

## Laboratorijas darbs 16.

### **Nosaukums: Baktērijas ap mums II**

**Mērķis:** Sniegt priekšstatu par baktēriju formu, sporām, kapsulām, baktēriju preparātu gatavošanu, mikroskopēšanu.

### **Terētiskais pamatojums**

Baktēriju daudzveidība.

### **Darba uzdevumi**

- Pārbaudīt sporu veidošanos *Bacillus subtilis*, *Bacillus mycoides* ( gatavie preparāti)
- Apskatīt baktērijas *Azotobacter chroococcum* kapsulas, kas negatīvi kontrastētas ar tušu( gatavs preparāts)
- Krāsošana pēc Grama metodes izmantojāt kā kontroli labi zināmus grampozitīvus un gramnegatīvus mikroorganismus un izolētu tīrkultūru.
- Pagatavot zobu apsūbējuma preparātu ar negatīvo krāsošanas metodi un apskatīt dažādas formas baktērijas, sevišķu vērību veltot izliektajām formām.

### **Literatūra:**

Zariņš P. 1973. Mikrobioloģijas praktikums. – Rīga.

Johnson T.R., Case C.L. 2004. Laboratory Experiments in Mikrobiology. 7<sup>th</sup> ed. San Francisko.

Pearson Benjamin Cumming, 434 pp.

## Teorētiskais pamatojums

### 1. Mikroorganismu forma

Mikrobu pasaule ir pārsteidzoši daudzveidīga. Baktērijas, sēnes, raugi ir atšķirīgi pēc formas un izmēriem. Baktērijas pēc formas var sadalīt 4 pamat grupas: lodveida baktērijas (kokus), nūjiņveida (no tam cēlies baktēriju nosaukums no grieķu val. – nūjiņa), viļņoti vibrioni, spirillas, spirohētas un diegveidīgās baktērijas. Nokļūstot nelabvēlīgos apstākļos, nūjiņveidas baktērijas var izveidot sporas. Koki biežāk ir lodveida un var izvietoties pa vienam (monokoki), pa divām šūnām (diplokoki), pa četrām (tetrakoki), ķēdīšu veidā (streptokoki), paciņu veidā vairākās rindās (sarcīnas) un vīnogu ķekara veida sakopojumos (stafilokoki). Nūjiņveida baktērijām ir cilindru veids ar noapaļotiem, kā noskaldītiem vai kā noasinātiem galiem. Komatveida viļņotās baktērijas sauc par vibrioniem, spirillām ķermenis sagriezts pa vienu apgriezīgu ap asi, spirohētām – vairāki apgriezīgi. Diegveida baktērijas pēc formas atgādina diegus. Tām pieder sēra baktērijas un dzelzs baktērijas. Tās mīt ūdeņos un nav patogēnas.

Neskatoties uz mikroskopiskajiem izmēriem, t.i. tos nevar saskatīt ar neapbruņotu aci, to izmēri savā starpā tomēr ir ļoti atšķirīgi. Raugu šūnas ir ievērojami lielākas nekā baktērijas un to garākais diametrs ir līdz 10 μm. Baktērijas atkarībā no to sugas un kultivēšanas apstākļiem ir 0,1-10 μm garas.

**2. Mikroorganismu kustības.** Daudzas baktērijas spēj kustēties. Baktēriju aktīva kustība notiek ar viciņu palīdzību. Viciņu esamība, skaits, izmēri un novietojums ir sugai pastāvīgs. Viciņas pieder ārējām pazīmēm, bet to klātbūtne atkarīga no mikroorganisma vecuma un vides apstākļiem. Vecām formām viciņas var arī nebūt.

Viciņu novietojums baktērijām ir dažāds.

Atkarībā no viciņu skaita un novietojuma baktērijas iedala **monotrihās** – ar vienu vici, **amfitrihās** – ar divām polāri novietotām viciņām, **lofotrihās** – ar viciņu pušķi vienā šūnas galā, **peritrihās** – ar viciņām pa visu šūnas virsmu.

Viciņu diametrs svārstās no 100 līdz 300 Å, garums no 3 –12 mkm. Viciņas sastāv no olbaltumvielas – **flagellīna**.

Baktēriju pārvietošanās notiek pateicoties aktīvai viciņu rotācijas kustībai.

Kustīgās baktērijas aktīvi pārvietojas noteiktā virzienā. Šādu pārvietošanos noteiktā virzienā sauc par **taksijām**. To nosaka tādi faktori kā vielu vai skābekļa koncentrācija vidē, apgaismojums un citi.

Atkarībā no faktora izšķir **hemotaksijas, aerotaksijas, fototaksijas**.

Baktērijām ir liels pārvietošanās ātrums. Piemēram baktērija var veikt attālumu, kas 20 –50 reizes

pārsniedz tās garumu.

### 3. Endosporas

Baktērijas sporas ir pielāgojums baktēriju izdzīvošanai nelabvēlīgos vides apstākļos. Ja visas baktērijas iet bojā pie 80°C (pasterizācijas temperatūra), dažas pat jau 10 minūšu laikā, termorezistentās endosporas iztur karsēšanu, un dažas pat vārīšanu vairāku stundu garumā. Sarežģītā [frakcionēta sterilizācijas tehnika](#) ir domāta tieši endosporu iznīcināšanai.

Sporu termorezistence ļauj atdalīt sporu veidojošās kultūras, t.i. vispirms 10 min laikā sakarsē augsni vai kādu citu materiālu līdz 80°C vai 100°C, veģetatīvas šūnas iet bojā, bet termorezistentās sporas izdzīvo, un tās var uzsēt uz piemērotas barotnes un izanalizēt sporu veidotāju bakteriālo kultūru.

Sporu veidošana nav obligāta baktēriju attīstības stadija. Sporu veidošanos ierosina dažādi apstākļi. Tie var būt barības vielu deficīts vidē, skābuma vai temperatūras izmaiņas. Katrā veģetatīvajā šūnā veidojas tikai viena endospora.

Sporas atšķiras formas ziņā. Iespējamā sporu forma ir: apaļa, ovāla, trīsstūrveida.

Baciļu tipa sporu gadījumā baktēriju šūnu forma neizmainās. Endospora novietojas šūnas centrā vai termināli, kas atkarīgs no baktērijas sugas.

[Klostrīdiju ģints](#) baktērijām ir pazīstami divi sporu veidošanās tipi. Daļai baktēriju, veidojoties sporai, šūnas centrs ieplešas un šūna izskatās vārpstveida. Spora novietota šūnas uzbiezinātajā daļā. Citām baktērijām, veidojoties sporai, šūna pagarinās vai vienā galā noapaļojas, kļūstot līdzīga bungu vāļītei, un spora lokalizējas šūnas paplašinātajā galā.

Mikroskopā sporas redzamas pateicoties to augstam gaismas laušanas koeficientam, kas ir tāds pats kā atūdeņotai olbaltumvielai. Tas liecina, ka sporā sakoncentrēts mazā tilpumā olbaltumvielu koncentrāts. Sporā ir gandrīz visa mātes šūnas sausne (sausā viela), bet 10 x mazākā tilpumā.

Endosporas virsmu klāj daudzkārtains, grūti caurlaidīgs apvalks, tāpēc, krāsojot, piemēram, ar genciānvioleto sporas nenokrāsojas. Šūnā tās redzamas kā bezkrāsaini ieslēgumu, brīvas sporas (sporas ārpus šūnas) ir gredzenveida.

Šūnu krāsošanai izmanto diferenciālo sporu un citoplazmas krāsošanas metodi – Peškova metodi. Sporas un citoplazmu krāso, karsējot. Preparātu izmazgājot ar ūdeni, citoplazma atkrāsojas, turpretim sporas saglabā noturīgu krāsojumu. Pēc tam krāso citoplazmu.

### 4. Kapsulas

Kapsula - gļotains slānis, kas dažiem mikroorganismiem atrodas uz šūnas sienas. Kapsulas sastāv no 98% ūdens, polisaharīdiem, glikoproteīna, polipeptīdiem. Dažu baktēriju kapsulas nodrošina virulenci, piemēram, pneimonijas izraisītājam *Streptococcus pneumoniae*. Sibīrijas mēri *Bacillus anthracis* izraisītāja kapsulas veidojas saimnieka organismā.

Kapsulas pilda aizsarg funkciju. To gļotainais slānis aizsargā mikroba šūnu no vides nelabvēlīgiem faktoriem, bet patogēnos mikrobus no iznīcinošiem organisma aizsarg mehānismiem, tai skaitā fagocitozes un antivielām.

Dažām citām baktērijām kapsula ir svarīga diagnosticēšanas pazīme.

Dzīvu baktēriju nekrāsotā preparātā baktēriju kapsulas ir grūti saskatāmas, un par to esamību liecina vienīgi tipiskais šūnu izkārtojums preparātā, nelielā attālumā vienai no otras. Fiksēšana un krāsošana kapsulas deformē, pie tam, tā kā dažādām baktērijām kapsulu ķīmiskais sastāvs ir atšķirīgs, tad tās nav iespējams atklāt ar kaut kādu vienu krāsošanas paņēmieni.

Biežāk kapsulas konstatē ar negatīvās krāsošanas metodi (negatīvā kontrastēšana), izmantojot tušu. Šo metodi var lietot arī spirohetu konstatēšanai, bet ja pielietotu preparātu fiksēšanu ar karsēšanu, šūnu forma varētu izmainīties. Sevišķi svarīgi tas ir klīniskajos izmeklējumos. Spirohetu ģints baktērijas var atrast zobu aplikumā, *Spirochaeta dentum* izraisa kariesu (zobu bojāšanos).

## 5. Mikroorganismu preparātu gatavošana

### Nekrāsoti preparāti.

Dzīvas mikroorganismu šūnas satur daudz ūdens, to sastāvdaļu spējas absorbēt gaismas starus ir samērā vienādas, tāpēc mikroskopā preparāti ir maz kontrastaini.

**Trūkums** - maz kontrastaini.

**Priekšrocība** – ir attēlu dabiskums. Mikroorganismi nav izkropļoti karsējot vai iedarbojoties ar ķimikālijām, nerodas neskaidrības artefaktu dēļ.

Nekrāsoti preparāti atvieglo orientēties mikroorganismu formu dažādībā, novērš pārpratumus kas rodas, par mikroorganismiem uzskatot tiem līdzīgi nokrāsotas barotnes sīkdaļiņas vai dažādus piemaisījumus.

Nekrāsotus preparātus parasti gatavo, uzskalojot šūnas ūdenī vai izmantojot kultūras šķidras barotnes.

Kontrastainību var uzlabot ar vitālās negatīvas krāsošanas metodēm.

Preparāts tušā – nekrāsotus mikroorganismus apņem tumši iekrāsots fons.

### Krāsoti preparāti.

**Priekšrocība** : Krāsošana pastiprina preparātu kontrastainums.

Parasti izmanto *bāziskās krāsvielas*: fuksīns, metilēnzilais, metilviolets, kristālviolets, genciānviolets, metilzaļais u.c.

No krāsvielas pagatavo piesātinātu alkoholisko šķīdumu ( tas nebojājas ), filtrē un atšķaidi ar ūdeni līdz vajadzīgajai koncentrācijai ( iegūtais šķīdums uzglabājas apmēram mēnesi ).

Skābes un to sāļus ( pikrinskābi, kongosarkano, skābo fuksīnu u.c. )izmanto speciālām krāsošanas metodēm.

Mikroorganismu šūnas galvenokārt krāso ar anilīna krāsām. Sārmajām krāsvielām galvenie krāsojošie joni ir katjoni (hromofori) , kas intensīvāk saistās ar šūnas kodola komponentiem. Augsta DNS un ribosomu RNS koncentrācija baktērijas šūnā padara to jutīgu pret sārmajām krāsām (metilenzilo, skābo fuksīnu, genciānvioleto, safranīnu). Skābajām krāsvielām krāsu veidojošie joni ir anjoni (eozīns, eritrozīns, skābais fuksīns) kas saistās ar šūnas citoplazmatiskajiem komponentiem.

### **Fiksācija**

**Fiksācija liesmā** mikroorganismus nonāvē, izžāvē, padara apvalkus caurlaidīgus, veicina krāsvielas iekļūšanu šūnā, materiālu piesaista stiklam

( tālākā apstrādē tas nenoskalojas ). Slimību ierosinātāju preparāti obligāti jāfiksē liesmā.

Fiksējot karstumā, raugu un baktēriju šūnas saraujas un maina formu.

Ir ķīmiskās **fiksācijas** metodes.

### **Mikroorganismu krāsošana pēc Grama metodes.**

#### **Grāma krāsošanas pamatprincips.**

Baktēriju krāsošana pēc Grama ir diferenciāla krāsošanas metode un tiek plaši lietota , nosakot baktēriju sugas. Pēc spējas nokrāsoties ar Grama metodi baktērijas iedala divās grupās – grampozitīvajās ( ) un gramnegatīvajās ( ) baktērijās.



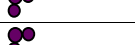

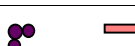
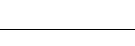
Grampozitīvās baktērijas, apstrādājot ar spirtu, aiztur genciānvioletā un joda kompleksu, un tāpēc paliek violetā krāsā. Gramnegatīvajām baktērijām nav tādas spējas, tāpēc spirts tās atkrāso.

Preparātu tālāk apstrādājot ar fuksīnu vai safranīnu, gramnegatīvās baktērijas nokrāsojas rozā krāsā.. Grampozitīvo un gramnegatīvo baktēriju šūnapvalki ļoti atšķiras, tāpēc tieši šī īpašība nosaka spēju aizturēt nokrāsoto kompleksu, kurš veidojas , kā pierādīts, uz šūnas protoplastiem.

#### **Grampozitīvo un gramnegatīvo baktēriju piemēri:**

<b>Grampozitīvi</b>	<b>Gramnegatīvi</b>
Pienskābes baktērijas	Zarnu nūjiņas ( <i>Escherichia coli</i> )
Streptokoki	Dizentērijas baktērijas ( <i>Shigella</i> ģints)
Stafilokoki	Etiķskābes baktērijas
Sarcīnas	Zilo strutu nūjiņa ( <i>Pseudomonas aeruginosa</i> )
Ganddrīz visi aerobie sporu radītāji ( <i>Bacillus</i> ģints)	Spirohetas

## Grama krāsošanas shēma

№	Etaps	Vielas	Apstrādes laiks	
1.	Pamatkrāsviela	genciānvioletā vai kristālviolētā šķīdums	2 min.	
2.	Fiksators	Lugola šķīdums	1 min.	
3.	Atkrāsošana	95% etilspirts	10-30 sek.	
4.	Skalošana	ūdens	1min.	
5.	papildkrāsviela	karbolfuksīna vai safranīna šķīdums	1 min.	
6.	Skalošana	ūdens	1 min..	
<p style="text-align: center;">● Grampozitīvās baktērijas (Gr<sup>+</sup>)</p> <p style="text-align: center;">— Gramnegatīvās baktērijas (Gr<sup>-</sup>)</p>				

### 6. Zobu mikroflora

Zobu aplikumā atrod lielu daudzumu mikroorganismu

(10<sup>8</sup> baktērijas - 1 mg apsūbējumā). Liela nozīme zobu kariesa progresēšanā ir streptokokam *Streptococcus mutans*.

*Streptococcus mutans* veido glikānu, kas piesaista bakterialas šūnas pie zoba virsmas. Glikans veidojas tikai saharozes klātbūtnē (ar to izskaidro pārāk liela saldumu lietošanas sekas pie zobu stāvokļa pasliktināšanās). **Saharoze ⇒ glikāns + fruktoze.**

Baktērijas no ģintīm *Lactobacillus*, *Streptomyces* sarauzē saharozi un fruktozi par pienskābi.

*Spirochaeta* ģints baktērijas sarauzē glikozi, veidojot etiķskābi un pienskābi.

Diegveida baktērija -*Leptotrichia buccalis* (Gram negatīvas, anaerobas nūjiņas ) arī piedalās šajā procesā. Skābe veicina kalciju (Ca) izdalīšanu no emaljas, veicina kalciju fosfātu ( CaPO<sub>4</sub> ) izgulsnēšanos – zobakmens rašanos.

#### Praktiski padomi mikroskopēšanā.

1. Ja lieto sausās sistēmas objektīvus, vispirms atrod preparātu ar mazāko objektīvu (8x), pēc tam pagriež 40x objektīvu. Asumu precizē ar mikroskrūvi.
2. Ja lieto imersijas sistēmu, objektīvu, skatoties no sāniem, nolaiž līdz vizemākais pozīcijai un meklē preparātu, ceļot tubusu uz augšu ar makroskrūvi. Asumu precizē ar mikroskrūvi. Apskatot nekrāsotus preparātus, pieveriet nedaudz apertūras diafragmu. Tas palielinās kontrastainību.
3. Apskatot fiksētus krāsotus preparātus, redzes laukam jābūt labi apgaismotam, tādēļ diafragmai jābūt stipri atvērtai.
4. Pēc imersijas eļļas lietošanas objektīvs jānotīra ar 96° etilspirtu. Etilspirta atlikumu noslauka ar filtpapīru.

## Praktiskais darbs

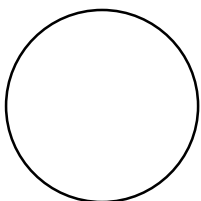
### 1. Dzīvu nekrāsotu pseidomonas *Pseudomonas sp.* preparātu apskatīšana

#### Darba uzdevums:

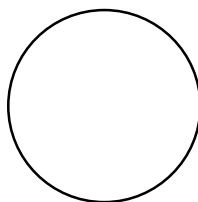
Kustīgumu parasti nosaka jaunām šūnām, visbiežāk diennakti vecā kultūrā. Uz segstikla uzliek nelielu imersijas eļļas pilienu. Mikroskopē ar 90x objektīvu. Novērot baktēriju aktīvas kustības, atšķirt tās no ūdens plūsmas radītās un Brauna kustības. Uzzīmēt- baktēriju kustības apzīmēt ar bultiņām.

### 2. Dzīvu nekrāsotu preparātu no izdalītas tīrkultūras gatavošana un apskatīšana

Uzzīmēt - baktēriju kustības apzīmēt ar bultiņām.



*Pseudomonas sp.*

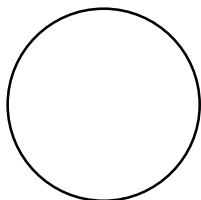


Izdalītā tīrkultūra

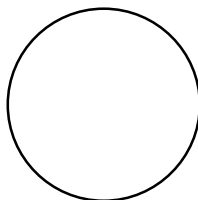
### 3. Krāsotu preparātu apskatīšana (izmanto jau gatavus preparātus)

- Apskatīt *Bacillus subtilis* un *Mikrococcus luteus* preparātus, lietojot 90x palielinājuma (eļļas imersijas) objektīvu.

Apskatot fiksētus krāsotus preparātus, redzes laukam jābūt labi apgaismotam, tādēļ diafragmai jābūt stipri atvērtai. Uzzīmēt.



*Bacillus subtilis*



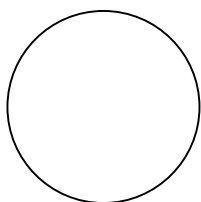
*Mikrococcus luteus*

Kā šie mikroorganismi atšķiras pēc formas?.....

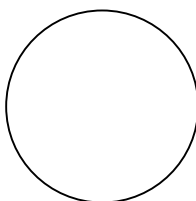
.....

### 4. Pārbaudīt sporu veidošanos *Bacillus subtilis*, *Bacillus mycoides*.

Apskatīt ar 90 x palielinājumu. Uzzīmēt 4-5 šūnas no katra suga. Veģetatīvas šūnas nokrāsojas sarkanā, bet sporas – zilā krāsā.



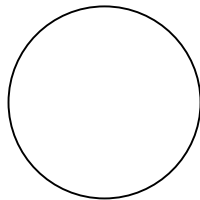
*Bacillus subtilis*



*Bacillus mycoides*

**5. Konstatēt kapsulas *Azotobacter chroococcum* preparāta pagatavotu ar negatīvās krāsošanas metodi (negatīvā kontrastēšana), izmantojot tušu.**

Šo metodi var lietot arī spirohetu konstatēšanai, bet ja pielietotu preparātu fiksēšanu ar karsēšanu, šūnu forma varētu izmainīties.



*Azotobacter chroococcum*

**6. Izolētās tīrkultūras krāsošana pēc Grama metodes**

Mikroskopēšanai izmanto jau iepriekšējā laboratorijas darbā no gaisa izdalītu un sīki aprakstītu mikroorganismu koloniju (I. un 2. laboratorijas darbi).

**Darba gaita**

1. Priekšmetstikla uznes 3 nelielus ūdens pilienus: divus savstarpēji tuvu un vienu atsevišķi.
2. Vienā no savā starpā tuvajiem pilieniem ar bakteriālo cilpiņu ienes grampozitīvo kultūru - baktērijas *Staphylococcus sp.* un otrajā gramnegatīvo kultūru-baktērijas *Escherichia coli*
3. Abus pilienus sajauc. Trešajā pilienā ar bakteriālo cilpiņu ienes izolētu kultūru, uzsētas iepriekšējā nodarbībā no atsevišķām kolonijām.
1. Priekšmetstikla uznes 3 nelielus ūdens pilienus: divus savstarpēji tuvu un vienu atsevišķi.
2. Vienā no savā starpā tuvajiem pilieniem ar bakteriālo cilpiņu ienes grampozitīvo kultūru - baktērijas *Staphylococcus sp.* un otrajā gramnegatīvo kultūru-baktērijas *Escherichia coli*
3. Abus pilienus sajauc. Trešajā pilienā ar bakteriālo cilpiņu ienes izolētu kultūru, uzsētas iepriekšējā nodarbībā no atsevišķām kolonijām.
4. Pagatavo divas uztriepes. Tās nedrīkst būt biezas.
5. Nožāvē gaisā.



6. Fiksē uz liesmas.
7. Krāso ar kristālvioletā šķīdumu 1 min., uzpilot krāsvielu tieši uz uztriepēm.
8. Noskalo ar krāna ūdeni.
9. Uzpilina uztriepēm Lugola šķīdumu uz 1. min.
10. Noskalo ar krāna ūdeni.
11. Atkrāso, priekšmetstiklu turot slīpi un pilinot 95% etispirtu, apmēram 10-30 sekundes, līdz spirts vairāk neizskalo krāsvielu no preparāta. Tūlīt skalo preparātu ar krāna ūdeni.
12. Krāso ar safranīnu 1 min.
13. Skalo ar krāna ūdeni
14. Nožāvē gaisā jeb siltā gaisa plūsmā.
15. Apskatīt uztripes, lietojot 90x palielinājuma objektīvu.

Tabulā - C ) \_ uzzīmējiet šūnas formu (3-5 šūnas) un atzīmējiet kāds ir rezultāts, krāsojot pēc Grama.

( Gr<sup>+</sup> vai Gr<sup>-</sup> ).

#### 7. Zobu apsūbējuma dzīvu preparātu gatavošana ar negatīvās krāsošanas metodēm

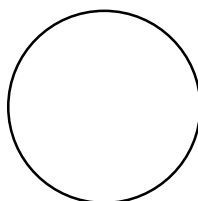
##### Darba uzdevums :

- Apskatīt zobu apsūbējuma preparātu. Lietot 90x palielinājuma objektīvu. Uzzīmēt visus redzamos mikroorganismus, sevišķu vērību veltot izliektajām formām.

##### Darba gaita

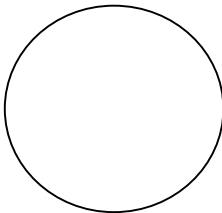
- Ar zobu bakstāmo ienes nedaudz zobu apsūbējuma ūdens pilienā, sajauc.
- Piepilina 2 pilienus atšķaidītas tušas (1:10), vēlreiz labi sajauc un pagatavo uztriepi. Uztriepām jābūt melnam.
- Nožāvē.

**NE FIKSĒ!**



**Zobu apsūbējuma preparāts**

**Gaisa mikrobioloģiskā pārbaude ( rezultātu konstatācija-turpinājums )**

1	Pētīšanas metode	
2	Barotne, kas izmantota uzsēšanai	
3	Paraugu ņemšanas vieta	
4	Ekspozīcija ( parauga ņemšanas laiks minūtēs )	
5	Baktērijas skaits 1 m <sup>3</sup> gaisā	
6	Vienas izvēlētas kolonijas apraksts forma diametrs spīdīgums caurspīdīgums krāsa  virsmas  kolonijas apmale  konsistence	Apaļa, ovāla, lēcveida, micēlijveida, punktveida  Matēta, spīdīga  Bezkrāsaina ( netīri baltas pieder pie bezkrāsainām ) vai pigmentēta (balta, dzeltena, oranža, rozā, sarkana, brūna, melna ) Gluda, rievota, krokota, radiāli svītrotā, ar koncentriskiem riņķiem Gluda, robota, simetriska vai nevienādi līkumota, mataina, viļņaina. 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	<u>Gr+</u> <u>Gr-</u>
11.*	Sporas	<u>Ir</u> <u>Nav</u>
12.*	Kapsulas	<u>Ir</u> <u>Nav</u>
*	Secinājumi:	

\* Atzīmētās tabulas daļas jāaizpilda nodarbības laikā, pārējās aizpildītas jau iepriekšējā nodarbībā.

