

Laboratorijas darbs 14

Nosaukums: Kā izaudzēt baktērijas.

Mērķis:

Iepazīstināt studentus ar sterilizācijas un dezinfekcijas metodēm, barotņu veidiem un baktēriju kultivēšanas principiem.

Teorētiskais pamatojums

Mikroorganismu kultivēšana.

Darba uzdevumi

- Iepazīties ar mikrobioloģijas laboratorijas iekārtu un darba drošības noteikumiem.
- Izliet agarizētas barotnes ZPA Petri trauciņos.
- Pārbaudīt gaisa mikrobioloģisko stāvokli dažādās telpās, izmantojot sedimentācijas metodi.
- Zarnu nūjiņas konstatēšana ūdenī
- Zarnu nūjiņas grupas baktēriju klātbūtnes konstatēšana uz virsmām.

Izmantojamā literatūra:

Zariņš P. 1973. Mikrobioloģijas praktikums. Rīga, Zvaigzne.

Kraifs P. Mikrobu mednieki. 1981.- Tulk. no angļu valodas. Rīga. Zinātne, 416 lpp.

Johnson T.R.,Case C.L. 2004. Laboratory Experiments in Mikrobiology. Seventh edition. 434pp.

Teorētiskais pamatojums.

Darbs mikrobioloģijas laboratorijā saistīts ar mikroorganismu – mikroskopiski mazu bioloģisku būtņu, kas ir mums visapkārt, izdalīšanu un pētīšanu. Mikrobi atrodas visur un piedalās mūsu dzīves visās norisēs. Tie ir upēs un ezeros, jūrās, ūdenī, kuru mēs dzeram, tie ir gaisā, kuru mēs elpojam un uz visiem priekšmetiem, kurus lietojam. Ļoti daudz mikroorganismu ir augsnē. Mikrobi atrodas uz mūsu ķermeņa un tā iekšā.

Laboratorijas darbu galvenais mērķis ir apgūt mikrobioloģiskās metodes, izprast baktēriju svarīgo lomu mūsu ikdienas dzīvē un to unikālo lomu dabā.

Darbs mikrobioloģijas laboratorijā atšķiras no darba citās zinātniskās laboratorijās tieši ar to, ka vajag obligāti ievērot sterilitāti. Tā, ka mikroorganismi ir visapkārt, ja mēs gribam strādāt tikai ar dažiem no tiem, mums ļoti jāizvairās no citiem mikroorganismiem. Gaisam, barotnēm, instrumentiem, visiem priekšmetiem, ar kuriem mēs strādāsim, jābūt steriliem. Dažos gadījumos mikroorganismi var būt bīstami, tāpēc **pret visām mikroorganismu kultūrām jāizturas ar piesardzību. Stingri ievērot drošības tehniku.**

1. Serilizācija

Par sterilizāciju sauc visu dzīvības formu iznīcināšanu kādā objektā – barotnē, traukos u.c. Mikroorganismu iznīcināšanai izmanto dažādus faktorus: paaugstinātu temperatūru, UV starus, jonizējošo radiāciju, ķīmiskas vielas.

Bieži mikrobioloģijā izmanto **termiskās sterilizācijas metodes**: sterilizāciju ar liesmu, sauso sterilizāciju (ar karstu gaisu), sterilizāciju ar piesātinātu tvaiku zem spiediena (autoklāvēšanu).

Ar liesmu sterilizē nelielus metāla vai stikla priekšmetus: bakterioloģiskās cilpas un adatas, mēģeņu kaklus, špatelus, priekšmetstiklus u.c. Priekšmetus no stikla var iemērt spirtā un spirtu aizdedzināt. Stikla priekšmetus nedrīkst turēt liesmā, jo tie var saspīgt.

Ar sausās sterilizācijas metodi sterilizē stikla traukus (mēģenes, Petri traukus, pipetes u.c.). Sausā karstumā sterilizē arī metāla priekšmetus, pulverveida vielas, eļļas, bet ne gumijas priekšmetus. Parasti priekšmetus sterilizē 2 stundas 160-180°C temperatūrā. Kad pagājis sterilizācijas laiks, sterilizatoru izslēdz un pagaida, kamēr priekšmeti atdziest līdz istabas temperatūrai.

Sterilizācija ar tvaiku zem paaugstināta spiediena (autoklāvā). Šādos apstākļos sterilizē barotnes, ūdeni, šķīdumus, gumijas priekšmetus. Piesātinātais tvaiks pastiprina paaugstinātās

temperatūras ietekmi uz mikroorganismiem. Autoklāvs ir metāla sterilizācijas kamera ar dubultām sienām. Autoklāva apvalkā iepilda destilētu ūdeni. Autoklāvu ieslēdz, ūdens sakarst un veido tvaiku. Tvaiks izspiež gaisu no autoklāva kameras. Kad pa caurulīti izplūst vienmērīga tvaika strūkļa, autoklāvu hermētiski noslēdz. Turpinot karsēšanu, ceļas spiediens. Ja spiediens ir 1 atmosfēra (virs normālā), temperatūra ir 121⁰ C. Šādā režīmā iet bojā visas baktērijas, arī to sporas. Parasti sterilizē 20 min.

Ja jāsterilizē materiāls, kas slikti vada siltumu (piemēram, pārsienamais materiāls), sterilizācijas laiks var būt līdz 45 min. Dažos gadījumos paaugstina spiedienu. Paaugstinātu spiedienu izvēlas tad, ja jāsterilizē augsne.

Ja barotnes vai šķīdumi satur termojūtīgus savienojumus izvēlas 0,5 atm. spiedienu (112⁰C). Šādā režīmā iet bojā tikai veģetatīvās šūnas, tādēļ sterilizāciju atkārtoti vēl divas reizes ik pēc 24 stundām. Starplaikos baktēriju sporas izdīgst un pārvēršas veģetatīvajās šūnās un nākošajā sterilizācijas reizē iet bojā. Barotnes, kas satur cukurus un želatīnu, neiesaka sterilizēt pie 1 atm.

Ja materiāls jāsterilizē ar **plūstošu tvaiku**, autoklāvu hermētiski nenoslēdz. Sterilizē 35-45 min., sterilizāciju atkārtojot 2 reizes ik pēc 24 stundām.

Par **pasterizāciju** sauc vienreizēju karsēšanu temperatūrā, kas zemāka par 100⁰C (parasti 60-80⁰C). Apstrādes laiks atkarīgs no tilpuma un temperatūras. Parasti pasterizē 30 min. Pasterizācijā iet bojā tikai veģetatīvās šūnas. Sporas paliek dzīvas.

Sterilizācija ar stariem. Sterilizācijai izmanto UV, Rentgena un citus starus. Baktericīdā iedarbība ir atkarīga no viļņu garuma, starojuma intensitātes un apstrādes ilguma. UV starus parasti izmanto mikroorganismu iznīcināšanai gaisā laboratorijās, boksos, operāciju telpās, farmaceitiskās rūpnīcās.

Ķīmiskā sterilizācija – objektu apstrāde ar baktericīdām vielām. Visbiežāk izmanto virsmām. Var pielietot 5% fenolu (karbolskābi), 0,5-5% borskābi, 70% etilspirtu, 0,2-5% hloramīnu, 1-3% ūdeņraža peroksīdu.

Aukstu sterilizāciju ar filtru palīdzību var izmantot. dažādu šķīdumu un barotņu atbrīvošanai no mikroorganismiem. Biežāk lietoto filtru poru diametrs 0,45 vai 0,22 mikrometri. Poru lielums apzīmē ar numuriem

Šie bakterioloģiskie filtri var būt no nitrocelulozes, celulozes acetāta, poliamīda, azbesta, porcelāna vai cita materiāla.

Membrānu filtrus visbiežāk izmanto ūdeņu bakterioloģiskai analīzei. Izfiltrējot noteiktu ūdens tilpumu caur filtru, var sakoncentrēt baktērijas uz filtra. Filtrus krāso un saskaita baktērijas caur mikroskopu.

2. Baktēriju kultivēšana, barotnes.

Mikroorganismu augšanai nepieciešamas barības vielas. Mikroorganismu spējas izmantot noteiktas barības vielas ir ļoti dažādas. Tas jāņem vērā, sastādot barotnes. Barotnē jābūt C (ogleklis), N (slāpeklis), S (sērs), P (fosfors), K (kālijs), Mg (magnijs) un citu elementu avotiem.

Pirmās barotnes bija šķidrās. Cietās barotnes sāka izmantot Roberts Kohs (1881.g. publikācija). R.Kohs -1905. gada Nobeļa prēmijas laureāts, pierādīja, ka Sibīrijas mēra izraisītājas ir baktērijas. Viņš nopublicēja plašu metodi, tīru kultūru iegūšanai. Tādā veidā tika likti pamati medicīniskās mikrobioloģijas "zelta laikiem".

Sākot strādāt mikrobioloģijas laboratorijā, svarīgi iemācīties patstāvīgi gatavot visas pamatņu barotnes.

Ērtāk ir izmantot rūpnieciski ražotus barotņu sausos koncentrātus (Agara sauso zivju barotni, Endo barotni un citi) kas pirms sterilizēšanas tikai jāatšķaida ūdenī.

Barotnes klasifikācija

| Blīvums | Sastāvs | Izpētes mērķis |
|---------|----------------|----------------|
| Šķidrās | sintētiskas | universālās |
| Cietas | pussintētiskas | diagnostiskas |
| | kompleksas | selektīvas |
| | | elektīvas |

Mikrobioloģijā izmanto gan **šķidrās**, gan **blīvās** barotnes.

Blīvās barotnes pagatavo, šķidrai barotnei pievienojot sarecinātāju. Visbiežāk par sarecinātāju izmanto agaru.

Agara ķīmiskās uzbūves pamatā ir polisaharīdi. Agaru iegūst no jūras sārtalģēm. Lai iegūtu blīvu barotni, pievieno 2-2,5% agara.

Agara koncentrācija atkarīga no barotnes pH un agara kvalitātes.

Agarizētās barotnes sašķidrinās 100⁰ C temperatūrā, sacietē 40-50⁰ C temperatūrā.

Želatīnu par sarecinātāju izmanto retāk. Želatīnu iegūst no kauliem, skrimšļiem un cīpslām. Želatīna ķīmiskās uzbūves pamatā ir olbaltumvielas, tādēļ pūšanas mikroorganismi to šķeļ ar saviem proteolītiskiem fermentiem. Lai barotni sarecinātu, pievieno 10-15% želatīna. Želatīns iepriekš noteikti jāuzbriedina aukstā barotnē. 10% želatīns kūst 32-34⁰ C temperatūrā, sacietē – 22-26⁰ C temperatūrā. Želatinizētas barotnes vēlams sterilizēt pie 0,5 atm. Želatinizētas barotnes izmanto mikroorganismu proteolītisko spēju noteikšanai.

Blīvās barotnes izmanto mikroorganismu koloniju iegūšanai, lai varētu no tām

mikroorganismus izolēt tīrkultūrā. Uz blīvām barotnēm vieglāk konstatēt kultūras inficēšanos ar svešiem mikroorganismiem. Blīvās barotnes izmanto mikroorganismu uzglabāšanai.

Šķidrās barotnēs vieglāk noteikt mikroorganismu biomasu un pētīt dažādu faktoru ietekmi uz kultūras augšanu.

Sintētiskajām barotnēm ir noteikts ķīmiskais sastāvs. Tās var sastāvēt no neorganiskām un organiskām vielām, kas noteiktā daudzumā izšķīdinātas ūdenī. **Dabiskās barotnes** (kompleksas) gatavo no dabas produktiem: gaļas, zivīm, piena, alus, misas, dārzeniem utt. To precīzs ķīmiskais sastāvs nav zināms. Šādās barotnēs atbilstošie mikroorganismi ļoti labi vairojas, jo tajās ir ne tikai nepieciešamo elementu avoti, bet arī augšanas faktori (vitamīni, aminoskābes u.c.).

Baktēriju kultivēšanai bieži izmanto gaļas-peptona buljonu (**GPB**) un gaļas-peptona agaru (**GPA**), kā arī zivju-peptona buljonu (**ZPB**) un zivju-peptona agaru (**ZPA**). Gaļas vai zivju buljonam pievieno 1% peptona un 0,5% NaCl (vārāmais sāls). **Peptons** ir gaļas nepilnīgas hidrolīzes produkts un satur oligopeptīdus un aminoskābes.

GPA, GPB, ZPA un ZPB, mikrobioloģijā izmanto bieži, tāpēc tās dažkārt sauc par **universālām barotnēm**.

Daudzas barotnes lieto īpašām vajadzībām: mikroorganismu diferencēšanai, noteiktu grupu uzkrāšanai un citām vajadzībām. Atbilstoši mērķim izšķir:

Selektīvās barotnes veicina tikai noteiktu mikroorganismu augšanu, pateicoties ķīmisku vielu pievienošanai, kas atļauj augt tikai noteiktiem mikroorganismiem, jo citus nomāc.

Elektīvās (bagātinātās) barotnes satur ķīmikālijas, kas veicina vajadzīgo mikroorganismu augšanu, salīdzinoši ar citiem, nevēlamajiem mikroorganismiem. Elektīvās barotnes palīdz izdalīt vajadzīgos mikroorganismus no nevajadzīgajiem, jo to sastāvā ir ķīmiskās vielas, kas veicina vēlamo mikroorganismu augšanu, salīdzinot ar citiem. Elektīvo barotņu paraugi ir barotnes ar augstu sāls vai cukura koncentrāciju (priekš halofīliem vai osmofīliem), alus ar etiķskābes piemaisījumiem, lai izaudzētu etiķskābās baktērijas, sīki sagriezta siena novārījums, siena nūjiņu *Bacillus subtilis* izdalīšanai.

Diferenciālās (diagnostiskas) barotnes satur dažādus komponentus, kas ļauj pētniekiem atšķirt vienas baktēriju sugas no citām, pateicoties baktēriju spējai dažādi metabolizēt vai mainīt barotņu īpašības. Diferenciālajām barotnēm tiek pievienotas dažādas krāsvielas, piemēram, sarkanais fenols, eozīns, metilēnzilais u.c. Baktēriju producētā metabolisma rezultātā šīs barotnes maina krāsu. Dažas krāsvielas, kā piemēram, eozīns un metilēnzilais, inhibē dažu baktēriju augšanu. Izmantojot šīs krāsvielu īpašības ir izveidota barotne **EMB (eosin methylene blue) agars**, kuru izmanto kā diferenciālu barotni membrānu filtros.

EMB- diferenciālbartotne tāpēc, ka kolonijas ar laktozes fermentāciju krāsojas no rozā krāsas uz zilu ar melnu centru vai metālisku spīdumu no eozīna vai metilēnzilā.

EMB- arī ir selektīvā barotne, tāpēc, ka krāsvielas inhibē grampozitīvo baktēriju augšanu, bet gramnegatīvās baktērijas šajā barotnē aug labi.

MacConkey agars – diferenciābarotne, kas paredzēta zarnu gramnegatīvo baktēriju izolācijai un noteikšanai. Laktozi fermentējošie mikroorganismi veido sarkanās necaurspīdīgas kolonijas, bet mikroorganismi, kas nefermentē laktozi veido bezkrāsainas caurspīdīgas kolonijas uz šīs barotnes.

Endo barotne(fuksīns- sulfītagars)- barotne, kuru izmanto lai izolētu zarnu gramnegatīvos mikroorganismus, it sevišķi koli formas (zarnu nūjiņas), no ūdens, piena produktiem un pārtikas. Šo barotni lieto, lai diferencētu laktozes pozitīvās un negatīvās zarnu trakta baktērijas, it sevišķi lai veiktu pirmsizmeklēšanas testus, lai noteiktu zarnu nūjiņas klātbūtni. Mikroorganismi, kas fermentē laktozi, piemēram, zarnu nūjiņa, izdala skābes un aldehīdus, kas reaģē ar fuksīnsērskābi. Veidojas aldehīdsērskābe un izdalās brīvs fuksīns. Zarnu nūjiņu kolonijas nokrāsojas tumši sarkanā krāsā ar metālisku spīdumu.

Laktozes peptona ūdens – ļauj noteikt zarnu nūjiņas nomazgājumus no analizējamajām virsmām. Zarnu nūjiņas baktērijas fermentē laktozi, veidojot skābi un gāzi 28-48 stundu laikā pie 37⁰ C temperatūras. Barotnē ir indikators (fenolsarkanais), kas maina krāsu skābā vidē no sarkana uz dzeltenu.

Žults-briljantzaļā barotnes sastāvs : peptons, laktoze, liellopu žults, briljantzaļā krāsa, kas ļauj noteikt koli titru dotajos ūdens paraugos. Grampozitīvās baktērijas tiek inhibētas ar žults sāļiem un krāsvielu. Laktozi fermentējošās enterobaktērijas samazina barotnes pH , izmainot barotnes krāsu no spilgti zaļas uz dzeltenu. Parasti šo barotni izlej mēģenēs ar pludiņiem, kas kalpo kā gāzu uztvērēji, kuras ražo enterobaktērijas.

Barotnē jābūt atbilstošai **pH** vērtībai. Vairums baktēriju vislabāk aug, ja videi ir neitrāla reakcija.

Mikroorganismus kultivē **mēģenēs, kolbās, Petri traukos.**

Tos novieto termostatos ar atbilstošu temperatūru, visbiežāk **28^o** vai **37^oC** temperatūrā. Ja šķidrai barotnei vajadzīga papildu aerācija, kolbas novieto uz **kratītāja**. Lai kultivētu **anaerobus** mikroorganismus, jāizslēdz gaisa skābekļa klātbūtne. Tam izmanto aparātus - **anaerostatus**.

Eksistē daudz dažādu barotņu un metožu mikroorganismu izdalīšanai. Zinot izdalāmo mikroorganismu īpašības var piemērot optimālus veidus to izdalīšanai. Var tikt izmantoti dažādi fizikālie faktori, piemēram, var izmantot augstas temperatūras, izdalot sporas veidojošās baktērijas, (sporas ir izturīgas pret augstām temperatūrām), paraugu pirms izdalīšanas sasildot.

Praktiskais darbs

1. Agarizētas barotnes izliešana Petri trauciņos

Darba uzdevums: Izliet agarizētu barotni Petri trauciņos, ievērojot sterilitāti .

Nepieciešamie piederumi:

Gāze deglis, sērkociņi

Sterilie Petri trauki –4 gab.

Burka ar ZPA barotni

Burka ar Endo barotni

Mikroviļņu krāsns

(Katedras laborants barotnes iepriekš sagatavo un nosterilizē).

Darba gaita:

1. Agarizētas barotnes izkausē mikroviļņu krāsnī vai ūdens vannā.
2. Aizdedz gāzes degli.
3. Ar labo roku tur burku ar barotni, ar kreiso – atskrūvē vāciņu. Iepriekš barotni nedaudz atdzesē, līdz 60⁰C, lai uz vāciņa neveidotos daudz kondensāta.
4. Burkas kakliņu īsu brīdi apdedzina liesmā un nedaudz paverot vāciņu ar kreisās rokas lielo un vidējo pirkstu, ātri ielej barotni Petri platē tik daudz, lai tā pārklāj visu plates pamatni (apmēram 20-25 ml uz plati).
5. Aizver Petri trauka vāciņu un atstāj traukus ar agarizēto barotni uz horizontālas virsmas apmēram 30 min. kamēr barotne sacietē.
6. Barotne ir gatava mikroorganismu uzsēšanai. Vajadzības gadījumā, veidojoties kondensātam, plates atstāj arī ilgāku laiku, kamēr apžūst.

2. Gaisa mikrobioloģiskā stāvokļa pārbaudīšana

Darba uzdevums:

Pārbaudīt gaisa mikrobioloģisko stāvokli, mikroorganismu konstatēšanai izmantojot universālo barotni ZPA (zivju peptona agars).

Gaisa mikrofloras noteikšanai dažādās telpās izmanto sedimentācijas metodi, t.i. Koha vai trauciņu metodi.

Nepieciešamie piederumi:

Petri trauciņi ar ZPA (zivju peptona agars)

Etilspirts 70%

Vates tampons

Markers, rakstīšanai uz stikla.

Darba gaita:

1. Uz vēlamo virsmu, iepriekš to dezinficējot ar spirta tamponu, uzliekam Petri trauciņu un to atveram, vāciņu novietojot blakus ar sterilo iekšpusi uz dezinficētas ar spirtotu vates tamponu virsmas un atstājam atvērtu 10 minūtes.
2. Aizveram Petri trauciņu un atgriežamies praktikumā.
3. Trauka apakšpusē atzīmēsim parauga nosaukumu, studentu iniciāļus un datumu.
4. Tālāk trauku ievieto termostatā (temperatūra 28⁰ C) uz plaukta ar vāciņu uz leju, lai kondensācijas ūdens nenokļūtu uz barotnes virsmas. Nākošajā nodarbībā vārēs izanalizēt gaisa mikrofloru dažādās telpās. Plates aina atšķirsies: pēc koloniju skaita, krāsas, morfoloģijas.

3. Zarnu nūjiņas konstatēšana pilsētas kanāla ūdenī

Nepieciešamie piederumi

Kolba ar kanāla ūdeni.

Petri trauks ar **Endo barotni**.

Automatiskā pipete 1ml

Sterīlie uzgaļi

Stikla špatelis(trīsstūrveidā saliekta stikla nūjiņa)

Trauks ar etilspirtu

Darba gaita:

Visā darba gaitā ievēro sterilitāti, strādā pie liesmas.

1. Aizdegt gāzes vai spirta lampiņas degli
2. Ar pipeti, jāizmanto mehāniskais dozators, ņemot ūdens paraugu un jāuzlej 0, 5ml uz plati ar Endo barotni. Strādājam pie liesmas, taču tā, lai pipete nesakarstu. Pipetei sakarstot mikroorganismi, kas ir ūdenī var iet bojā.
3. Stikla špateli iemērcam spirtā un spirtu aizdedzinām. Stikla špateli nedrīkst turēt liesmā, jo tas var sasprāgt.
4. Špateli atdzesē pie Petri trauka vāka iekšpuses, vienlaicīgi notraucot tur sakrājušos kondensācijas ūdeni.
5. Uznesto suspensiju ar sterilo špateli vienmērīgi izkļiedē pa agarizētas barotnes virsmu, ar apļveida kustībām, kamēr rodas viegla pretestība no agara virsmas.
6. Traukus apgriežam ar vākiem uz leju. Trauka apakšpusēs atzīmēsim parauga nosaukumu, studenta iniciāļus un datumu.
7. Plates novietot termostatā pie 37 0 C temperatūras. Tā ir optimālā temperatūra zarnu nūjiņas

augšanai.

4. Zarnu nūjiņas grupas baktēriju klātbūtne uz virsmām

(**Virsmu noskalojumi *Escherichia coli* konstatēšanai**)

Darba uzdevums: Konstatēt zarnu nūjiņas baktērijas klātbūtni izmantojot diagnostiskas barotnes.

Nepieciešamie piederumi:

Pincete.

Sterils vates tampons celofāna apvalkā.

Mēģene ar **laktozes peptona ūdeni** vai žults - **briljantzaļā barotne** lai noteiktu, vai noskalojumā ir zarnu nūjiņa.

Darba gaita:

1. Pinceti samērcējam spirtā un apdedzinām uz gāzes vai spirta lampiņas liesmas;
2. Ņemam līdzī sterilo pinceti, tamponu mazgāšanai, mēģeni ar ūdeni un mēģeni ar barotni;
3. Paraugus noņemsim no durvju rokturiem. Rokturi varētu būt notriepti ar fekāliju netīrumiem. Katra grupa izvēlēsies vienu durvju rokturi.
4. Noņemam celofānu no tampona ļoti uzmanīgi, neaizskarot tamponu ar rokām. Ar sterilo pinceti paņemam un saslapinām vates tamponu mēģenē ar ūdeni.
5. Ar tamponu nomazgājam durvju rokturi un tamponu ieliekam mēģenē ar barotni.
6. Uz mēģenes virsmas uzraksta telpas numuru vai nosaukumu, studentu iniciāli, datumu.
7. Mēģenes ielikt statīvā un atstāt termostatā 37⁰C temperatūrā.

Nākošajā nodarbībā izanalizēsim iegūtos rezultātus, novērojot mēģenē barotnes krāsu izmaiņu un gāzes veidošanos.