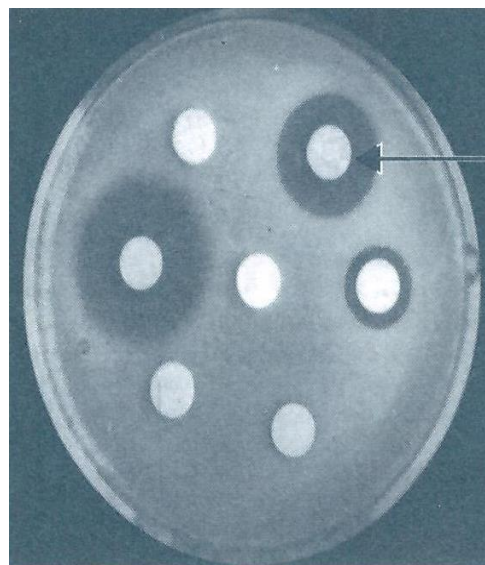
I.DEL (Šol.let:2012/2013)

POTEK DELA

- I. Antibiogram
- II. Priprava vzorcev zemlje in vode
- III. Inokulacija ali nacepljanje mikroorganizmov vode in zemlje na trdna gojišča
- IV. Štetje kolonij na posameznih gojiščih

I. ANTIBIOGRAM

- Antibiogram je metoda, s katero ugotavljamo občutljivost bakterij na antibiotike ali odpornost proti njim.
- Pri tem uporabljamo kemoterapevtike.

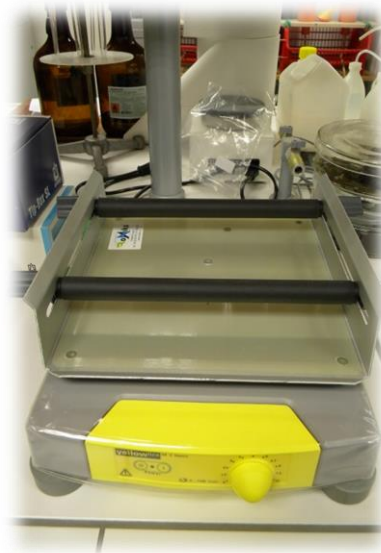


ZAVIRALNI OBROČ

II. PRIPRAVA RAZLIČNIH KONCENTRACIJ PENICILINA

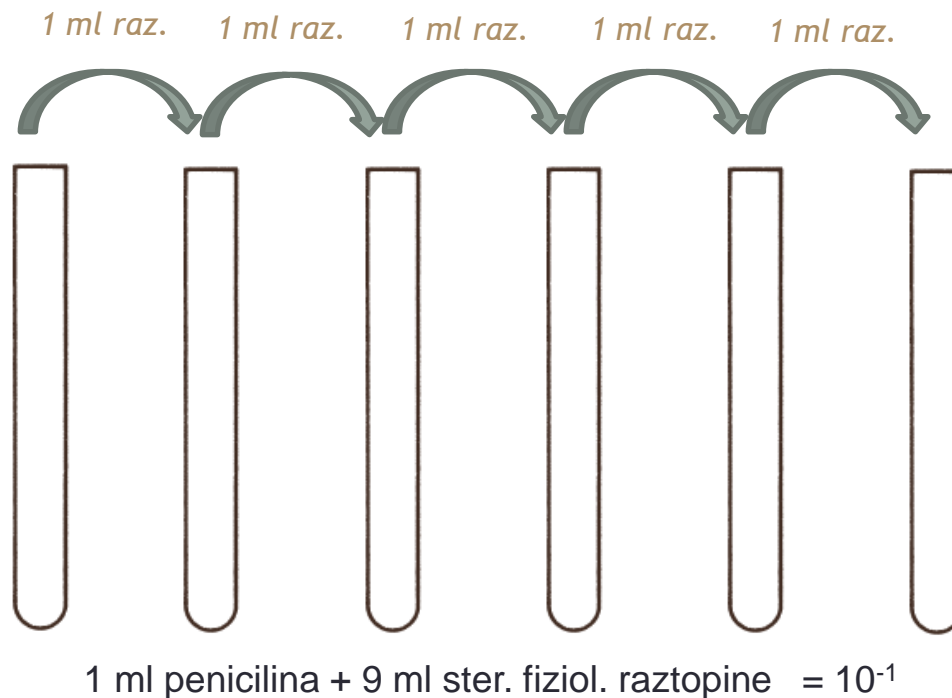
Material:

- epruvete
- stojalo za epruvete
- erlenmajerica
- stresalnik
- vzorec zemlje (tal)
- penicilin
- mikropipeta (1 ml; 0,1 ml)
- spatula
- gojišče



III. POTEK DELA

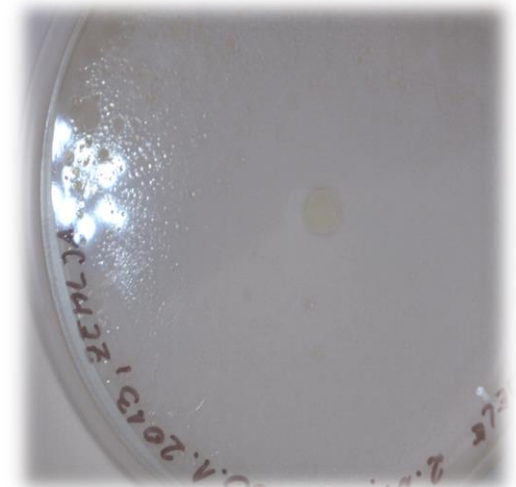
- V sterilni erlenmajerici pripravimo suspenzijo zemlje (10 g prsti + 90 ml sterilne fiziološke raztopine).
- Suspenzijo na stresalniku stresamo 1 uro.
- V epruvetah pripravimo 6 različnih razredčitev penicilina: od 10^{-1} do 10^{-6} .



- *Odpipetiramo 0,1 ml vzorca zemlje in ga prenesemo na 6 gojišče.*
- *Vzorec razmažemo s spatulo po celi površini in ob ognju sušimo 5 minut.*
- *V vsako petrijevko (gojišče) s pinceto položimo en disk, ki smo ga predhodno namočili v ustrezno razredčitev penicilina.*

IV. REZULTATI

- Ugotovili smo, da antibiotik zavira rast mikroorganizmov.
- V raztopini s koncentracijo 10^{-1} mikroorganizmi niso zrastle, pri koncentraciji 10^{-6} pa je bil porast mikroorganizmov tako velika, da jih nismo mogli prešteti.



II.DEL (Šol.let:2012/2013)

IZVEDBA

- I. Izdelava kolon (simuliran ekosistem)
- II. Onesnaževanje kolon s penicilinom in prelivanje kolon z deževnico
- III. Nacepitev mikroorganizmov iz zemlje na trdno gojišče, štetje kolonij, analiza vseh vzorcev
- IV. Nacepitev mikroorganizmov iz vode na trdno gojišče, štetje kolonij, analiza vseh vzorcev

I. IZDELAVA KOLON

Material

- čaša
- tehtnica
- kolone (6)
- plastična mrežica
- različne frakcije peska (debelejši in drobnejši)
- zemlja (iz šolskega rastlinjaka)

Potek izdelave kolon

- Vzamemo šest kolon.
- Na dno kolone damo plastično mrežico, preko katere nasujemo 40 ml debelejšega peska.
- Ponovno dodamo plastično mrežico in jo prekrijemo s 50 ml drobnejšega peska.
- Kolone nato napolnimo s 4 kg zemlje.
- Na spodnji del vsake kolone nato pritrdimo cevko.
- Kolone na koncu prelijemo z vodo.



II. ONESNAŽEVANJE KOLON S PENICILINOM IN PRELIVANJE Z DEŽEVNICO

Material

- penicilin
- deževnica
- steklene čaše (6)

Potek dela



2 ml

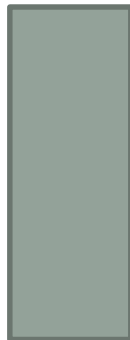
2 ml

0,5 ml

0,5 ml

kontrola

kontrola



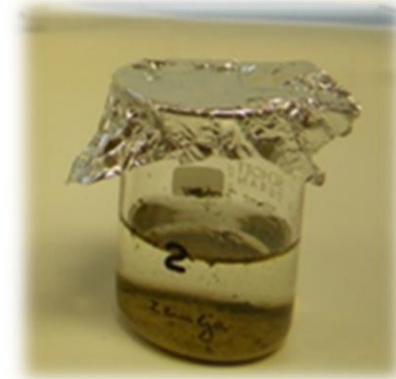
- V vsako kolono nalijemo 400 ml deževnice.
- Deževnica, ki jo nalijemo v kolone, pronica v globino zemlje in spodaj počasi odteka skozi cevko.



III. NACEPITEV MIKROORGANIZMOV IZ ZEMLJE NA TRDNA GOJIŠČA

Material

- Vzorec zemlje (tal)
- Sterilno gojišče (agar MacConkey)
- *Hranljiva juha* (PKE)
- Eza
- Špiritni gorilnik
- Erlenmajerica
- Stresalnik
- Tehnica
- Fiziološka raztopina



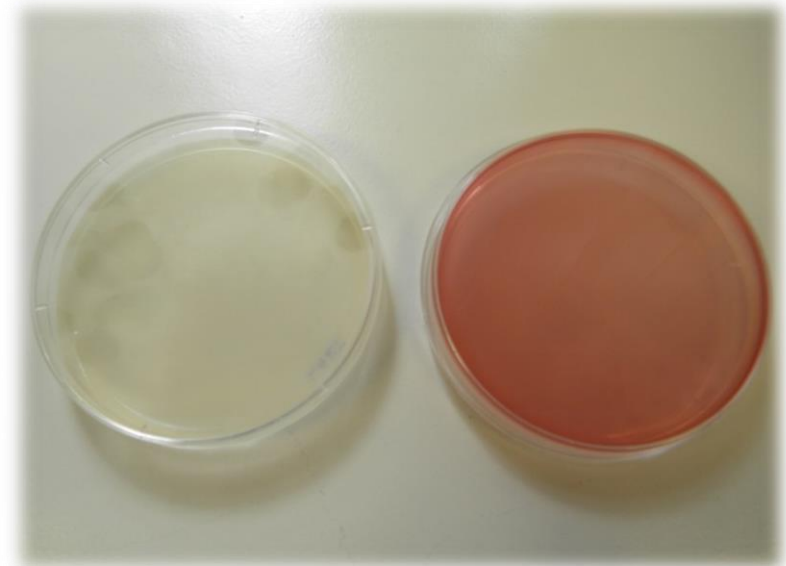
Gojišča so substrati za gojenje mikroorganizmov v laboratorijskih razmerah.

Pri raziskovalni nalogi smo uporabili dve vrsti gojišč:

- *hranljivo juho (PKE)*
- *agar MacConkey*
(selektivno gojišče za koliformne bakterije)



KOLIFORMNE BAKTERIJE so skupina različnih bakterij v okolju. Z njimi presojamo onesnaženje z večjimi količinami organskih ali anorganskih snovi iz okolja.

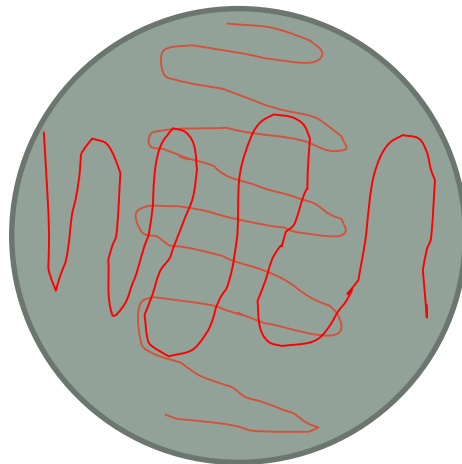


Potek dela

- V erlenmajerici natehtamo 10 g zemlje in prelijemo z 90 ml sterilne fiziološke raztopine.
- Erlenmajerico damo na stresalnik za eno uro na hitrost 2.
- Delovno površino redno čistimo z razkužili.
- Nacepimo mikroorganizme iz suspenzije zemlje na dve različni vrsti gojišč z ezo ob plamenu.

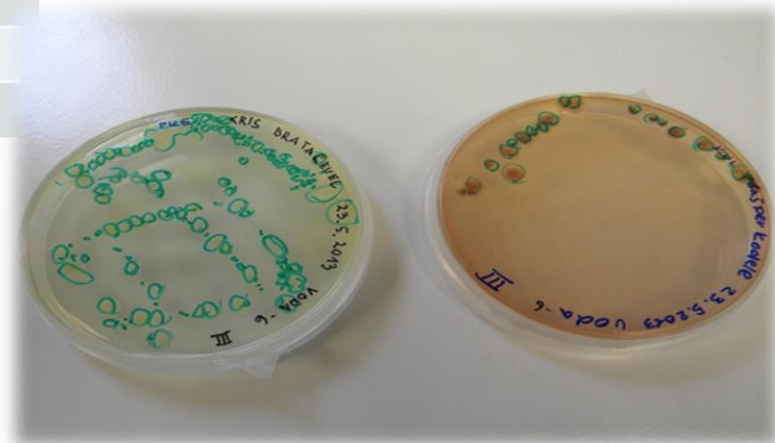


- Kapljico razmažemo s krožniki gibi v obliki niti.
- Ezo nato steriliziramo nad plamenom, dokler ne zažari.
- Ponovno prenesemo kapljico suspenzije na gojišče in naredimo vijugasto črto pravokotno na prvotni razmaz.
- Gojišče inkubiramo pri 28 ° C

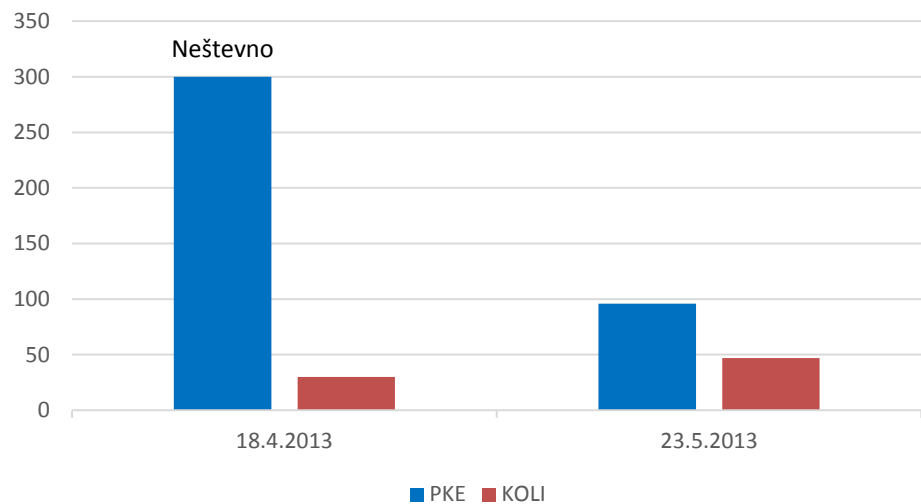


Rezultati

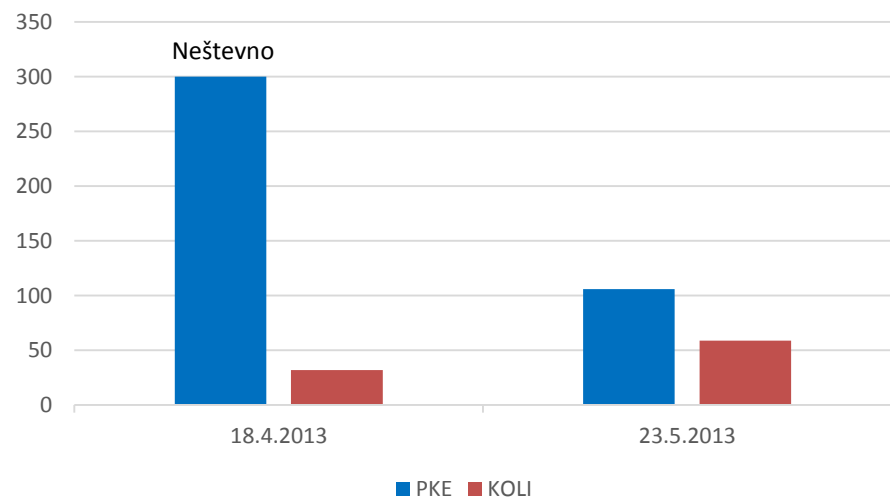
Kolona	Vrsta	Datum štetja	
		18.4.2013	23.5.2013
1. KOLONA	PKE	Neštevno	96
	KOLI	30	47
2. KOLONA	PKE	Neštevno	106
	KOLI	32	59
3. KOLONA	PKE	181	75
	KOLI	37	51
4. KOLONA	PKE	Neštevno	101
	KOLI	41	66
5. KOLONA	PKE	Neštevno	89
	KOLI	8	13
6. KOLONA	PKE	186	91
	KOLI	9	11

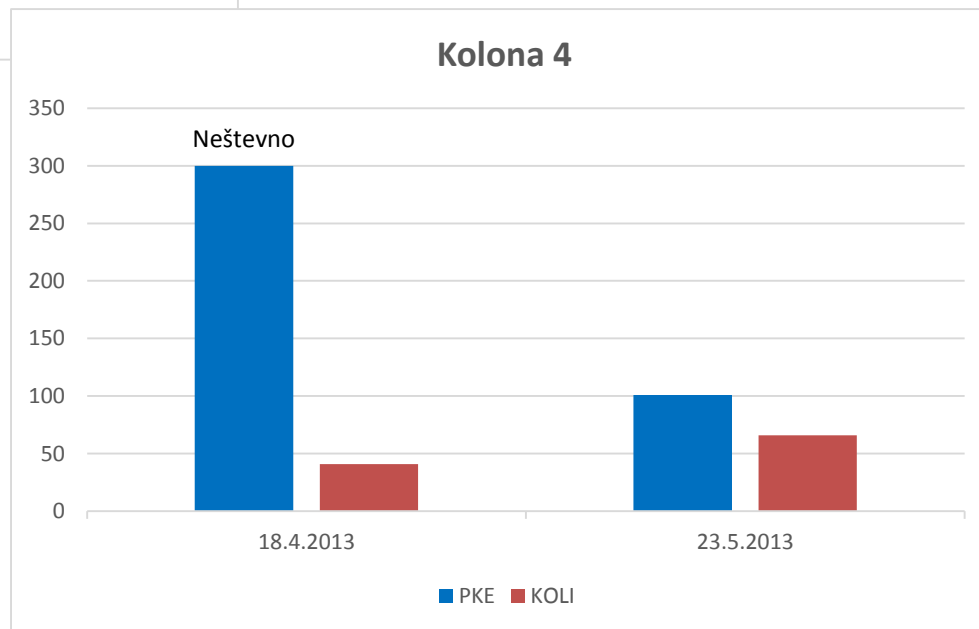
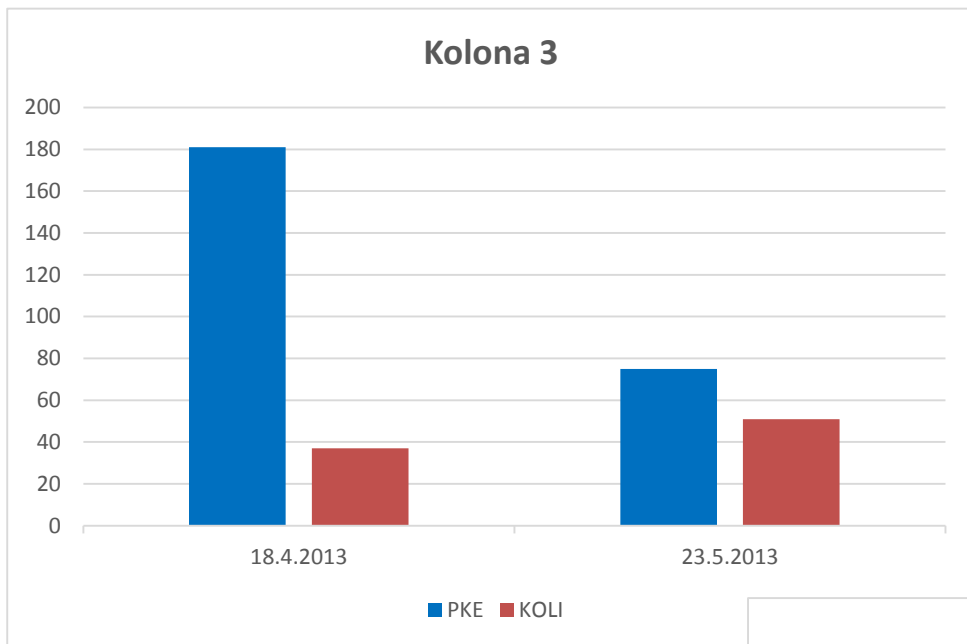


Kolona 1



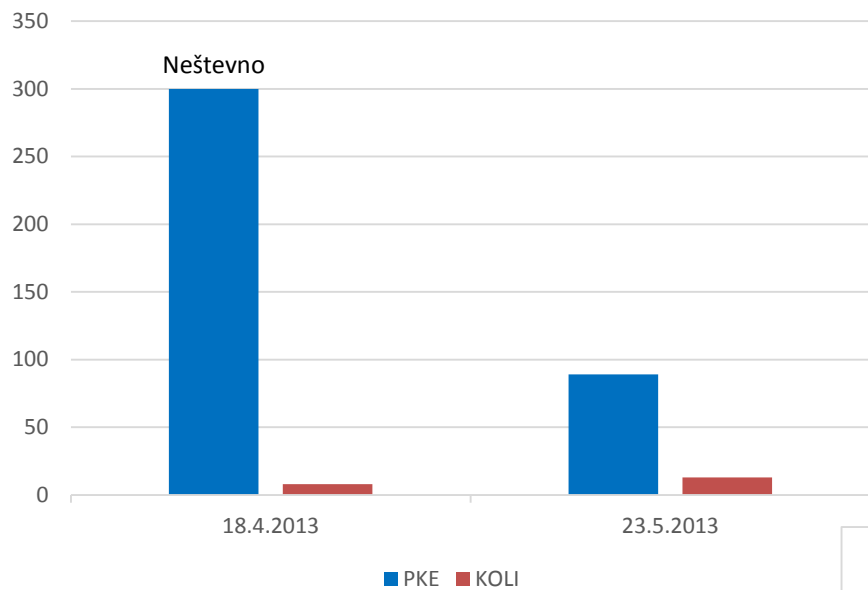
Kolona 2



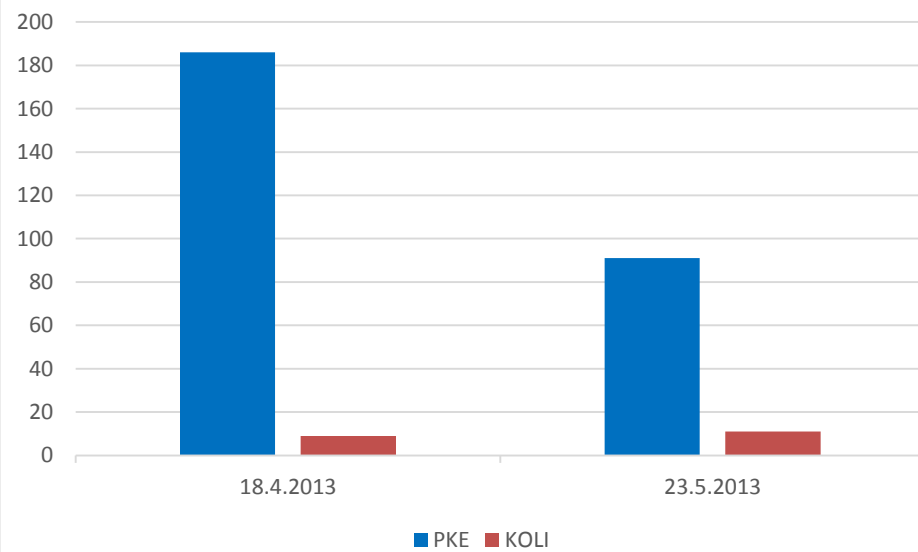


Kolona 5

Neštevno



Kolona 6



- Penicilin kot antibiotik je v tleh mikrobiološko neaktiven, kar pomeni, da ne vpliva na spreminjanje mikroorganizmov v tleh.
- Iz rezultatov je razvidno, da antibiotik, s katerim smo onesnažili tla vpliva na povečanje koliformnih bakterij. Po naključju smo po že končanih poskusih in narejenih analizah izvedeli, da preparat s katerim smo onesnaževali zemljo ni bil samo penicilin ampak penicilin z dodatkom dihidrostreptomicina, ki izboljšuje delovanje antibiotika in se imenuje sustrepen.
- Ker smo s poskusi in analizami zaključili in rezultate poskusov prvega leta že objavili, smo pustili ime antibiotika kar penicilin.

IV. NACEPITEV MIKROORGANIZMOV IZ VODE NA TRDNA GOJIŠČA

Material

- Sterilno gojišče (agar MacConkey)
- *Hranljiva juha* (PKE)
- Eza
- Špiritni gorilnik
- Vzorci vode iz kolon

Potek dela

- Nacepimo mikroorganizme iz vode (voda iz kolon) na dve različni vrsti gojišč z ezo ob plamenu.

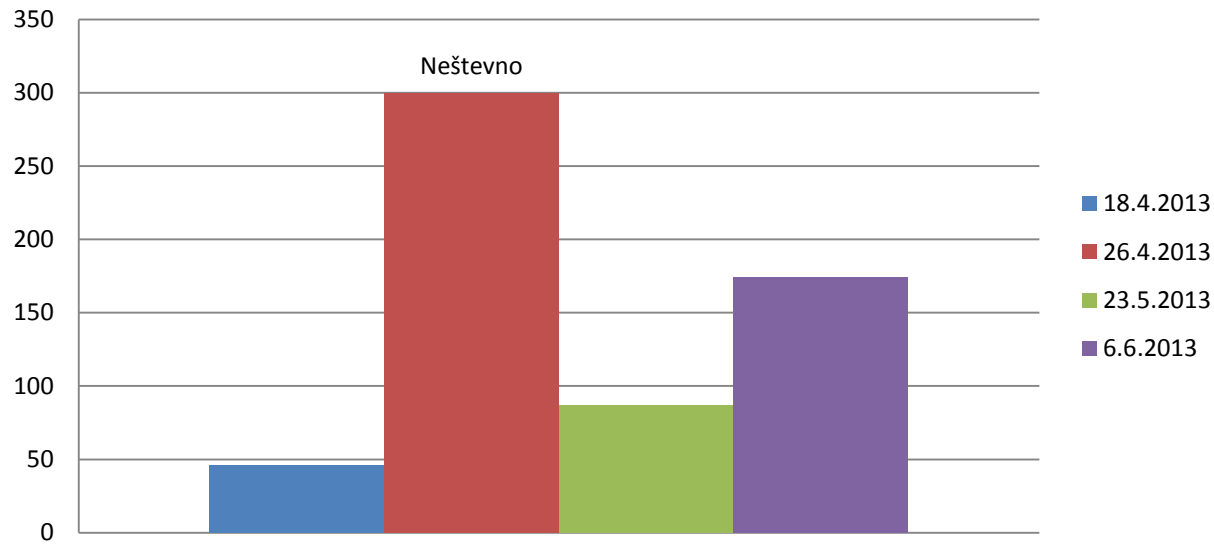


Rezultati

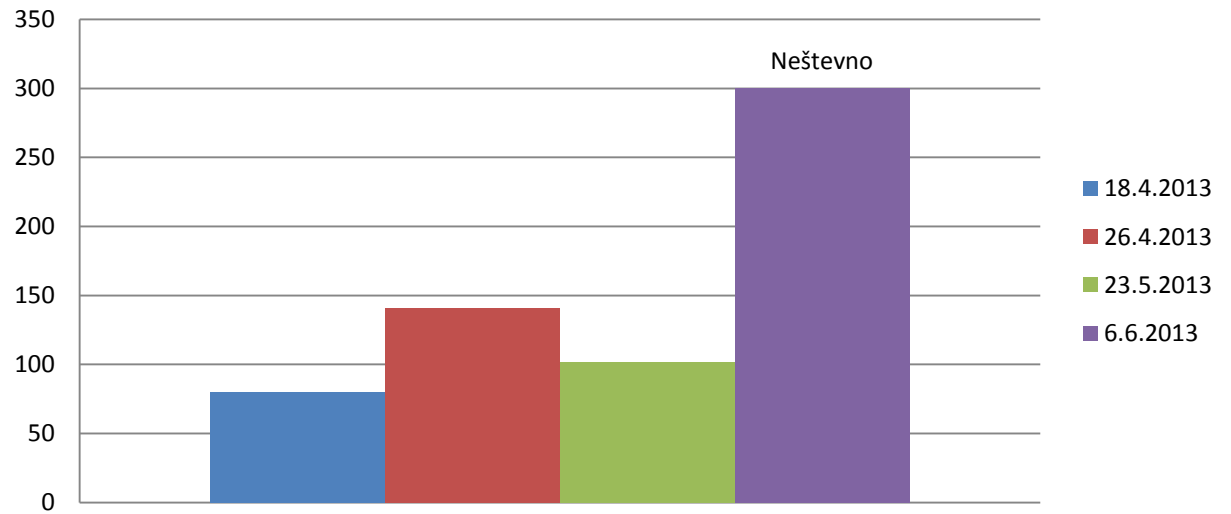
MacConkey

Kolona	Datum štetja			
	št. kolonij			
	18.4.2013	26.4.2013	23.5.2013	6.6.2013
1. KOLONA	46	neštevno	87	174
2. KOLONA	80	141	102	neštevno
3. KOLONA	14	26	60	176
4. KOLONA	10	19	45	neštevno
5. KOLONA	9	8	12	22
6. KOLONA	9	8	12	22

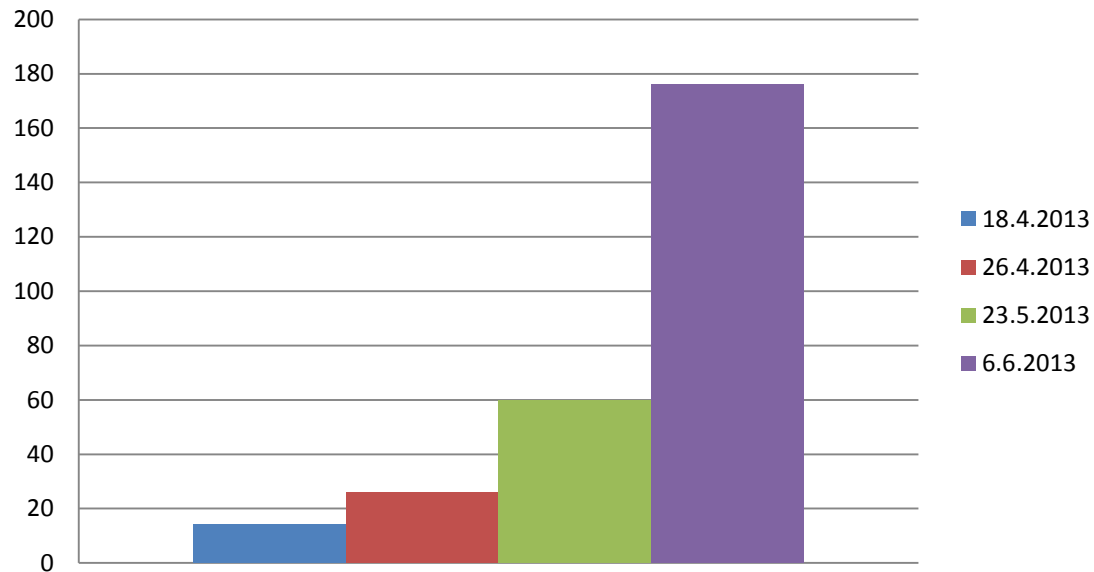
Kolona 1



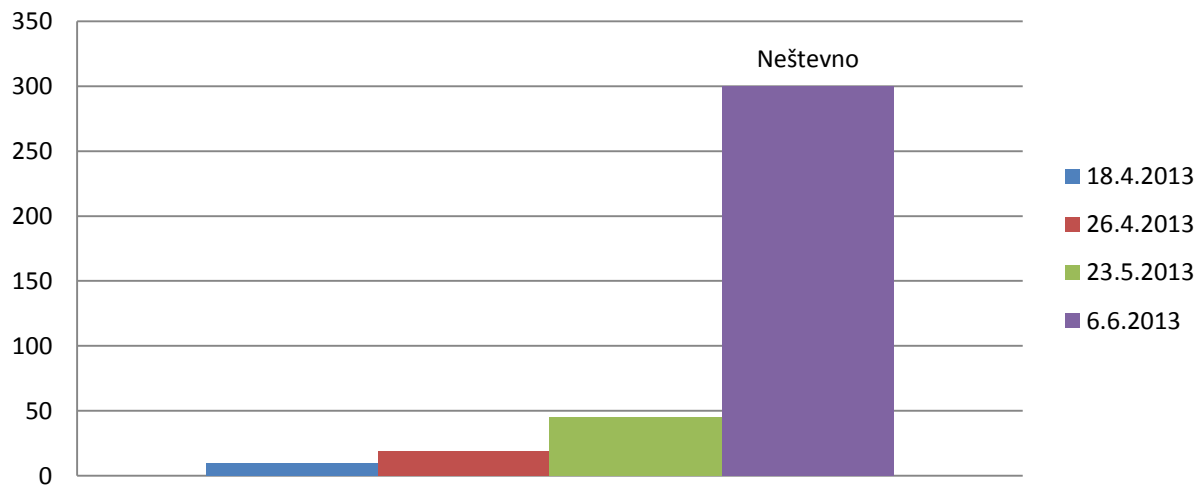
Kolona 2



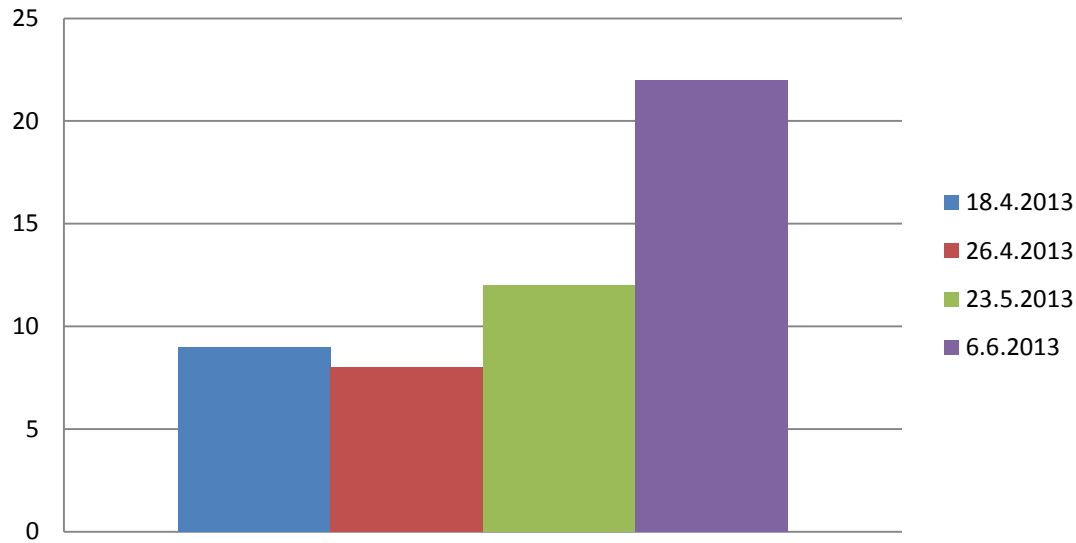
Kolona 3



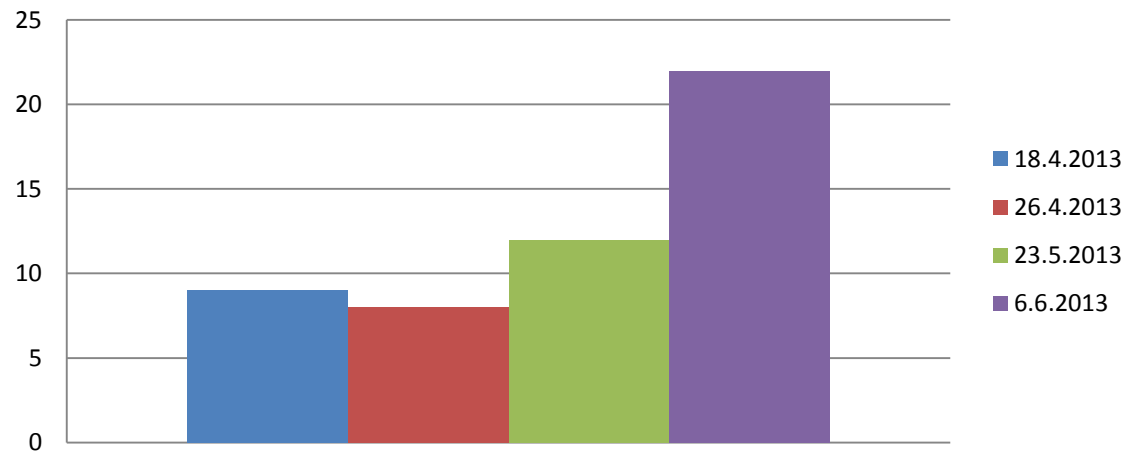
Kolona 4



Kolona 5



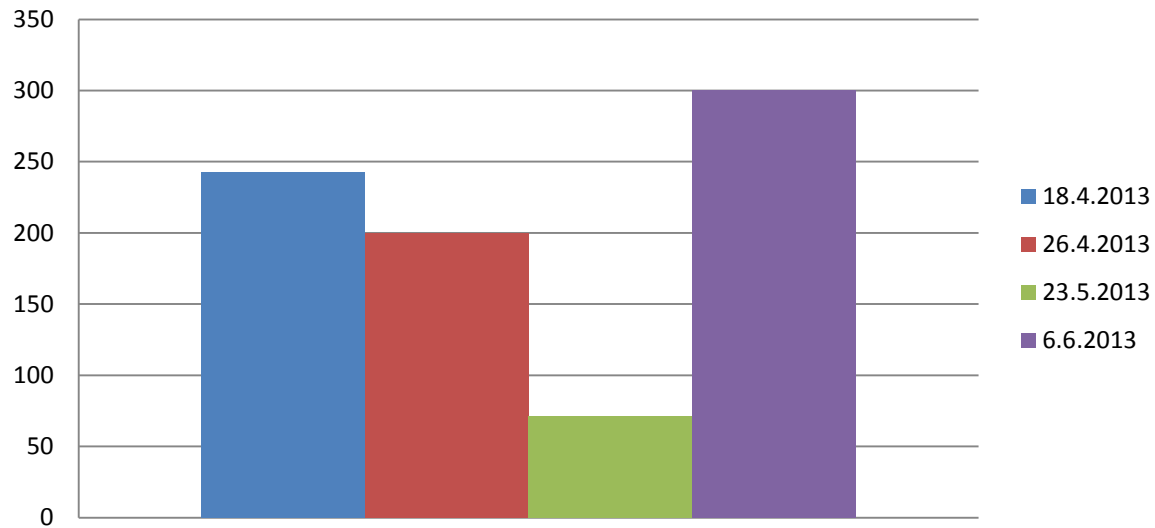
Kolona 6



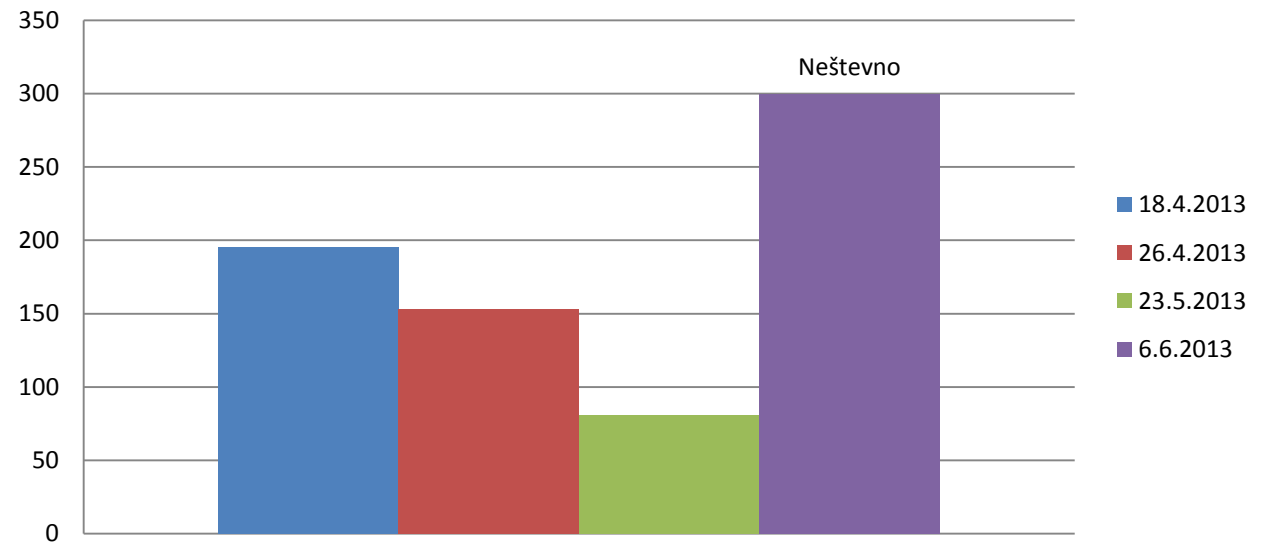
PKE

Kolona	Datum štetja			
	št. kolonij			
	18.4.2013	26.4.2013	23.5.2013	6.6.2013
1. KOLONA	243	200	71	neštevno
2. KOLONA	195	153	81	neštevno
3. KOLONA	101	135	155	neštevno
4. KOLONA	108	141	176	neštevno
5. KOLONA	167	157	160	neštevno
6. KOLONA	131	neštevno	131	neštevno

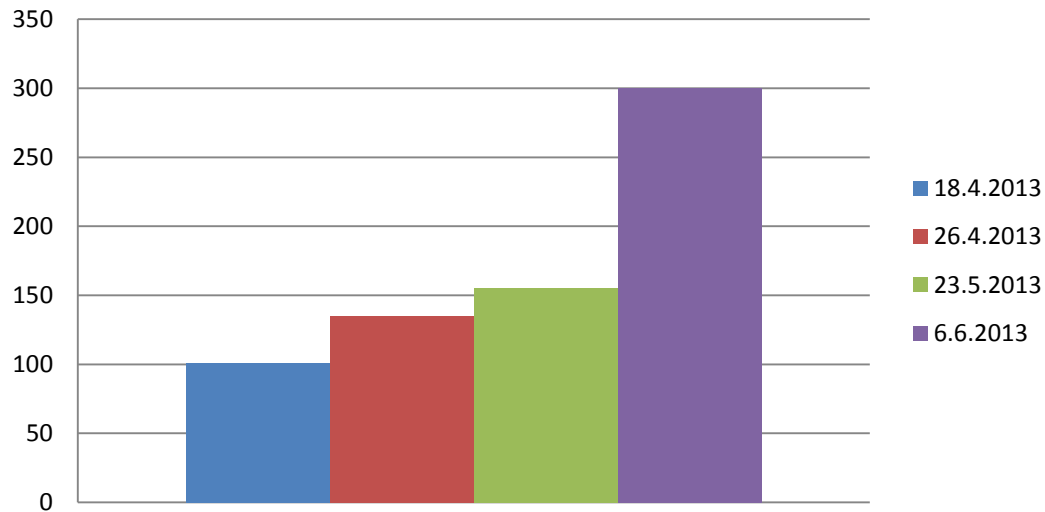
Kolona 1



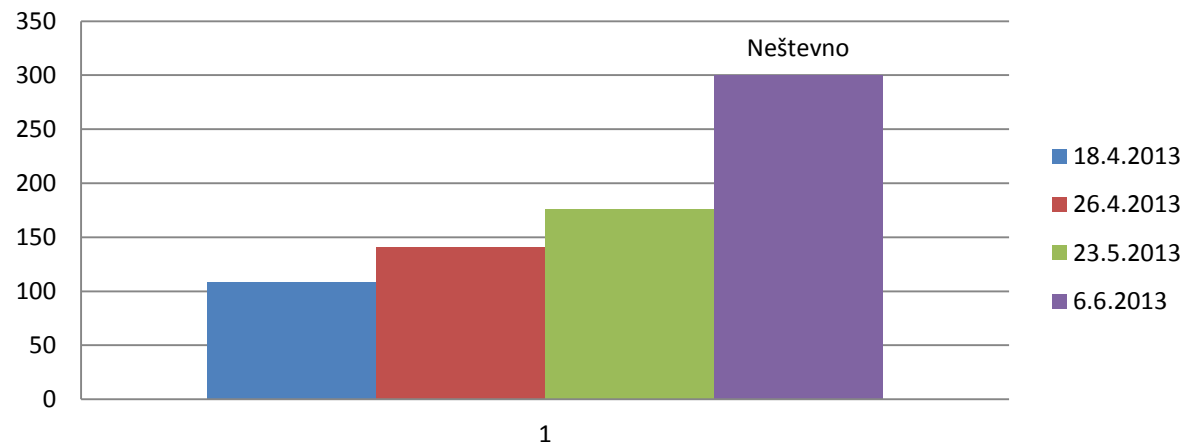
Kolona 2



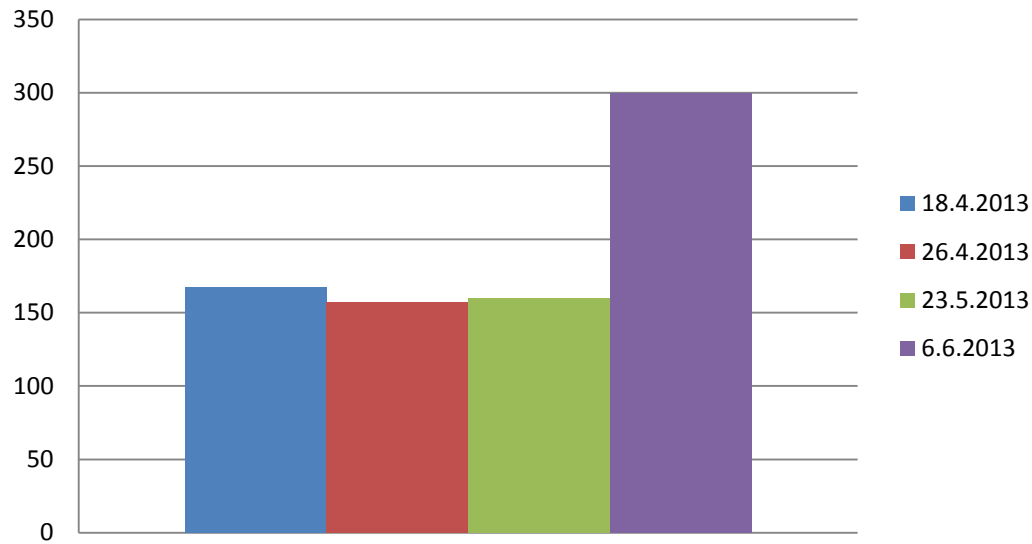
Kolona 3



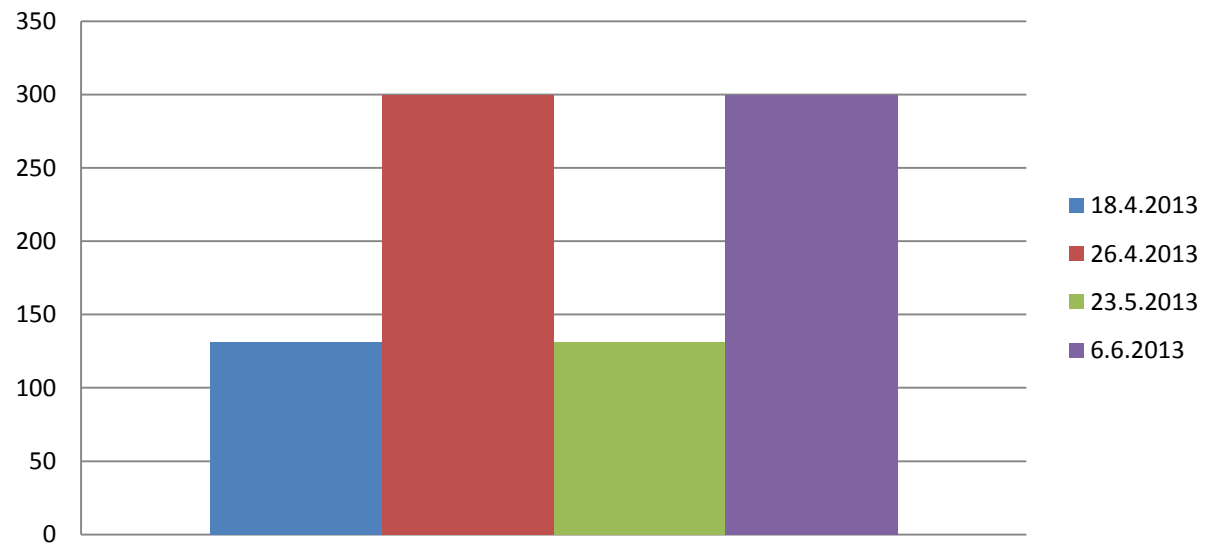
Kolona 4



Kolona 5



Kolona 6



III.DEL (Šol.letó: 2013/2014)

Poskus smo ponovili le da smo uporabili drugačna gojišča in tehnike.

IZVEDBA

- I. Izdelava kolon
- II. Onesnaževanje kolon s penicilinom in prelivanje kolon z deževnico
- III. Nacepitev mikroorganizmov iz vode na trdno gojišče, štetje kolonij, analiza vseh vzorcev

I. IZDELAVA KOLON



II. ONESNAŽEVANJE KOLON S PENICILINOM IN PRELIVANJE Z DEŽEVNICO





III. NACEPITEV MIKROORGANIZMOV IZ VODE NA TRDNA GOJIŠČA

- V tretjem delu smo uporabili za ugotavljanje mikroorganizmov v vodi hranilno juho (PKE).
- Za ugotavljanje enterobakterij pa smo uporabili metodo določanja z membransko črpalko ter metodo določanja z uporabo trdnih gojišč VRBL (vijoličnordeči žolčnolaktozni agar)
- in BGLBB (briljantnozeleni laktozni žolčni bujon) ter *agar MacConkey*.

PKE

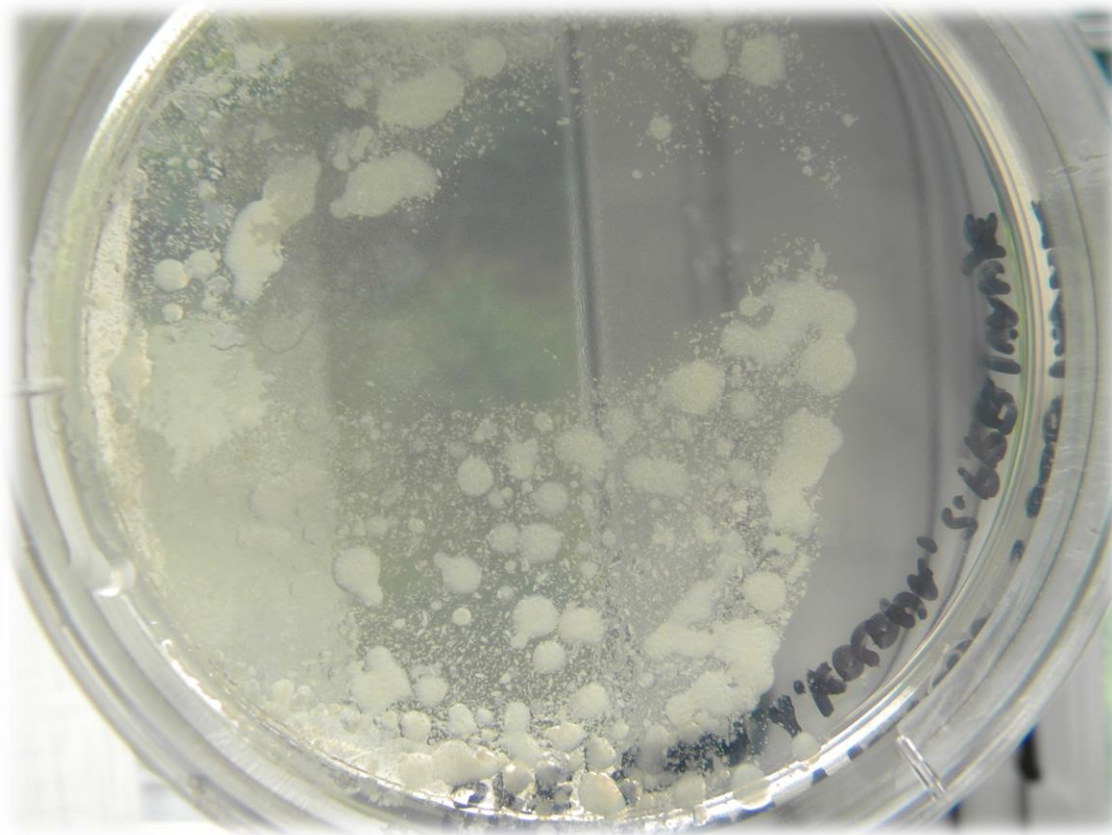
Material

- Hranljiva juha (PKE)
- Avtomatska pipeta
- Špiritni gorilnik
- Vzorci vode iz kolon





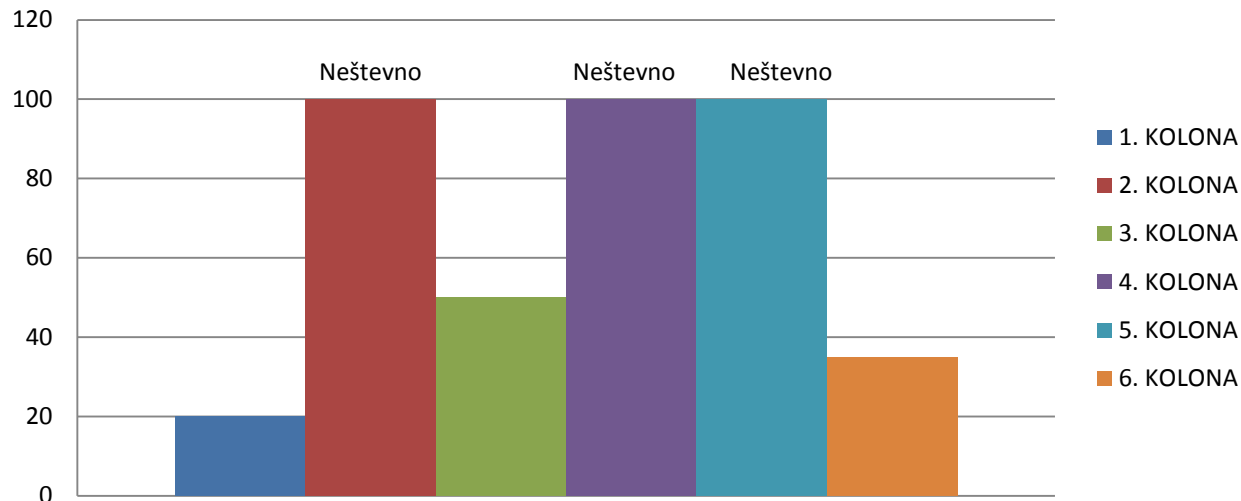
Rezultati



PRELIVANJE/ DATUM	1.kolona		2.kolona		3.kolona		4.kolona		5.kolona		6.kolona	
	1.	2.	1.	2.	1.	2.	1.	2.	1.	2.	1.	2.
I. 31.3	20	0	Neštevno	Neštevno	50	41	Neštevno	Neštevno	neštevno	neštevno	35	50
II. 7.4	neštevno	12	Neštevno	Neštevno	48	40	Neštevno	Neštevno	neštevno	neštevno	30	46
III. 17.4	neštevno	20	Neštevno	Neštevno	38	42	1	0	neštevno	neštevno	55	76
IV. 24.4	61	0	45	70	25	neštevno	3	12	neštevno	neštevno	6	77

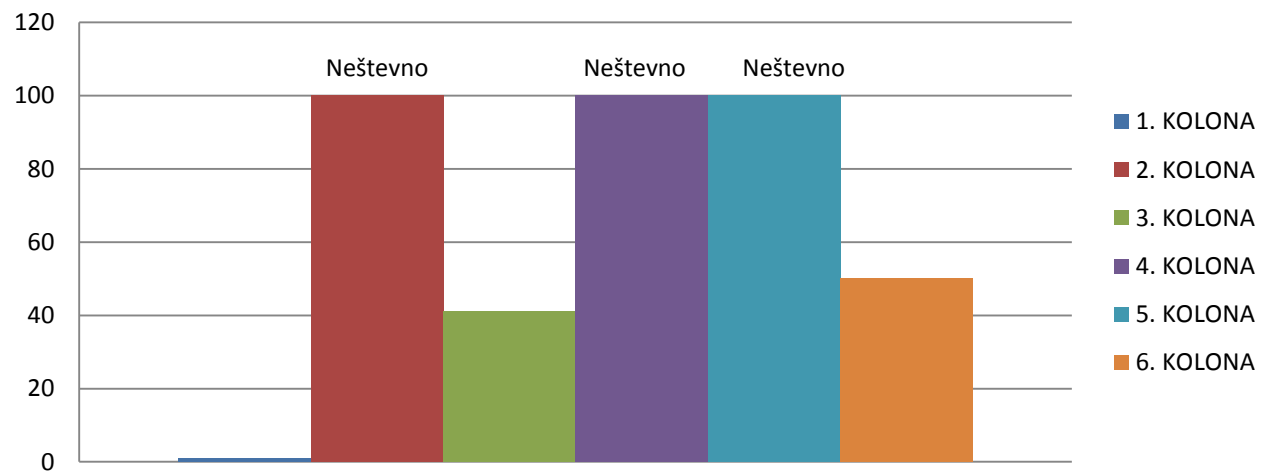
Prvo prelivanje (31.3.2014)

PRVI VZOREC



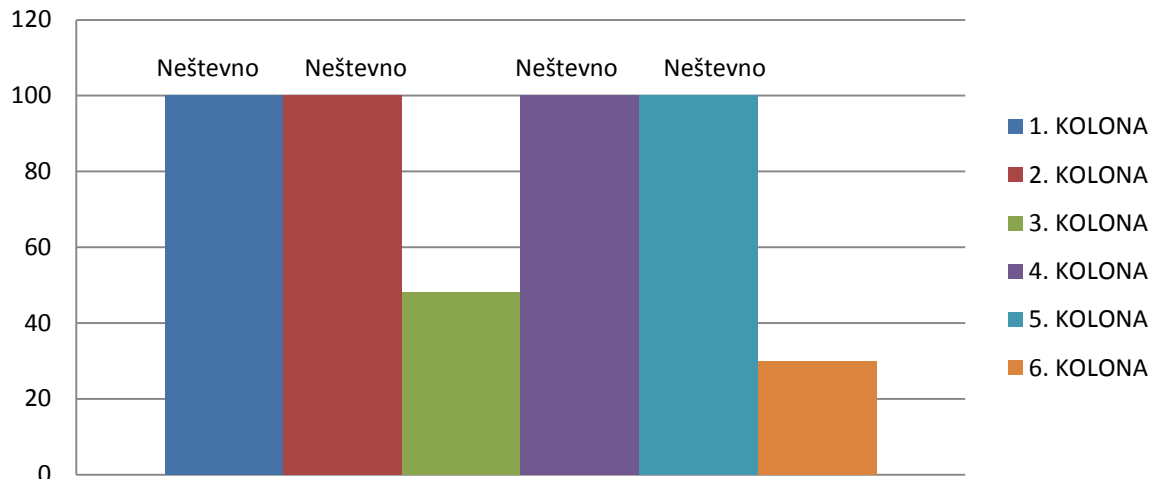
Prvo prelivanje (31.3.2014)

DRUGI VZOREC



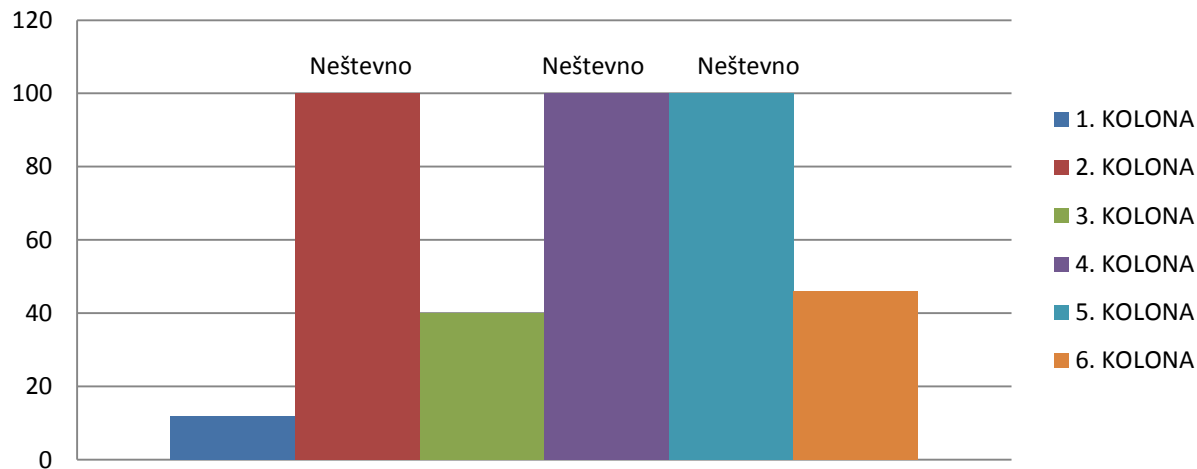
Drugo prelivanje (7.4.2014)

PRVI VZOREC



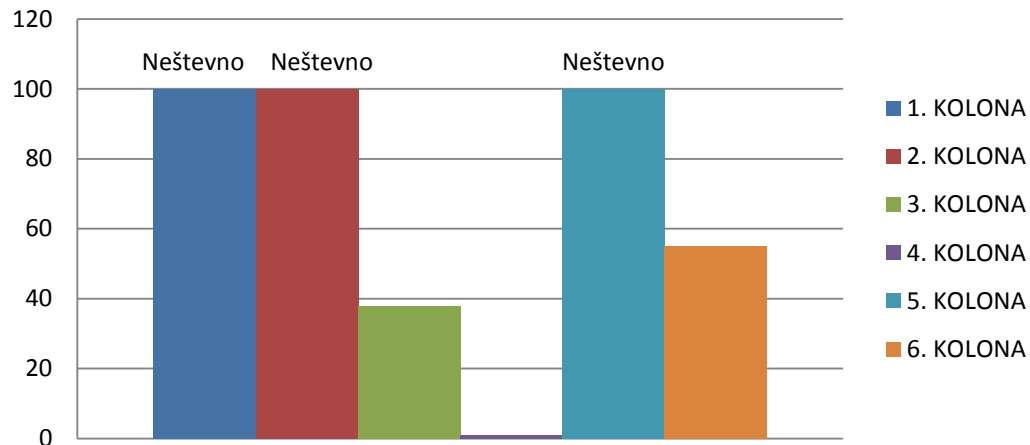
Drugo prelivanje (7.4.2014)

DRUGI VZOREC



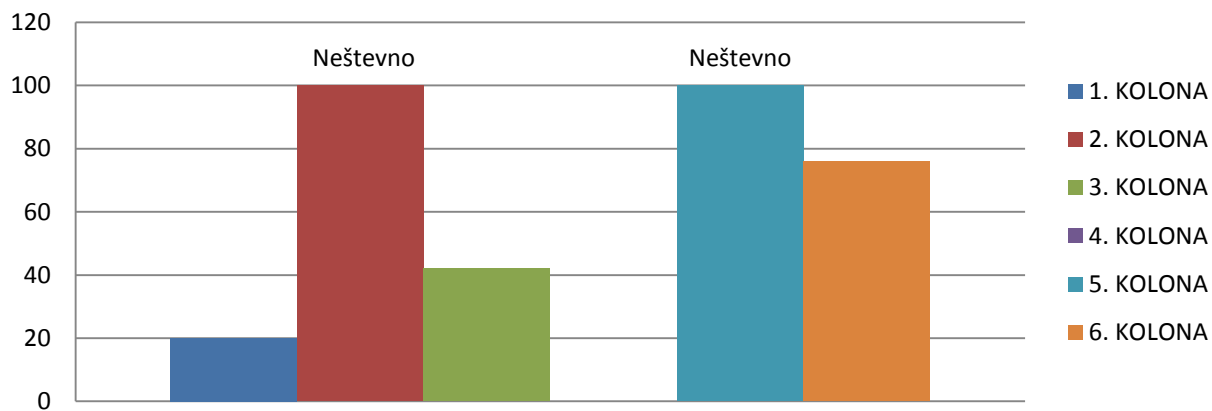
Tretje prelivanje (17.4.2014)

PRVI VZOREC



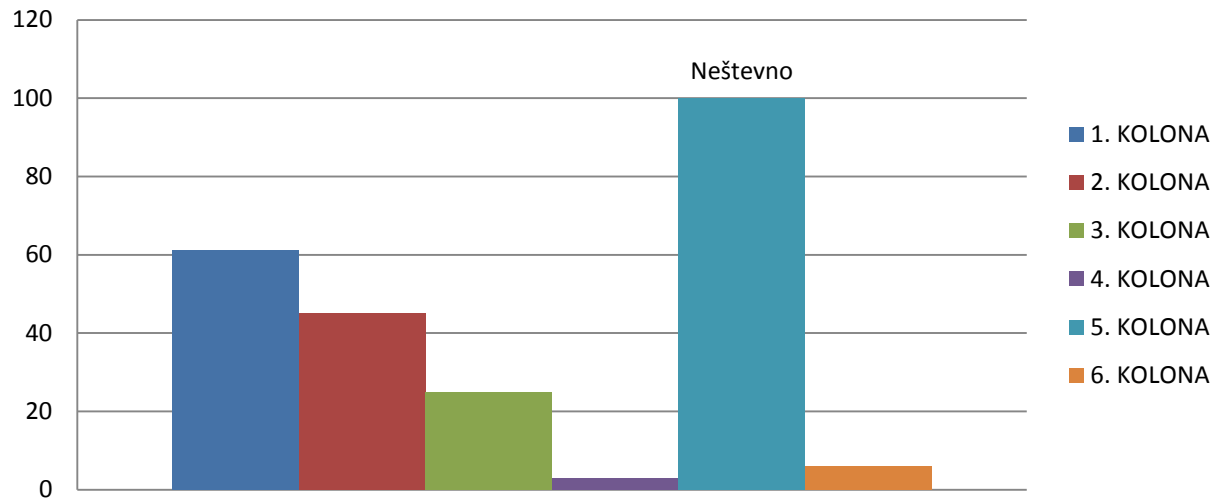
Tretje prelivanje (17.4.2014)

DRUGI VZOREC



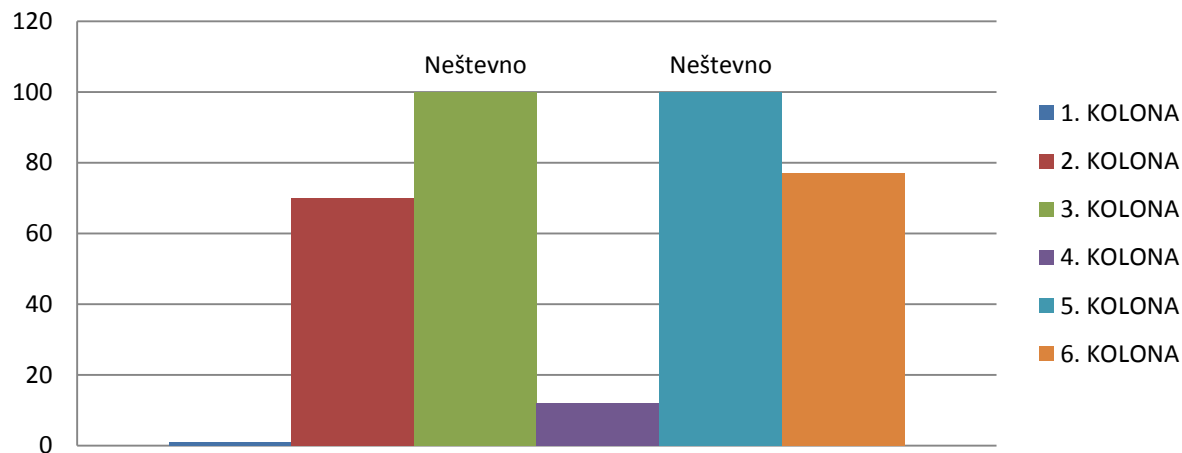
Četrto prelivanje (24.4.2014)

PRVI VZOREC



Četrto prelivanje (24.4.2014)

DRUGI VZOREC



MEMBRANSKA ČRPALKA

Material

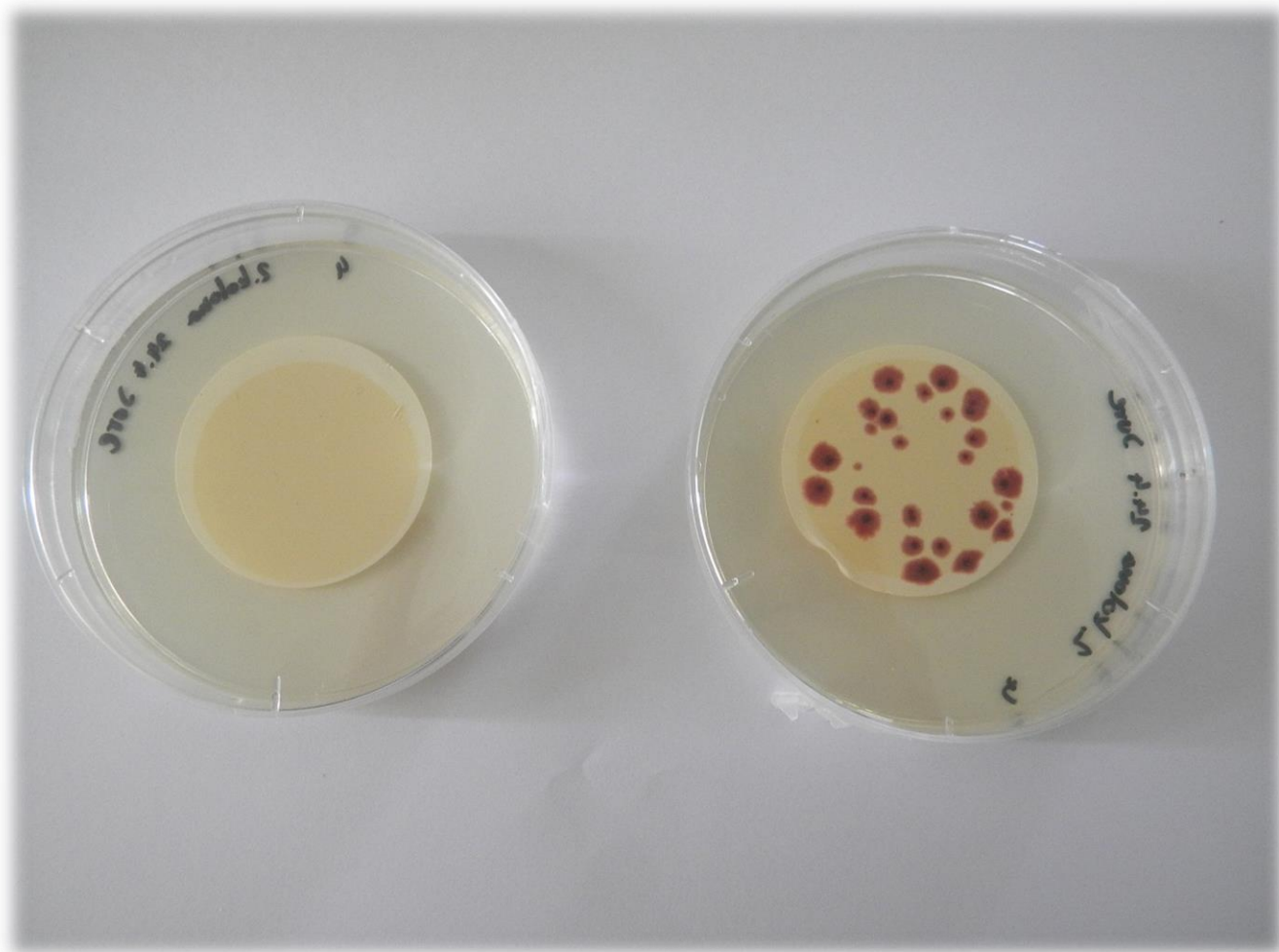
- Selektivno gojišče (Slanetz & Bartley)
- Sistem za membransko filtracijo
- Pinceta
- Čaša
- Vzorci vode iz kolon



Potek dela

- 100 ml vzorca prefiltriramo skozi membranski filter. Pri tem se mikrobnе celice ujamejo na filter.
- Filter aseptično prenesemo na petrijevko s selektivnim trdnim gojiščem (Slanetz & Bartley)
- Inkubiramo pri temperaturi 44 ur pri temperaturi 36°C .
- Po inkubaciji ugotavljamo število koliformnih mikroorganizmov. Štejemo rdeče obarvane kolonije, ki so porasle na filtru.

Rezultati



PRELIVANJE/ DATUM	1.kolona		2.kolona		3.kolona		4.kolona		5.kolona		6.kolona	
	1.	2.	1.	2.	1.	2.	1.	2.	1.	2.	1.	2.
I. 31.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
II. 7.4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
III. 17.4	0	0	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IV. 24.4	1	4	23	0	0	0	2	1	2	7	0	0

Prvo prelivanje (31.3.2014)

PRVI VZOREC



Prvo prelivanje (31.3.2014)

DRUGI VZOREC



Drugo prelivanje (7.4.2014)

PRVI VZOREC



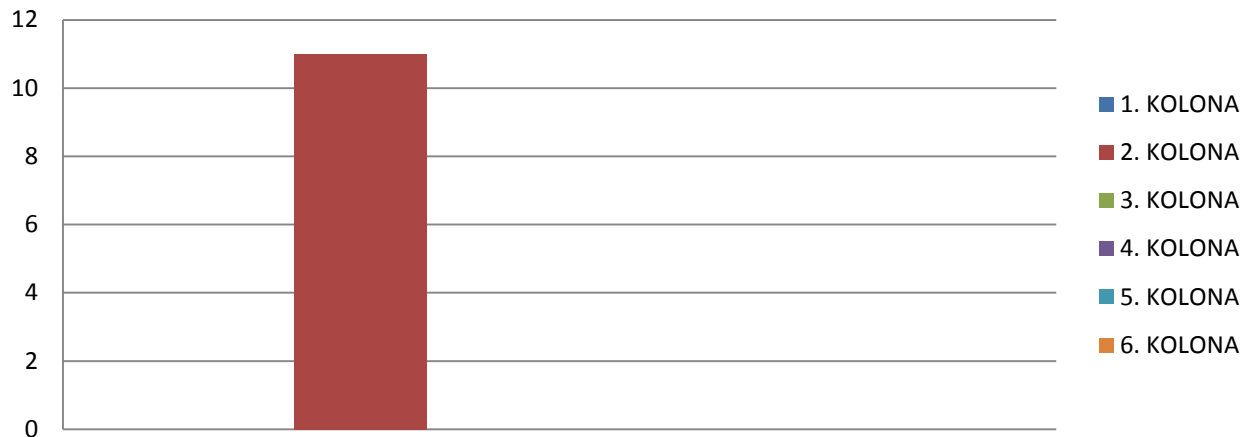
Drugo prelivanje (7.4.2014)

DRUGI VZOREC



Tretje prelivanje (17.4.2014)

PRVI VZOREC



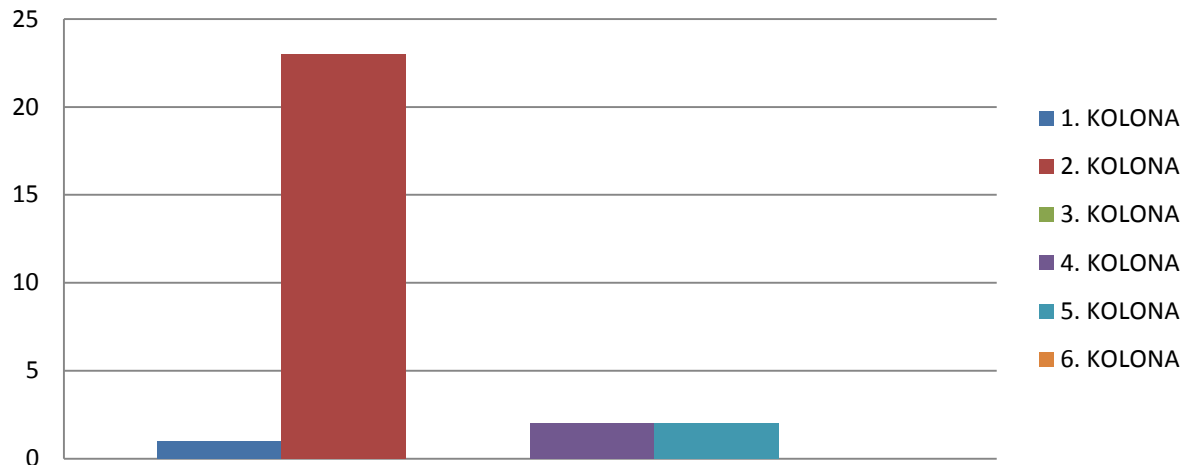
Tretje prelivanje (17.4.2014)

DRUGI VZOREC



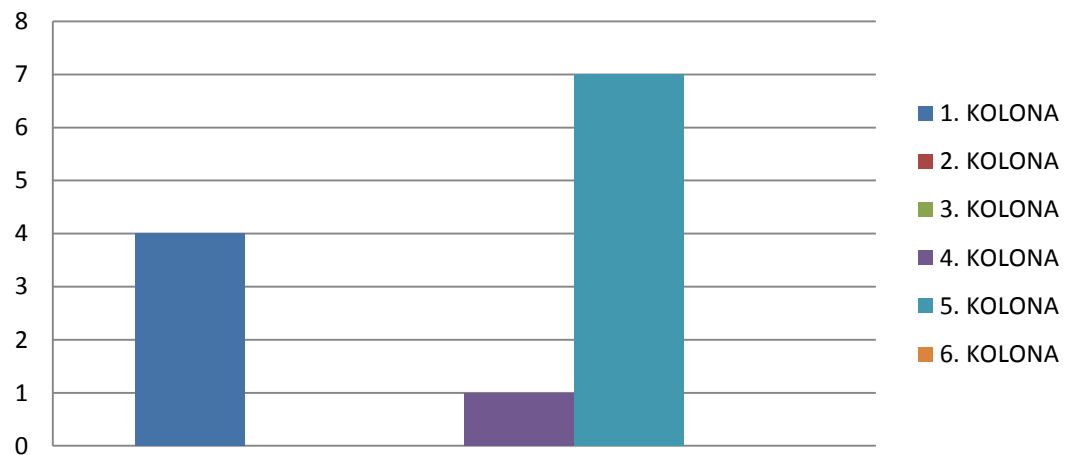
Četrto prelivanje (24.4.2013)

PRVI VZOREC



Četrto prelivanje (24.4.2013)

DRUGI VZOREC



DOLOČANJE KOLIFORMNIH MIKOORGANIZMOV Z UPORABO TRDNIH GOJIŠČ

Gojišče VRBL in BGLBB

Material

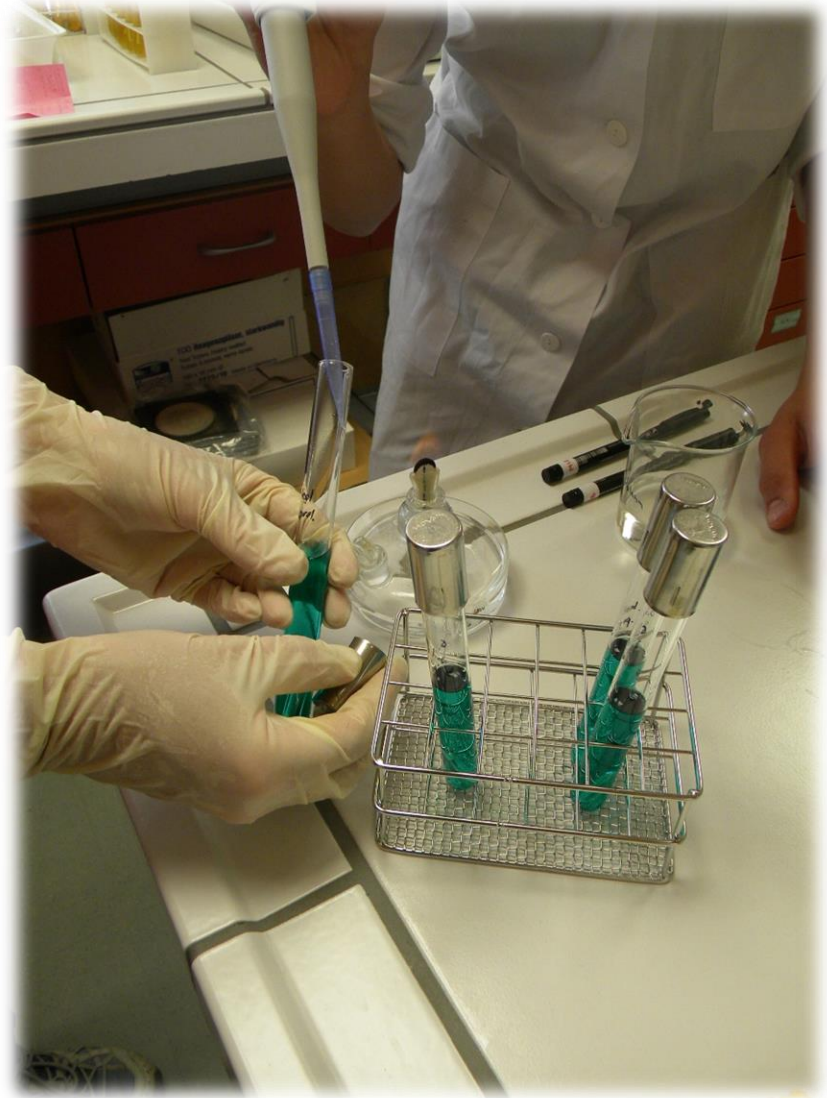
- Gojišče VRBL (vijoličnordeči žolčnolaktozni agar)
- Gojišče BGLBB (briljantnozeleni laktozni žolčni bujon) z durhamovi cevkami
- Avtomatska pipeta
- Špiritni gorilnik

Potek dela

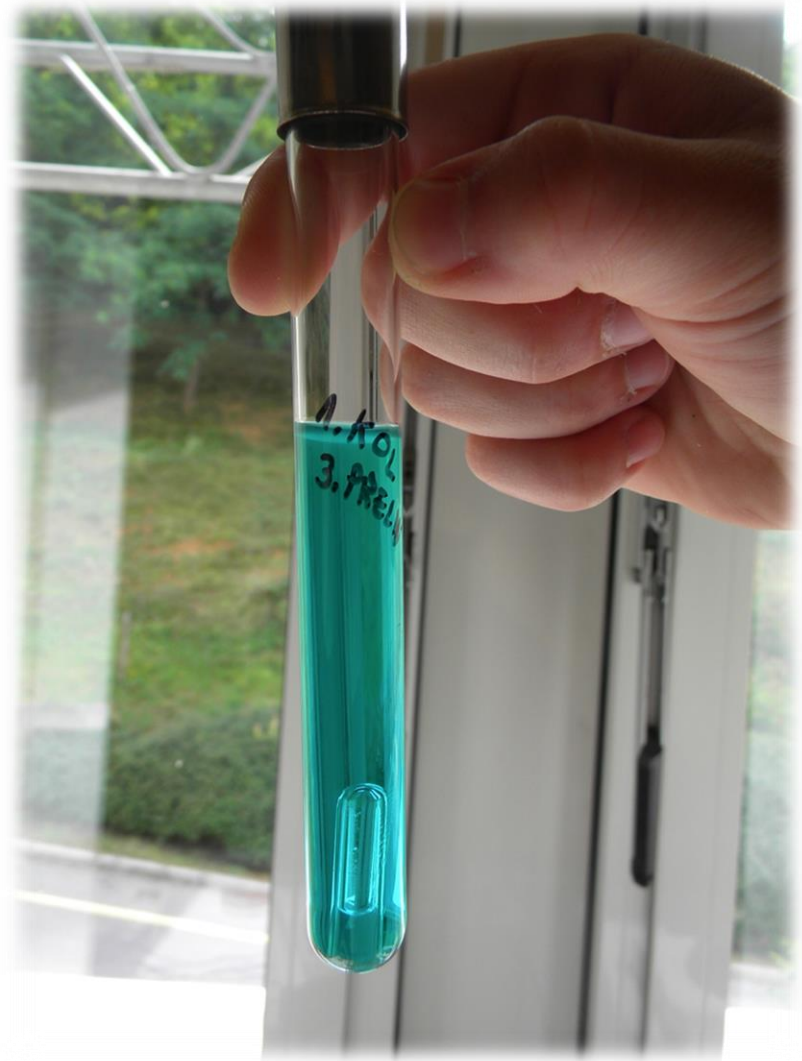
- Odpipetiramo 1ml vzorca vode v petrijevko.
- Prelijemo ga z gojiščem VRBL in ga zmešamo z vzorcem.
- Ko se vzorec z gojiščem popolnoma strdi ga še enkrat prelijemo z istim gojiščem, da ustvarimo delne anaerobne pogoje.
- Petrijevke inkubiramo 24 ur pri temperaturi 30 °C.
- Po inkubaciji ugotavljamo poraslost škrlatnordeče obarvanih kolonij. (Tam kjer se pojavijo delamo naprej.)

- Na gojišču se pojavilo tudi druge kolonije, zato za potrditev specifičnih bakterij uporabimo gojišče BGLBB.
- V gojišče BGLBB z durhamovimi cevkami prenesemo po pet kolonij iz gojišča VRBL in inkubiramo 24 ur pri temperaturi 30 °C.
- Po inkubaciji se v durhamovi cevki pojavi plin, ki ga predvidoma tvorijo koliformne bakterije. Na ta način potrdimo njihovo prisotnost.





Rezultat



Gojišče MacConkey

Material

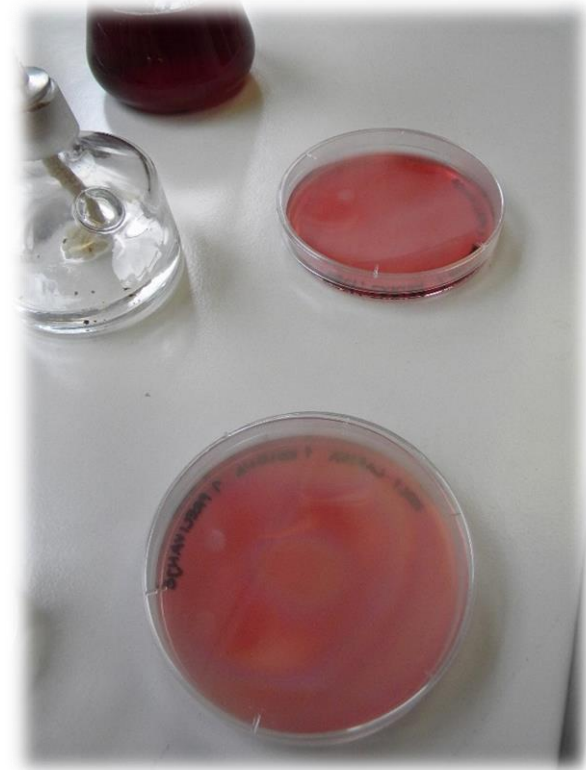
- MacConkey
- Avtomatska pipeta
- Špiritni gorilnik
- Vzorci vode iz kolon



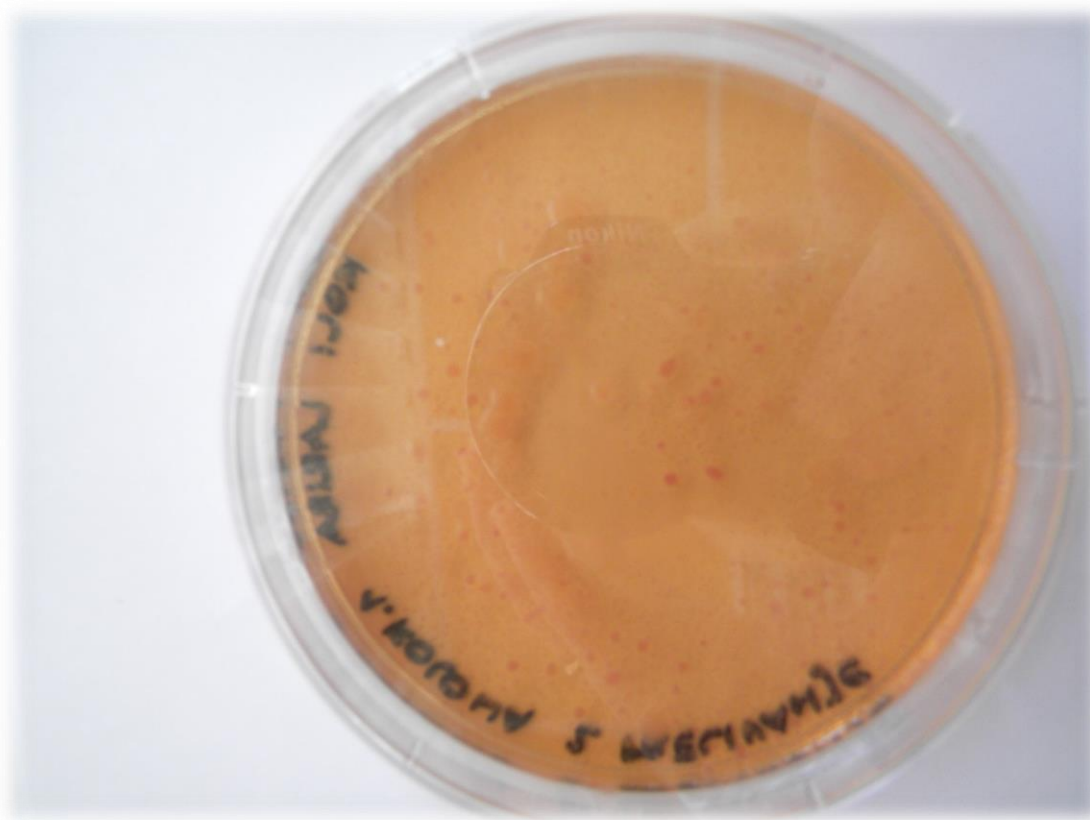
Potek dela

- S pipeto vzamemo 1 ml vzorca in ga aseptično prenesemo na petrijevko.
- Prelijemo ga z gojiščem MacConkey in ga zmešamo z vzorcem.
- Petrijevke inkubiramo 24 ur pri temperaturi 30 °C.
- Po inkubaciji preštejemo kolonije.





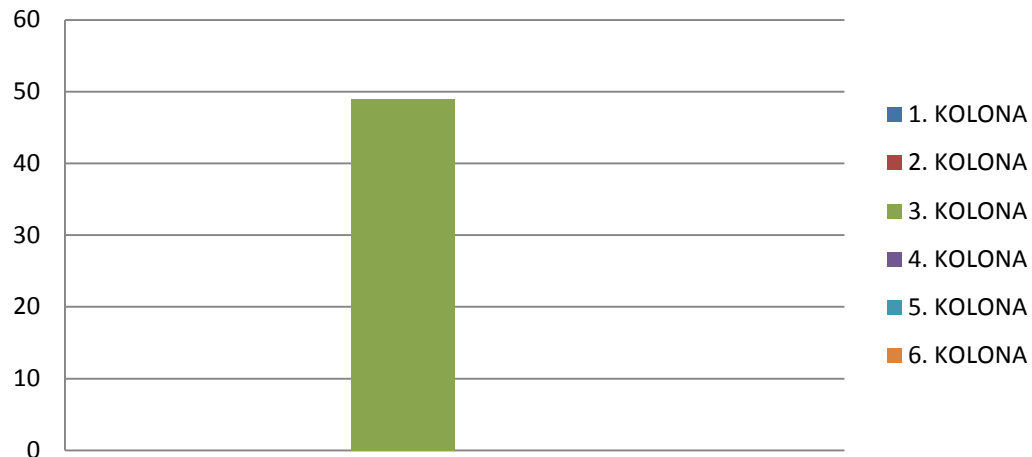
Rezultati



PRELIVAN JE/ DATUM	1.kolona		2.kolona		3.kolona		4.kolona		5.kolona		6.kolona	
	1.	2.	1.	2.	1.	2.	1.	2.	1.	2.	1.	2.
I. 31.3	0	0	0	0	49	36	0	0	0	0	0	0
II. 7.4	31	0	13	16	52	42	85	76	0	neštevno	5	2
III. 17.4	64	2	2	14	54	66	13	15	51	64	15	11
IV. 24.4	neštevno	57	30	55	67	86	3	2	neštevno	neštevno	12	20

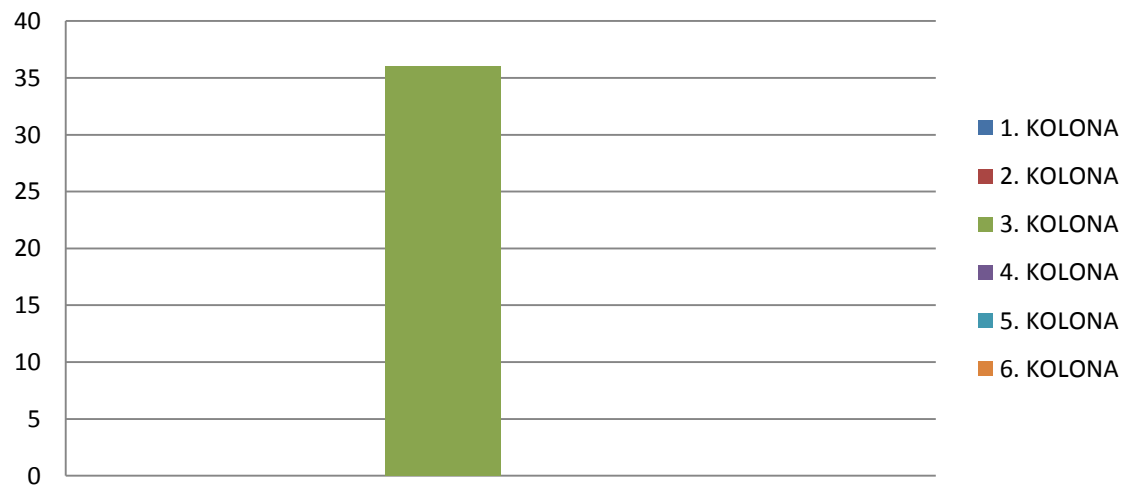
Prvo prelivanje (31.3.2014)

PRVI VZOREC



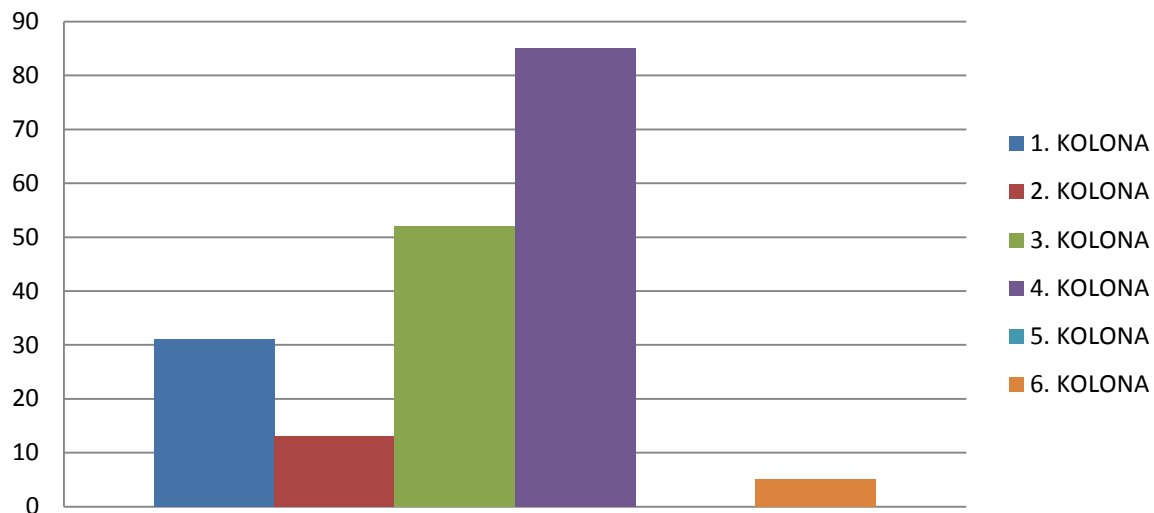
Prvo prelivanje (31.3.2014)

DRUGI VZOREC



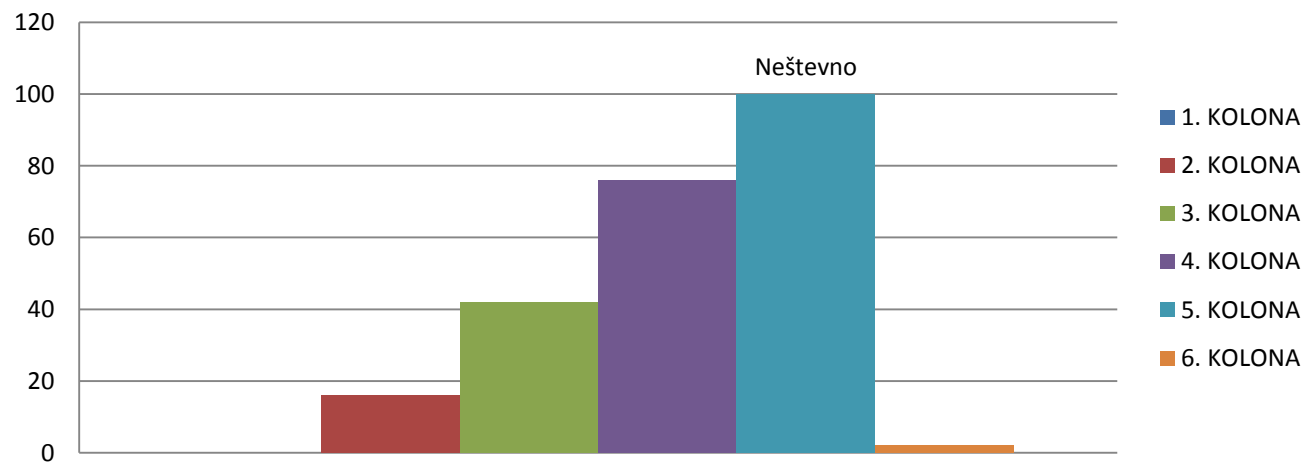
Drugo prelivanje (7.4.2014)

PRVI VZOREC



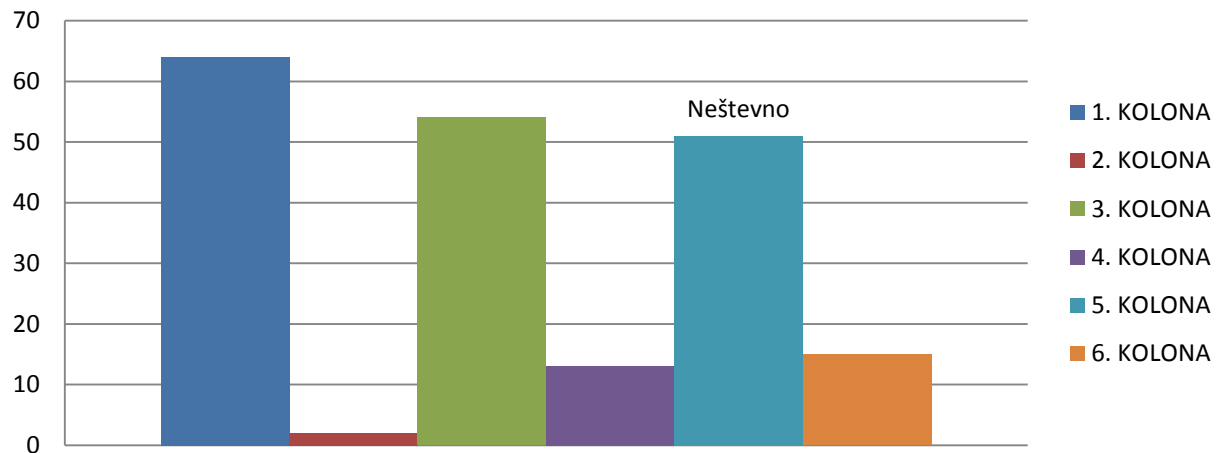
Drugo prelivanje (7.4.2014)

DRUGI VZOREC



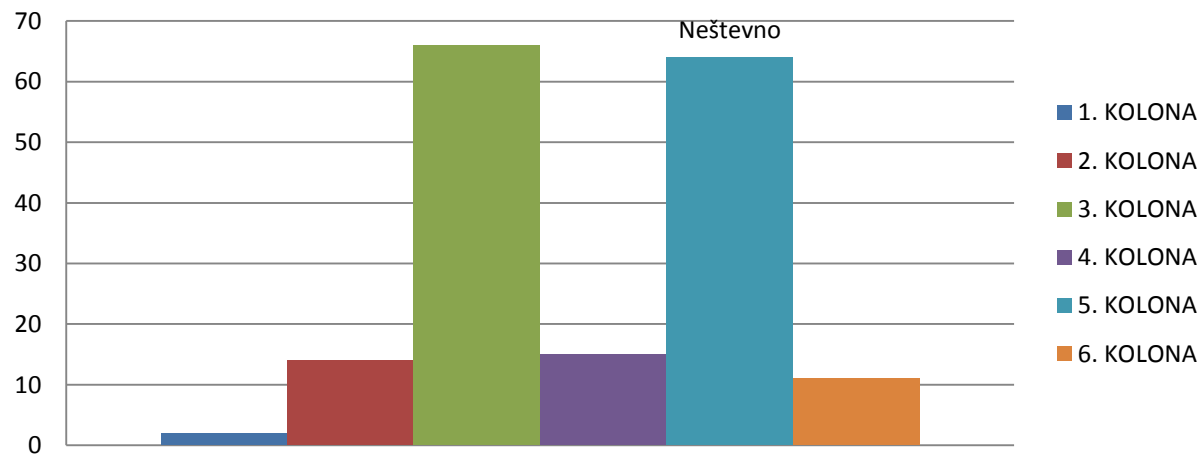
Tretje prelivanje (17.4.2014)

PRVI VZOREC



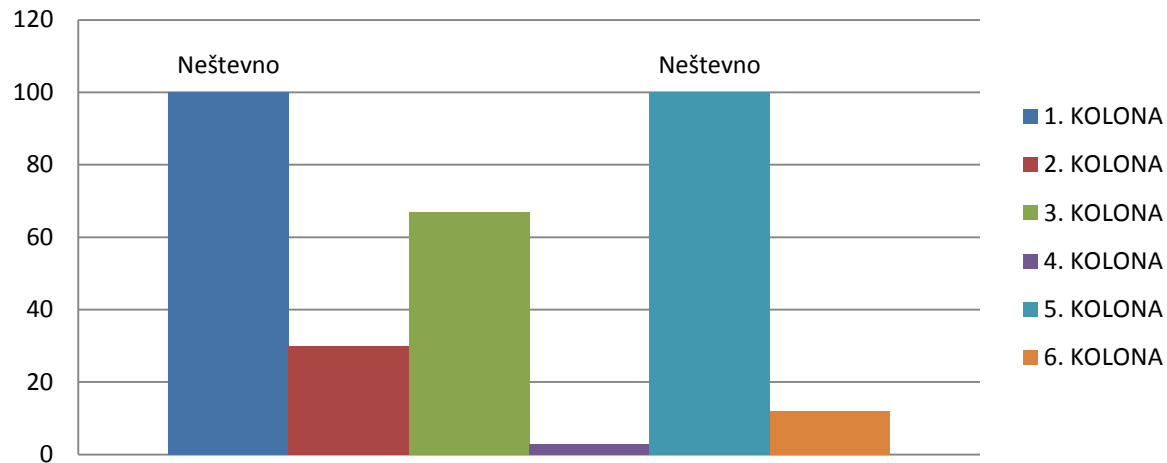
Tretje prelivanje (17.4.2014)

DRUGI VZOREC



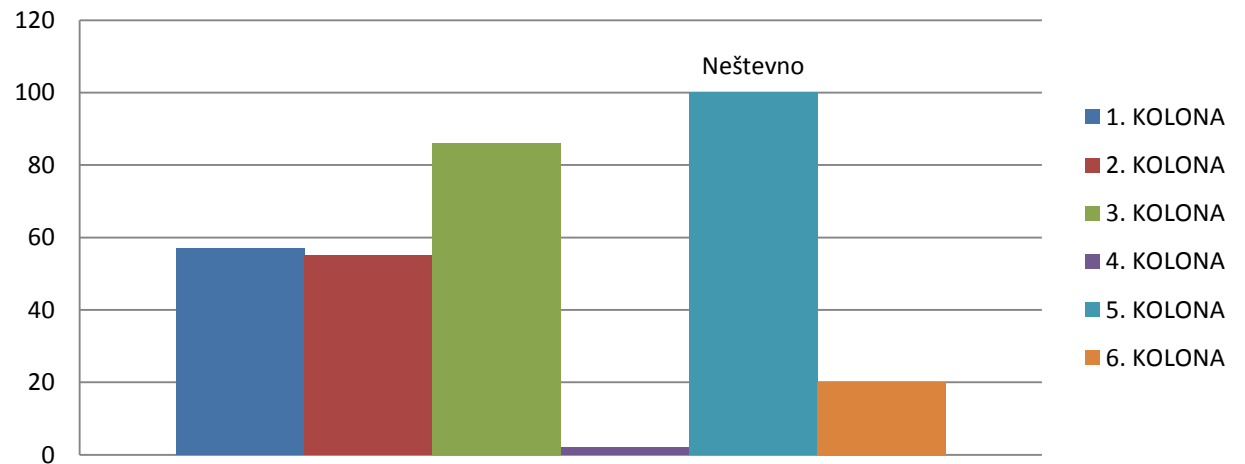
Četrto prelivanje (24.4.2014)

PRVI VZOREC



Četrto prelivanje (24.4.2014)

DRUGI VZOREC



ZAKLJUČEK

- V projektu smo se prvič soočili z onesnažili iz kmetijstva kot je npr. penicilin.
- Spoznali smo veliko različnih metod dela, kar je bil tudi naš glavni namen.
- Rezultati, ki smo jih dobili, niso bili skladni z našimi pričakovanji. Kot smo že omenili, smo imeli za onesnažilo penicilin z dodatki za boljše delovanje.
- Kljub temu smo z našim delom zadovoljni, saj smo dokazali, da antibiotiki, ki jih uporabljajo v kmetijstvu slabo vplivajo na mikroorganizme v vodi in tleh.