

Laboratorijas darbs 15.

Nosaukums: Baktērijas ap mums I

Mērķis: Sniegt priekšstatu par baktēriju izolēšanu, tīrkultūru izdalīšanu. Iepazīties ar sterilā darba pamatpaņēmiem, uzskaitīšanas un identificēšanas metodēm.

Teorētiskais pamatojums

Baktēriju ekoloģija.

Darba uzdevumi

- Izanalizēt iepriekšējā nodarbībā iegūtos rezultātus, saskaitot izaugušās kolonijas. Aizpildīt tabūlas 1, 2, 3.
- Izdalīt tīrkultūras no gaisa mikrofloras.
- Pārbaudīt zarnu nūjiņas grupas baktēriju klātbūtni uz virsmām.

Literatūra:

Johnson T.R., Case C.L. Laboratory Experiments in Mikrobiology. Seventh edition. 2004. P.434.
Zariņš P. Mikrobioloģijas praktikums. – Rīga. 1973.

Teorētiskais pamatojums.

1. Gaisa mikroflora

Gaiss nav labvēlīga vide mikroorganismiem, jo tajā nav to attīstībai nepieciešamo barības vielu.

Ultravioletā starojuma ietekmē un sausuma dēļ mikroorganismi iet bojā.

Gaisa mikroflorā sastopami daudzveidīgi mikroorganismi. Mikroorganismu daudzums gaisā atkarīgs no putekļu daudzuma, jo tie paceļas gaisā no virsmām kopā ar putekļiem. Galveno gaisa mikrobu skaitu sastāda tādi, kas neizraisa slimības, galvenokārt tie ir rūgšanas izraisītāji, pigmenta mikrobi, pelējuma sēņu sporas un raugi. Visbiežāk sastopamas nesporulējošas baktērijas:

Micrococcus aurantiacus, *M. albus*, *M. roseus*, *Streptococcus lactis*, *Sarcina flava*, *S. urea*, bet no sporulējošām baktērijām: *Bacillus subtilis*, *B. mesentericus*, *B. cereus*, *B. megaterium*.

Gaisa kvalitātes kontrole ir piesārņojuma novērtēšana, nosakot kopējo baktēriju skaitu 1 m³ gaisā.

Dzīvojamās telpās gaiss, kurā ir vairāk kā 1500 baktērijas 1 m³ gaisā uzskatāms par piesārņotu.

Gaisa piesārņojuma noteikšana notiek ar sedimentācijas, filtrācijas un citām metodēm.

Petri trauku (sedimentācijas) metode atklāj, kādas mikroorganismu sugas ir gaisa mikroflorā, bet par mikroorganismu daudzumu noteiktā gaisa tilpumā dod tikai aptuvenu priekšstatu. Izejot no mikroorganismu daudzuma normas dzīvojamās telpās, ja uz 1 plates ar agara barotni izaug vidēji līdz 20 koloniju, gaiss uzskatāms par tīru, ja vairāk koloniju – gaiss ir piesārņots. Lai noteiktu mikroorganismu skaitu 1 litrā gaisa ar lielāku precizitāti, jāizmanto Krotova aparāts. Pēc kvantitatīvās metodes datiem, noteikts, ka apmēram 5 min laikā uz 100cm² laukumu (agara virsmas laukums Petri platē) nogulsņējas mikroorganismi, kas bijuši 3 litros gaisā.

Gaisa tīrīšanai der ventilācija, baktericīdās lampas, dezinficējoši šķīdumi un citas vielas.

2. Ūdens mikroflora

Viens no mikroorganismu attīstības nosacījumiem ir vides mitrums, tāpēc ūdens dažādās ūdenstilpēs var saturēt ievērojamu daudzumu dažādu mikrobu.

Ūdens mikrobu piesārņojuma pakāpe ir atkarīga no vairākiem faktoriem. Vieni no tiem nomāc mikrofluoru (tieši saules staru iedarbība uz ūdens virsmu), citi – gluži otrādi veicina tās attīstību (ūdens piesārņojums ar organiskiem atkritumiem). Mikrobu daudzums ūdenī atkarīgs no organisko vielu daudzumā tajā.

Dažādas izcelsmes ūdeņos ir dažāds mikrobu daudzums. Vismazāk to ir destilētā ūdenī, nokļūstot tajā no gaisa un trauka sienām.

Diezgan maz mikrobu ir lietus ūdenī, kur tie nokļūst tikai no gaisa. Tāpēc lietus ūdenī vairāk mikrobu atrodami pilsētās, bet pavisam maz lietus ūdenī virs jūras, kurā nav putekļu. Ja līst ilgstoši,

tad sakumā lietus ūdenī būs salīdzinoši daudz baktēriju, bet vēlāk samazinās – lietus it kā izmazgā gaisu.

Ezeros mikrobu daudzums samazinās no krastiem uz centru un no virsmas uz dziļumu. Visvairāk ezerā to ir ūdens slānī 5 – 10 metru dziļumā. Upes un citas ūdenskrātuves, kas atrodas apdzīvotās vietās, bieži apdraud netīri ūdeni ar milzīgu mikrobu skaitu. Attālinoties no apdzīvotām vietām, ūdens atkal kļūst tīrāks.

Kā ūdens fekālijas piesārņojuma rādītājs ir zarnu nūjiņas klātbūtne ūdenī, kas tur nokļūst ar notekūdeni. Vienlaikus ar zarnu nūjiņu ūdenī nokļūst arī citi mikroorganismi, to starpā arī infekciju izraisītāji. Tos konstatēt praktiski ir grūti, tāpēc jānosaka zarnu nūjiņas esamība un daudzums.

Normēti ir divi dzeramā ūdens rādītāji.: kolī indekss un mikrobu skaits ūdenī.

Kolī indekss – zarnu nūjiņu skaits 1 litrā ūdens. Ūdens krāna ūdenim tam jābūt ne lielākam kā 3 baktērijas 1 ūdens litrā.

Mikrobu skaitlis vai **vispārīgā kopīgā piesārņotība** – tas ir koloniju skaits, kas izaug uz cietā barotnes (MPA,ZPA) no 1 ml ūdens krāna vai cita ūdens avotā 37 0 C temperatūrā 24 stundu laikā vai arī 20 0 C temperatūrā 48 stundu laikā.

Dzeramā ūdens bakteriālais piesārņojums nedrīkst būt lielāks par 100 baktērijām 1 ml. Patogēnu mikrobu formu klātbūtne nav pieļaujama.

Praktiskais darbs

1. Gaisa mikrobioloģiskā pārbaude.

Darba uzdevums:

1. Saskaitīt kolonijas uz agarizētas barotnes Petri platē. Konstatēt koloniju daudzveidību, pigmentēto koloniju daudzumu. Izvēlēties vienu no kolonijām un sīkāk aprakstīt tās morfoloģiju, t.i. formu, izmēru, krāsu un citas morfoloģijas īpatnības. Rezultātus ierakstiet 1.tabulā . Gaisa mikrobioloģiskā pārbaude.
2. Izdalīt tīrkultūru ar dziestošā švīkojuma un pakāpenisku atšķaidījuma metodi.

Rezultātu konstatācija (tab. 1)

Pieņemts uzskatīt, ka katra kolonija ir vienas šūnas pēcnācēji.

Kolonijas skaita, neatverot Petri plašu vāciņus. Lai būtu ērtāk, ar flomasteru uz stikla ārsienas atzīmē ar punktiņu saskaitītās kolonijas. Ja koloniju ir daudz, Petri plati iedala sektoros, un rezultātus sasummē. Ir dažādu modeļu koloniju skaitītāji, kas ievērojami atvieglo skaitīšanu.

Analizējot gaisa mikrofloru, jāievēro, ka kolonijas ir dažāda veida.

Tās atšķiras pēc izmēra – ir sīkas 1-2 mm diametrā, lielas – 4-5 mm un pat lielākas, ir punktveida kolonijas ar diametru mazāku par 1 mm. Kolonijas konsistenci var uzzināt tikai ar bakterioloģisko

cilpiņu atlasē momentā, ņemot nedaudz kultūras no kolonijas tīras kultūras izdalīšanai.

Baktēriju skaitīšanas piemērs 1 m³ gaisa: plātes laukumu aprēķina pēc formulas $S = \pi r^2$

$$\begin{array}{l} 78,5 \text{ cm}^2 \quad - \quad 17 \\ 100 \text{ cm}^2 \quad - \quad x \end{array} \quad x = 100 \times 17 / 78,5 = 21,6$$

$$\begin{array}{l} 21,6 \quad - \quad 10 \text{ l} \\ x \quad - \quad 1000 \text{ l} \end{array} \quad x = 21,6 \times 1000 / 10 = 2160$$

2. Tīrkultūras izdalīšana no atsevišķas kolonijas.

Tīrkultūras izdalīšanai izmantojam vienu no gaisa analīzē izdalītajām kolonijām. Izmantojam uztriepumu metodi vai izkļiedētu uzsēšanas metodi un pakāpenisku atšķaidījumu metodi. Izvēloties izolētu atsevišķu koloniju, ar vaska zīmuli vai marķieru uz Petri plātes apakšējās virsmas apvelk kolonijas kontūras.

Nepieciešamie piederumi:

spirta lampiņas vai gāzes degļi,

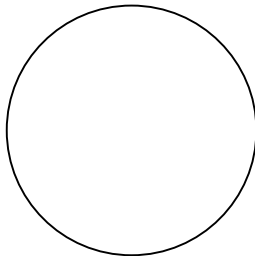
bakterioloģiska cilpiņa,

plate ar mikroorganismu kolonijām uz agara barotnes,.

Darba gaita:

1. Ar bakterioloģisko cilpiņu atlasē nedaudz kultūras no kolonijas un uzsēj to uz cietās barotnes virsmas. Sākumā vienā plātes ceturtdaļā, pēc tam otrā, trešā un ceturtajā.
2. Pirms katra jauna švīkājuma cilpiņu sterilizē gāzes liesmā. Svarīgi ir, lai uzsējamā materiāla daudzums uz cilpiņas nepārtraukti samazinātos.
3. Pēc uzsēšanas plātes ievieto termostatā pie 28°C uz 1-2 dienām, ar vāciņiem uz leju, lai kondensācijas ūdens, kas izveidojas uz Petri trauka vāciņa iekšējās virsmas, barotnei sastingstot, netraucētu izolētas kolonijas iegūšanu.
4. Plātes novieto termostatā (24 0 C) ar vāciņiem uz leju, lai neveidoties kondensācijas ūdenim, uz Petri plātes vācina, tas traucētu iegūt baktēriju izolētas kolonijas. Plātes iztur termostatā 1-7 diennaktis, atkarībā no baktēriju kultūras augšanas ātruma. Izaugušo koloniju viendabīgums liecina par kultūras tīrību. Mikroorganismu kultūras tīrību nepieciešams kontrolēt mikroskopā.

Gaisa mikrobioloģiskā pārbaude (rezultātu konstatācija)

1*	Pētīšanas metode	
2*	Barotne, kas izmantota uzsēšanai	
3*	Paraugu noņemšanas vieta	
4*	Ekspozīcija (parauga ņemšanas laiks minūtēs)	
5*	Kolonijas skaits	
6*	Vienas izvēlētas kolonijas apraksts	
	forma	Apaļa, ovāla, lēcveida, micēlijveida, punktveida
*	izmērs	
*	spīdīgums	Matēta, spīdīga
*	caurspīdīgums	
*	krāsa	Bezkrāsaina (netīri baltas pieder pie bezkrāsainām) vai pigmentēta (balta, dzeltena, oranža, rozā, sarkana, brūna, melna)
*	virsmas	Gluda, rievota, krokota, radiāli svītrotā, ar koncentriskiem riņķiem
*	kolonijas apmale	Gluda, robota, simetriska vai nevienādi līkumota, mataina, viļņaina.
*	konsistence	Viendabīga, sīkgraudaina, rupjgraudaina, blīva, mīksta, staipīga, lipīga, ādaina, gļotaina.
8.	Kustīgums	
9.	Mikroskopiskā aina fiksētā, ar karbolfuksīnu krāsotā preparātā (uzzīmēt)	
10.	Krāsošana pēc Grama metodes	<input type="checkbox"/> <u>Gr+</u> <u>Gr-</u>
11.	Sporas	<input type="checkbox"/> <u>Ir</u> <u>Nav</u>
12.	Kapsulas	<input type="checkbox"/> <u>Ir</u> <u>Nav</u>
Secinājumi:		

* Tabulas atzīmētās daļas tiek aizpildītas tekošajā nodarbībā, bet pārējās nākošajā 3. nodarbībā.

Tabula 2.

3.Zarnu nūjiņas konstatēšana pilsētas kanāla ūdenī (rezultātu konstatācija)

1	Pētīšanas metode	
2	Barotne, kas izmantota uzsēšanai	
3	Paraugu noņemšanas vieta	
4	Parauga tilpums	
5	Izaugušo koloniju skaits	
6	Koloniju apraksts	
8.	Secinājumi	

Uz Endo barotnes *Escherichia coli* kolonijas ir sarkanas ar bronzu spīdumu. Barotne kādreiz paliek sarkanāka. Gadījumā, ja parādās tumši sarkanas kolonijas, veic mikroskopēšanu un izdara [oksidāzes](#) pārbaudi.

Baktērija *Enterobacter aerogenes* ļoti līdzīga *Escherichia coli*, arī veido gāzi, *Lac*⁺, bet uz *Endo* barotnes veido rozīgas kolonijas. Ļoti plaši izplatīta augsnē. *Shigella* un *Salmonella* ir *Lac*⁻ baktērijas.

Tabula 3.

5. Zarnu nūjiņas grupas baktēriju klātbūtne uz virsmām (rezultātu konstatācija)

1.	Pētīšanas metode	
2.	Barotne, kas izmantota uzsēšanai	
3.	Paraugu noņemšanas vieta	
4.	Paraugu noņemšanas vieta izmērs (cm ²)	
5.	Diferenciāla barotnes krāsa	
6.	Gāzes veidošana	
7.	Secinājumi	

No tam mēģenēm, kur veidojies saduļņojums, gāzes vai arī tikai nodzeltējusi vide (t.i. notikusi vides pH izmaiņšanās – ieskābšana), izdara mikroorganismu uzsēšanu ar cilpu uz Petri trauciņu ar diferenciālo barotni (mūsu gadījumā **ENDO** barotni), lai iegūtu atsevišķas kolonijas. Plates ieliek termostatā uz diennakti 37⁰C temperatūrā.

