

TARTU RIIKLIK ÜLIKOOL

L. VIILEBERG

# MIKROBIOLOOGIA PRAKTIKUM

TARTU 1966

2/68358



-28041

TARTU RIIKLIK ÜLIKOOL

Taimefüsioloogia ja taimebiokeemia  
kateeder

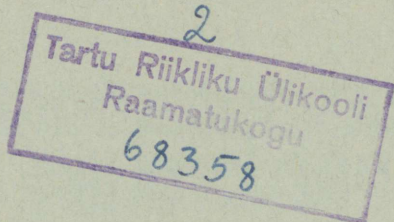
L. VIILEBERG

# MIKROBIOLOOGIA PRAKTIKUM

Teine trükk

TARTU 1966

2



## E E S S Õ N A

Mikrobioloogia praktikum on koostatud Tartu Riikliku Ülikooli bioloogiaosakonna üliõpilaste jaoks, silmas pidades bioloogiaosakonna õppeplaani, mikrobioloogia kursuse õppeprogrammi ja kateedri tehnilist baasi. Et mikrobioloogia praktikumi jaoks on ette nähtud 15 kahetunnilist praktikumi, siis ilmneb kohati materjali kokkusurutust.

Käesoleva praktikumi koostamisel on kasutatud seni trükkis ilmunud vastavasisulisi eesti-, vene- ja võõrkeelseid erialaseid teoseid, millede loetelu on toodud raamatu lõpus. Terminoloogias on arvestatud vabariigi bioloogide-mikrobioloogide seas väljakujunenud seisukohti.

Selle praktikumi ülesandeks on üliõpilasi tutvustada mikrobioloogias kõige vajalikumate uurimismeetoditega, mis lubavad tunda õppida mikroobide morfoloogiat, füsioloogiat ja biokeemiat. Tutvutakse ka väliskeskkonna tegurite toimega mikroobidele. Suhteliselt üksikasjalikumalt käsitlemist leiavad spetsiifilised süsiniku ja lämmastiku ringkäigust osavõtavad mikroobid.

Et paljud bioloogiaosakonna lõpetajad siirduvad koolidesse õpetajateks, kus neil tuleb botaanika kursuse raames tutvustada õpilasi ka mikrobioloogia algteadmistega, siis on püütud sisse võtta ka koolides sobivaid töid. Naturalistide ringi tööplaani peaksid aga sobima paljud tööd.

Autor on tänulik kõikide märkuste ja ettepanekute eest ning palub need saata Tartu Riikliku Ülikooli taimefüsioloogia ja taimebiokeemia kateedrisse aadressil: I.V.Mitsurini t. 40, Tartu.



## I p r a k t i k u m

### T e e m a: LABORATOORIUMIS TÖÖTAMISE KORD. MIKROBIOLOOGILISTE PREPARAATIDE VALMISTAMINE

Mikrobioloogia laboratooriumi asukohaks sobib hästi päikese poolest vaasem maha lääne-, ida- või p  h  japoolne osa, sest p  ikeseekiired segavad näiteks mikroskoopimist ja teisi t  id. Mikrobioloogia laboratooriumi seinad ja lagi kaetakse toonitud valge õlivärviga, p  randa ja laudade katmiseks kasutatakse linoleumi või plastmasskatet. Laboratooriumi sisustus olgu võimalikult lihtne, otstarbekas ja kergesti desinfitseeritav.

Tööks vajalikud esemed ja reaktiivid asetatakse kindlaks m  aratud kohale laual; see soodustab töötamist.

#### T       t a m i s e k o r d .

1. Mikrobioloogia laboratooriumis töötavad üliõpilased peavad seljas kandma valget kitlit ja peas valget mütsi, mis pärast töö lõpetamist asetatakse laboratooriumis asuvasse kitlite kappi.
2. Iga   li  pilane on kohustatud korras hoidma töökoha ja töövahendid ning kasutama ainult temale ettenähtud vahendeid. Tarvitatud k  lviaasad ja nõelad tulevad kohe steriliseerida leegil. Pipettide suupoolsed otsad peavad olema isoleeritud vattfiltritega. Pipettida tuleb ettevaatlikult, kusjuures kasutatud pipetid asetatakse selleks ettenähtud nõusse. Laboratoorsete nõude (katseklaasid, kolbid) vattkorke ei tohi asetada lauale.
3. Patogeensete mikroobidega infitseeritud materjali sattumisel töölauale, riinetele, nahale või mujale tuleb kohe informeerida juhendavat õppejõudu vastavate abinõude tarvitamisele võtmiseks.
4. Pärast töö lõpetamist desinfitseeritakse käed ning pestakse seebi ja veega.
5. Mikrobioloogia laboratooriumis on keelatud söömine, joomine ja suitsetamine.

Patogeensete mikroobidega infitseeritud materjali  
sattumisel

- 1) tervele välisnahale: desinfitseeritakse vastav piirkond 3%-lise klooramiinilahusega ja seejärel pestakse seebi ja veega;
  - 2) suhu ja kurku: mingil juhul ei tohi neelata:  
Suud loputatakse 0,2%-lise soolhappe vesilahusega ja loputusvedelik sülitatakse selleks määratud nõusse. Korratatakse suu loputamist ja hiljem juuakse mõned suutäied sama soolhappelahust;
  - 3) silma limaskestale: loputatakse silma 0,1%-lise elavhõbeda oksütsüaniidilahusega selleks ettenähtud loputusnõust. Seejärel määratakse silmalaukude alla silmalabidaga 0,1%-list elavhõbeda oksütsüaniidsalvi;
  - 4) nina limaskestale: viiakse tampooniga nina limaskestale 0,1%-list elavhõbeda oksütsüaniidsalvi;
  - 5) nahale nahavigastuste kaudu: nahavigastust lastakse eelnevalt veritseda. Ei tohi suuga imeda! Seejärel kaetakse vigastatud koht jooditinktuuriga ja asetatakse peale steriilne side ning järgneva töö puhul kasutatakse kummikindaid.
- M ä r k u s: vanad haavad kätel kaetakse enne töö algust kolloidiumis niisutatud vatiga.

---

\* Esmaabi toodud E. Tallmeister jt. (1964) järgi.

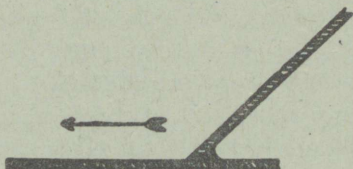
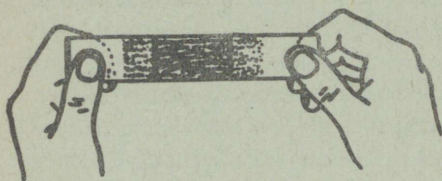


## Mikrobioloogiliste preparaatide valmistamine.

Mikroobide morfoloogiat on võimalik nende väikeste mõõtete tõttu uurida ainult mikroskoobi abil. Mikroobide kuju, asetuse, suuruse ja liikumisvõime uurimiseks valmistatakse kas äigepreparaat või ripptilk. Mõlemal viisil on võimalik uurida nii elusaid kui ka surmatud mikroobe. Elusatest mikroorganismidest valmistatud äigepreparaadi ja ripptilga uurimiseks kasutatakse sagedasti pimeväljameetodit ja faasi-kontrastmikroskoopi. Surmatud mikroorganisme aga uuritakse peamiselt värvitud äigepreparaatides.

Äigepreparaatide valmistamine. Äigepreparaatide valmistamiseks kasutatakse plaatinast või terastraadist aasaga külvinõelu. Külviaasa valmistamiseks painutatakse nõela ots ümber sobiva diameetriga varda vastu traadi küljeosa. Aasa läbimõõt on tavaliselt 2 mm.

Preparaatide valmistamiseks kasutatakse alusklaase suurusega 26 x 76 mm, paksusega 1-1,2 mm. Ripptilga valmistamiseks vajatakse niisama suuri lohuga alusklaase (Kochi kambrike). Kateklaaside suurus võib olla mitmesugune, paksus 0,16-0,18 mm.



Joon. 1. Äigepreparaadi valmistamine. alus- ja kateklaasid on rasvavabad ja steriilsed.



Valmistatud äigepreparaati uuritakse mikroskoobi abil kuiva süsteemi objektiiviga. Kõigepealt reguleeritakse valgustus kuiva süsteemi nõrga suurenduse objektiiviga. Vanemate mikroskoopide kuiva süsteemi objektiivid kannavad numbreid 2, 3, 4 ja 5, millele vastavad uuematel mikroskoopidel suurendused 4, 6, 10, 16 ja 34 korda. Okulaaridel on analoogiliselt numbrid I, III ja IV, millele vastavad suurendused 7, 10 ja 15 korda. Vähemalt 10-kordse suurendusega objektiivi puhul kondensoriga töötamisel kasutatakse tasapeeglit. Nõguspeeglit kasutatakse kondensorita töötamisel (objektiivid alla 10-kordse suurenduse) või nõrga valgustuse puhul. Parema nähtavuse saavutamiseks koondatakse diafragma vähemalt pooleni.

Preparaadi üksikasjalikum uurimine toimub tugeva suurenduse (40x) abil, mispuhul mikroskoobi suurendus on 10 korda suurendava okulaari puhul 400 korda. Soovitav on kasutada suhteliselt nõrgema suurendusega okulaari, sest 15-kordse suurendusega okulaar ei anna detailide osas midagi juurde, küll aga ähmastab pilti.

Vanemate mikroskoopide üldsuurendus võrdub okulaari ja objektiivi suurenduste korrutisega. Nõukogude uute, binokulaarsete ja längtuubusega mikroskoopide üldsuurenduse arvutamisel tuleb veel arvestada prismadest ja läätsedest koosneva lisasüsteemi suurendust.

Mikroskoopimise tehnikaga üksikasjalikumaks tutvumiseks (kondensorite, diafragmade, filtrite jne. valik) on soovitatav kasutada järgmisi käsiraamatuid.

М.В. Федоров, Руководство к практическим занятиям по микробиологии, Москва 1957.

Н.А. Наумов и В.Е. Козлов, Основы ботанической микротехники. Москва 1954.

М.Н. Прозина, Ботаническая микротехника, Москва 1960.

Современные методы и техника морфологических исследований, Медгиз, 1955.

Immersioonobjektiivi kasutamine. Õli-immersioonobjektiivile on märgitud suurendus 90 x, 100 x, 1/12 või tähed NO.

Mikroskoop üldse ja eriti immersioonobjektiiv vajab ettevaatlikku ning hoolikat käsitlemist. Mikroskopeerimist

alustades reguleeritakse kõigepealt valgustus (võimalikult spetsiaalvalgusti) kuiva süsteemi nõrga suurenduse objektii-  
viga. Siis asetatakse preparaadile pipeti või klaaspulgake-  
sega 1 tilk seedriõli või immersioonõli; nende murdumisnäita-  
ja on 1,51, mis peaaegu võrdub klaasi murdumisnäitajaga (1,52).  
Sel puhul ei teki kiirte hajumist ja see homogeenne süsteem  
võimaldab objektiiivi avaust ja mikroskoobi töövõimet suuren-  
dada. Selle järel lastakse tuubus madalamale, kuni õliga kok-  
kupuuteni. Nüüd juba aeglaselt, algul makromeeter- ja hiljem  
mikromeeterkruvi abil, tõstetakse tuubust ettevaatlikult ku-  
ni uuritavate mikroobide kujutused muutuvad selgesti nähta-  
vaks. Tavaliselt uuritakse mitmeid vaatevälju preparaadis.

Pärast töö lõpetamist eemaldatakse õli objektiiivi läät-  
selt kohe ettevaatlikult õhukese filterpaberiga imamise teel  
ilma hõõrumata. Kui vanud õli puhastatakse läätstelt bensooli-  
ga niisutatud pehme lapiga.

Tavaliste mikroskoopidel on lahutusvõime  $0,2\mu\text{m}$ .

Peale õli-immersioonobjektiivide esinevad veel vesi-im-  
mersioonobjektiivid ( $40\times 0,75$ ). Vesi-immersioonobjektiiv-  
ideks on 40-kordse suurendusega objektiivid kui nende apertuur  
on 0,65, nagu see esineb näiteks MFP-3, MEM-3, MEM-6 akro-  
maatobjektiividel ( $40\times 0,75$ ).

Ripptilga valmistamine. Elusate mikroorganismide kuju,  
asetuse, ehituse, liikuvuse ja paljunemise jälgimiseks valmis-  
tatakse ripptilk. Ripptilga valmistamiseks kasutatakse  
steriilset lohuga alusklaasi. Steriilsele jahtunud kateklaa-  
sile viiakse steriilse külvindelaga mikroobide suspensiooni.  
Aurustumise vältimiseks määratakse alusklaasi lohu ümbrus va-  
seliiniga ja lohk kaetakse kateklaasiga nii, et suspensiooni-  
tilk asetseks lohu keskel, kuid ei puutuks kokku selle põhje-  
ga (joon. 2). Vaseliinikiht takistab vedeliku kuivamist.

Kui tahetakse ripp-  
tilgas uurida mik-  
roobide paljune-  
mist, siis aseta-  
takse rasvatusta-  
tud kateklaasile

Joon. 2. Ripptilga valmistamine.



tilk puljongit, millesse külvatakse külvinõelaga mõni mikroobirakk. Et tilka ei satuks liiga palju mikroobe, mis raskendab paljunemise jälgimist, siis kasutatakse külvamisel lahjendusmeetodit. Esimesse prooviklaasi, milles on 8-10 ml puljongit, külvatakse külvinõelaga väike hulk mikroobe ja loksutatakse. Esimesest prooviklaasist külvatakse külvinõelaga teise prooviklaasi, milles on ka 8-10 ml puljongit, ja loksutatakse. Teisest prooviklaasist tehakse külv kolmandasse jne., kuni saadakse külviks sobiva tihedusega suspensioon, millest juba tehakse külv ripptilka.

Ripptilka uuritakse mikroskoobiga väga ettevaatlikult, sest kateklaas võib kergesti puruneda. Algul kuiva süsteemi nõrga suurenduse objektiiviga (3 ehk 10) leitakse ripptilga servajoon, millest ühel pool paistavad võrdlemisi suured udutilgad, teisel pool ühtlane väikeseteraline mikroobide suspensioon. Pärast seda asetatakse kateklaasile tilk immersioonõli ja vaadatakse õli-immersioonobjektiiviga.

#### Mikroobide värvimine.

Mikroobide lihtvärvimise puhul kasutatakse korraga ainult ühte värvi. Bakterioskoopilisteks uurimisteks kasutatakse peamiselt aluselist aniliinvärve. Aluselistest värvidest kasutatakse sagedamini metüleensinist, fuksiini, neutraalpunast, kristallvioletti, malahiitrohelist jne. Happelistest värvidest eosiini ja happelist fuksiini. Aluseliste värvidega värvub hästi tuumaine, happelistega aga tsütoplasma. Mikroorganismide värvumine sõltub nende raku isoelektrilisest täpist ja keskkonna reaktsioonist.

Mikroobide värvumine on tõenäoliselt nii keemilise kui ka füüsikalise protsessi kombinatsioon.

Värvid on müügil amorfsete kristalsete pulbritena, millest valmistatakse küllastatud piirituselahused. Viimaseid filtreeritakse enne destilleeritud veega lahjendamist. Tavaliselt kasutatakse väikese kontsentratsiooniga värvilahuseid, kõige intensiivsemalt värvivateks on kuni 1%-lised värvilahused. Värvilahustele lisatakse intensiivistajatena sageli happeid, leelisi, fenooli, aniliinõli jne. Ka soojustamine mõjub in-



tensiivistavalt.

Mitmesugused värvained erinevad värvimistugevuse poolest, näiteks metüleensinine on nõrga, fuksiin keskmise ja gentsiaanviolett tugeva toimega.

Värvimine lahjendatud fuksiiniga. Alusklaasil valmistatud äigepreparaat kuivatatakse õhu käes ja fikseeritakse leegil kuni alusklaas ] tekitab käeseljal kerge põletustunde. Tavaliselt kulub selleks 1-3 sekundit, olenevalt alusklaasi pakusest. Jahtunud preparaadile kallatakse 1-2 minutiks lahjendatud fuksiini. Seejärel loputatakse preparaat veega ja lastakse õhus kuivada. Metüleensinisega värvimise puhul ei tohi kuumutada. Peale selle asetatakse alusklaasile 1 tilk seedriõli ja uuritakse mikroskoobiga.

Preparaadi fikseerimine on vajalik järgmistel põhjustel:

- 1) mikroobid surmatakse
- 2) mikroobid kleepuvad alusklaasile
- 3) mikroobid muutuvad värvidele vastuvõtlikumaks.

Leegil kuumutamine on kõige lihtsamaks fikseerimise viisiks. Kui mikroobid kuumutamisel deformeeruvad, siis kasutatakse teisi fikseerimismeetodeid, nagu: 1) etüülalkoholiga 10-15 minutit, 2) metüülalkoholiga 2-3 minutit,

3) atsetooniga 5 minutit,

4) alkoholi ja eetri seguga (1:1) 10-15 minutit,

5) osmiumhappe auruga.

Elusate mikroobide uurimine. Elusate mikroobide värvimise ehk nn. vitaalse värvimise abil on võimalik uurida mikroobirakkude ehitust, suurust ja paljunemist, neid muutmata, surmata. Vitaalse värvimise puhul kasutatakse mikroobidele indifferentselt mõjuvaid aluselisi (neutraalpunane, niilsinine, bismarckpruun, metüleensinine, alisariin jt.) ja hapusid (püroosinine, liitlokarmiin jt.) värve. Parimaks vitaalvärviks peetakse kaasajal akridiinoranži, mis võimaldab ka elusate ja surnud rakkude eristamist luminescentsmikroskoobi abil.

Vitaalset värvimist võib teostada modifitseeritud Fickeri meetodil. Sel puhul pannakse alusklaasile 1 tilk mikroobide suspensiooni füsioloogilises keedusoolalahuses või 2,5%-lises isotoonilises glükoosilahuses ja kaetakse kateklaasiga. Ühe sentimeetri kaugusele kateklaasist asetatakse alusklaasile

1 tilk metüleensiniselahust ( 1 : 5000 ) ja ühendatakse aasa abil ettevaatlikult kateklaasi servaga. Nüüd võetakse pintseti vahele filterpaberi riba, asetatakse vastaspoolsele äärele ja imetakse sel viisil värvilahus läbi mikroobide suspensiooni. Mõne minuti jooksul on mikroobid värvunud. Liiga intensiivne imemine võib kaasa tuua ka bakterirakud.

Elusaid mikroobe võib uurida ka järgmiselt. Steriilsele alusklaasile kallatakse mõni tilk tulist värvilahust, aetakse klaasil laiali ja lastakse õhu käes kuivada. Peale selle pühitakse klaasilt värv marliga, mispuhul klaas peab jääma nõrgalt siniseks või punaseks. Kui alusklaas ei värvu, siis korratakse eespool nimetatud võtet. Steriilsele kateklaasile asetatakse tilk uuritavate mikroobide suspensiooni ja sellega kaetakse värvitud alusklaas. Värvusetud mikroobid on värvilisel taustal hästi nähtavad. Kateklaasi nihutatakse pintsettidega ettevaatlikult, nii et preparaati ei jääks õhumullikesi. Kui preparaati tahetakse pikemat aega uurida, siis kaetakse kateklaasi ääred eelnevalt vaseliiniga.

#### T ö ö ü l e s a n d e d

1. Valmistada äigepreparaat presspärmist (*Saccharomyces cerevisiae*) ja vaadelda mikroskoobi kuivsusüsteemi objektiiviga.
2. Presspärmist äigepreparaati uurida õli-immersioonobjektiiviga ja joonistada vihikusse mõni tüüpiline rakk.
3. Valmistada presspärmist ripptilk ja uurida vesi-immersioonobjektiiviga.
4. Valmistada stafülokokkide kultuurist äigepreparaat ja värvida Ziehl'i karboolfuksiiniga 10 minutit, uurida mikroskoobiga ja joonistada mõni rakk vihikusse.
5. Teostada sartsiinide vitaalne värvimine modifitseeritud Fickeri meetodil metüleensinisega ( 1 : 5000 ) ja tausta värvimine neutraalpunasega ( 1 : 500 ). Preparaate uurida mikroskoobis ja joonistada vihikusse.



## II. p r a k t i k u m

### T e e m a: MIKROOBIDE EHITUSE UURIMINE KOMBINEERITUD VÄRVI-MISMEETODITE ABIL

Mikroobide raku ehitusega tutvumiseks ning mitmesuguste liikide eristamiseks ja nende rakulistest elementidest eraldamiseks kasutatakse liitvärvimismeetodeid, mis põhinevad bakteriraku füüsikalise-keemilisel ehitusel ja bakterite ning nende struktuurielementide afiinsusel teatud värvide suhtes.

Kombineeritud värvimismeetoditest kasutatakse kõige sagedamini Grami meetodit. Esimesena rakendas seda Chr. Gram 1883. a. Kõik mikroobid jaotatakse Grami meetodil värvumise järgi kaheks grupiks: gram-positiivsed ja gram-negatiivsed.

Tutvume Grami meetodi Sinjevi modifikatsiooniga.

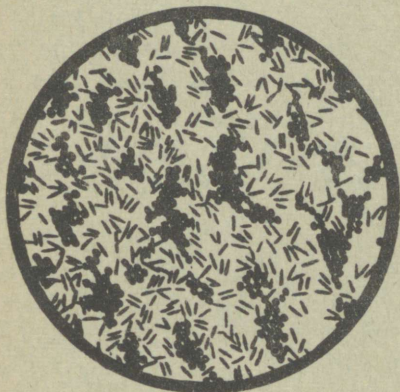
1. Fikseeritud äigepreparaadile asetatakse 1%-lise kristallvioleti etüülalkoholilahusega immutatud filterpaber.
2. Paberile tilgutatakse 2-3 tilka vett ja jäetakse 2 minutiks seisma.
3. Paber eemaldatakse pintsetiga ja preparaadile kallatakse 1-2 minutiks Lugoli lahust.
4. Värvitustatakse etüülalkoholiga (10-30 sekundit).
5. Värvitakse lahjendatud fuksiiniga 1-2 minuti jooksul.
6. Loputatakse veega.

#### Värvimise mehhanism.

Grami meetodi olemus seisneb selles, et trifenüülmetaanrea värvid, näiteks gentsiaanviolett või kristallviolett kinnistuvad mikroobide peitsidega, Lugoli lahusega või pikriinhappega, moodustades mõnede bakterirakkude protoplasmas niisuguseid ühendeid, mida rakk tugevasti kinni hoiab ja mis ei muutu värvusetuks ka etüülalkoholiga mõjustamisel. Niisuguseid mikroobe, millel on nimetatud värve kinnihoidvaid omadusi ning värvuvad nendega sinakasviolettseks, nimetatakse gram-positiivseteks. Vastupidi, neid mikroobe, mis alkoholiga mõjustamisel kaotavad sinakasviolette värvuse ja mida kontrastsete värvidega, näiteks fuksiiniga saab täiendaval värvimisel nähtavaks teha, nimetatakse gram-negatiivseteks (joon.3).

Mikroobirakkude erinev suhtumine värvidesse Grami järgi

värvimisel sõltub nende füüsikalise-keemilistest omadustest. Bakterite gram-poosiivsed omadused sõltuvad nukleiinhapete magneesiumsoolast - magneesiumribonukleaadist, millel on hapelised omadused. Gram-positiivsed mikroobid struktuuri iseärasuste tõttu adsorbeerivad aluselisi värve suuremal hulgal ja peavad neid tugevamini kinni kui gram-negatiivsed mikroobid. Tuleb silmas pidada, et Gram meetodi järgi värvimist teostatakse alati ühesugustes tingimustes ja ühesuguste aegadega, siis on tulemused võrreldavad.



Joon. 3. Stafülokokid ja bakterid, värvitud Grami meetodil (E. Tallmeister jt. järgi).  
(Kokid peaksid olema sinised, bakterid /kepikesed/ punased.)

#### Happekindlate mikroobide värvimine.

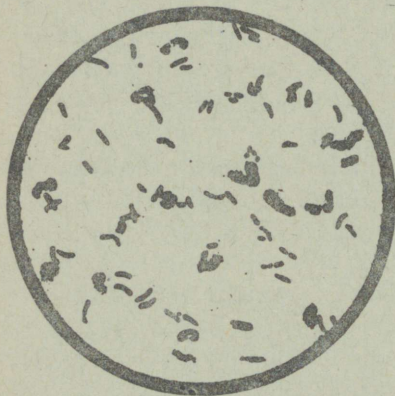
Happekindlate mikroobide värvimise meetod põhineb nende omadusel värvuda kuumutamisel ainult väga tugevate värvilahustega. Järgneval mõjustamisel nõrkade hapetega säilitavad nad värvuse. See võimaldab happekindlaid mikroobe teistest diferentseerida (joon. 4). Kõige enam värvitakse Ziehl-Neelsen meetodil. Värvimise tehnika on järgmine.

1. Fikseeritud äigepreparaadile asetatakse filterpaber, millele kantakse karboolfuksiini. Värvimine toimub kuumutamise teel kuni auru tekkimiseni (3 korda), mille järel värv veel mõneks minutiks peale jäetakse ja lastakse preparaadil jahutada.
2. Värv valatakse pealt ära ja preparaati uhutakse veega.
3. Värvitustatakse 5%-lise väävelhappelahusega (10-30 sek.).



4. Uhutakse veega.
5. Uhutakse piiritusega 10-15 sekundit.
6. Piiritus uhutakse veega pealt ära.
7. Värvitakse täiendavalt Löffleri metüleensinisega 3-5 minutit.

Preparaati võib värvitustada ka 3%-lise soolhappe alkoholilahusega. Selle värvimismeetodi abil värvuvad happekindlad mikroobid rubiinpunaseks, happe suhtes vastuvõtlikud mikroobid aga siniseks.



Joon. 4. Tuberkuloositekitajad rõgast, värvitud Ziehl-Neelseni meetodil (Kolle-Hetschi järgi), /kepikesed punased/.

#### Metakromatiinterakeste värvimine Neisseri meetodil.

Värvilahused A ja B segatakse vahetult enne värvimist vahekorras 2 : 1. A - metüleensinine B - kristallviolett.

Fikseeritud preparaadile kantakse 1/2-1 minutiks Neisseri metüleensinist; seejärel uhutakse värv veega ära ja preparaati värvitakse täiendavalt vesuviinlahusega 1-3 minutit, uhutakse veega, kuivatatakse ja mikroskoobitakse. Sellel meetodil värvuvad mikroobid helepruuniks, metakromatiinterakesed aga siniseks. Vesuviini nimetatakse ka bismarkpruuniks.

#### Metakromatiinterakeste värvimine Romanovski-Giemsa meetodil.

Giemsa värv on segu asuurist, eosiinist ja metüleensinisest. Olles lahuses sinine, värvib ta raku plasma helesiniseks, raku tuumad, terakesed, lima ja mikroobide kapslid aga punakas-

violetseks.

10 ml neutraalse või nõrgalt aluselise reaktsiooniga destilleeritud veele lisatakse vahetult enne preparaadi värvimist 10 tilka värvi ja kallatakse otsekohe fikseeritud preparaadile (või asetatakse preparaat värvilahusesse). Tunni aja pärast kallatakse värv pealt ära, preparaati uhutakse veega, kuivatatakse õhu käes ja mikroskoobitakse. Kui preparaat koos värviga asetatakse termostaati temperatuuril  $37^{\circ}$ , siis värvub see kiiremini (30 - 40 minutiga).

Värvimise resultaat sõltub vee omadustest; seepärast tuleb vee reaktsiooni kontrollida.

Spooride värvimine. Spooride esinemist mikroobidel saab kindlaks teha Schaeffer-Fultoni värvimismeetodi järgi.

1. Mikroobide suspensioonist valmistatud äigepreparaat fikseeritakse leegil.
2. Preparaadile asetatakse 5%-line malahhiitroheline vesilahus ja soojendatakse kuni auru ilmumiseni 3-4 korda, värvitakse 1 minut.
3. Loputatakse veega 30 sek.
4. Valatakse preparaadile 0,5%-line safraniini vesilahus 30 sekundiks.
5. Loputatakse veega.
6. Lastakse preparaat kuivada, uuritakse.

Spoorid värvuvad malahhiitrohelisega püsivalt rohelisteks, mikroobide vegetatiivsed kehad aga muutuvad pesemisel kergesti värvusetuks ning safraniiniga täiendaval värvimisel punaseks.

Kapslite värvimine tušimeetodil. 1. Alusklaasi otsale asetatakse tilk tušši lahjendatult destilleeritud veega 1:2-1:5, sellesse tilgasse suspendeeritakse aasatäis mikroobikultuuri ja äigepreparaat valmistatakse nagu vere äigepreparaat. 2. Preparaat lastakse õhus kuivada, fikseeritakse küllastatud  $HgCl_2$ -lahusega - 1 minut. 3. Loputatakse veega. 4. Värvitakse 2%-lise gentsiaanavioleti vesilahusega kergelt soojendades - 2 minutit. 5. Loputatakse veega. 6. Lastakse kuivada, uuritakse.

Mikroobid värvuvad violetseks, kapslid jäävad värvusetaks



ning on tumedal taustal hästi nähtavad.

Glükogeeni (loomatärklis) sedastamine Lugoli lahusega.  
Uuritava kultuuri suspensioonist valmistatud äigepreparaat värvitakse Lugoli lahusega, mille mõjul rakkudes sisalduv glükogeen värvub pruuniks. Glükogeenisaldust määratakse erineva vanusega vedelates ja tahketes kultuurides. Glükogeenisaldusega rakkude arv loendatakse vaateväljas ja võrreldakse mitmesuguse vanusega kultuuride glükogeeni sisaldavate rakkude arvukust omavahel.

Rasva tuvastamine sudaan III ja osmiumhappega. Alusklaasil olevale uuritava kultuuri suspensioonitilgale lisatakse üks tilk formaliini ja üks tilk 0,5%-list sudaan III lahust (95%-lises piirituses või piimhappes). Viie minuti pärast vaadatakse preparaati mikroskoobis, mispuhul on näha oranžiks värvunud rasvatilku.

Osmiumhappega mõjustamiseks lastakse äigepreparaadil õhus täielikult kuivada, alles siis asetatakse preparaat osmiumhappe aurudesse. Osmiumhappe mõjul rakkudes esinevad rasvatilgad värvuvad tumehalliks.

Volutiini tõestamine neutraalpunase- ja metüleensiniselahusega. Uuritavast kultuurist valmistatud äigepreparaati värvitakse kas 0,04%-lise neutraalpunase- või sama kontsetratsiooniga metüleensiniselahusega 5 minutit. Värvilahuste pH peab olema 8.

Lämmastiku varuaine volutiin esineb vakuoolis. Neutraalpunasega värvitud preparaadis näeme mikroskoopimisel punaseid volutiinitilku, metüleensinisega mõjustatud preparaadis aga violetseid volutiinitilku.

#### T ö ö ü l e s a n d e d

1. Valmistada Sarcina flava, Esch. coli suspensioonist äigepreparaat ja värvida Sinjevi järgi modifitseeritud Gram meetodil.
2. Värvida Saccharomyces vini kultuurist äigepreparaat Neisseri ja Romanovski-Giemsa meetodil.
3. Bac. subtilis'e kultuurist valmistatud äigepreparaadis teostada spooride värvimine.

4. Azotobacter chroococcum'i kultuurist valmistatud prepraadis teostada kapslite värvimine tušimeetodil.
5. Saccharomyces cerevisiae kultuurist valmistatud ägeprepraadis sedastada glükogeen lugoli lahusega, rasv sudaan III ja osmiumhappega ning velutiin neutraalpunasega.

### III p r a k t i k u m

T e e m a: ENAMLEVINUD BAKTERIVORMIDEGA TUTVUMINE JA RAKU SUURUSE MÕOTMINE

Bakterid kui arvukaim ja tähtsaim mikroorganismide grupp jagatakse raku väliskuju järgi kolme rühma. Esimesse rühma kuuluvad kerakujulised mikroobid ehk kokid, teise - pulgakujulised ja silindrilised, kolmandasse - spiraalsed ja kruvikujulised.

Kuju iseärasuste ja rakkude asendi järgi üksteise suhtes intaktset kultuuris jaotatakse neid vorme veel omakorda (joonis 5).

Kokkide diameeter on ca 0,5 - 2  $\mu$ m. Pärast pooldumist ühekaupa asetunud kokke nimetatakse mikrokokkideks - Micrococcus (joonis 5,a), paarikaupa jäänud kokke kaksik- ehk diplokokkideks - Diplococcus (joonis 5,b), neljakaupa esinevaid nelik- ehk tetrakokkideks - Tetracoccus (joonis 5,c).

Pärast pooldumist ahelana asetunud kokke nimetatakse ahel- ehk streptokokkideks - Streptococcus (joonis 5,e), viinamarjakobarate taoliselt asetunudid kobar- ehk stafülokokkideks - Staphylococcus (joonis 5,d), 8-kaupa pakikestena asetunudid sartsiinideks - Sarcina (joonis 5,f).

Pikki pulga- ehk kepikujulisi asporogeenseid baktereid nimetatakse batsillideks - Bacillus (joonis 5,h), nad värvuvad gram-positiivselt, asporogeenseid lühemaid kepikesi - bakteriteks kitsamas mõttes - Bacterium (joonis 5,g) viimased värvuvad enamasti gram-negatiivselt. Ka pulgakujulised mikroobid võivad esineda mitmesugustes kombinatsioonides: kahekaupa ühinenud kepikesi nimetatakse diplobatsillideks ehk diplobakteriteks, ahelatena esinevaid kepikesi streptobatsillideks ehk streptobakteriteks, kobaratena esinevaid kepikesi stafülo-



batsillideks ehk stafülobakteriteks (joonis 5,1).

Pulgakujulistel mikroobidel võivad otsad olla ümarad, sirged või teravad, neil võib esineda pundumisi või harulisi moodustusi (Mycobacterium) (joonis 5,j). Pulgakujulistel mikroobidel võivad olla nuiataolised otsad (Corynebacterium), nad võivad aeste kohalt olla ka paksenenud või pundunud (Clostridium).

Spiraalse ehm kruvikujuliste mikroobide rühma kuuluvad komakujulised pulgakesed-vibrioonid (Vibrio) ja spiraalikuju-  
julised mikroobid - spirillid (Spirillum), mille rakukeha teeb 1-2 keerdu ümber kesktelje (joonis 5,k,l).

Sellesse rühma kuuluvad ka kuju poolest teistest bakteritest erinevad spiroheedid, millel on kruvisarnaselt pikitelje ümber keerdunud või lainetaoliste paljude keerdudega niidid (joonis 6). Tuleb silmas pidada, et käesoleval juhul on meil tegemist mikroobide morfoloogilise, mitte aga süstemaatilise jaotamisega. Näiteks termin Micrococcus tähistab morfoloogilise jaotuse järgi pärast pooldumist ühekaupa asetunud kokke. Krassilnikovi süstemaatilise jaotuse järgi aga Coccaceae sugukonda kuuluvat perekonda (Micrococcus), kuhu kuuluvad asporogeensed, liikumatud kokikujulised, lihtsa pooldumise teel paljunevad bakterid.

### Mikroobiraku suuruse mõõtmine.

Mikroorganismide rakkude suuruse mõõtmiseks kasutatakse kas okulaarvõrku või okulaarskaalat, mis asetatakse okulaari diafragmasse ülemise ja alumise läätse vahele ning objektmikromeetrit (alusklaas), viimane asetatakse mikroskoobilauale.

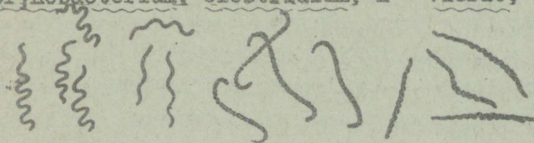
Mõõtokulaar kujutab endast ümmargust klaasplaati, mille keskele on graveeritud võrdseteks osadeks (50 osa) jagatud joon- või võrkskaala.

Objektmikromeeter on klaas- või metallplaadike, mille keskel on 1 mm pikkune skaala, mis on jagatud 100 võrdseks osaks. Skaala jaotus on 0,01 mm ehk 10  $\mu$ m.

Järgnevalt määratakse mõõtokulaari ühe jaotuse näiv pikus antud optilises süsteemis. Näiteks objektmikromeetri 6 jaotust (0,06 mm) langeb kokku mõõtekulaari 30 jaotusega.



Joon. 5. Enamlevinud bakterivormid. a - Micrococcus,  
 b - Diplococcus, c - Tetracoccus, d - Staphylococcus, e -  
Streptococcus, f - Sarcina, g - Bacterium, h - Bacillus,  
 i - Diplo-, Strepto-, Staphylobacillus, j - Mycobacterium,  
Corynebacterium, Clostridium, k - Vibrio, l - Spirillum.



Joonis 6.  
 Spirocheetid.



Seega mõõtokulaari 1 jaotuse näiv pikkus on  $0,06:30=0,002$  mm ehk  $2\mu\text{m}$ .

Uuritavate objektide mõõtmist võib teostada ainult selle objektiivide ja okulaari suurenduste kombinatsiooni juures, mille juures toimub okulaarmikromeetri jaotuse pikkuse määramine.

Pärast mõõtokulaari jaotuse näiva pikkuse määramist asendatakse objektmikromeeter uuritava preparaadiga ja vaadatakse mitut mõõtokulaari jaotust hõlmab mõõdetav rakk. Kui näiteks pärmirakk (mööda pikitelge) hõlmab 4 mõõtokulaari jaotust, siis on tema pikkus  $8\mu\text{m}$ .

Veelgi hõlpsam on raku suuruse mõõtmine sel puhul, kui mõõtokulaari asemel kasutatakse okulaarmikromeetrit. Objektmikromeetri abil määratakse okulaarmikromeetri ühe jaotuse pikkus. Mõõtmise algul asetatakse okulaarmikromeeter 0 seisu, siis pööratakse viimast seni, kui okulaarmikromeetril olev rist liigub ühe objektmikromeetri jaotuse võrra. Objektmikromeetri ühe jaotuse pikkus on  $0,01$  mm ehk  $10\mu\text{m}$ . Kui  $0,01$  millimeetrile vastas okulaarmikromeetri 40 jaotust, siis okulaarmikromeetri ühe jaotuse pikkus on  $0,01:40=0,00025$  mm ehk  $0,25\mu\text{m}$ .

Objekti suuruse määramisel asendatakse objektmikromeeter preparaadiga. Raku suuruse mõõtmisel pööratakse okulaarmikromeetrit seni, kui okulaaril olev rist liigub mööda raku pikitelge ühest raku otsast teise ja loetakse mitme jaotuse võrra tuli selleks trumlit edasi pöörata. Kui näiteks trumlit pöörati edasi 23 jaotuse võrra, siis on mõõdetava raku pikkus  $0,00025$  (mm)  $\times 23 = 0,00575$  (mm) ehk ca  $6\mu\text{m}$ .

### Faaskontrastmikroskoop.

Elusate värvimata mikroobide morfoloogia uurimiseks sobib hästi faaskontrastmikroskoop, mille võttis esmakordselt kasutusele Zernicke aastal 1932.

Mikroskoopimisel sõltub nähtavus uuritava eseme kontrastsusest. Mikroskoopimisel on kõige paremini nähtavad need esemed, mille eri osades neeldub valgus ebaühtlaselt, s.t. mille eri osad on kontrastsed. Kui valguskiired läbivad preparaadi kontrastsaid osi, siis muutub nende intensiivsus, millele

inimese silm reageerib, hästi.

Mikroskoopimisel on halvasti nähtavad need esemed, milles valgus neeldub ühtlaselt. Uuritavate esemete mitmesugused osad võivad olla erineva optilise tihedusega, mistõttu nende läbimisel valguse intensiivsus ei muutu, küll aga toimuvad valguslaine faasi nihked, mida inimese silm ei ole võimaline registreerida. Elusad värvimata mikroobid osutuvad sellisteks objektideks, milledega toimuvad ainult valguslaine faasi nihked.

Faaskontrastmikroskoobis on võimalik värvimata mikroobe muuta nähtavaks sel teel, et valguskiirte faasinihked muudetakse ketaskondensorite ja rõngasobjektiivide abil üksteisest erinevaks. Sel puhul muutub valguskiirte suund  $90^{\circ}$  võrra ja ketaskondensori läbimisel neeldub 50% tsentraalseist valguskiirtest.

Üksikasjalik seletus faaskontrastmikroskoobi kasutamiseks esineb järgmistes käsiraamatutes: М.Ф. Федоров, Руководство к практическим занятиям по микробиологии, Москва 1957. М.Н. Прозина, Ботаническая микротехника, Москва 1960.

#### T ö ö ü l e s a n d e d

1. Oppida tundma enamlevinud bakteriverme demonstratsiooni korras väljapandud preparaates ja joonistada töövihikuse igast preparaadist mõned rakud.
2. Mõõta Saccharomyces cerevisiae, Bact. bulgaricum'i ja perek. Chromatium'i rakkude suurus mõõtokulaari ja okulaarmikromeetri abil.
3. Tutvuda demonstratsiooni korras väljapandud Proteus vulgaris'e kultuuri suspensioonist valmistatud preparaadiga faaskontrastmikroskoobi abil.



#### IV p r a k t i k u m

### T e e m a: RIISTADE ETTEVALMISTUS STERILISEERIMISEKS JA STERILISEERIMISE VIISID

Steriliseerimiseks nimetatakse eseme, materjali või söötmee täielikku vabastamist elusatest mikroobidest.

#### Klaasanumate ja -riistade ettevalmistus steriliseerimiseks.

Mikrobioloogilisteks töödeks sobivad ainult hästi pestud, rasvavabad nõud ja klaasanumad, sest halvasti ettevalmistatud nõud võivad põhjustada ebaõigeid resultate.

Enne nõude kasutamist tuleb nad vastavalt töödelda. Nakuse vältimiseks steriliseeritakse kasutusel olnud nõusid autoklaavis 30 min. 115°C juures, pärast seda pestakse sooja vee ja harjaga ning uhutakse 2-3 korda destilleeritud veega. Puhtaks pestud nõud lastakse kuivada õhus, soojas kuivatuskapis (50°C) või kuivatatakse alkoholi või eetriga. Soojendamisega kuivatamine ei ole lubatav ühegi mõõtriista, ka mõõtmiseks kasutatavate pipettide puhul.

Kui nõud tavalise pesemisega hästi puhtaks ei lähe, töödeldakse neid 30 minuti vältel vastava kroomseguga (1 liitri vee kohta võetakse 50 g kaaliumdikromaati ja 500 g tehnilist väävelhapet), mille järel uhutakse nõud veega hästi puhtaks.

Nõusid võib asetada mõneks minutiks ka 5 - 10%-lisse tehnilisse soolhappelahusesse ja seejärel hästi loputada. Uusi nõusid keedetakse 1 - 2 %-lises soolhappelahuses, et neutraliseerida liigset leelist, mis võis tekkida klaasi valmistamisel. Seejärel uhutakse nõud veega hästi puhtaks ja kuivatatakse.

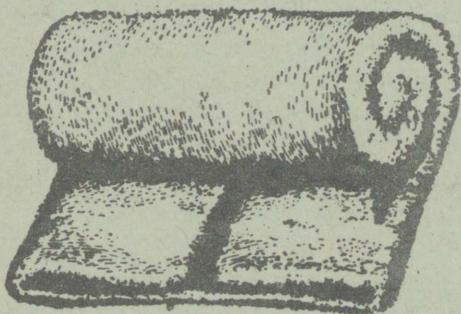
Nõusid, mille külge on jäänud agar-agarit, želatiini või teisi söötmejäänuseid, võib päev enne pesemist leotada leeliselises lahuses. Värviplekkide eemaldamiseks kasutatakse 3%-list kloorlubjalahust.

Alusklaaside rasvast puhastamiseks tuleb neid keeta 10 - 15 minutit 1 %-lises soodalahuses ja loputada destilleeritud vees. Peale selle pestakse algul nõrgas soolhappelahuses ja siis uuesti destilleeritud vees. Puhtad klaasid säilitatakse

vähese ammoniaagilisandusega 70° alkoholis. Varem tarvitatud alusklaase keedetakse 5%-lises soodalahuses, asetatakse 1-2 päevaks kontsentreeritud väävelhappesse, seejärel loputatakse destilleeritud veega, siis keedetakse 15-20 min. 1 %-lises soodalahuses, loputatakse destilleeritud vees. Pärast seda keedetakse 1-2 %-lises soolhappes, loputatakse destilleeritud veega ning asetatakse 70°alkoholisse.

Puhastatud ja kuivatatud klaasnõude ettevalmistamine steriliseerimiseks toimub järgmiselt. Klaasnõude (katseklaasid, kolbid, kultuuripudelid jne.) avad suletakse vattkorkidega, kusjuures 2/3 osa korgist asub avases ja 1/3 osa väljaspool. Tööks kasutatavad materjalid ( Petri tassid, pipetid, uhmrid, pahtlid, alusklaasid ja lehtrid jne.) pakitakse paberisse.

Vattkorgid valmistatakse järgmiselt. Lauale asetatakse vastava suurusega piklik nelinurkne vatikiht, millele asetatakse nn. südamik ja tehakse 1½-2 keerdu, siis keeratakse sisse vatitüki kõik neli serva nii, et tekiks vattpael, mille laius vastaks korgi pikkusele, ja rullitakse siis kokku vastavalt katseklaasi või kolvi diameetrile (joon.7). Vattkorgi võib mähkida ka ühekihilisesse marlitükisse. Marli servad ühendatakse niidiga korgi peal.



Joon. 7

Vattkorgi valmistamine.

#### Steriliseerimise viisid.

Eristatakse järgmisi steriliseerimise viise: 1) steriliseerimine kõrge temperatuuriga, 2) mehhaaniline steriliseerimine, 3) steriliseerimine keemiliste ainetega.



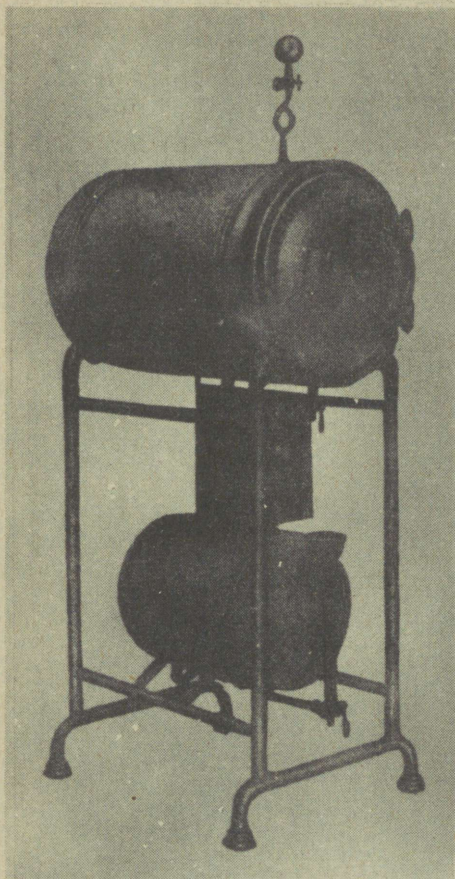
## I. Steriliseerimine kõrge temperatuuriga.

1) Kuumutamine põleti leegil on kõige lihtsamaks ja kiiremaks steriliseerimise mooduseks, Bunseni põleti leegi üla- ja küljeosas on temperatuur üle  $1500^{\circ}$ . Kuumutamiseega steriliseeritakse külvinõelad, pipeti suuosa, katseklaaside ja kolbide avad, pahtlid, väikesed metall- ja klaasesemed, nagu pintsetid, alus- ja katteklaasid jne. Et aga enamik esemeid taolisel kuumutamisel rikneb, on selle meetodi rakendamine piiratud.

2) Keetmine vees hävitab 1-3 minuti jooksul mikroobide vegetatiivsed vormid. Destilleeritud veega metallsterilisaatoris, kuhu lisatakse 1 %-list soodalahust roostetamise vältimiseks, keedetakse süstlaid, nõelu, pintsette, kääre jne. 15-30 min. See moodus ei ole aga absoluutselt kindel, sest mõnede bakterite spoorid võivad säilida pikaajalisel keetmisel.

3) Voolava auruga steriliseerimine toimub  $100^{\circ}\text{C}$  juures Kochi aparaadis. Kochi aparaat on silindrikujuline metallist nõu, mille seinad on väljast vooderdatud linoleumiga ja pealt kaetud avaga varustatud kaanega. Nõu põhjas on vesi, mille kohale restile asetatakse võrestatud põhjaga panges steriliseeritavad esemed. Steriliseerimine voolavas kuumas auru toimub nõu põhjas oleva vee keemisel tekkiava auru voolamisel kaanes oleva ava suunas. Kochi aparaadis steriliseeritakse nõusid ja materjale 30-60 minutit, millise aja jooksul hävivad mikroobide vegetatiivsed vormid, kuid võivad säilida nende spoorid. Järgmiseks päevaks muutub osa spoore vegetatiivseteks vormideks, eriti siis, kui steriliseeritav ese jäetakse ööpäevaks seisma temperatuuril mitte alla  $20-22^{\circ}$ . Eoste hävitamiseks teostatakse steriliseerimist kolmel üksteisele järgneval päeval.

4) Steriliseerimine auruga rõhu all toimub autoklaavis. Autoklaave on mitmesuguse ehitusega. Mikrobioloogilisteks töödeks on kõige sobivamad elektri abil köetavad horisontaalsed autoklaavid (joon.8). Autoklaavid on metallist õhukindlalt suletavad aparaadid, mis on varustatud manomeetri, kaitseventiili ja mitmesuguste kraanidega. Mõnedel autoklaavidel on ka termomeeter.



Joon. 8. Horisontaalne autoklaav.

geb manomeetril 0-le, siis avatakse auru väljavoolukraan ja lõpuks autoklaav. Kuuma autoklaavi avamisel tekib surve kiirel langemisel vedelikkude tormiline keemine, mis võib vattkorgid märjaks teha või need katseklaasidest välja suruda. Väljavoolav auru juhitakse kummivooliku kaudu veeanumasse. Voolik eemaldatakse veeanumast enne manomeetri 0-le langemist, sest vastasel korral tungib vesi autoklaavi.

Steriliseeritavad esemed asetatakse autoklaavi, kaas suletakse õhukindlalt. Autoklaav lülitatakse vooluvõrku, alumiises aurukambris asuv vesi aetakse keema, kust auru tungib ülemisse nn. steriliseerimiskambrisse. Vee keemisel tekib auru surub algul õhu aparaadist välja väljavoolukraani kaudu. Kui õhk on täies ulatuses välja tõrjutud, väljub auru ühtlase joona, mis ei sisalda õhku. Siis suletakse auru väljavoolukraan. Tekib auru satub suletud ruumi, tõstab rõhku ja koos sellega ka temperatuuri, mida näitavad manomeeter ja termomeeter. Ülesurve teket väldib vastav kaitseventiil. Vajaliku steriliseerimisaja möödumisel lülitatakse välja kütte-

keha, autoklaav lastakse jahtuda, kuni surve lan-



Kuumas aurus surve all hävivad tavaliselt nii mikroobide vegetatiivsed vormid kui ka nende spoorid. Autoklaavis steriliseeritakse tavaliselt 20 minutit 115 - 120° C (1 atm) juures, suuremate nõude puhul 30-60 minutit. Suhkrut sisaldavate söötmete steriliseerimisel tuleb piirduda 0,5 atm rõhuga (karamelliseerumine).

Tavaliselt puuduvad autoklaavidel termomeetrid, mistõttu temperatuuri üle otsustatakse manomeetri näitude järgi.

Alljärgnevalt esitatakse temperatuuri vastavus auruurvele atmosfäärides.

| Rõhk atm | Temperatuur °C |
|----------|----------------|
| 0        | 100            |
| 0,5      | 112            |
| 1,0      | 121            |
| 1,5      | 127            |
| 2,0      | 134            |
| 3,0      | 145            |

Nõukogude meditsiinilised autoklaavid lubavad rõhku tõsta ainult 2 atmosfäärini.

Soovitav on vahetevahel kontrollida, kas temperatuurid autoklaavis vastavad manomeetri näitudele. Kõige lihtsam on seda teha maksimumtermomeetriga. Viimase puudumisel võib autoklaavi asetada ka klaastorukestesse joodetud indikaatoreid, mis teatava temperatuuri juures sulavad. Indikaatoritele lisatakse pisut metüleensinist, fuksiini või mõnda teist värvainet, mis muudavad sulanud indikaatori värviliseks.

|              | Sulamistemp. °C |
|--------------|-----------------|
| Bensonaftool | 110             |
| Antipüriin   | 114             |
| Väävliõis    | 115             |
| Bensoehape   | 121             |

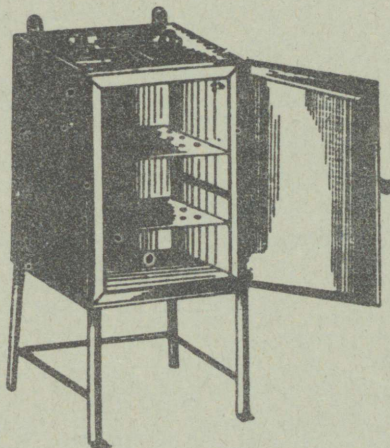
5) Tündaliseerimist kasutatakse nende esemete steriliseerimiseks, mis kuumutamisel temperatuuril 100° muutuvad. Niisuguseid esemeid kuumutatakse temperatuuril 56-58° viis päeva järjest, iga päev 1 tund. Tündaliseerimist teostatakse kas veevannil või spetsiaalsetes seadistes.

6) Pastöriseerimine tähendab steriliseerimist temperatuuril

60-70°. Selle menetlusega, mille rakendajaks oli Louis Pasteur, hävitatakse eostega mikroobe niisugustes vedelikes, mis kõrgemal temperatuuril kuumutamisel muutuvad või riknevad (vein, õlu, piim). Laialdaselt kasutatakse piima pastöriseerimist, sest steriliseerimisel mitte üle 65° jäävad piima toite- ja maitseomadused muutmatuks.

7) Kuivkuuma õhuga steriliseerimine teostatakse termostaatides (joon. 9). Termostaatides steriliseeritakse kuivi puhtaid pakitud klaasnõusid (katseklaasid, Petri tassid, kolbid, pipetid, pudelid, alusklaasid jne.).

Termostaat on metallist kahekordsete seintega kapp, mis on väljastpoolt kaetud soojust isoleeriva materjaliga. Termostaat on tavaliselt automaatselt reguleeriva elektriküttega ja kontrolltermomeetriga. Pakitud klaasnõusid steriliseeritakse 1,5 - 2 tundi 160° C juures. Steriliseerimisega hakatakse arvama vastava temperatuuri saavutamise momendist. 160° kõrgema temperatuuri juures pole steriliseerimine soovitatav, sest vatt ja paber söestuvad ning seejuures vabanenud tõrvaine avaldab mikroobide kasvule bakteriostaatilist toimet.



Joon. 9. Termostaat.



## II. Mehhaaniline steriliseerimine.

Mehhaanilist steriliseerimist teostatakse mikropoorsest materjalist valmistatud bakterfiltrit abil.

Tänapäeval kasutatakse bakterite eraldamiseks vedelikku-dest kõigepealt kõvu filtreid, nagu Pasteur'-Chamberland'i küünlaid, mis on valmistatud portselansavi ja räniliiva segust, kus pooride (urvete) läbimõõt reguleeritakse räniliiva hulgaga. Nõukogude Liidus kasutatakse filtrite tähistamiseks tähte "Φ". NSVL-is toodetakse 10 tüüpi filtreid, mille numbrid vastavad rahvusvahelisele numeratsioonile ( $\Phi_1$ ,  $\Phi_2$ ,  $\Phi_3$ ,  $\Phi_4$ ,  $\Phi_5$ ,  $\Phi_7$ ,  $\Phi_{11}$ ).

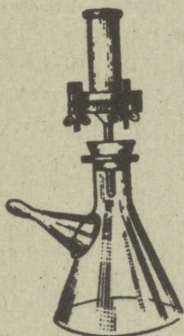
Berkefeldi filtrite valmistamiseks kasutatakse ränimulda, pooride suuruse järgi eristatakse W, N ja V filtreid. Kõvu filtreid kasutatakse korduvalt, kusjuures orgaanilisest ainest puhastamiseks kuumatatakse neid muhvelahjudes.

Laboratooriumides kasutatakse kõige sagedamini nn. pehmeid filtreid, eriti Seitz'i asbestkettaid, mis asetatakse Seitz'i metallstatiivi (joon. 10). Laialt kasutatakse mikroo-

bide eraldamisel veest membraanfiltreid, mis kujutavad endast sõõrikujulisi poorseid nitrotselluloosikilekesi. Sõltuvalt pooride suurusest eristatakse filtreid numbritena: 1, 2, 3, 4 ja 5, neist kõige tihedam on nr. 1, kõige hõredam - nr. 5.

Ka filtreeruvate viiruste määramiseks kasutatakse nitrotselluloosi või kolloidmembraane.

Bakterifiltreid on võimalik valmistada igas laboratooriumis tselluloidist. Selleks asetatakse kolbi 7 g filmilinti, millele lisatakse 64 ml atsetooni ja 36 ml äädikhappeetüleestrit. Kui filmilindi



joon. 10. Seitz'i statiiv koos imikolbiga.

tükikesed on lahustunud, lisatakse 50-55 ml isoamüülalkoholi, segatakse hästi läbi ja filtreeritakse läbi paberfiltrit. Filtraat valatakse väga puhtale (eetriga puhastatud) horisontaalsesse asendisse seatud siledale klaasile. Vedelik tardub seismisel ja klaasi pinnale jääb valge kile, mida vajaduse korral niisutatud vatitükikesega saab kergesti eraldada. Saadud ki-  
lest lõigatakse vajaliku suurusega filter ja asetatakse  
Seitzi statiivi.

Filtrid steriliseeritakse enne kasutamist pooletunnisel vees keetmisel ja steriliseeritav vedelik filtreeritakse, kasutades sealjuures kas negatiivset või positiivset rõhku vee-  
joapumba või vaakumaparaadi abil.

Filtreerimisel kasutatakse imikolbi, mis on ühendatud kummivooliku ja klaastoru abil **vaakuumpumbaga** ühelt poolt ja filtriga teiselt poolt (joon.10).

Nii filtrid kui ka kõik teised filtreerimiseks vajalikud seadmed, nagu kolvid, klaastorud, kummivoolikud jne. peavad olema steriliseeritud ja kuni kasutamiseni säilitatud korralikult paberisse pakituna.

### III. Steriliseerimine keemiliste ainetega.

Steriliseerimist keemiliste ainetega teostatakse vastavate kemikaalide tugevate lahuste abil. Laboratoorses praktikas kasutatakse niisugust steriliseerimisviisi väga harva.

Tavaliselt kasutatakse steriliseerimiseks desinfitseerivate ainete nõrku lahuseid.

### T ö ö ü l e s a n d e d .

1. Valmistada klaasnõud ette steriliseerimiseks; valmistada vattkorgid 6 katseklaasile ja 1 kolville. Valmistada kahele pipetile vatist sillake ning pakkida paberisse; 3 Petri tassi pakkida paberisse ja asetada kandjasse.
2. Tutvuda Kochi aparaadiga ja termostaadiga ning üksikasjalikult horisontaalse autoklaaviga viimase juures oleva spetsiaalse juhendi abil. Steriliseerida autoklaavis 1.punktis ettevalmistatud klaasnõud.



- 3 Õppida tundma bakterifiltreid ja jälgida nende kasutamist.
4. Tutvuda mikrobioloogia laboratooriumi spetsiaalse aparatuuriga (loksutaja, külmutuskapp, inkubaatorid (bakteriaalsed kapid), külviboks, ultraviolettlamp jne.).
5. Valmistada tselluloidist bakterifilter.

## V p r a k t i k u m

### T e e m a: MIKROOBIDE SÖÖTMED

Mikroorganismide puhaskultuuride eraldamiseks ja kasvatamiseks kasutatakse kunstlikke söötmeid, millel on võimalik neid igakülgselt uurida. Mikroobid arenevad keskkonnas ainult vee juuresolekul, sest nad kasutavad vees lahustunud toitaineid.

Mikroorganismid kasutavad toitainetena nii orgaanilisi kui ka mineraalaineid, vitamiine ja teisi kasvufaktoreid, mistõttu eri juhtudel nende kasvatamiseks sobivad väga mitmesuguse koostisega söötmed.

Mikroobide kasvatamiseks kasutatavad kunstlikud söötmed peavad vastama järgmistele nõuetele.

Sööde peab sisaldama kõiki antud mikroobi toitumiseks vajalikke aineid, olema steriilne, selge ja läbipaistev ning kasvatatava liigi suhtes optimaalse pH-ga.

Ka söötte füüsikalisi-keemilisi omadusi (konsistents, pH, Eh, viskoossus jne.) peavad vastama mikroobide optimaalsetele tingimustele.

Mikroobide söötmeid on võimalik klassifitseerida mitmesuguste omaduste alusel, mistõttu kohtamegi palju klassifikatsioone. Sagedasti võib ühte söödet olemasolevate klassifikatsioonide puhul paigutada mitmesse gruppi, mis põhjustab segadust. Maailmakirjanduses puudub veel tänini üldtunnustatud söötmete liigitus. Alljärgnevalt tutvume söötmete ühe klassifikatsiooniga.

1. Kultiveerimis- ja säilitussöötmed on niisugused, mis sobivad paljude mikroobide kasvatamiseks. Siia kuuluvad lihapuljong, lihapeptonpuljong, lihapeptonagar, Na-kaseinaatagar, liha-maksapuljong, pärmiekstrakt, mullatõmmis jne.

2. Rikastussöötmed on niisugused, kus kultiveerimissöötmele lisatakse mõnda ainet sõltuvalt kasvatatavate bakterite nõudeist. Rikastussöötmetena võib mainida suhkrupuljongit, Buliri söödet jne.

3. Diferentsiaalsöötmeid kasutatakse mikroobide biokeemilise aktiivsuse, nende ensümaatiliste omaduste määramiseks. Sellesse rühma kuuluvad Endo sööde, Hissi sööde, spetsiifilised söötmed asporogeensete gram-negatiivsete mikroobide jaoks jt. gruppide jaoks.

4. Füsioloogiliste omaduste indikaatorsöötmed on niisugused, mida kasutatakse mikroobide mitmesuguste omaduste, nagu süsivesikute käärimis-, ammonifitseerimis-, nitrifitseerimis- jt. võime määramiseks ning ka söötme reaktsioonis toimunud muutuste uurimiseks. Siia kuuluvad süsivesikuline indikaator-sööde, tärkliisagar, nitraatpuljong, lakmuspiim jne.

5. Spetsiaaleesmärkidega söötmed. Siia kuuluvad mikroobide ensüümide, toksiinide, antibiootikumide jt. ainete moodustamiseks kasutatavad söötmed jt.

Konsistentsi alusel jagatakse söötmed vedel- ja tardsöötmeiks.

Tardsöötmed võivad kõigepealt olla mitmesugused taimsed produktid, nagu kartul, porgand, puuviljad jne., siis leib jt.

Enamikul juhtudel saadakse tardsöötmed mõningate indifereentsete tarduvate ainete lisandamisel, või siis kasutatakse tardsöötmena koaguleeritud valke, nagu vereseerumit jne.

Tardsöötme alusena kasutatakse vahel ka vasika kontidest, peadest, jalgadest jne. valmistatud želatiini. Želatiin on keerulise struktuuriga valkaine, milles põhiliseks tarduvaks osaks on kollageen. Želatiini sulamistäpp on ca 24°C. Tardsöötme saamiseks lisatakse lihapeptonpuljongile 10-15% želatiini. Sellisel tardsöötmel võib mikroobe kasvatada ainult 23-24°C juures.

Parimaks tardsöötme aluseks on agar-agar, mida saadakse genus Florideae'sse kuuluvatest merevetikatest. Agar-agar absorbeerib hulgaliselt vett (200-250 korda rohkem oma kaalust) ja sisaldab vähe lämmastikühendeid. Peamine koostisosa on pek-



tiinitaoline geloos, mis pundub vees, sulab keemisel 98-100°C juures ja jahtudes tardub 45°C juures. Tardsöötme saamiseks lisatakse vedelsöötmele kaalu järgi 1,5 - 2% agar-agarit. Sellist söödet mikroobid ei vedelda ja see püsib tardununa vajaliku inkubeerimistemperatuuri juures.

Mikrobioloogia-alases kirjanduses kohtame sagedasti termineid: selektiivsööde, sünteetiline sööde ja dehüdreeritud sööde.

Selektiivsöötmed on sellised söötmed, mis võimaldavad mikroobide looduslikust või kunstlikult koostatud segust arene-ma hakata ainult teatavate kindlate füsioloogiliste omaduste-ga mikroobidel. Selektiivsöötmetega luuakse uurijat mitte-huvitavate mikroobide elutegevuseks ebasoodsad tingimused kas kasvu pidurdavate ainete (värvained, kemikaalid, sapp) lisa-misega või sel teel, et jäetakse lisamata ained, mis lubaksid kasvada ka kõrvalistel vormidel. Ka söötme reaktsiooni on või-malik kohandada ainult ühele liigile.

Sünteetilised söötmed on sellised, mille valmistamiseks kasutatakse lihtsaid keemilisi individuaalseid ühendeid ja vett kindlas vahekorras. Selliste söötmete kasutamine võimal-dab bakteri ainevahetusprotsessi ja tema eluliste mehhanismi-de uurimist. Jättes söötmest välja mõne aine või muutes selle kontsentratsiooni, on võimalik mikroobi kultuuris tekkinud morfoloogiliste ja biokeemiliste muutuste järgi otsustada ühe või teise aine vajalikkuse üle uuritavale mikroobile. Sünteetiliste söötmete valmistamiseks kasutatakse keemiliselt puh-taid aineid, kvartsnõusid ja bidestillleeritud vett.

Dehüdreeritud söötmed on tööstuslikult valmistatud kuiv-söötmed (pulber). Neid lahustatakse vees 1,5-6% kontsentrat-sioonis. Dehüdreeritud kuivsöötmeid kasutatakse väiksemates laboratooriumides, kus esineb raskusi söötmete valmistamisega.

Järgnevalt tuuakse bioloogidele-mikrobioloogidele mõned sagedamini vajalikkude söötmete retseptid.

Lihapuljong (LP) e. lihavee, lihapeptonpuljongi (LPP) ja lihapeptonagari (LPA) valmistamine. Enamiku söötmete aluseks on lihavesi, mille valmistamiseks võetakse 500 g noore veise

või hobuse rasvata ja kõõlusteta liha, hakitakse peeneks ja asetatakse 1000 ml kraanivette 12 tunniks või 1 tunniks 50-55°C juurde matsereeruma. Lisatav vesi tuleb enne liha sisseviimist soolhappega hapustada kuni pH 4,5-5,0. Liha võidakse asetada ka lõdvalt 3-4 kordsesse marlikotti, millega viiakse vette matsereeruma. Peale selle keedetakse pool tundi ja kurnatakse. Kurnatud hautist keedetakse veel pool tundi. Kuumale hautisele lisatakse 5 g NaCl ja neutraliseerimiseks soodalahust. Koaguleerunud valgud filtreeritakse. Filtraadi maht täiendatakse veega 1 liitrini, lisatakse 10 g peptooni ja kuumutatakse viimase lahustumiseni ning peale selle keedetakse veel pool tundi. Uuesti filtreeritakse ja grupi-analüüside jaoks filtraat lahjendatakse veel 2 korda.

Saadud LPP steriliseeritakse 121°C juures 15 minutit.

LPA valmistamiseks lisatakse LPP-le 2% pestud agar-agarit.

Pärmiekstrakti valmistamine. Tärklisevabale värsketele presspärmile lisatakse kaalult 9-kordne kogus vett ja segatakse hästi segi ning autoklaavitakse 3 tundi 1 atm juures. Peale selle lastakse liigutamata settida mitme päeva jooksul toatemperatuuril. Vedelik eraldatakse sifooniga ja tsentrifugeeritakse. Saadud ekstrakti autoklaavitakse 20 minutit 1 atm juures.

Mullatõmmise valmistamine. 1 kg aiamulda suspendeeritakse 1 liitris kraanivees ja segatakse hästi ning autoklaavitakse 1 tund 1,5 atm juures. Pärast seda jäetakse sööde pikemaks ajaks seisma - **settima**. Hiljem filtreeritakse läbi kahekordse filterpaberi. Filtraat neutraliseeritakse soodaga pH 7-7,2. 100 ml-le mullatõmmisele lisatakse 900 ml destilleeritud vett ja 15 g agar-agarit. Keedetakse kuni agar-agar sulab ja kallatakse katseklaasidesse või kolbidesse ning steriliseeritakse autoklaavis 1 atm juures 30 minutit.

Kartuliagari valmistamine. Kooritud ja pestud kartulid lõigatakse viiludeks ja keedetakse vees. Kartulite ja vee vahekord peab olema 1:10. Peale selle filtreeritakse läbi paberfiltrit ja lisatakse 1,5% agar-agarit. Agar-agar sulatatatakse tulisel veevannil. Hägususe puhul filtreeritakse veel



kord. Sööde steriliseeritakse 30 minutit 1,5 atm juures.

Kartulilõigud või happebakterite kasvatamiseks. Kasutatakse mädaplekkideta valgeid mugulaid, viimased pestakse hästi puhtaks, kooritakse ja lõigatakse 10-15 mm paksusteks lõikudeks. Lõigud hõõrutakse hästi kriidiga sisse tekkivate hape te neutraliseerimiseks ja asetatakse Petri tassidesse. Söötme ga Petri tassid steriliseeritakse autoklaavis 2 atm juures 25-30 minutit. Kartulilõikude õige steriliseerimine on väga oluline, sest kartulis esinevad peaaegu alati Bac. mesentericus väga vastupidavad spoorid. Kriidiga sissehõõrumise asemel võib kartulilõike hoida ka 6-12 tunni jooksul 1%-lises soodalahuses.

Samuti nagu kartulist, valmistatakse söödet ka porgandist ja teistest juurviljadest.

#### Suhkrupuljongi ja suhkrugaru valmistamine.

Tavalisele puljongile või tavalisele sulatatud agar-agarile lisatakse 0,5 kuni 1% mingeid süsivesikuid. Vastav süsivesik lahustatakse väheses vees ja lisatakse söötmele. Steriliseeritakse Kochi katlas 3 päeva järjest, iga päev üks tund.

Buliri sööde sisaldab 1 liitri LPP kohta 12,5 g manniiti ja indikaatorina 6 ml neutraalpunase 1%-list vesilahust. Sööde steriliseeritakse Kochi katlas voolava auruga 3 päeva järjest, iga päev 30 minutit.

Vereagar glükoosiga. Nõrgalt leelise reaktsiooniga glükoosagar (2-3% agar-agarit ja 2% glükoosi) valatakse suurtesse katseklaasidesse, mille kõrgus 25 cm ja  $\varnothing$  2,5 cm. Igasse katseklaasi valatakse umbes 60 ml söödet, steriliseeritakse 110°C juures ca 30 minutit ja säilitatakse selliselt. Enne kasutamist kuumutatakse glükoosagarit veevannil, jahutatakse siis 45°-ni ja lisatakse igasse katseklaasi 12-15 ml steriilset defibrineeritud verd; segatakse läbi ja valatakse 3 või 4 Heidenreichi tassi.

Täidetud tasse hoitakse enne külvi 2 ööpäeva toatemperatuuris.

Endo sööde. 100 ml-le LPA-le lisatakse 1 g laktoosi, indikaatorina aluselise fuksiini ja naatriumsulfiiti ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ )

segu ning 0,1 g kristalset soodat. Indikaator valmistatakse järgmiselt. Katseklaasi võetakse 1 ml aluselise fuksiini küllastatud alkoholilahust, millele lisatakse vähehaaval 10%-list  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  vesilahust kuni fuksiini värvitustumiseni, s.o. kuni kahvaturoosa värvuseni. Saadud kahvaturoosa värvusega lahus lisatakse sulatatud laktoosagarisse ja segatakse hoolikalt. Endo sööde valmistatakse võimalikult enne tarvitamist ning hoitakse kaitstult valguse eest. Escherichia coli pesad on Endo söötmel punased pronksitaolise läikega, kuna laktoosi mittefermenteerivad bakterid kasvavad söötmevärvi oranžroosade pesadena. Kõhutüüfuse, paratüüfuse ja bakteriaalse düsenteeria pisikud annavad värvusetuid kolooniaid.

### Hissi sööde ehk süsivesikute "kirju rida".

Kasutatakse mikroobide ensümaatilise toime määramiseks. 100 ml-le veele lisatakse 1 g peptooni ja 0,5 g keedusoola. Peptoon ja  $\text{NaCl}$  lahustatakse kuumas vees mõne minuti vältel ja filtreeritakse läbi paberfiltrit (lahus peab olema täiesti läbipaistev). Lahuse pH peab olema 7,0. Valmistatud peptoonveele lisatakse 1-2% keemiliselt puhast süsivesikut (pentoos, heksoos, disahhariid, trisahhariid, polüsahhariid) ja mõni tilk sellist indikaatorit, mis muudab värvust süsivesiku fermenteerimisel tekkinud hapete toimel. Indikaatorina kasutatakse sagedasti 0,04%-list broomtümoolsinise vesilahust, mida lisatakse söötmale vahekorras 1:10. Happelises keskkonnas on indikaator kollase, leeliseses sinise ja neutraalses keskkonnas roheline värvusega. Valmistatud sööde valatakse steriilsetesse ujukitega varustatud katseklaasidesse ja steriliseeritakse vaheaegadega 100° juures kolm päeva.

Tärklisammooniumagar (TAA) sööde. Mulla ammonifitseerivate mikroobide kasvatamiseks kasutatakse LPA kõrval edukalt TA-söödet, mille koostis on järgmine.

|                              |         |                     |         |
|------------------------------|---------|---------------------|---------|
| $\text{K}_2\text{HPO}_4$     | - 1,0 g | kriit               | - 3,0 g |
| $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | - 2,0 g | lahustuv tärklis    | - 1,0 g |
| $\text{MgSO}_4$              | - 1,0 g | agar-agar           | - 2 %   |
| $\text{NaCl}$                | - 1,0 g | destilleeritud vesi | - 1 l   |

Sööde steriliseeritakse 0,5 atm juures 30 minuti jooksul.



Lakmuspiim. Mikroobide elutegevuse tagajärjel muutunud söötme reaktsiooni määramiseks võib kasutada näiteks lakmuspiima. Lakmuspiima valmistamiseks võetakse 2,5 g pulbrilist lakmust, peenendatakse uhmris ja viiakse liitrisesse mensuurri. Lakmusele lisatakse veidi 1 n leelist lahustuvuse suurendamiseks ja loksutatakse. Pärast seda lisatakse destilleeritud vett liitrini. Valmistatud ekstrakt peab olema violetse värvusega. Violetse värvuse saavutamiseks lisatakse tilkhaaval piimhapet. 7 ml lakmuseekstrakti lisatakse 93 ml kooritud piimale, loksutatakse ja täidetakse katseklaasid. Söötmele katseklaasid steriliseeritakse 120°C juures 12-15 minutit. Pärast seda jahutatakse katseklaasid kiiresti maha.

Happeliste eritiste puhul muutub lakmuspiim punaseks, aluseliste eritiste puhul siniseks.

#### Söötmete pH määramine.

Enamik mikroobe eelistab kasvuks ja arenguks neutraalset või nõrgalt leelisest keskkonnareaktsiooni. Iga valmistatud söötme pH tuleb määrata, et mikroobide pH steriliseerimisel ja kasvu kestel tunduvalt ei muutuks, lisatakse söötmele puhvreid. Puhvriteks nimetatakse nii hapete kui ka aluste suhtes afiinseid aineid. Puhvrid neutraliseerivad söötmele lisanduva happe ja aluse ning hoiavad söötmes alal esialgse vesinikioonide kontsentratsiooni. Tavaliselt lisatakse laboratooriumides söötmele puhvritena kas fosforhappe primaarseid või sekundaarseid naatriumi- või kaaliumisoolasid. Ei tule unustada, et ka pepton ja lihavesi on ise puhvriteks. Et autoklaavimisel langeb pH peaaegu kõigis söötmeis, siis viiakse söötme pH enne autoklaavimist pisut kõrgemale ettenähtust.

pH määramist on võimalik teostada elektromeetriliselt, kolorimeetriliselt ning ka universaalindikaatorpaberi ja universaalindikaatorlahuse abil.

pH elektromeetriliseks määramiseks kasutatakse takistuskompensatsioonpotentsiomeetrit "Pehavi" kalomel- ja kinhüdron-elektroode, 1 n KCl-lahust, kinhüdroni ja kindla pH väärtusega puhverlahust potentsiomeetri töö õigsuse kontrollimiseks. pH väärtus oleneb temperatuurist, mistõttu määra-

mised tulevad läbi viia konstantses temperatuuris või nimetatud tingimuste puudumisel arvestada väljatöötatud parandusi.

Kateedril kasutada oleva takistuskompensatsioon potentsiomeetri "Pehavi" näitude kontrollimiseks valmistatakse täpselt 4,62 pH-väärtusega atseetpuhver. Atseetpuhvri valmistamiseks kasutatakse 1%-list äädikhapet. Viimase valmistamiseks võetakse 100 ml destilleeritud vett ja 1 ml jää-äädikhapet. Väiksesse keeduklaasi mõõdetakse 10 ml valmistatud lahust, millele lisatakse paar tilka 0,1% fenoolftaleiinilahust ja tiitritakse 0,1 n NaOH-lahusega roosa värvuse ilmumiseni. Kasutamata jäänud 1%-lisele äädikhappele (90 ml) lisatakse pooles koguses 0,1 n NaOH. Näiteks kui 10 ml happe tiitrimiseks kulus 12 ml leelist, siis tuleb 90 ml-le happele lisada 54 ml leelist ( $\frac{12}{2} \cdot 9 = 54$ ), et saada atseetpuhver, mille pH on täpselt 4,62.

Kui potentsiomeeter ei ole täpne, siis on vaja ettevaatlikult keerata reguleerimiskruvi.

Potentsiomeeter tuleb ka kaliibrida pH intervallides. Kaliibrimine peab tingimata toimuma selle pH läheduses, mida on oodata uuritaval lahusel. Kontrollida tuleb aeg-ajalt ka normaalelemente.

Pärast potentsiomeetri täpsuse kontrollimist määratakse uuritava söötme pH. Uuritav lahus asetatakse kinhüdroonelektroodiga nõusse, kuhu lisatakse veidi kinhüdrooni elektrijuhtivuse paremusestamiseks. pH määramine teostatakse kas 30 sekundi või 2 minuti järele pärast voolu lülitamist. pH väärtus loetakse skaalalt.

Kolorimeetrilisel määramisel võib edukalt kasutada Gillespie meetodit (joon. 11).

Määramisel kasutatakse vabalt valitud kontsentratsiooniga happe- ja aluselahust, kuid happe ja aluse kontsentratsioonid peavad olema võrdsed, võrdsed peavad olema ka lahuste ruumalad ja katseklaaside läbimõõdud. Käesoleval praktil kumil kasutatakse 0,1 n HCl- ja 0,1n NaOH-lahust ning indikaatorina 0,04% broomtümoolsinist. Indikaatori valik oleneb sellest, missuguse pH piirkonnaga on määramisel tegemist. Lahuse pH eelmääramine teostatakse universaalindikaatoriga. Indikaa-



torlahus lisatakse mikrobüreti abil.

Valmistatakse 9 katseklaasist koosnev katseklaaside seeria, igasse neist mõõdetakse 10 ml 0,1 n HCl, alates esimesest katseklaasist lisatakse indikaatorit üha vähenevas hulgas (esimesse katseklaasi 9 tilka, teise - 8 tilka, kolmandasse - 7 tilka ..... üheksandasse 1 tilk). Analooogiliselt esimesele katseklaaside seeriale valmistatakse teine 9 katseklaasist koosnev seeria, igasse neist mõõdetakse 10 ml 0,1 n NaOH, alates esimesest katseklaasist lisatakse üha suurenevas hulgas indikaatorit (esimesse 1 tilk, teise 2 tilka... üheksandasse 9 tilka. Katseklaaside seerias on igas katseklaasis erineva värvuseintensiivsusega lahus. Igale erineva värvuseintensiivsusega katseklaaside paarile vastab kindel pH väärtus, millega võrreldakse uuritava lahuse värvuse intensiivsust ja leitakse sel teel viimase pH. Lahuse pH määratakse indikaatori teoreetilise pöördeala alusel. Broomtümoolsinisel on see 6,1 - 8,1 (praktiline pöördeala aga on 6,0-7,6).

Lahuste värvuse intensiivsuse võrdlemine toimub statiivis (komparaatoris) joonisel 11 toodud skeemi kohaselt.

Katseklaaside paaride järjekord loetakse indikaatori tilkade järgi leelises.

#### T ö ö ü l e s a n d e d

1. Tutvuda demonstratsiooniks väljapandud mikroobide kunstlike söötmetega.
2. Valmistada grupi kohta 1 l lakmuspiima, 1 l kartuliagarit, 1/2 l Endo söödet ja 1 l tärklisammooniumsöödet.
3. Määrata valmistatud söötmete pH elektromeetriliselt ja kolorimeetriliselt.
4. Igal üliõpilasel täita 3 katseklaasi lakmuspiimaga, 3 katseklaasi tärklisammooniumsöötmega. Valmistada 3 püstliha-peptonagarit ja 2 länglihapeptonagarit.

# GILLESPIE MEETODI SKEEM

| I KATSEKLAASIDE SEERIA | II KATSEKLAASIDE SEERIA | KATSEKL.                | pH      |
|------------------------|-------------------------|-------------------------|---------|
| 10ml 0,1n HCl          | 10ml 0,1n NaOH          | NR.                     | VÄÄRTUS |
| 1 tilk indikaatorit    |                         | 9 tilka indikaatorit IX | 8,0     |
| 2 tilka "              |                         | 8 " " VIII              | 7,7     |
| 3 " "                  |                         | 7 " " VII               | 7,5     |
| 4 " "                  |                         | 6 " " VI                | 7,3     |
| 5 " "                  |                         | 5 " " V                 | 7,1     |
| 6 " "                  |                         | 4 " " IV                | 6,9     |
| 7 " "                  |                         | 3 " " III               | 6,7     |
| 8 " "                  |                         | 2 " " II                | 6,5     |
| 9 " "                  |                         | 1 tilk " I              | 6,3     |

I paar -  $pH_2$ 

IX paar -  $pH_1$ 
 $pH_1$  6,3 —  $pH_2$  8,0

## KOMPARAATORISSE ASETAMISE SKEEM

vesi

alus + indikaator

hape + indikaator

alus + indikaator

hape + indikaator

uuritav lahus  
+10 tilka indikaatorit



## VI p r a k t i k u m

### T e e m a: MIKROOBIDE KÜLVI TEHNIKA

Mikroobide kultiveerimine on vajalik nende morfoloogia, füsioloogia ja biokeemia uurimiseks.

Mikroorganismide ainevahetusproduktide kogunemise tõttu söötmeis tuleb mikroobe aeg-ajalt ümber külvata. Edasikülv toimub põhisöötmetele, millel antud liigi kasv on normaalne ja säilivus hea. Edasikülvamise puhul rakendatakse võimalikult väikest külvimäära, et külvatava kultuuri omadused saaksid avalduda. Edasikülvide puhul kontrollitakse mikroskoobi abil kultuuri puhtust. Edasikülvid tehakse külvinõela või gradueeritud pipeti abil kas vedel- või tardsöötmetele.

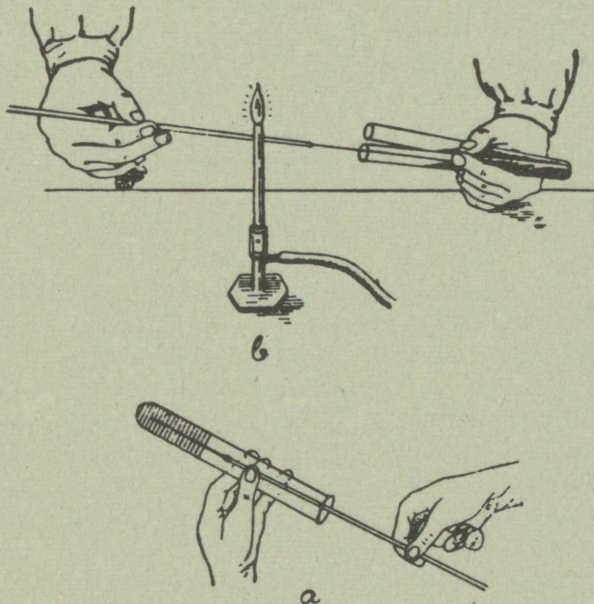
Külvid teostatakse spetsiaalses, väga puhtas külviboksis, kus hoitakse ainult külviks vajalikke esemeid. Enne külve steriliseeritakse boksi vähemalt pool tundi ultraviolettlambi abil, mille tulemusena hävib enamik seal leiduvaid mikroobe. Boksi puudumisel tehakse külvid hoolikalt tolmuimejaga puhastatud toas, milles külvamise ajal ei tohi olla avatud akent ega ventilaatorit ja kõrvalisi isikuid. Töölaud peab olema klaasiga kaetud, mille pind enne töö algust uhitakse üle 96%-lise etanooliga. Külvaja kandku seljas kas pesust või desinfektsioonist tulnud hermeetiliselt pakitud kitlit. Patogeense materjaliga ja puhaskultuuridega töö puhul kantakse suu ja nina ees steriilset marlikatet, juuksed kaetakse, käed pestakse hoolikalt ja desinfitseeritakse (karbool, etanool). Patogeense materjaliga töö puhul on soovitatav kanda kirurgikindaid.

Külvide teostamiseks on aegade jooksul välja kujunenud teatud kindlad võtted. Külvide tegemisel tuleb vältida ümbritsevast keskkonnast, õhust juhuslike mikroobide katseklaasidesse sattumist. Saastumise vältimiseks hoitakse avatud klaasnõud käes langesendis ning nende suudmed kuumutatakse leegil pärast avamist ja enne vattkorgiga sulgemist juhuslikult suudmele langenud mikroobide hävitamiseks.

Uuritavast materjalist tehakse külvid katseklaasides

ja kolbides olevatele söötmetele kas aasata või aasaga külvinõela ja pipeti abil. Väiksemate materjalihulkade puhul kasutatakse aasata külvinõela või mikropipetti, suuremate hulcade puhul aga aasaga külvinõela või gradueeritud pipetti. Petri tassi söötmeplaadile tehakse külvid aasaga külvinõela ja Drigalski pahtli abil (joon. 14).

Katseklaasidesse tehakse külvid kahel viisil. Ühe viisi puhul on korraga käes ainult üks katseklaas, teise viisi puhul aga mõlemad katseklaasid (joon. 12).



Joon. 12. Katseklaasi külvitehnika a - aasata nõela abil pistekülvi tegemine katseklaasi (korraga käes üks katseklaas), b - aasaga külvinõela abil joonkülvi tegemine katseklaasi (korraga käes kaks katseklaasi).

Esimese viisi järgi külvamisel võetakse längasendis katseklaas külvatava materjaliga vasakusse kätte esimese kolme sõrme vahele, kusjuures katseklaas toetub põidla ja esimese

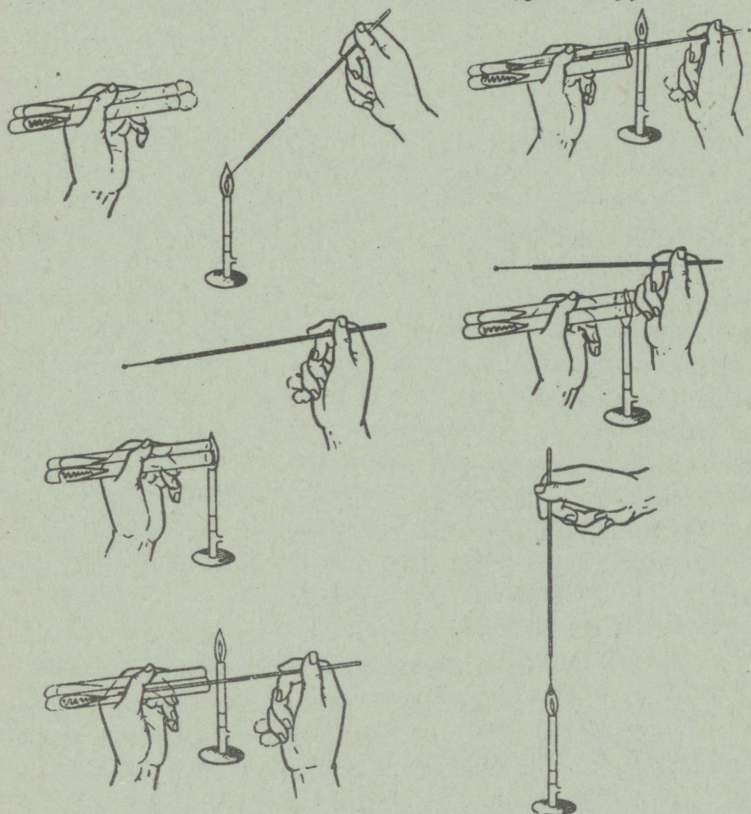


sõrme vahele käe dorsaalsele pinnale. Sellise võtte puhul on katseklaasi sisu kogu ulatuses hästi jälgitav. Parema käe esimese kolme sõrme vahele võetakse pliiatsi asendis külviaas või külvinõel, nii et aasaga külvinõel ja selle klaasist pea oleksid ca 15 - 20 cm ulatuses vabad. Külvinõela kuumutatakse leegis kuni hõõgumiseni, siis lastakse kergelt leegist läbi ka külvinõela peasse jootekoht. Pärast seda jahutatakse külviaas õhus. Siis eemaldatakse kogu külviprotsessi ajaks katseklaasilt vattkork kruviva liigutusega parema käe peopesa ja viienda sõrme või dorsaalselt neljanda ja viienda sõrme vahele. Seejärel kuumutatakse leegil katseklaasi suudmeosa ja võetakse külviaasaga ettevaatlikult ilma katseklaasi seinu ja suudmeosa puudutamata materjal. Pärast seda jälle kuumutatakse leegil katseklaasi suudmeosa ja katseklaas suletakse paar korda läbi leegi tõmmatud vattkorgiga kruviva liigutuse abil ning asetatakse statiivile. Vattkorgi alumise osa süttimisel asetatakse kork kiiresti katseklaasi või kolbi avasse, mille tulemusena leek hapniku puuduse tagajärjel kustub. Kui süttib puuvillkorgi ülemine osa, siis asetatakse kork kiiresti avasse ja korgi ülemine osa haaratakse pihku, mitte aga peale puhuda. Nüüd võetakse vasakusse kätte längagarsöötmeiga katseklaas eespool kirjeldatud asendis, oluline on, et söötme pind jääks külva ja poole. Pärast seda avatakse katseklaas parema käega eespool kirjeldatud viisil, kuumutatakse suudmeava ja viiakse külvatav materjal külviaasaga katseklaasis olevale söötmele. Külvi teostamist längagarile alustatakse katseklaasi põhjast, kusjuures libistatakse aasaga siksakiliselt mööda söötme pinda. Lõpuks kuumutatakse leegil veelkord katseklaasi suudmeosa ja suletakse paar korda läbi leegi tõmmatud vattkorgiga ning asetatakse katseklaas oma kohale.

Mittepatogeense materjaliga külvi lõpetamisel loputatakse plaatinatraati koos klaaspideme alumise osaga kas vees või etanoolis, selleks et vältida aasa saastumist boorse sademega. Pärast seda kuumutatakse külviaasa leegil kuni hõõgumiseni, kusjuures paar kolm korda lastakse leegist läbi ka nõel ja selle pea. A l l e s p ä r a s t s e d a a s e -

t a t a k s e      k ü l v i a a s      ettenähtud kohale.

Teise viisi järgi külvamise puhul võetakse vasakusse kätte eespool kirjeldatud asendis kaks katseklaasi. Üks neist on materjaliga ja teine söötmega katseklaas. Külvimaterjaliga katseklaasilt eemaldatakse vattkork parema käega, kusjuures kork jääb viienda ja neljanda sõrme vahele. Ka selle külvivii- si puhul asub külviaas materjali võtmisel paremas käes. Enne ja pärast külvimaterjali võtmist kuumutatakse leegil katse- klaasi suudmeosa, mis suletakse paar korda läbi leegi tõmmatud vattkorgiga. Pärast seda avatakse söötmega katseklaas ja teos- tatakse külv eespool kirjeldatud viisil (joon. 13).



Joon. 13. Joonkülv tehnika etapid.



Vedelsöötmetesse tehakse külviaasaga külvid samal põhimõttel (külvinõel pistetakse 3 - 4 korda söötmesse).

Katseklaasis asuvasse püstasendis tardsöötmesse tehakse pistekülv aasata külvinõela abil, piste ehk torge tehakse söötmesamba keskosas katseklaasi põhjani (joon.12 a). Pistekülvi võib teostada ka teisiti. Vasakusse kätte võetud söötmega katseklaas, mille ava on allapoole, lastakse oma raskusega vajuda paremas käes püstiasendis olevale külvinõelale.

Petri tassides olevatele söötmeplaatidele võib külv vi teha sektoritena külviaasaga või -nõelaga. Selleks asetatakse Petri tass lauale leegi lähedusse ja vasaku käega tõstatatakse tassi kaas söötmeplaadi kohal nii kõrgele, et on võimalik paremas käes oleva külvinõela abil teha külv siksakjoo- nega söötmele. Kaas takistab õhust mikroobide langemist söötmele.

Petri tassis olevasse vedelasse agarsöötmesse tehakse külv järgmiselt. Selleks võetakse püstagariga katseklaas, milles olev agarsööde sulatatakse veevannis keemistemperatuuril ja seejärel jahutatakse 45°C. Selle temperatuuri juures on agarsööde veel vedel, kuid ei tohi põhjustada mikroobide hävinemist. Pärast seda külvatakse uuritav materjal katseklaasis olevasse agarisse kas pipetiga või külviaasaga. Sellise menetluse puhul võetakse korgitud katseklaas peaaegu horisontaalasendis peopesade vahele ja edasi-tagasi roteerimise abil soodustatakse materjali segunemist söötmega. Pärast seda eemaldatakse katseklaasil kork ja kuumutatakse selle suudmeosa leegil ning valatakse inokuleeritud sööde Petri tassi. Valamise puhul hoitakse kaas avatud söötme pinna kohal. Pärast Petri tassi sulgemist liigutatakse seda laual ringjoont mööda külvimaterjali söötmega segunemise huvides ja jäetakse horisontaalsele pinnale tarduma.

#### Mullakülv aeroobsete mikroobide uurimiseks

Muld on mikroorganismide poolest kõige rikkam keskkond. Ühes grammis mullas, sõltuvalt selle omadustest, võib leiduda kuni kümneid miljardeid mikroobe. Mullas leidub baktereid, seeni, spiroheete, ainurakseid, viirusi ja bakterio-

faage, mille omavahelised suhted on väga mitmesugused. Mullas leidub nii aeroobe, fakultatiivseid aeroobe kui ka obligaatseid anaeroobe. Mikroobide peamine mass paikneb 5-20 cm sügavusel.

Mulla külvi abil on võimalik määrata mullas esinevate mikroobide hulka, nende liigilist koostist jne. Et muld on väga mikroorganismiderikas, et mullas on palju mikrootsoone, kus juba mõne mm ulatuses võivad elutingimused niivõrd järele muetuda, et põhjustavad erinevate liikide eksisteerimist, siis on otstarbekohane valmistada mulla lahjendused. Selleks kaalutakse mulla keskmisest proovist steriilselt 10 g mulda ja viiakse seisukolbi 90 ml-sse steriilsesse vette. Arvestades kadu autoklaavimisel võetakse 95 ml vett. Pärast seda loksutatakse 5 minutit loksutusaparaadil ja lõpuks 15 sekundit käes. Saadud mulla suspensiooni nimetatakse esimeseks lahjenduseks (1 : 10), millest valmistatakse teine lahjendus. Selleks mõõdetakse steriilselt 5 ml esimese lahjenduse suspensiooni ja kantakse teise seisukolbi, milles on 50 ml steriilset vett ja loksutatakse käes 1 minut. Sel puhul saadakse teine lahjendus (1 : 100). Analooiliselt sellega valmistatakse kolmas (1 : 1000), neljas (1 : 10.000), viies (1 : 100.000), kuues (1 : 1.000.000), seitsmes (1 : 10.000.000) jne. lahjendus.

Samalaadisel määramisel määratakse mulla kuivainesisaldus.

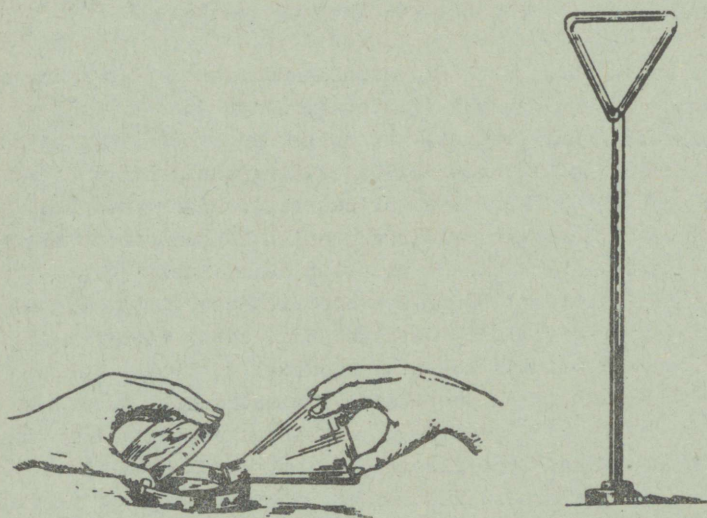
Steriilsesse Petri tassi valatakse umbes 1/2 sm paksune tärklisammooniumagarsöötme kiht, millele lastakse tarduda. Pärast seda kantakse tardsöötme pinnale steriilse pipetiga 0,05-0,1 ml VI lahjenduse suspensiooni ja aetakse steriilse Drigalski pahtliga laiali (joon. 14). Petri tass numeeritakse ja asetatakse 25°C juurde termostaati 3 ööpäevaks. Resultaatide arvutamiseks loetakse kolooniate arv tassil ja arvutatakse mikroobide hulk 1 g mulla kohta.

#### Mullakülv anaeroobsete mikroobide uurimiseks.

Anaeroobide kultiveerimiseks kõrvaldatakse söötmest vaba hapnik ja hoitakse kultuuri kogu inkubeerimisperioodi kestel hapniku eest kaitstult.



Enamik anaeroobe ei karda niivõrd hapniku manulust  
kuivõrd kõrget redokspotentsiaali.



Joon. 14. Söötme valamine Petri tassi ja Drigalski pahtel.

Anaeroobide kultuurimeetodeid võib liigitada järgmiselt:

1. Mehhaaniline kaitse hapniku eest (isoleeriva kihiga söötme keetmine, külv tardsöötme sügavusse jne.).
2. Kultuur õhuta ruumis (vaakuumis) või inertsete gaaside atmosfääris.

Viimast tuleb pidada paremaks, sest vaakuum toimib mikroobidele halvasti.

3. Õhuhapniku neelamine (enamasti kasutatakse selleks pürogallooli- ja leeliselahust.
4. Taandavate ainete (glükoos, indigokarmiin, Na-hüposulfit) lisamine keskkonnale.
5. Kultuur koos aeroobidega.

Käesoleval praktikumil kasutatakse anaeroobide kasvatamiseks esimest, teist ja kolmandat meetodit.

Katseklaasid täidetakse Kitt-Tarozzi söötmega, mille pinnale asetatakse 2-3 cm paksune vaseliinõli või vesiagari

kiht kaitseks hapniku sissepääsemise eest. Katseklaasi kuumutatakse keeval veevannil 10-30 minutit, mille tagajärjel eraldub söötimest õhk, seega ka hapnik. Pärast seda külvatakse nimetatud söötmesse aasatäis mulla II lahjendust. Seejärel kuumutatakse katseklaase veevannil 80°C juures 15-20 minutit, et vegetatiivset mikrofloorat hävitada. Eluvõimelistena säilivad aga mitmesuguste mikroobide, sealhulgas ka anaeroobide spoorid. Asporogeensed anaeroobid sel puhul hävivad.

Külve hoitakse 24-48 tundi termostaadis 30°C juures.

Tavalistele söötmetele anaeroobide uurimiseks teostatud külvid asetatakse anaerostaati, millest õhk vaakumpumba abil eemaldatakse. Hapniku täielikuks eemaldamiseks võib seda meetodit kombineerida neelamise meetodiga. Selleks asetatakse anaerostaati, inokuleeritud katseklaaside kõrvale lah-tisesse Petri tassi mõni gramm pürogallooli ja selle kõrvale lahtisesse kõrgemasse nõusse 10-15 ml 10%-list KOH-lahust. Pärast õhu eemaldamist anaerostaadist vaakumpumba abil aetakse järsu liigutusega leelist sisaldav nõu ümber pürogallooli sisaldavasse nõusse. Nimetatud koguses võetud kemikaalid on võimelised hapnikku adsorbeerima 100 ml mahuga õhuruu-mist.

### Õhukülv.

Õhu mikrofloora uurimisele pani aluse L. Pasteur oma klassikaliste töödega (1860-1862). Juba tema näitas, et õhus leidub alati suuremal või vähemal määral mitmesuguseid mikroobe, kuid nad pole õhu päriselanikud, vaid on sinna sattunud kas mullast tolmu või veekogudest auruga. Toitainete puudumine, kuivus ja ultraviolettkiired pidurdavad nende arengut õhus. Mida rohkem on õhus tolmu, seda rohkem on ka mikroobe. Nii võib koristamata siseruumi õhus leiduda väga palju mikroobe, nende hulgas ka inimese hingamisteedest pärinevaid mikroobe.

Õhu mikrofloora liigiline koostis on küllaltki kirju, kuid ülekaalus on siiski spoore ja pigmente moodustavad bakterid.

Siseruumide õhu mikrofloora arvuline koostis oleneb



ruumide puhtusest ja aastaajast, mida näitab koostatud tabel (tabel 1).

Kriteerium eluruumide õhu sanitaarseks hinnanguks Tetsi järgi.

Tabel 1

| Õhu hinnang | Mikroobide üldarv tk. |        |
|-------------|-----------------------|--------|
|             | suvel                 | talvel |
| Puhas       | 1500                  | 4500   |
| Saastunud   | 2500                  | 7000   |

Õhus esinevate mikroobide arvu on võimalik määrata mitmel viisil.

Viimasel ajal on hakatud üha enam rakendama elektri jõul töötavat Krotovi aparaati. Viimase puhul aspireeritakse teatav kindel hulk õhku (ca 25-250 liitrit) Petri tassis oleva tärgklisammooniumagari söötme pinnale, millele fikseeruvad õhus leiduvad mikroobid ja nende spoorid. Petri tassid suletakse ja asetatakse üheks ööpäevaks 37°C juurde. Pärast seda loetakse mikroobikolooniate arv.

Järgnevalt tutvutakse Robert Kochi rakendatud sadestamis-meetodit. Steriilse tärgklisammooniumagariga ja lihapepton-agariga täidetud Petri tassid hoitakse 5 minuti vältel avatuna uuritavas õhus. Pärast seda suletakse tassid kaanega ja asetatakse inkubaatorisse 37°C juurde 24 tunniks ning loetakse söötme pinnal kasvanud kolooniate arv.

S. I. Omeljanski arvestuse järgi sadeneb 100 cm<sup>2</sup> suurusele söötme pinnale 5 minuti jooksul ligikaudu samapalju mikroobe, kui neid on 10 liitris õhus.

#### Veekülv.

Veekogud on paljudele mikroobiliikidele looduslikuks biosfääriks. Veekogude mikrofloora sõltub suurel määral teda ümbritsevate teiste looduslike kude keskkondade - mulla ja õhu mikrofloorast, kust pärineb enamik veomikroobe. Spetsiifiliste vee-elanikena esinevad Pseudomonas fluorescens, Ps. eisen-

bergii, Micrococcus candidus, Micrococcus roseus, Bact. aqua-  
dilis communis, Bac. lividas, Rhodospirillum rubrum jt. Loodus-  
likkudes veekogudes on mikroobide arv väga kõikuv, olenedes  
aastaaegadest ja meteoroloogilistest tingimustest. Looduslik-  
kude veekogude vesi on harva ilma eelneva filtreerimiseta  
joogiks kõlblik. Joogivee kõlblikkuse hindamiseks on sea-  
tud vastavad normid. Puhas, hea joogivesi võib sisaldada mil-  
liliitris kuni 100 mikroobi, kusjuures nende hulgas ei tohi  
esineda patogeenseid mikroobe.

Et vees esinevate kõigi eluvõimeliste mikroobide üld-  
arvu määramine on seotud raskustega, siis piirduakse elu-  
võimeliste aeroobsete mesofiilsete mikroobide arvu määramise-  
ga 1 ml-s uuritavas vees.

Eluvõimeliste aeroobsete mikroobide arvu määramiseks  
lahjendatakse uuritav vesi steriilse kraaniveega vastavalt  
vajadusele 1 : 10, 1:50, 1:100. 1:1000 jne. Lahjendatud vee  
külvi teostatakse Petri tassis 45 kraadini jahutatud LPA-le.  
Selleks võetakse steriilse pipetiga 1 ml uuritavat vett ja  
viiakse Petri tassi, seejuures tõstetakse Petri tassi kaant  
vaid niipalju, et pipetiots sinna sisse mahub. Pärast seda  
valatakse Petri tassi 10–12 ml 45°C-ni jahutatud LPA. Et uu-  
ritav veeproov seguneks ühtlaselt söötmega, liigutatakse  
Petri tassi ettevaatlikult ringliigutuste abil. Pärast seda  
jäetakse Petri tass lauale kuni söötme tardumiseni. Petri tas-  
si põhjale märgitakse proovi number, külvimäär ja lahjendus.  
Kõigi teiste vee lahjendustega toimitakse analoogiliselt. Pet-  
ri tassid asetatakse termostaati 24 tunniks 37°C juurde.

#### Veekülv kolitiitri ja koliindeksi määramiseks.

Vee joogiks kõlblikkus ei olene niivõrd bakterisisaldu-  
se tiitrist, kuivõrd bakterite omadustest. Et patogeensete  
mikroobide avastamine on tehniliselt raskem kui normaalse soo-  
lemikrofloora määramine, siis peetaksegi neid väliskeskkonna  
reostumise indikaatoreiks. Kui uuritavas vees leidub seedetrak-  
tis alati esinevat kolibakterit (*Esch. coli*), siis on ilmne,  
et hiljuti pidi toimuma fekaalidega reostumine, sest välis-  
keskkond ei ole kolibakteri loomulikuks biosfääriks. Selline



vesi on joogiks ohtlik, sest koos normaalse seedetrakti mikroflooraga võib sinna sattuda ka patogeenseid mikroobe. Sanitaarse tähtsusega on ainult soojavereliste loomade kolibakter. Soojavereliste kolibakterit on võimalik eraldada külmavereliste loomade ja insektide kolibakterist süsivesikute fermenteerimisvõime alusel. Soojavereliste kolibakter lagundab 43° C juures süsivesikuid ja moodustab indooli, milleks pole võimalised külmavereliste kolibakterid.

Kolitiitri all me mõistame vähimat uuritava vee hulka milliliitrites või grammides, milles leidub eluvõimeline kolibakter.

Koliindeksi all me mõistame Esch. coli arvu ühes liitris uuritavas vees.

Koliindeksi määramiseks kasutatakse nitrotselluloosist kettakesi - membraanfiltreid. Sanitaarbakterioloogiliseks uurimiseks kasutatakse meil membraanfiltreid nr. 2, 3 ja 4, mille poorid on mitmesuguse läbimõõduga.

Määramiseks kasutatavaid membraanfiltreid keedetakse destilleeritud vees 15-20 minutit. Steriilne membraanfilter asetatakse steriilsete pintsettide abil steriilsesse Seitzi statiivi. Seitzi statiiv steriliseeritakse leegis põletamisel. Seitzi statiiv koos membraanfiltriga asetatakse imikolville. Läbi filtri filtreeritakse kindel hulk uuritavat vett. Pärast seda võetakse steriilsete pintsettidega membraanfilter statiivist ja asetatakse külvatud poolega ülespoole Petri tassis olevale Endo söötmele. Filtri söötmele asetamisel tuleb jälgida, et söötme ja filtri vahele ei jääks õhku. Pärast seda asetatakse tassid termostaati 37°C juurde 24 tunniks. ~~Uhte~~ Petri tassi võib asetada 3-4 membraanfiltrit. Filtri pinnale jäänud kolibakterid paljunevad ja moodustavad läikivad punased kolooniad. Kolibakterite kasv saab toimuda söötme lahustunud osade difusiooni tõttu läbi filtri pooride. Filtreeritud vee hulga ja membraanfiltril kasvanud kolibakterite kolooniate arvu alusel arvestatakse koliindeksi.

Külvi puhul membraanfiltritele on võimalik määrata ka kolitiitrit. Selleks filtreeritakse erinevad vee hulgad läbi mitme filtri. Endo söötme pinnale kasvama asetatud ketastel

jälgitakse Esch. coli olemasolu (kolooniaid pole vaja loendada). Kolitiitri ja koliindeksi määramiseks kasutatakse Petrovitsi koostatud tabelit (tabel 2).

Tabel 2

Koliindeksi ja kolitiitri arvestus membraanfiltrite abil (Petrovitsi järgi).

| Külvatud vee hulk ml-tes |    |   |     | Koli-<br>indeks | Koli-<br>tiiter |
|--------------------------|----|---|-----|-----------------|-----------------|
| 300                      | 30 | 3 | 0,3 |                 |                 |
| -                        | -  | - | -   | 3               | 333             |
| -                        | -  | - | +   | 3               | 333             |
| -                        | -  | + | -   | 3               | 333             |
| -                        | +  | - | -   | 3               | 315             |
| -                        | -  | + | +   | 6               | 168             |
| -                        | +  | - | +   | 6,5             | 159             |
| -                        | +  | + | -   | 7               | 138             |
| +                        | -  | - | -   | 8               | 129             |
| -                        | +  | + | +   | 9               | 108             |
| +                        | -  | - | +   | 30              | 33              |
| +                        | -  | + | -   | 31              | 30              |
| +                        | -  | + | +   | 60              | 18              |
| +                        | +  | - | -   | 77              | 12              |
| +                        | +  | - | +   | 320             | 3               |
| +                        | +  | + | -   | 793             | 1,2             |
| +                        | +  | + | +   | 793             | 1,2             |

Sanitaarse tähtsusega kolibakterite identifitseerimiseks kasutatakse vee külvi Eijkmanni vedelsöötmesse katseklaasides. Külvid hoitakse 43<sup>o</sup>C juures 24 tundi. Selles temperatuuris fermenteerub ühes gaasiprodukttsiooniga söötmes asuv glükoos sanitaarse tähtsusega kolibakterite toimel. Fermentatsiooni näitavast katseklaasist tehakse edasikülv tahkele Endo söötmele selleks, et kontrollida, kas on tegemist kolibakteritega

Ühe veeproovi uurimiseks võetakse 2 kolbi ja 10 suurt



katseklaasi Eijkmanni söötmega (ühes käärimistorukestega). Kolbidesse külvatakse 100 ml ja katseklaasidesse 10 ml uuritavaid vett.

Veevärgivee uurimiseks võetakse proov steriilsesse nõusse pärast kraani kuumutamist leegiga ja vee voolamist avatud kraanist 10 kuni 15 min. jooksul.

Kaevuvee uurimiseks võetakse proovid batomeetriga. Lahustite kaevude ja veekogude vee uurimisel külvatakse - 100 ml, 10 ml ja 0,1 ml. Pärast külvide hoidmist 43°C juures 24 tunni jooksul valitakse need kolvid ja katseklaasid külvidega, kus täheldatakse kasvu ja gaasiproduktiooni käärimistorukestes. Tulemuste määramiseks kasutatakse tabelit 3.

Tabel 3

Vee kolitiitri ja koliindeksi määramine Eijkmanni söötmel toimunud gaasiproduktiooni alusel.

| Positiivsete<br>katseklaaside<br>arv | Positiivsete kolbide arv |                 |                 |                 |                 |                 |
|--------------------------------------|--------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|                                      | 0                        |                 | 1               |                 | 2               |                 |
|                                      | Koli-<br>indeks          | Koli-<br>tiiter | Koli-<br>indeks | Koli-<br>tiiter | Koli-<br>indeks | Koli-<br>tiiter |
| 0                                    | 3                        | 333             | 4               | 250             | 11              | 91              |
| 1                                    | 3                        | 333             | 8               | 125             | 18              | 56              |
| 2                                    | 7                        | 143             | 13              | 77              | 27              | 37              |
| 3                                    | 11                       | 91              | 18              | 56              | 38              | 26              |
| 4                                    | 14                       | 71              | 24              | 42              | 52              | 19              |
| 5                                    | 18                       | 56              | 30              | 33              | 70              | 14              |
| 6                                    | 22                       | 45              | 36              | 28              | 92              | 11              |
| 7                                    | 27                       | 37              | 43              | 23              | 120             | 8               |
| 8                                    | 31                       | 32              | 51              | 20              | 161             | 6               |
| 9                                    | 36                       | 28              | 60              | 17              | 230             | 4               |
| 10                                   | 40                       | 25              | 69              | 14              | 230             | 4               |

Tabeli kasutamise näide. Kui kolibakteri kasvu suhtes esi-

neb positiivseid katseklaase 5 ja kolbe 1, siis tabeli horisontaalse ja vertikaalse rea lõikumisel saame kätte uuritava proovi koliindeksi 30 ja kolitiitri 33.

Kolibakteri identifitseerimiseks tehakse paarist positiivse reaktsiooniga katseklaasist ümberkülv Endo söötmele. Pärast 24-tunnilist kasvamist Endo söötmel 37°C juures uuritakse kolooniaid Grami järgi värvitud preparaadis.

Kolitiitrit on võimalik ümber arvutada koliindeksiks ja vastupidi.

Koliindeksi leidmiseks jagatakse arv 1000 kolitiitri arvule ja omakorda: kolitiitri saamiseks jagatakse arv 1000 koliindeksi arvule.

Riikliku Uleliidulise standardi (ГОСТ 2874-54) alusel ei tohi koliindeks olla veevärgi- ja üldkasutatavate kaevude vetes suurem kui 3 ja kolitiiter mitte väiksem kui 300. Lahtised veekogud loetakse soodsateks, kui kolitiiter on neis vähemalt 111.

Moskva veevärgi vee kolitiiter ei tohi olla koguni alla 500, koliindeks aga mitte üle 2.

#### Eijkmanni sööde

100 g peptooni

50 g NaCl

100 g glükoosi

1 l dest. vett

Sööde autoklaavitakse 0,5 atm juures 30 minutit. Paremaks steriliseerimise viisiks on voolava auruga steriliseerimine 3 päeva jooksul a 30 min.

Kolbidesse valatakse 10 ja katseklaasidesse 1 ml söödet.

#### Kitt-Tarozzi sööde.

8-10 ml lihapeptonpuljongi kohta lisatakse katseklaasi 3-5 g küüliku või vasika värske maksa tükikesi või hakkliha. Sööde kaetakse steriilse vaseliinõlikihiga ja autoklaavitakse 30 min. 1 atm juures.



## T ö ö ü l e s a n d e d

1. Bact. cloacae ja Bacterium proteus'e kultuurist teha külviaasata nõela abil pistekülv lihapeptonagarisse.
2. Sarcina flava ja Bac. subtilis'e kultuurist teha aasaga nõela abil külv länglihapeptonagarisse.
3. Lactobacterium plantarum ja Esch. coli suspensioonist teha gradueeritud pipetiga (0,1 ml) külv lakmuspiimaga täidetud katseklaasi.
4. Teha mullakülv VI lahjendusest Petri tassi tahkele tärkliis-ammooniumagarile ja lihapeptonagarile pipeti (0,1 ml) ja pahtli abil aeroobide arvukuse määramiseks.
5. Teha mullakülv VI lahjendusest Kitt-Tarrozzi söötmega katseklaasi ja lihapeptonpuljongiga katseklaasi anaeroobide saamiseks. Viimane külvidest asetatakse anaerostaati.
6. Teostada õhukülv Krotovi aparaadiga Petri tassi tärkliis-ammooniumagarile ja sadestuskülv Petri tassi samale söötmele.
7. Teostada veekülv Petri tassi lihapeptonagarile.
8. Määrata vee kolitiiter ja koliindeks membraanfiltriga Endo söötmel.

## VII p r a k t i k u m

### T e e m a: KULTUURIDE UURIMINE. MIKROOBIDE ARVUKUSE MÄÄRAMINE JA PUHASKULTUURI ERALDAMINE

Kultuuride uurimine. Eelmise praktikumi külvidest kasvanud kultuuride kontrollimisel tuleb vaadata, kas tegemist on ainult ühe mikroobiliigiga või on seal veel muid juhuslikult söötmesse sattunud mikroobe. Selleks valmistatakse kultuuridest preparaadid, värvitakse Ziehl'i karboolfuksiiniga ja Grami järgi ning mikroskopeeritakse.

Vedelkultuuridest tuleb materjali võtta aasaga külvinõela abil kas katseklaasi põhjas olevast sademest või suspensioonist. Püstagarisse tehtud pistekülvist peab preparaadi valmistamiseks materjali võtma ettevaatlikult söötme pinnalt piste kohalt ja väikeses veetilgas esemeklaasil ühtlaselt laiali hõõruda.

Bact. cloacae pistekultuurist valmistatud preparaadis esinevad lühikesed gram-negatiivsed kepikesed, peritrihhid. Nimetatud liik on fakultatiivne anaeroob, esineb taimedel, mullas, loomade seedekanalis ja sõnnikus. Silohoidlates esineb sileerimise esimestel päevadel, pidurdades piimhappebakterite arengut.

Bacterium proteus'e ehk Proteus vulgaris'e pistekülvist valmistatud preparaadis näeme mitmesuguse kujuga rakke, sest antud mikroobirakkude kuju on muutlik. Noortes kultuurides on ülekaalus väikesed liikuvad rakud, vanades esineb aga sageli kuni 10 korda pikemaid viburitega rakke. Bact. proteus esineb mullas, vees, samuti ka inimeste ja loomade seedetraktis. Bact. proteus on gram-negatiivne, energiline ammonifitseeriv fakultatiivne anaeroob.

Sarcina flava ehk kuld kollase sartsiiini joonkülvist valmistatud preparaadis on kokid suurte "pakenditena", milles esineb 64 ja rohkem kokki, mikroskopeerimisel näeme neid sagedasti 4-kaupa. Esineb taimedel, õhus, vees ja mullas.

Bacillus subtilis'e ehk heinakepikese joonkülvist val-



mistatud preparaadis näeme liikumisvõimelisi pulgakesi, mis sagedasti moodustavad ahelaid. Vanemates kultuurides esineb ka ümmargusi spoore. Heinakepike on ammonifitseeriv aeroob, esineb mullas, vees, loomsetel substraatidel ja taimedel, eriti heintaimedel.

Lakmuspiimasse külvatud Bact. coli ehk Escherichia coli kultuurist valmistatud preparaadis on näha ebakorrapärase asetusega lühikesi ümarate otstega pulgakesi kas ühekaupa või ahelatena. Kolibakter eritab aktiivselt keskkonda hapet ja gaasi, mistõttu lakmuspiim muutub konsistentsilt paksuks ja värvuselt punakaks. Esch. coli on gram-negatiivne, fakultatiivne aeroob, esineb soolekanalis, vees, mullas ja mujal.

Lakmuspiimasse külvatud Lactobacterium plantarum'i ehk Streptobacterium plantarum'i silobakteri rakud on liikumisvõimetud gram-positiivsed kepikesed, mis sagedasti moodustavad ahelaid. Happelises keskkonnas on silobakteri rakud märgatavalt pikemad tavalistest. Nad eritavad keskkonda hapet, mistõttu lakmuspiim värvub punaseks.

Piste- ja joonkülvide puhul jälgida ka kultuuritunnuseid.

Kultuuritunnuste uurimisel jälgida kultuuri iseloomu (üksikud kolooniad, kattekultuur), värvust, pinna iseloomu (jahujas, limajas, läikiv jne.), söötmes laiumist, ainete eritatavust (gaasid, pigmendid jne.), kolooniate vertikaalläbilõiget (joon. 15) ja servajoont (joon. 16).

### Mikroobide arvukuse määramine mullas, õhus ja vees

Mikroobide arvukuse määramise mitmesugused meetodid võimaldavad määrata I. elusate ja surnud rakkude summat (totaalarvestus) ja II. ainult elusate rakkude summat.

#### I. Totaalarvestus

##### A. Otsene loendus mikroskoobis

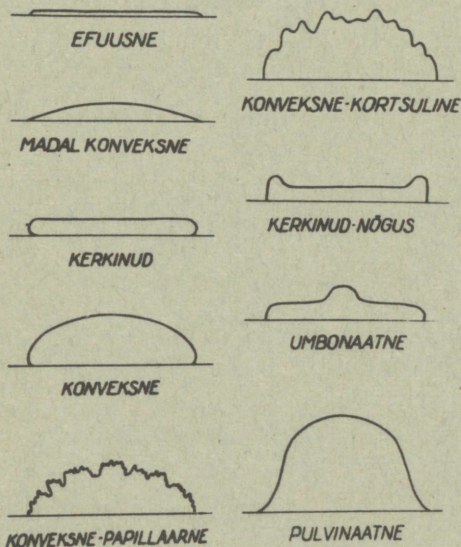
1. Värvitud preparaat alusklaasil
2. Wrighti meetod
3. Loenduskambri meetod

##### B. 1. Opatsiteedimeetod (nefelomeetriline, arvestab peale arvu ka raku suurust)

2. Üldlämmastiku määramise teel
3. Tsentrifugeerimise meetodil
4. Mitmesugused meetodid (tiitritav happesus, kaäl, refraktiivindeks jne.)

## II. Elusate rakkude arvestus

1. Piirlahjenduste meetod (McGrady, Greenwood)
2. Plaadimeetod.

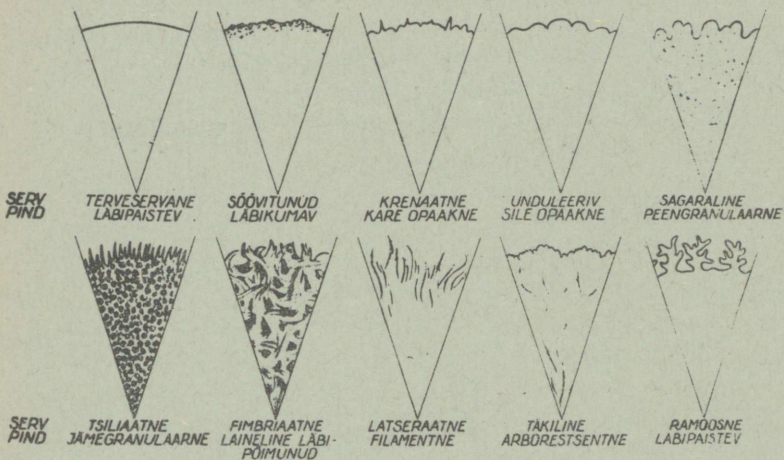


Joon. 15. Bakter-kolooniate verti-  
kaalläbilõige.

Mullakülv. Kui Petri tassil söötmeplaadil on kasvanud kuni 300 kolooniat, siis loendatakse kolooniate arv kas kogu tassil või Wolffhügeli kambri 10 ruudus. Iga loetud koloonia märgitakse tindi või tušiga (täpikene) Petri tassi kaanel, mis väldib kolooniate korduvat loendamist. Loendada võib varustamata silmaga, luubi või binokulaari abil. Ei ole soovitatav, et Petri tassil oleks kolooniate arv üle 300, sest siis on nende eristamine raske, saadud andmed pole usaldusväärsed. Kolooniate arvu (100 - 300) Petri tassil on võimalik regu-



leerida külviks kasutatava mullalahjenduse valikuga.



Joon. 16. Bakterkolooniade servajoon.

Wolffhügeli kambriks (joon. 17) nimetatakse 1 cm<sup>2</sup> suurus-  
teks ruutudeks jagatud mustale alusele paigutatud klaasplaati.  
Uuritav Petri tass paigutatakse põhjaga ülespoole aluse ja  
klaasplaadi vahele. Petri tassil loendatakse kolooniade arv  
vähemalt kümnes eraldi asuvas ruudus. Kolooniade üldarv arvu-  
tatakse järgmiselt. Kümnes ruudus loendatud kolooniade arv  
jagatakse 10-ga, millega saadakse keskmine kolooniade arv ühes  
ruudus. Kolooniade üldarv (X) kogu tassil leitakse võrrandi  
järgi  $X = n\pi r^2$ ,

$n$  - keskmine kolooniade arv 1 cm<sup>2</sup>-l;

$\pi = 3,14$ ;

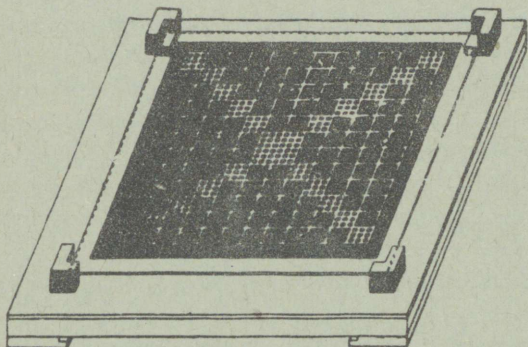
$r = 5$  (tassi raadiuse tavaline suurus).

Leitud kolooniade arv korrutatakse veel mullalahuse lahjen-  
dusega, mispuhul saadakse eluvõimeliste mikroobide arv 1 g  
mullas. Et mulla mikroobide arv väljendatakse tavaliselt  
1 g absoluutselt kuiva mulla kohta, siis tuleb korrutada veel  
koefitsiendiga K.

$$K = \frac{g}{g_1}$$

$g$  = mulla kaal  $g$ -des enne kuumutamist

$g_1$  = mulla kaal  $g$ -des pärast  $105^{\circ}\text{C}$  juures kuumutamist.



Joon.17.

Wolffhügeli kam-  
ber.

Õhukülvi puhul leitakse eespool kirjeldatud viisil kolooniate arv kogu söötmepladil. Õhukülvide puhul väljendatakse mikroobide arv  $1\text{ m}^3$  õhu kohta.

V. I. Omeljanski järgi on teada, et 5 minuti jooksul sadeneb  $100\text{ cm}^2$  suurusele söötmepladile ligikaudu samapalju mikroobe, kui neid on 10 l õhus. Nimetatud sõltuvuse põhjal võime arvutada mikroobide hulga  $1\text{ m}^3$  kohta.

$78,5\text{ cm}^2$ -l söötmepladil on 50 kolooniat,

$100,0\text{ cm}^2$ -l - " - -" - X - " -

$X = 50.000 : 785 = 64$

10 l õhus - 64 mikroobi

1000 l õhus - 6400 mikroobi.

Külvide puhul täheldatakse mikroobikolooniate struktuuris suurt mitmekesisust. Erinevused esinevad kolooniate suuruses, kujus, konsistentsis, värvuses, pinna iseloomus ja servajoones. Kolooniate vaatlemiseks kasutatakse binokulaarset luupi või mikroskoopi. Väikeste kolooniate läbimõõt võib olla vähem kui 1 mm, keskmistel kolooniatel 1-4 mm, kuna suurtel võib see olla 5 mm ja enam. Osa kolooniaid on värvusetud, teised aga värvilised, see sõltub mikroobide produtseeritud



pigmentidest. Jälgitakse kolooniate kultuuritunnuseid (kuju, servajoont, vertikaalläbilõiget ja struktuuri). Loetletud tunnuste määramisel kasutada jooniste 15 ja 16 abi.

Mikroobikolooniate kuju tardsöötmel peetakse igale liigile iseloomulikuks ning oluliseks tunnuseks nende identifitseerimisel.

Veekülvi puhul väljendatakse mikroobide arv 1 ml vee kohta. Et külvimäär oli 1 ml, siis Petri tassil loendatud kolooniate arv väljendabki mikroobide arvu 1 ml-s vees. Lahjendatud vee külvide puhul tuleb kolooniate arv korrutada lahjendusemääraga. Leitakse erinevate lahjendustega külvide aritmeetiline keskmine.

Vee puhtuse hindamisel kasutatakse Miquel'i koostatud tabelit.

|                  |             |                             |
|------------------|-------------|-----------------------------|
| 0 - 10 mikroobi  | 1 ml-s vees | - äärmiselt puhas           |
| 10 - 100         | " " "       | - väga puhas                |
| 100 - 1000       | " " "       | - puhas                     |
| 1000 - 10000     | " " "       | - keskmine                  |
| 10000 - 100000   | " " "       | - joogiks kõlbmatu          |
| 100000 ja rohkem | " " "       | - joogiks täiesti kõlbmatu. |

Järgnevalt tuuakse mikroobide arvu määramiseks eespool kirjeldamata, kuid sagedasti kasutatavate meetodite kirjeldus.

#### Mikroobirakkude loendamine suspensioonis.

Mikroobirakkude arvu määramiseks suspensioonis kasutatakse spetsiaalseid loenduskambreid (Gorjajevi jt.). Loenduskambrisse paigutatakse uuritav suspensioon ja loendatakse kambri ruudustikus näha olev mikroobirakkude arv (N).

$$N = \frac{1000 \cdot n}{a^2 \cdot T},$$

kus a - kambri ruudu pindala mm<sup>2</sup>-tes, Gorjajevi kambri väikese ruudu pindala on 0,0025 mm<sup>2</sup> ja suure ruudu pindala 0,04 mm<sup>2</sup>,

T - kambri sügavus mm-tes, Gorjajevi kambri puhul 0,1 mm,

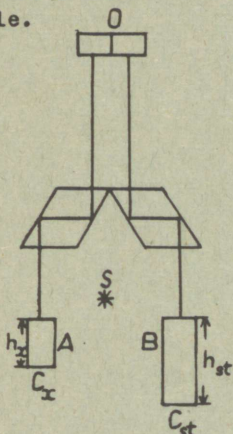
n - mikroobirakkude keskmine arv ühes ruudus.

Värvitud äigepreparaadis on võimalik mikroobide arvu määrata proportsionaalse loenduse abil Wrighti järgi. Äigepreparaadi valmistamisel segatakse uuritavat suspensiooni ja mehe verd võrdses koguses. Mehe normaalse vere punaliblede arv on suhteliselt konstantne, 5 miljonit ühes  $\text{mm}^3$ -s. Okulaarmikromeetri abil loendatakse mitmes vaateväljas kokku 500 punaliblet ja neile vastav arv mikroobe ning arvutatakse selle alusel mikroobide arv 1 ml-s suspensioonis.

Mikroobide arvu (massi) määramine suspensiooni hägususe abil.

Uuritavate mikroobide suspensiooni hägusust võrreldakse standardsuspensiooni hägususega, milles mikroobide arv on teada. Standardsuspensioone (bakterite teatud arvule vastavaid  $\text{BaSO}_4$ -lahuseid) toodavad ja väljastavad tsentraalsed mikrobioloogia instituudid. Viimasel ajal kasutatakse flintklaasist prisma. Täpsemalt kui standardampullide abil on võimalik määrata mikroobide arvu visuaalse ja elektrofotonefeloomeetri abil.

Visuaalse nefelomeetri ehitus sarnaneb visuaalse kolorimeetri ehitusega. Erinevus seisneb selles, et nefelomeetri puhul satub vaatleja silma ainult see osa pealelangeva valguse energiast, mis hajutatakse risti pealelangeva valguse suunale.



Joon. 18. Visuaalse nefelomeetri skeem.

Küvettidesse A ja B on asetatud uuritav lahus ja standardlahus. Valgusallika S poolt valgustatava lahuse samba kõrgus  $h$  on reguleeritav ning samba kõrgust loetakse nooniusse abil täpsusega kuni 0,1 mm.

Reguleerides valgustatavate sammaste kõrgust, saavutatakse olukord, et okulaaris on mõlemad väljad ühtlaselt valgustatud. Sel juhul valgustatavate sammaste kõrgus on pöörd-



võrdeline hajutatud valguse tugevusega

$$\frac{C_x}{C_{st}} = \frac{h_{st}}{h_x} .$$

Seega määratakse nefelomeetri abil sammaste kõrgused ja teades standardlahuse kontsentratsiooni, saame leida uuritava lahuse kontsentratsiooni.

Täpsed tulemused saadakse sel juhul, kui lahus ei ole väga hägune ja võrreldavad lahused erinevad oma kontsentratsioonilt vähe.

Tuleb silmas pida, et nefelomeetrilisel meetodil ei ole võimalik määrata rakkude arvu, vaid nende massi.

Peale visuaalse nefelomeetri kasutatakse mikroobide massi määramiseks fotoelektronefelomeetrit, mille kasutamise juhend asub aparaadi juures.

#### Mikroobide kaalumine

Tardsöötmele kasvavast puhaskultuurist võetakse külvinõelaga mikroobe ja asetatakse steriilsele uuriklaasile ning kaalutakse poolmikroanalüütilistel kaaludel vastav hulk ja suspendeeritakse kindlas hulgas vees. Sel puhul saadakse kindla tihedusega suspensioon.

Olgu tähendatud, et kõik ülalnimetatud mikroobide arvu määramise meetodid nõuavad väga täpset tehnikat, kuid annavad seejuures sagedasti ainult ligilähedasi tulemusi.

#### Piirlahjenduste meetod (McGrady)

Valmistatud lahjendustest (näiteks mullalahjendustest) tehakse väljakülvid katseklaasidesse vedelsöötmele (igast lahjendusest vähemalt 3 väljakülvi). Teatud aja jooksul jälgitakse kasvu esinemist katseklaasides. Mikroobide arv leitakse McGrady tabeli abil (lisa 1).

#### McGrady tabeli kasutamise näide

Katses esines 5 mullalahjendust. Igast lahjendusest teostati 3 väljakülvi katseklaasidesse.

|                    |   |   |   |   |    |
|--------------------|---|---|---|---|----|
| Lahjendused:       | 1 | 2 | 3 | 4 | 5  |
| Katseklaaside arv, |   |   |   |   |    |
| milles esineb      |   |   |   |   |    |
| bakterite kasv     | 3 | 3 | 1 | 1 | 0. |

Käesoleva näite puhul on karakterseks arvuks 311. McGrady tabelis vastab sellele tõenäoline arv 7,5. Järelikult ühes milliliitris teise lahjendusega katseklaasis on 7,5 bakterirakku, 1 g mullas vastavalt  $7,5 \times 100 = 750$  rakku.

Et mikroobide arv väljendatakse 1 g absoluutselt kuiva mulla kohta, siis tuleb korrutada veel koefitsiendiga K

$$K = \frac{g}{g_1}$$

g - mulla kaal g-des enne kuumutamist

g<sub>1</sub> - mulla kaal g-des pärast kuumutamist.

Karakterne arv on kolmekohaline. Esimeseks numbriks on see lahjendus, kus veel kõikidel paralleelsetel katseklaasidel esineb kasv - positiivne reaktsioon. Kaks järgnevat numbrit näitavad järgnevates lahjendustes esinevate positiivsete katseklaaside arvu. Kui aga esineb veel peale nende kolme lahjenduse mõnes järgnevas lahjenduses positiivse reaktsiooniga katseklaase, siis viimaste arv liidetakse kolmandale numbrile juurde (vt. Разумовская и др. 1960, lk. 91).

Olgu tähendatud, et eespool kirjeldatud mikroobide arvu määramise meetodid nõuavad väga täpset tehnikat, kuid annavad seejuures ainult ligilähedasi tulemusi.

### Puhaskultuuride isoleerimine.

Looduslikult esinevad mitmesugused mikroobid sagedasti üheaegselt koos paljude liikidega. Mikroobide identifitseerimiseks on laboratoorses praktikas tingimata vajalik isoleerida mikroobi puhaskultuur, s.t. eraldada vastavalt söötmel eri liigid.

Mikroobide puhaskultuuride isoleerimise meetodid jagatakse kahte rühma:

- 1) mehhaanilised meetodid, mille puhul eraldatakse mikroobide liike erinevate välistunnuste järgi,



- 2) bioloogilised meetodid, mis võimaldavad uuritavat mikroobi eraldada tema erinevate omaduste järgi. Esimesse rühma kuuluvad järgmised meetodid.

#### Külv Drigalski pahtli abil söötmeplaadile.

Petri tassis olevale tardsöötmele kantakse steriilse jahtunud külvinõela või -aasaga uuritav materjal. Sel puhul tõstetakse vasaku käega Petri tassi kaant niipalju, et külvinõel sisse mahub. Pärast seda hõõrutakse külvimaterjal tardsöötme pinnal steriilse ja täielikult jahutatud Drigalski pahtliga laiali. Seejuures avatakse vasaku käe pöidla ja esimese sõrmega Petri tass, parema käega viiakse Drigalski pahtel tardsöötme pinnale ja liigutatakse õrnalt, ilma sellele vajutamata ühes suunas edasi-tagasi. Samal ajal aga keeratakse vasaku käe kolmanda ja neljanda sõrmega Petri tassi põhja laual ringi. Nii hõõrutakse külvimaterjal laiali üle kogu söötme. Et osa külvimaterjali koos mikroobidega jääb pahtli külge, siis võib vajaduse korral sellega hõõruda ka teise ja kolmanda Petri tassi tardsöötme pinda. See on vajalik suure mikroobide sisaldusega külvimaterjali puhul. Inokuleeritud ja märgistatud Petri tassid asetatakse põhjaga ülespoole 24 tunniks termostaati 37°C juurde. Tulemuste arvestamisel lähtutakse sellest, et juba järgmiseks päevaks areneb igast eluvõimelisest mikroobist paljunemisel silmaga nähtav koloonia.

Järgmisel päeval võetakse termostaadist Petri tass ja asetatakse läbivalgustusseadmele või vertikaalselt vastu valgust, põhjaga enda poole ning tehakse vastavad vaatlused. Juhul, kui inokulum sai hästi laiali hõõrutud, siis näeme kogu söötme pinnal erineva ehitusega kolooniaid. Vaatluste tegemisel tuleb silmas pidada kolooniate kuju, värvust, servajoont ja suurust. Inokulumi puuduliku laialihõõrumise puhul võib näha tassi mõnedes osades erinevaid kolooniaid tihedalt koos limase katuna, samal ajal aga mõned söötme osad on steriilsed, ilma ühegi kolooniata.

Kui ühe pahtliga sama külvimaterjali puhul inokuleeriti järgemööda kolm Petri tassi, siis esimeses neist esineb kõige rohkem kolooniaid, mis asuvad tihedalt üksteise juures.

Teises tassis on kolooniaid vähem ja nad asuvad hõredamalt, kolmandas Petri tassis on aga kolooniaid veelgi vähem ja nad paiknevad hästi isoleeritult kogu söötme pinnal. Vaatlused tehakse kõigepealt varustamata silmaga, siis luubiga ja lõpuks mikroskoobiga.

Huvitav on teatav mikroob isoleerida looduslikust materjalist. Näiteks mullasuspensiooniga inokuleeritud ja termosta-  
teeritud Petri tassides märgitakse klaaspliiatsiga eraldi asetsevad mitmesugused kolooniad, milledest võetakse steriilse külvinõelaga materjal ja külvatakse eraldi lihapeptonagari-  
ga katseklaasidesse. Inokuleeritud katseklaasid asetatakse termostaati 37°C juurde.

Ühtlasi teostatakse kolooniate mikroskoobiline analüüs, kusjuures võrreldakse nende morfoloogilisi ja kultuurilisi omadusi. Selleks valmistatakse äigepreparaadid ja teostatakse ka Grami järgi värvimine. Sagedasti ei õnnestu selle meetodiga ühekordsel menetlusel saada puhaskultuure, sel puhul tuleb menetlust korrata. Puhaskultuuride saamiseks on soovitav rakendada ka selektiivsöötmeid.

#### Joonkülv söötmeplaadile.

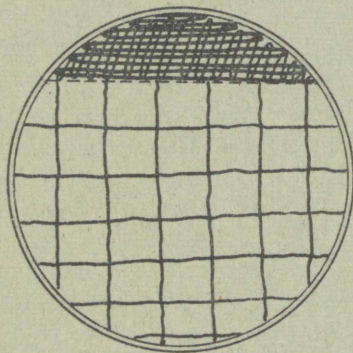
Petri tassilt eemaldatakse kaas ja vasaku käega võetakse lihapeptonagariga täidetud Petri tassi põhi ning hoitakse silmade kõrgusel vertikaalselt. Paremas käes oleva lapiti hoitud uuritava materjaliga külviaasa abil tõmmatakse ettevaatlikult söötme pinnale üksteisest vähemalt poole cm kaugusel asetsevad paralleelsed jooned. Esimestel paralleelsetel joontel on mikroobe palju rohkem kui viimastel joontel. Üksteisest isoleeritud kolooniaid leidub peamiselt viimastes joontes, kust tehakse edasikülvid eraldi söötmeile nii, nagu eespool kirjeldatud. Viimasel ajal kasutatakse seda meetodit praktiliselt harva.

#### Pinna hõõrumise meetod.

Võetakse tardsöötme Petri tass, millelt eemaldatakse kaas. Söötme Petri tassi põhi tõstetakse vertikaalses asendis silmade kõrgusele ja aasaga külvinõela abil kantakse uuri-



tav materjal söötmelale ning hõõrutakse  $\frac{1}{6}$  Petri tassi pinnal laiali. Pärast seda steriliseeritakse aasaga külvinõel leegis, jahutatakse ja tõmmatakse joon, külvinõel steriliseeritakse uuesti jne. Jooned on soovitatav tõmmata  $\frac{1}{2}$ -sentimeetriste vahedega. Kui ülalt alla on jooned tõmmatud, siis pööratakse Petri tassi põhi nii, et järgnevaid jooni oleks võimalik tõmmata eelmistega risti. Steriilse aasaga tõmmatakse jälle ülalt alla joon, steriliseeritakse uuesti aas ja tõmmatakse eelmisest joonest  $\frac{1}{2}$  cm kaugusele järgmine joon jne., kuni tassil on tekkinud külvi joontest ruudustik. Selle meetodi puhul õnnestub puhaskultuuri saada Petri tassi mõnes äärmises osas.



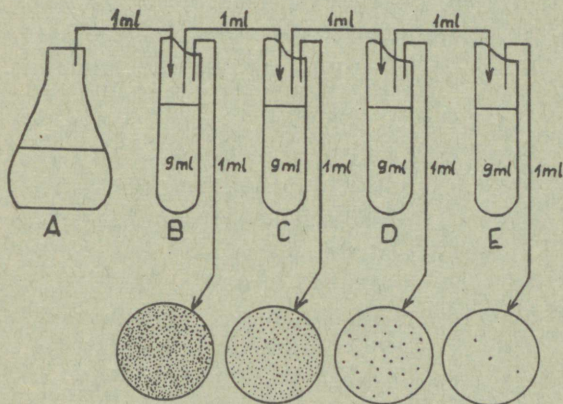
Joon. 18 a.

Puhaskultuuri saamine  
pinnahõõrumise meeto-  
dil.

### Lahjendusmeetod.

Lahjendusmeetodi teatud modifikatsioon (pour plate) leiab viimasel ajal üha laialdasemat kasutamist praktikas. Joonisel 19 on toodud lahjendusmeetodi skeem. Kolvis A on kolme mikroobiliigi, kokkide, batsillide ja spirillide segu. Sellest kolvist võetud vedeliku igas tilgas on kõiki segus esinevaid mikroobe palju. Kolvist A viiakse 1 ml järgmisse katseklaasi B, milles on 9 ml steriilset destilleeritud vett ja loksutatakse. Katseklaasis B on uuritavate mikroobide segu.

kontsentratsioon 10 korda nõrgem. Sellest katseklaasist viiakse 1 ml järgmisse katseklaasi C, milles on ka 9 ml steriilset vett. Katseklaasis C on jälle mikroobide kontsentratsioon 10 korda nõrgem kui katseklaasis B. Katseklaasist C kantakse 1 ml katseklaasi D jne., kuni saadakse küllalt madala kontsentratsiooniga suspensioon, millest tehakse tardsöötmele pealekülvl (0,1 ml) või sulatatud ja 45°C jahutatud samasse söötmesse sissekülvl (1 ml). Tardsöötmes ei saa mikroobid enam laiali minna, nagu see vedelsöötmes toimub, vaid jäävad samasse kohta ja moodustavad paljunemisel nähtavaid kolooniaid. Tekkinud kolooniaid kontrollitakse mikroskoobis ja nendest tehakse uued külvid selektiivsöötmetele, kuni saadakse puhaskultuur.



Joon 19.  
Lahjendusmeetodi skeem.

### Üherakukultuur.

Kindlamaks mikroobi puhaskultuuri saamise meetodiks on üherakukultuur. Sel puhul eraldatakse kultuurist üksainus mikroob ja külvatatakse vastavale söötmele ning lastakse sellel soodsates tingimustes paljuneda. Ühe raku eraldamiseks kasutatakse mitmesuguseid meetodeid. Enamlevinumateks on Burri tušimeetod ja mikromanipulaatorikapillaarmedod.



Bioloogilised meetodid puhaskultuuri saamiseks on järgmised.

### Aine kuumutamine.

Sporogeenseid mikroobe on võimalik eraldada asporogeensetest mikroobidest seetõttu, et spoorid taluvad pikemaajalist kuumutamist 80–100°C juures, kuna vegetatiivsed vormid sõltuvalt liigist surevad lühema või pikema aja jooksul juba 60°C juures. 80 (15–20 minutit) või 100°C (2–3 minutit) juures veevannis kuumutatud uuritav materjal annab edasikülvi puhul vaid sporogeensete mikroobide kasvu. Enne kuumutamist on soovitatav sporogeenne kultuur sundida sporolatsioonile.

### Isoleerimine selektiivse söötme abil.

Puhaskultuuri saamiseks kasutatakse sageli niisuguseid söötmeid, mis, sõltuvalt oma koostisest, võimaldavad ühtede mikroobiliikide kasvu ja pidurdavad tugevalt teiste liikide arenemist. Nimetatud söötmeid kasutatakse tavaliselt rikaistuskultuuride kasvatamiseks, kust omakorda tehakse ümberkülv mitmesugustele söötmetele.

### Inokuleerimine katseloomadele.

Teatud patogeensete mikroobiliikide puhaskultuure on võimalik saada nende suhtes vastuvõtlikkude katseloomade inokuleerimisel uuritava materjaliga. Selleks süstitakse uuritav materjal katseloomasse, kus patogeenne mikroob paljuneb kõige kiiremini ja sageli peaaegu puhaskultuurina. Inokuleeritud looma verest tehakse väljakülv vastavale söötmele, kust toimub puhaskultuuri isoleerimine eespool kirjeldatud viisil.

### Elusate ja surnud rakkude arvu määramine.

Meetod põhineb värvilahuste erineval läbitungivusel elusate ja surnud rakkude protoplasmast.

Alusklaasile valmistatud äigepreparaadile asetatakse üks tilk 0,02% metüleensiniselahust. Surnud rakud värvuvad 5–6 minuti jooksul siniseks, elusad rakud aga jäävad värvetuks. Loetakse mikroskoobis surnud ja elusrakkude arv ning arvutatakse nende %.

Paremaid tulemusi saadakse luminestseeruvate värvide nagu akridiinoranži kasutamisel.

## T ö ö ü l e s a n d e d

1. Valmistada eelmisel praktikumil tehtud joon- ja pistekultuurist preparaadid, värvida Ziehli karboolfuksiiniga ja Grami järgi ning jälgida nende kultuuritunnuseid. Peale selle määrata ühes kultuuris elusate ja surnud rakkude arv.
2. Valmistada preparaadid lakmuspiimale tehtud kultuuridest, värvida ja jälgida lakmuspiima värvust, konsistentsi ja gaasi eraldumist.
3. Loendada mikroobide arv mullakultuuris ja väljendada 1 g abosoluutselt kuiva mulla kohta.
4. Loendada mikroobide arv õhukultuuris ja väljendada Omeljanski järgi 1 m<sup>3</sup> õhu kohta.
5. Uurida kolooniate struktuuri õhukultuurides binokulaarmikroskoobiga.
6. Loendada mikroobide arv veekultuuris ja väljendada vee puhtus Miqueli järgi.
7. Määrata kolitiiter ja koliindeks.
8. Eraldada õhukultuurist üks mikroobivorm puhaskultuuri edasikülvamise teel lihaeptoonagarile.



# VIII ja IX praktikum

## T e e m a: BIOOSI RÜHMA AINETE MÄÄRAMINE PÄRMSEENTE ABIL.

Bioosi rühma ainete (B-grupi vitamiinid, pantoteenhape jt.) määramiseks võib kasutada põhjapärmide hulka kuuluvaid õllepärmes. Õllepärm eraldatakse humalateta lahjendatud õlle- virdest. Enne külvi kasvatatakse pärmi 12 tunni jooksul sünteetilisel toitelahusel. Viimane koosneb orgaanilistest ja mineraalsetest ainetest, kuid ei sisalda bioosi rühma kasvu- aineid, mistõttu pärmseened selles söötmes ei paljune. Sel- leks kasutatakse järgmise koosseisuga toitelahust

|                                                            |         |
|------------------------------------------------------------|---------|
| glükoos (väga puhas) .....                                 | 50 g    |
| $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .....                             | 1,6 g   |
| $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ ..... | 0,5 g   |
| $\text{NaCl}$ .....                                        | 0,5 g   |
| $\text{K}_2\text{HPO}_4$ .....                             | 0,3 g   |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ .....           | 1,0 g   |
| $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .....                         | 2,0 g   |
| $\text{CaCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ .....           | 0,5 g   |
| $\text{H}_3\text{BO}_3$ .....                              | 0,002 g |
| $\text{ZnSO}_4$ .....                                      | 0,002 g |
| $\text{MnSO}_4$ .....                                      | 0,002 g |
| $\text{FeCl}_3$ .....                                      | 0,002 g |
| Destilleeritud vesi .....                                  | 1000 ml |

Toitelahus steriliseeritakse kolmel päeval 30 minutit Kochi sterilisaatoris või 20 min. 1/2 atm juures autoklaavis.

Steriliseerimise ajal valmistatakse bioosi ekstrakt. Sel- leks võetakse 10 g taimset materjali, mis kääridega peenenda- takse väikesteks tükikesteks. Purustatud materjal asetatakse Erlenmeyeri kolbi ja sellele lisatakse 200 ml destilleeritud vett. Ekstraheerimine teostatakse veevannil 70°C juures 1 tun- ni kestel. Kolb varustatakse kas klaaskapillaaridega või vatt- korgiga. Ekspositsioonaja vältel loksutatakse kolbi mitu kor- da. Õhukuivast materjalist määramise puhul võetakse 1 g ras- kune kaalutis, mida ekstraheeritakse 70 ml-s destilleeritud vees.

50 ml-le eespool valmistatud toitelahusele lisatakse 1-5 ml ekstrakti. Ühte kontrollkolbi mõõdetakse 50 ml **kraanivett** ja lisatakse 1 - 5 ml ekstrakti. Teise kontrollkolbi mõõdetakse 50 ml söödet, kuid ei lisata ekstrakti. Kõik kolbid steriliseeritakse 20 minutit autoklaavis 0,5 atm juures.

Pärmikultuuri külv teostatakse kohe pärast lahuse jahtumist.

Uhtlase tihedusega suspensiooni saamiseks loksutatakse külvatavat **pärmilahust** 2/3 tundi. **Paraja** tihedusega suspensiooni saamiseks lahjendatakse viimast steriilse **kraaniveega seni, kuni 1 ml-s lahuses esineb ca 20.000** rakku. Rakkude arv määratakse Gorjajevi loenduskambri abil.

Pärast seda lisatakse kolbidesse 1 tilk valmistatud suspensiooni. Kui külvi soovitakse teostada aasaga külvinõela abil, siis peab suspensioonis rakkude arv olema suurem - ca 200.000 ml-s. Pärast külvi loksutatakse kolbe hästi ja asetatakse termostaati 28°C juurde 48 tunniks. Ühe päeva möödumisel loksutatakse kolbe. Katse lõpetamisel määratakse **pärmiseente** paljunemistfaktor mitmel viisil:

- 1) tsentrifugeerimise teel (gradueeritud klaasides),
- 2) filtreerimise ja kuivkaalu määramise teel  
(kuivkaalu määramine toimub 2 tunni jooksul 105°C juures),
- 3) hägususe määramisega nefelomeetri abil,
- 4) loenduskambris loendamise teel, mispuhul rakkude arv väljendatakse 1 ml kohta.

Et rahvamajanduse seisukohalt ei ole tähtis ainult pärmrakkude arv, vaid ka nende mass, siis on vajalik mõõta erinevates katsevariantides rakkude keskmine pikkus ja laius. Sel juhul, kui erinevates katsevariantides on rakkude mõõtmed enam-vähem võrdsed, võib toodangu üle otsustada ainult rakkude arvu põhjal. Kui aga rakkude keskmised mõõtmed erinevad, tuleb arvutada nende ruumala järgmise valemi abil

$$f = a \cdot b^2 \cdot n$$



- a - ellipsoidi pool pikkust
- b - " - pool laiust
- n - rakkude arv 1 ml-s
- f - paljunemistfaktor

$$f = \frac{\text{pärmseente hulk katsekolvis}}{\text{pärmseente hulk kontrollkolvis}}$$

Katse tehakse kolmes korduses. Vajaduse korral võib katse kesta ka 4-5 päeva.

Bioosi rühma ainete hulga määramiseks koostatakse graafik.

Graafiku koostamine toimub järgmiselt. Võetakse 10 g õllepäarmi ja ekstraheeritakse 50 ml destilleeritud veega eespool kirjeldatud viisil. Pärast ekstraheerimist tsentrifugeeritakse lahus ja 1 ml läbipaistvat ekstrakti lisatakse 50 ml eespool valmistatud sünteetilisele toitelahusele. Ülejäänud ekstraktist lahjendatakse üks osa 10 korda, teine osa 100 ja kolmas osa 1000 korda, igast lahjendusest lisatakse 1 ml 50 ml-le toitelahusele. Pärast seda teostatakse kõikidele katsekolbidele väljakülv võrdse hulga pärmseentega. Külvid asetatakse termostaati 28°C juurde 48 tunniks. Peale selle määratakse pärmseente hulk. Saadud andmete alusel koostatakse graafik, mille alusel võime otsustada mitmesuguste objektide bioosi rühma ainete sisalduse üle.

#### VIII p r a k t i k u m i t ö ö ü l e s - a n d e d

1. Valmistada taimелеhtedest või pungadest bioosi ekstrakt.
2. Valmistada külviks sobiva tihedusega õllepäarmi suspensioon (200.000 rakku ml-s).
3. Ette valmistada katse- ja kontrollkolvid ning nendesse teha külv aasaga külvinoela abil.
4. Katseobjektide bioosirühma ainete sisalduse määramiseks graafiku alusel, teha viimase koostamiseks metoodikas antud lahjendused ja külvid.

## IX praktikumi tööüles- anded

1. Määrata katse- ja kontrollkolbides pärmseente sisaldus tsentrifugeerimisel, filtreerimisel, nefelomeetrimise teel ja lugemiskambris loendamise teel.
2. Mõõta katse- ja kontrollkolvis ca 10 pärmseene pikkus ja laius ning arvutada nende ruumala.
3. Määrata pärmseente paljunemiskordaja.
4. Määrata graafiku koostamiseks tehtud külvides pärmseente arv lugemiskambri abil ja joonistada saadud andmete põhjal graafik.



## X p r a k t i k u m

### T e e m a: SUHKRUTE MÄÄRAMINE PABERKROMATOGRAAFILISELT MIKROORGANISMIDE TOITEKESKKONNAST

Nii mikrobioloogilises uurimistöös kui ka mikrobioloogilistele protsessidele rajatud tööstustes on sagedasti vaja teada, kui suurel hulgal kasutavad mikroobid toitekeskkonnast üht või teist ainet. Näiteks pagari- ja söödapärmitehases huvitab meid pärmseente võime kasutada mitmesuguseid suhkruid ja nende kasutamise intensiivsus. Nimetatud tööstustes kasutatakse pärmi tootmiseks sagedasti suhkru- ja tselluloositööstuse jäätmeid. Rahvamajanduse huvides tuleks pärmitehastes kasutada intensiivsema suhkrute kasutamise võimega tüvesid.

Mikroobide poolt toitekeskkonnast kasutamata jäänud ainete paberchromatograafiline määramine lubab otsustada uuritavate ainete kasutamisevõime ja -intensiivsuse üle.

Kromatograafiline meetod, mille võttis kasutusele M. S. Tsvett, võimaldab uuritavas toitekeskkonnas määrata nii suhkrute koostist kui ka nende hulka.

Meetodi põhimõte seisneb selles, et liikuvfaas, lahusti (käesolevas töös butanool) liigub mööda kromatograafilise paberi riba ja kannab endaga suhkrud. Mitmesugused suhkrud liiguvad sama aja jooksul starditäpist erinevale kaugusele.

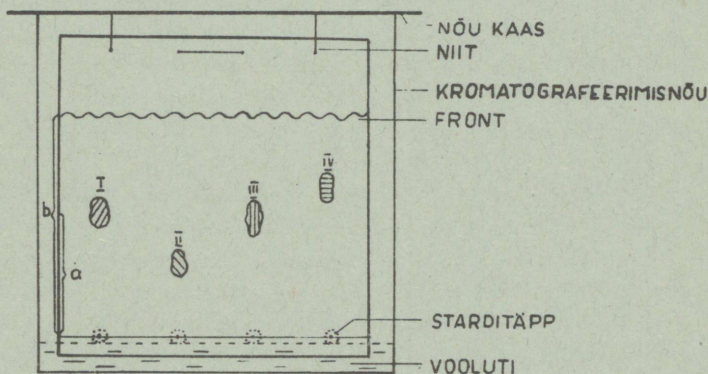
Pärast voolutamist linnid kuivatatakse ja piserdatakse p-aminofenoolilmutiga. Mitmesugused suhkrud annavad erineva värvusega laigud.

Ainete jaotuvus kromatograafilisel meetodil ei sõltu adsorptsioonist, sest puhas filterpaber praktiliselt ei adsorbeeri suhkruid, vaid peamiselt sõltub suhkrute jaotuvusest orgaanilise vooluti (butanooli) ja vee vahel. Õhukuiva kromatograafilise paberi niiskusesisaldus on keskmiselt 25%, mistõttu ta esineb kui vedel liikumatu - statsionaarne faas.

Igale suhkrule on iseloomulik temale omane jaotuvuskoeffitsient ( $R_f$ ).

$$R_f = \frac{\text{aine laigu keskkoha kaugus stardipunktist}}{\text{vooluti frondi kaugus stardipunktist}}$$

Selle või teise suhkru Rf sõltub peaaegu kõigist režiimifaktoreist, eriti aga butanoolis ja vees lahustuvuse suhtest ning temperatuurist. Katsed viiakse läbi konstantse temperatuuriga termostaadis.



I-IV - KROMATOGRAFEERIMISEL ERALDUNUD  
AINETE LAIGUD

Joon. 20. Kromatografeerimise skeem.

Mida rohkem lahustub suhkur butanoolis, seda kaugemale liigub ta starditäpist ja asetub lähemale vooluti frondile. Mida rohkem lahustub suhkur kromatograafilises paberis sisalduvas vees, seda lähemale jääb ta starditäpile ja kaugemale vooluti frondist, seda väiksem on tema Rf.

Paberjaotuvuskromatograafilist meetodit kasutatakse peale suhkrute veel rea teiste ainete määramiseks. Selle meetodi eelis võrreldes keemiliste määramismeetoditega seisneb selles, et ta võimaldab uurida väga väikesi suhkrute ja teiste ainete hulki, isegi mikrogrammides esinevaid ainete hulki.

Määramise käik:

1) Võetakse 4-5 ml söödet ja tsentrifugeeritakse (2000 pööret minutis) kümne minuti jooksul. Läbipaistev tsentrifugaat va-



latakse 100 ml-sse Erlenmeyeri kolbi või keeduklaasi.

2) Tsentrifugaadile lisatakse valkude sadestamiseks 10% -

Pb (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> kuni sademe tekkimine katkeb.

3) Tekkinud sade eraldatakse tsentrifuugimise teel.

4) Pb(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> liia kõrvaldamiseks lisatakse küllastatud (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-lahust kuni sademe tekkimine katkeb.

5) Tekkinud sade eraldatakse tsentrifuugimise teel.

6) Läbipaistev tsentrifugaat tihendatakse (kuumutatakse veevannil kuni 1-2 ml-ni).

7) Tihendatud filtraadile lisatakse antiseptikumina paar tilka tümooli.

Kromatograafilise paberi ühte otsa aetakse mitme pistega niit. Paberi teise otsa, 2-3 cm kaugusele äärest tõmmatakse joon ja märgitakse grafiitpliiatsiga 2-4 mm diameetriga ringid proovide pealekandmiseks.

Kromatograafilisele paberile "kiire" kantakse ringide keskele 0,05 ja 0,1 ml uuritavat proovi osade kaupa ja kuivatatakse fööni või ventilaatori abil (viimane kogus sobib hästi, kui hiljem on kavas elueerimine) ja sama suures koguses 0,2% märklahuseid (sahharoos, fruktoos, glükoos, arabiin, galaktoos, ksüloos).

Kromatografeerimise kambrisse valatakse solventi: n-butanool: jää-äädikhape : vesi (5 : 1 : 2). Valada tuleb ettevaatlikult, nii et solvent ei satuks kambri seintele.

Solvendi valmistamisel lisatakse jaotuslehttris butanoolile vesi ja äädikhape ning loksutatakse 1/2 tundi. Kasutatakse lahuse ülemist fraktsiooni.

Kromatograafiline paber võetakse niitide abil vasakusse kätte ja asetatakse kambrisse nii, et alumine serv ulatuks solvendi sisse. Niidi otsad kinnitatakse kambri äärte külge plastiliini abil ja voolutamiskamber suletakse klaasiga. Paber asetatakse kambri keskele, alumine serv võib ulatuda 1-2 mm voolutisse.

Kromatogramme voolutatakse parema jaotuvuse saavutamiseks kolm korda 20-24 tundi. Iga voolutamise järel kromatogrammid kuivatatakse.

Kromatogrammi ilmutamiseks kasutatakse p-aminofenool-ilmutit ( 1 g p-aminofenoolile lisatakse uhmris 2 ml ortofosforhapet ja osade kaupa 60 ml 96% etanooli). Ilmutamine toimub pulverisaatori abil. Pärast pritsimist asetatakse kromatogramm 5-7 minutiks 105°C juurde. Selle aja jooksul laigud "ilmuvad".

Kasutatud ilmuti puhul värvuvad suhkrud järgmiselt.

|           |                  |
|-----------|------------------|
| fruktoos  | - sidrunkollane  |
| glükoos   | - keskmine pruun |
| galaktoos |                  |
| ksüloos   | - punakaspruun   |
| arabinoos |                  |
| sahharoos |                  |
| maltoos   | - kollakaspruun  |
| rafinoos  |                  |

Määratakse ilmunud suhkrute Rf.

#### T ö ö ü l e s a n d e d

1. Valmistada söödapärmitehases kasutatava meski suhkrute kromatogramm.
2. Valmistada söödapäarmi tootmiseks kasutatava Candida utilis'e 3 päeva vanusest (meski) kultuurist suhkrute kromatogramm.



## XI p r a k t i k u m

### T e e m a: ANTIBIOOTIKUMIDE BAKTERIOSTAATILINE TOIME MIKROOBIDELE. ANTIBIOOTIKUMIDE KROMATOGRAAFILINE ERALDAMINE JA KROMATOGRAMMI BIOLOOGILINE ILMUTAMINE

Antibiootikumideks nimetatakse bioloogilisi või nende eeskujul saadud sünteetilisi preparaate, mis pidurdavad teatud mikroobide ainevahetust ja kasvu või mõjuvad neile surmavalt. Antibiootilisi aineid kui vahendeid võitluses olemasolu eest produtseerivad seened, aktinomütseedid ja ka bakterid, kes kuuluvad põhiliselt mulla mikrofloorasse. Antibiootilisi aineid produtseerivad ka kõrgemad taimed, samuti on tuntud loomse päritoluga antibiootikumid. Mõningaid antibiootikume (penitsilliin, streptomütsiin, levomütsiin, biomütsiin, terramütsiin jt.) iseloomustab väga tugev toime teatavatele mikroobidele vähese kahjustava toime juures inimorganismile, mistõttu kasutatakse neid laialdaselt haigete ravimisel.

Antibiootikumid on valikulise toimega. Nad võivad olevalt kontsentratsioonist avaldada mikroobidele nii bakteriostaatilist kui ka bakteriotsiidset toimet. Näiteks penitsilliin madalas kontsentratsioonis avaldab teatud mikroobidele bakteriostaatilist toimet, kõrges kontsentratsioonis aga bakteriotsiidset toimet. Bakteriostaatilise toime all mõistetakse kasvu pärssimist, mispuhul mõjustatakse mitmesuguseid mikroobirakule elulise tähtsusega fermentsüsteeme. Igale antibiootilisele preparaadile on omane kindel toitemehhanism, mille aluseks on mõju teatud kindlale mikroobiraku fermentsüsteemile. Üksikute mikroobiliikide fermentsüsteemide vahel esineb aga erinevusi. Sellest tingituna toimib antibiootiline preparaat ainult teatud kindlatele mikroobigruppidele, s.t. on kindla toimespektriga.

Erinev on ka sama mikroobiliigi üksiktüvede tundlikkus teatud antibiootikumi suhtes. See tundlikkus võib muutuda vastava ravi vältel, kusjuures võivad kujuneda isegi nn. resistentsed tüved, mis ei allu enam antud antibiootikumi toimele. Resistentsus antibiootilise preparaadi suhtes on spet-

siifiline - see tähendab, et näiteks streptomütsiiniravi väl-  
tel areneb haigusetekitajal ainult streptomütsiiniresistent-  
sus, kusjuures säilib tundlikkus teiste antibiootikumide suh-  
tes.

Haigusetekitajate tundlikkuse määramine antibiootiliste  
preparaatide suhtes on väga tähtis kliinikus, võimaldades ra-  
kendada ratsionaalset ravi. Selleks kasutatakse mitmesuguseid  
meetodeid. Diagnoose teostavates laboratooriumides on  
levinumaks meetodiks mikroobide penitsilliini-, streptomütsii-  
ni-, levomütsiini- ja biomütsiinitundlikkuse määramine vasta-  
vate antibiootikumidega immutatud diagnostiliste paberketaste-  
ga. Selliseid kettaid toodetakse farmaatsiatööstuses. Nende  
kasutamise meetodika on järgmine.

1) Uuritavast mikroobitüvest tehakse tihe külv lihapep-  
toonagarplaadile. Petri tass jagatakse klaasipliatsiga 4  
sektoriks. Iga sektori keskele söötme pinnale asetatakse pint-  
setiga üks diagnostiline ketas - ühele penitsilliiniga, tei-  
sele streptomütsiiniga, kolmandale levomütsiiniga ja neljan-  
dale biomütsiiniga. Kui erinevate antibiootikumidega immuta-  
tud kettad on sama värvusega, tuleb sektorid märkida. Inoku-  
lum paigutatakse 18 tunniks termostaati 37°C juurde.

2) Antibiootilised preparaadid difundeeruvad kettaist  
söötmesse, pärssides neile vastava antibiootikumi suhtes tund-  
like mikroobide kasvu. Selle tulemusena jääb vastava ketta  
ümber kasvuvaba tsoon, mille läbimõõt võimaldab hinnata uuri-  
tava mikroobi tundlikkust antud antibiootikumi suhtes.

Kasvuvaba tsooni läbimõõt (koos ketta enda läbimõöduga)  
mõõdetakse joonlauaga. Sellest läbimõõdust olenevalt hinnatakse  
mikroobi tundlikkust järgmiselt:

kasvuvaba tsooni läbimõõt üle 25 mm - uuritav mikroob on  
antud antibiootikumi suhtes väga tundlik (+++);

kasvuvaba tsooni läbimõõt 15-25 mm - uuritav mikroob on  
antud antibiootikumi suhtes tundlik (++);

kasvuvaba tsooni läbimõõt kuni 15 mm - uuritav mikroob on  
antud antibiootikumi suhtes vähetundlik (+);

kasvuvaba tsoon puudub - uuritav mikroob pole antud anti-  
biootikumi suhtes tundlik, s.t. on antud antibiootikumi suh-  
tes resistentne.



## Antibiootikumide kromatograafilise eraldamine.

Antibiootikumide produtseerijaina kasutatakse käesoleval juhul aktinomütseete, mille arenemine ja antibiootikumide moodustamine toimub intensiivselt sobiva koostisega vedelsöötmes 28°C juures heades aeratsioonitingimustes.

Valmistatakse kaks järgmise koostisega söödet, mille pH peab olema 7,2.

### Sööde I

|                             |        |
|-----------------------------|--------|
| 1) Glükoos                  | 2%     |
| 2) $\text{KNO}_3$           | 0,3%   |
| 3) $\text{K}_2\text{HPO}_4$ | 0,05%  |
| 4) $\text{MgSO}_4$          | 0,05%  |
| 5) NaCl                     | 0,05%  |
| 6) $\text{FeSO}_4$          | 0,005% |
| 7) Hothingeri buljong       | 2%     |

### Sööde II

|                             |        |
|-----------------------------|--------|
| 1) Glükoos                  | 2%     |
| 2) $\text{KNO}_3$           | 0,35%  |
| 3) $\text{K}_2\text{HPO}_4$ | 0,05%  |
| 4) $\text{MgSO}_4$          | 0,05%  |
| 5) NaCl                     | 0,05%  |
| 6) $\text{FeSO}_4$          | 0,005% |
| 7) Maisiekstrakt            | 0,5%   |

Valmistatud söötmed viiakse 100 ml kaupa laia põhjaga kolbidesse ning steriliseeritakse autoklaavis 20 minutit 0,5 atm juures. Pärast seda tehakse külv 2 ööpäeva vanusest aktinomütseetide õhumütseeliga vedelkultuurist.

Kolvid asetatakse külviboksis (28°C) asuvale loksutajale üheks nädalaks parema õhustatavuse huvides. Võimaluse korral on soovitatav kasutada õhu läbipuhumist.

Pärast seda valatakse ühe ja sama aktinomütseedi liigiga infitseeritud kultuurivedelikud kokku ja mütseelid eraldatakse filtreerimise või tsentrifugeerimise teel. Saadud kultuurivedelik hapustatakse 30% fosforhappelahusega kuni pH 5-ni. Fosforhappe lisamine toimub ettevaatlikult, kusjuures happesust kontrollitakse pidevalt universaalindikaatoritega. Kultuurivedelikus olev antibiootikum langeb sademesse, mis eraldatakse 15-minutilisel tsentrifugeerimisel (1500 pööret minutis). Saadud antibiootikumi määrtule sademele valatakse mõni ml veega küllastatud butanooli.

Tsentrifugeerimisel eraldatud mütseelid asetatakse keeduklaasi ja lisatakse veega küllastatud butanooli (üks mahuosa butanooli ühe mahuosa mütseeli kohta) ning jäetakse üheks ööpäevaks toatemperatuuri juurde seisma. Butanooli mõjul tõi-

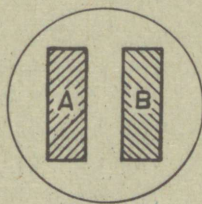
mub mütseelidest antibiootikumi ekstraheerimine. Pärast seda valatakse kokku kultuurivedelikust sadestatud ja mütseelidest ekstraheeritua antibiootikum, mida nimetatakse toor- ehk puhastamata antibiootikumiks. Viimast on võimalik puhastada kromatograafilise meetodi abil. Igal antibiootikumil või antibiootikumide grupil on teatud voolutis kindel jaotuvuskoeffitsient (Rf). Uuritava antibiootikumi Rf määramine konstant-ses režiimis võimaldab teatud määral selle omaduste võrdlemist kirjanduse andmetega.

Kromatografeerimine. Kromatograafilisele paberile "Kiire" kantakse mikropipetiga tilkhaaval 10 tilka uuritavat vedelikku. Igal paberile kantud tilgal lastakse õhus kuivada, alles siis kantakse järgmine tilk.

Kromatogramm asetatakse 6 tunniks veega küllastatud butanooli voolutisse (100 ml butanooli + 25 ml vett asetatakse jaotuslehtrisse, loksutatakse. Voolutina kasutatakse pealmist faasi). Pärast seda kuivatatakse kromatogramm tõmbekapis.

#### Kromatogrammi bioloogiline ilmutamine.

Kromatogramm lõigatakse ülalt alla ribadeks ja asetatakse Petri tassi toiteagari (5% pestud agarit + 0,5% glükocosi) pinnal olevale testorganismide tihedale külville. Petri tassid asetatakse ööpäevaks termostaati. Antibiootikumi lai-gu kohal ei saa testorganismid kasvada, sinna jääb steriilne laik, mille alusel arvutatakse uuritava antibiootikumi Rf.



Joon. 21. Antibiooti-kumide bioloogiline ilmutamine.



## T ö ö ü l e s a n d e d

1. Teha külv Petri tassidesse Staphylococcus aureus'e, Escherichia coli, Proteus vulgaris'e ja Pseudomonas aeruginosa kultuuride penitsilliini-, streptomütsiini-, levomütsetiini-, biomütsiini- ja terramütsiinitundlikkuse määramiseks diagnostiliste ketaste abil.
2. Eraldada aktinomütseetide kultuurivedelikust nn. toorantibiootikum tsentrifugeerimise teel.
3. Kultuurivedelikust saadud antibiootikum puhastada kromatograafiliselt (valmistada kromatogramm).
4. Ilmutada eelmisel praktikumil valmistatud suhkrute kromatogrammid p-aminofenoolilmutiga.
5. Võrrelda alg- ja kultuurivedeliku kromatogrammide vastavate laikude suurust ja värvuse intensiivsust, mille alusel otsustada Candida utilis'e mitmesuguste suhkrute kasutamise võime üle.

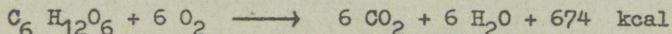
## XII p r a k t i k u m

### T e e m a : LÄMMASTIKUTA AINETE MUUTUMINE MIKROORGANISMIDE ELUTEGEVUSE TAGAJÄRJEL

Looduses toimub lakkamatult mitmesuguste ainete - süsiniku, lämmastiku, fosfori, väevli, raua ja teiste ringlus mikroobide kaasabil, mistõttu nende ainete varud on looduses ammendamatud.

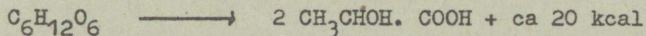
Mikroobide abil teostuvad orgaanilise aine dissimilatsiooniprotsessid jagatakse kolme tüüpi.

I. Hingamistüüp. Dissimilatsiooni selle tüübi puhul toimub süsiniku aatomite aheliku astmeline aeroobne lagundamine, kusjuures vabaneb suhteliselt palju energiat



II. Otsene hapendamistüüp. Sel puhul ei lagune hapendatavas aines süsinikuaatomite ahelik. Orgaanilise aine hapendamine toimub aeroobsetes tingimustes õhuhapniku osavõtul. Orgaanilise aine otsest hapendamist õhuhapniku abil nimetatakse oksüdatiivseks e. oksübiontiliseks "käärimiseks".

III. Käärimistüüp. Lagundatavas orgaanilises aines toimub süsinikuaatomite aheliku anaeroobne lagundamine. Üks osa orgaanilisest ainest hapendub, teine osa taandub, seega on tegemist redoksprotsessiga



Käärimise puhul muudetakse lähteaine, näiteks glükoos, mitmesuguste mikroorganismide tegevuse tulemusena erinevateks lõpp-produktideks.

Vastavalt käärimise kemismile ja lõpp-produktidele jaotatakse eriti bakteriaalsed käärimised reaks tüüpideks, millest iseloomulikemaks võib pidada piimhappelisi ja võihappelisi käärimisi, samuti eeskätt pärmseente poolt läbiviidud etüülalkoholkäärimist.

Missuguse tüübi järgi käärimine toimub, oleneb mikroobide fermentüsteemist, keskkonnatingimustest (temp., pH) ja kääritatava aine omadustest.



## Piimhappelist käärimist põhjustavate mikroobide uurimine.

Piimhappelise käärimise tavaliseks substraadiks on piimasuhkur, mille molekul lõhustub mikroobide fermentide toimel piimhappeks, kusjuures piimast sadestub kaseiin.

Tuntumaid piimhappebaktereid on gram-positiivsed Streptococcus lactis, Lactobacillus bulgaricus, L. plantarum jt.

Piimhappebakterid võtavad osa ka mitmesugustest majapidamises toimuvatest käärimisprotsessidest, nagu see esineb taigna kerkimisel, kapsaste hapendamisel, juustu valmistamisel, sileerimisel jm.

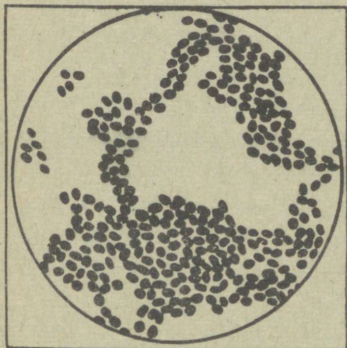
Piimhappelist käärimist põhjustavate bakterite tundmaõppimiseks asetatakse piim vattkorgiga suletud Erlenmeyeri kolviga 5-6 päevaks termostaati 30°C juurde. Selle aja jooksul muutub piim temas leiduvate piimhappebakterite elutegevuse toimel hapuks. Klaaspulgaga võetakse üks tilk vadakut (leent) ja pannakse alusklaasile veetilka ning aetakse laiali. Preparaadil lastakse õhu käes kuivada. Kuivale preparaadile lisatakse üheks minutiks paar tilka fiksaatorit (etanooli-eetri segu, vahekorras 1 : 1). Fiksaator surmab mikroobid, kinnitab nad alusklaasile ja vabastab preparaadi rasvatilkadest, mis segavad mikroskoopimist. Pärast fiksaatori ärakallamist asetatakse preparaadile pesemise eesmärgil mõni tilk vett, mis peatselt samuti ära kallatakse. Preparaat värvitakse metüleensinise 5 min. jooksul ja vaadatakse mikroskoobis tugeva suurendusega.

Preparaadis on näha mitmesuguse kujuga mikroobe:

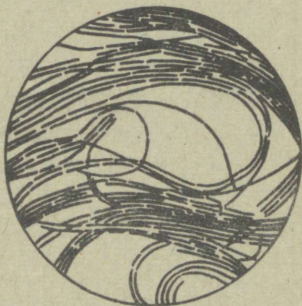
- 1) väikesed ovaalsed rakud, sageli lühikeste ahelatena (Streptococcus lactis); (joon.22).
- 2) pikad kepikesed (Lactobacterium bulgaricum) (joon.23)
- 3) suured ovaalsed rakud (Saccharomyces fragilis)
- 4) jämedad lühikesed kepikesed (Oidium lactis) (joon.24)

Kolm esimest põhjustavad piima hapnemist, neljas aga on nende antagonist, keskkonna leelistaja.

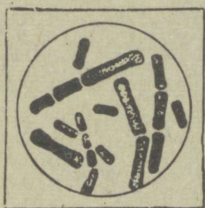
Lactobacterium plantarum'i saamiseks valmistatakse laboratoorselt kartulisilo.



Joon.22. Streptococcus  
lactis (800x).



Joon. 23. Lactobacterium  
bulgaricum (1000 x).



Joon.24. Oidium lactis  
(800 x ).

Kartulisilo valmistamiseks võetakse väikesed pestud ja keedetud kartulid, mis tükeldatakse klaaspulga abil nii, et ei toimuks sisu saastumist koore osadega. Tükikesed asetatakse purkidesse ja kallatakse peale kraanivett (kuni poole mahuni). Purgid suletakse õhukindlalt ja asetatakse üheks nädalaks termostaati 30°C juurde.

Klaaspulgaga võetakse purgist tilk vedelikku, asetatakse alusklaasile ja valmistatakse preparaat, mis värvitakse metüleensinisega. Preparaadis näeme sinakaks värvunud Lactobacterium plantarum'i rakke, mis moodustavad võrdlemisi pikki ket-  
te.

Äädikhape oksübiontilist "käärimist" põhjustavate mikroobide uurimine.

Äädikhape tekib etüülalkoholi hapendamise tagajärjel äädikhappebakterite fermentide toimet.



Lahjendatud õlle või veini seismisel tekib sellel mõne päeva jooksul õrn sile kelme, mis hiljem muutub tihedamaks. Ühtlasi on tunda äädikhappe nõrka lõhna. Vedeliku pinnal on arenenud äädikhappebakterid, mis kujult on liikumatud lühikesed pulgakesed. Neist on tuntumad Acetobacter aceti (joon.25), A. pasteurianum (joon.26) jt.

Äädikhappebakterite uurimiseks tehakse alusklaasil preparaat õhu käesseisnud veinist ja värvitakse metüleensinise-ga ( 5 min.). Preparaadis on näha lühikesi pulgakesi, mis asuvad üksikult, kahekaupa või pikemate ahelatena. Peale äädikhappebakterite võib preparaadis leida suuri ovaalseid pärmseeni.



Joon.25. Acetobacter aceti  
(1500 x ).



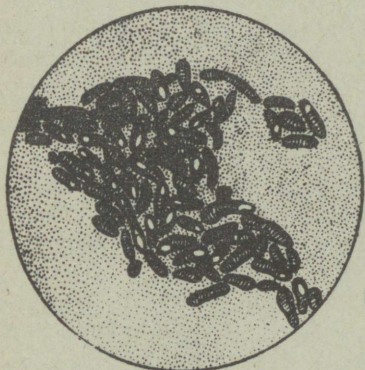
Joon. 26. Acetobacter pasteu-  
rianum (1500 x ).

Võihappelist käärimist põhjustavate mikroobide  
uurimine.

Võihappelisel käärimisel tekib süsivesikutest, alkoholi-dest, piimhapest ja selle sooladest võihape,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2$ , bu-tüülalkohol ja orgaanilised happed. Võihappelist käärimist põhjustavad mikroobid on gram-positiivsed obligaat-sed anaeroobid, neid leidub rahkesti mullas, sõnnikus, juustus ja mujal. Tuntuimad on Clostridium butyricum, Cl. pasteurianum (joon.27) jt.

Võihappelist käärimist põhjustavate mikroobide saamiseks asetatakse klaaspulgaga läbitorgitud väikesed mullased kartulid vesikorgiga suletavasse purki kraanivette, kuhu lisatakse kriiti, pastöriseeritakse ja inkubeeritakse 4-5 päeva 35°C juures. Kolvist eritub räästunud või lõhna.

Preparaadi tegemiseks võetakse aasaga kolvi põnjast materjali. Preparaat värvitakse Grami järgi. Mikroskoopimisel näeme preparaadis jämedaid pikki pulgakesi, osalt üksikult, osalt lühikeste ahelatena. Kohati on pulgad käävjalt paisunud, mispuhul rakus on spoor, mis Grami meetodil värvimise puhul jääb värvumata ümmarguse täpina.



Joon. 27. Clostridium pasteurianum.

### Pektiinainete käärimist põhjustavate mikroobide uurimine.

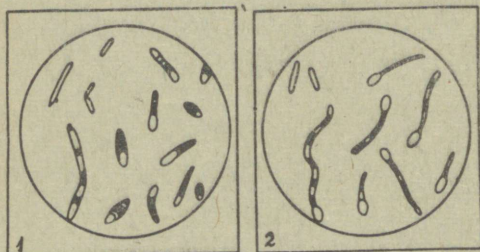
Pektiinainete poolest on eriti rikkad kiudtaimede - lina ja kanepi varred. Linavarte pektiinainete käärimisel eristatakse 3 faasi: 1) linavarte ligunemine 2) segakäärimine, millest võtavad osa mitmesugused mikroobid, nagu roiskbakterid, koli-grupp jt. 3) puhas pektiinainete käärimine, mis olenevalt keskkonnast võib kesta mõnekümnest tunnist kuni paari nädalani. Pektiinainete käärimine on keeruline protsess, kus tekib hulk lõpp-produkte.

Pektiinainete käärimist põhjustavate mikroobide tõesta-



miseks asetatakse väikesed linavarte kimbukesed Erlenmeyeri kolbi destilleeritud vette ja keedetakse mõne minuti kestel linavarte pinnal esinevate mikroobide hävitamiseks. Pärast seda valatakse keedetud vesi linavartelt ära ning lisatakse uuesti destilleeritud vett ja kuumutatakse kuni keemiseni. Seejärel jahutatakse ning lisatakse veidi keetmata linavarsi nakatamiseks. Kolb suletakse vattkorgiga ja asetatakse termostaati kaheks nädalaks. Selle aja jooksul tekib pektiinainete käärimine.

Preparaadi valmistamiseks võetakse üks linavars ja määratakse sellega alusklaasile ühtlase paksusega preparaat, vajaduse korral lisatakse veel tilk käärimisvedelikku ning kaetakse katteklaasiga. Katteklaasi serva lähedusse viiakse tilk Lugoli lahust, mille mõjul värvub võrdlemisi pikk trummipulgakujuline kepikene - Granulobacter pectinovorum siniseks, sest ta sisaldab tärklisi ja hemitselluloosi. Peale selle näeme preparaadis veel lähemaid Plectridium pectinovorum'i ja Clostridium felsineus'i rakke (joon.28).



Joon. 28

1. Clostridium felsineus
2. Plectridium pectinovorum

( 1000 x ).

### T ö ö ü l e s a n d e d

1. Mõõta mikroorganismide külvidele antibiootikumide bakteriostaatilise mõju uurimiseks asetatud diagnostiliste ketaste kasvuvaba tsooni diameeter joonlauaga (eelmisel praktikumil alustatud töö).
2. Ilmutada antibiootikumi kromatogramm bioloogiliselt.
3. Üles panna nelja üliõpilase kohta piim-, äädik- ja võihap-

peline käärimine.

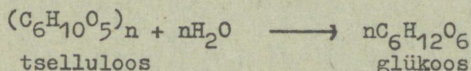
4. Üles panna pektiinainete käärimine.

### XIII p r a k t i k u m

#### T e e m a: TSELLULOOSI LAGUNDAMINE

Tselluloos on **polüsahhariid**, mida hüdroolüüsivad või hapendavad vastavalt anaeroobsed ja aeroobsed tselluloosi lagundavad mikroobid fermentide toimetel.

Ühtede tselluloosi lagundavate mikroobide hüdroolüüsiva tegevuse tagajärjel tekib tselluloosist glükoos, mille -CH<sub>2</sub>OH grupi hapendavad teised tselluloosi lagundavad mikroobid aldehüüd- (CHO-) rühmaks ja viimase karboksüül- (COOH-) rühmaks. Tekkinud **oksühappeid** kasutavad asotobakter, *Cl.pasteurianum* jt.

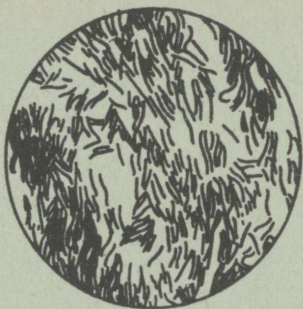


Tselluloosi lagundamise tulemusena tekivad väga mitmesugused produktid, nagu v<sup>õ</sup>i- ja äädikhape, etüülalkohol, CO<sub>2</sub>, gaasiline vesinik, metaan.

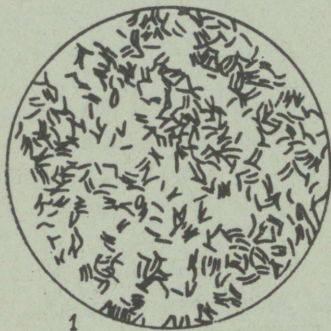
Tselluloos moodustab taimerakkude kesta põhilise osa. Surnud taimejäätmes toimub selle pidev lagundamine, mistõttu saavad mikroobidele kättesaadavaks ka rakusisaldised. Seega taimsete jäätmete lagundamist alustavad alati tselluloosi lagundavad mikroobid, mistõttu nende arvukus on väga oluliseks näitajaks mullas, sõnnikus, loomade sooltes, veekogude põhjamudas ja mujal. Aeroobsete tselluloosi lagundavate mikroobide arvukuse järgi hinnatakse sagedasti mulla biogeensust ja kultuuristatuse astet.

Aeroobsetest tselluloosi lagundavatest mikroobidest on tuntuimad perekondade Cytophaga, Cellvibrio, Cellfalcicula, jt. esindajad (joon.29 - 31). Anaeroobsetest - Bac. cellulosa  
sae methanicus, Bac. cellulosa  
hydrogenicus jt. (joon.32).

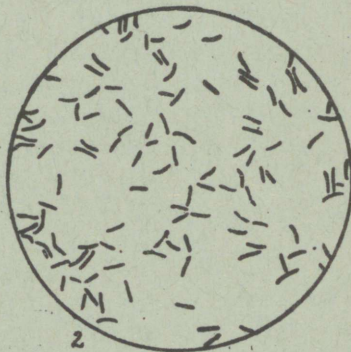




Joon.29. Perekond  
Cytophaga esindajad.



1

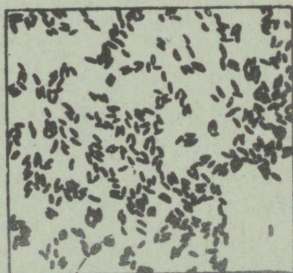


2

Joon.30.1.Cellvibrio ochraceae. 2.Cellvibrio flavescens.

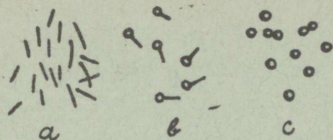


1



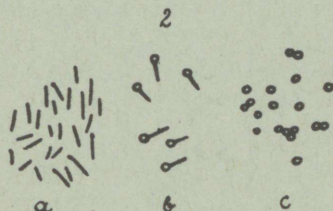
2

Joon.31. 1.Cellfalcicula viridis. 2.Cellfalcicula fusca.



Joon. 32. Bac. cellulosaе hydrogenicus (1)

- a - noored rakud
- b - trummipulgakujulised rakud
- c - spoorid

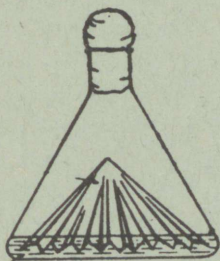


Bac. cellulosaе methanicus (2)

- a - noored rakud
- b - trummipulgakujulised rakud
- c - spoorid.

Peale nende tuleks veel nimetada perekond Clostridium'i ja Proteus'e mõningaid liike, seentest perekondi Trichoderma, Fusarium ja Aspergillus, aktinomütseetidest Act. violaceus, Act. cellulosaе jne.

Tselluloosi aeroobse lagundamise demonstreerimiseks valatakse Erlenmeyeri (150 ml) kolbi 30 ml kraanivett, millele lisatakse 0,1 %  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ja 0,5 %  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ . Lahus kaetakse koonilise volditud filterpaberiga, mille koonuse tipp ulatub üle poole kolvi kõrguse (joon.33). Kolbi lisatakse veidi kritt ja tselluloosi lagundavate mikroobidega infitseerimiseks mulda. Kolb asetatakse üheks nädalaks termostaati 30°C juurde.



Joon. 33. Aeroobsete tselluloosi lagundavate mikroobide kasvatamine.



Filterpaberi energiline lagundamine algab lahuse ja paberi kokkupuute piiril. Filterpaber kattub aeglaselt kolase limaga ja pikkamisi laguneb üksikuteks kiududeks.

Aeroobsete tselluloosi lagundavate mikroobide uurimiseks võetakse külvinoela abil filterpaberilt lima ja viiakse alusklaasile asuvasse veetilka, mis aetakse laiali ja värvitakse fuksiiniga. Mikroskoopimisel näeme mitmesuguse suurusega rakke.

Fakultatiivselt anaeroobsete tselluloosi lagundavate mikroobide avastamiseks valatakse Erlenmeyeri kolbi järgmise koostisega toitelahust.

|                                                        |       |
|--------------------------------------------------------|-------|
| $\text{K}\text{N}\text{H}_4\text{H}\text{P}\text{O}_4$ | 0,2%  |
| $\text{K}\text{H}_2\text{P}\text{O}_4$                 | 0,1%  |
| $\text{CaCl}_2$                                        | 0,03% |
| Peptoon                                                | 0,1%  |
| $\text{CaCO}_3$                                        | 0,5%  |
| $\text{MgSO}_4$                                        | 0,5%. |

Käärimist stimuleerib peptoon.

Toitelahusele lisatakse veidi mulda ja 1 g filterpaberribasid. Kolb suletakse kautšukkorgiga, millest juhitakse läbi kõveraks painutatud klaastoru, mille ots asetatakse vee- ja täidetud kolbi. Selle kaudu juhitakse käärimisel tekkinud gaasid vette. Kolvid asetatakse üheks nädalaks termostaati 35°C juurde. Filterpaberribad kattuvad limaga ja hiljem lagunevad kiududeks.

Kultuuridest valmistatakse preparaadid, milles on näha väikesi kepikesi. Need on sagedasti trummipulgakujulised terminaalselt tekkinud spoori tõttu.

Mulla aeroobsete tselluloosi lagundavate mikroobide kolooniate ilmekamaks demonstreerimiseks tehakse külv Petri tassi modifitseeritud Hutchinsoni söötmele 1,5% agar-agari lisamisega. Teisest ja kolmandast mulla lahjendusest (viljakate muldade puhul 3. ja 4. lahjendusest) tehakse pindkülv (0,05-0,1 ml) agarplaadile, mis kaetakse steriilse filterpaberkettaga. Siis suletakse Petri tass kaanega ja asetatakse

se kaheks nädalaks termostaati  $28^{\circ}\text{C}$  juurde küllastatud niiskusega atmosfääri (kuplid).

Vaatlusi tehakse 5., 10., 15. päeval. Pärast seda võetakse filterpaber koos söötmega Petri tassist välja ja asetatakse lauale paigutatud filterpaberile. Igale väljavõetud filterpaberkettale asetatakse Petri tass. Kõikidesse tassidesse asetatakse 3 kuni 4 päevaks veel üks üldine koormus selleks, et filterpaberkettad ei tõmbuks kortsu. Pärast seda tasandatakse rataste servad ja kleebitakse kaseiinliimiga töövihikusse.

Filterpaberil esinevate kolooniate värvus märgitakse vihikusse, mille alusel võib orienteeruvalt määrata perekondi.

Perekond Cytophaga - kollane  
Cellvibrio - pruun  
Cellfalcicula - roheline  
Mycobacterium - roosa

Modifitseeritud Hutchinsoni sööde aeroobsete tselluloosi lagundavate mikroobide kultiveerimiseks

|                          |        |
|--------------------------|--------|
| $\text{K}_2\text{HPO}_4$ | 1 g    |
| $\text{CaCl}_2$          | 0,1 g  |
| $\text{MgSO}_4$          | 0,2 g  |
| $\text{NaCl}$            | 0,1 g  |
| $\text{FeCl}_3$          | 0,01 g |
| $\text{NaNO}_3$          | 2,5 g  |
| $\text{CaCO}_3$          | 2,5 g  |
| vesi                     | 1 l    |
| agar-agar                | 1,5%   |

Söötme pH võib olla 7,2 kuni 7,3.

Sööde steriliseeritakse  $120^{\circ}\text{C}$  juures 20 minutit.

Mulla aeroobsete tselluloosi lagundavate mikroobide arvukuse määramine Hutchinsoni vedelsöötmele.

Hutchinsoni sööde valatakse 5-10 ml kaupa katseklaasidesse, kuhu lisatakse filterpaberribad (1-1,5 sm). Katseklaasid steriliseeritakse 20 minuti jooksul 1 atm juures, jahutatakse ja infitseeritakse pipeti abil 1 ml materjaliga teisest kuni



kuuendast mullalahjendusest. Igast lahjendusest tehakse külv (1 ml) kolme katseklaasi. Katseklaasid märgitakse ja asetatakse 2-3 nädalaks termostaati 30°C juurde. Vaatlustega alustatakse 1 nädala pärast. Jälgitakse filterpaberribal pigmendi ja lima teket ning paberi purunemist.

Aeroobsete tselluloosi lagundavate mikroobide arvukus määratakse McGrady tabeli järgi (lisa 1). Tabeli kasutamise juhised toodud VII praktikumis.

### T ö ö ü l e s a n d e d

1. Jälgida bioloogiliselt ilmutatud kromatogrammi.
2. Valmistada preparaat piimhappelise käärimise põhjustavatest mikroobidest ja värvida metüleensinisega (5 min.), uurida preparaati mikroskoobis ja joonistada mõni tüüpiline rakk töövihikusse.
3. Valmistada äädikhappelise käärimise põhjustavatest mikroobidest preparaat ja värvida metüleensinisega (5 min.).
4. Valmistada preparaat või happelise käärimise põhjustavatest mikroobidest ja värvida Grami järgi, seejärel uurida preparaati mikroskoobis.
5. Valmistada pektiinainete käärimise põhjustavatest mikroobidest preparaat, mida mõjustada Lugoli lahusega.
6. Teha mullakülv tselluloosi aeroobseks ja anaeroobseks lagundamiseks.
7. Teha mullakülv Hutchinsoni tardsöötmelise aeroobsete tselluloosi lagundavate mikroobide uurimiseks.
8. Teha mullakülv vedelale Hutchinsoni söötmelise aeroobsete tselluloosi lagundavate mikroobide arvukuse määramiseks.

T e e m a : LÄMMASTIKAINETE MUUTUMINE MIKROOBIDE ELUTEGEVUSE  
TAGAJÄRJEL

Igal aastal satub mulda tohutu hulk taimede ja loomade jäätmeid, milles leiduvaid valke lagundavad aeroobsed ja anaeroobsed roiskbakterid. Viimaste mitmesugused proteolüütilised fermentid - proteinaasid, peptidaasid, desaminaasid jt. - lammutavad valke järk-järgult lihtsamateks ühenditeks, kusjuures vaheproduktidena tekivad mitmesugused halva lõhnaga ühendid, alifaatsed happed, aromaatsed ühendid jne. Lõpp-produktidena tekivad aeroobse protsessi puhul  $\text{NH}_3$ ,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{H}_2\text{S}$ ,  $\text{N}_2$ ,  $\text{H}_2$  jt. Anaeroobse protsessi puhul esinevad loetletud lõpp-produktide kõrval ka liitsemad ühendid. Suur osa valgu-lämmastikust muutub roiskumisel ammoniumisooladeks, mida omakorda hapendavad mullas leiduvad nitrifitseerivad bakterid lämmastikus- ja lämmastikhappeks ning nende sooladeks. Viimastest on taimed võimelised sünteesima pärast kudedesinest taandamist keerukaid kehavalke.

Seega on bakterid lämmastiku ringluses vahendajateks anorgaanilise maailma ja kõrgemate organismide vahel.

Lämmastiku ringlust on sobiv käsitleda neljas osas: ammonifikatsioon, nitrifikatsioon, denitrifikatsioon ja õhulämmastiku sidumine.

Ammonifikatsiooni all mõistetakse ammonifitseerivate bakterite põhjustatud valkude roiskumist. Ammonifitseerivaid (joon. 34-37) mikroobe leidub looduses kõikjal. Aeroobsetest ammonifitseerivatest mikroobidest on sagedamini esinevateks: 1) Bac. megatherium - moodustab valgeid siledaid kumeraid kolooniaid, 2) Bac. mesentericus (kartulikepike) - moodustab tahketel söötmel õhukesti kuivi kortsulisi kolooniaid, 3) Bac. subtilis - moodustab peenekortsulisi kuivi või teralisi kolooniaid, 4) Bac. mycoides - moodustab tahketel söötmel valgeid seente mütsele meenutavaid kolooniaid. Mikroskoopi-misel on näha viburitega varustatud väike kepik.

Peale batsillide teostavad aeroobsetes tingimustes



ammonifikatsioonil veel mitmete perekondade (Pseudomonas, Bacterium jt.) esindajad.

Fakultatiivselt anaeroobsetest ammonifitseerivatest mikroobidest on tuntum muutliku kujuga Bact. vulgare ehk Proteus vulgaris, mis tardsöötmetel moodustab väikesi õhukesi siledaid laialivalguvaid kolooniaid. Anaeroobsetest ammonifitseerivatest mikroobidest tuleks nimetada Bac. putrificus't, mille rakud meenutavad kuju poolest trummipulka terminaalse spoori tõttu. Rakud esinevad sagedasti kettidena. Moodustab agari sees helbetaolisi kohevaid kolooniaid.



1



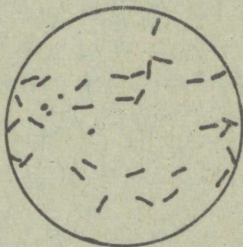
2

Joon. 34. 1. Bac. megatherium (1000x)

2. Chromobacterium prodigiosum



1



2

Joon.35. 1. Proteus vulgaris (1500 x)

2. Bac. putrificus (800 x)



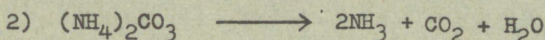
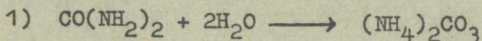
Joon. 36. Bac. mycoides  
( 1000 x ).

Mitmesugused roisubakterid lagundavad valgumolekuli eri astmeni. Lagundamisaste oleneb ka välistingimustest. Aeroobsetes tingimustes lagunevad valgud täieliku hapendumisega stabiilsete lihtsate lõpp-produktideni, anaeroobsetes tingimustes aga lagunevad valgud ebatäieliku hapendumisega ebastabiilsete produktideni, mille seas esineb rida halvasti lõhnavaid ühendeid (merkaptaanid, amiinid, rasvhapped, indool,  $H_2S$  jt.). Roiskumine algab bakterite eritatud ektoproteaaside mõjul hüdroolüüsiga. Hüdroolüüsil tekivad kõigepealt albumoosid, mis lagunevad edasi peptoonideks, viimased polüpeptiidideks ja need aminohapeteks. Aminohapped desamineeritakse, mispuhul eraldub  $NH_3$ .

Sarnaselt valkude lagunemisega toimub ka teiste lämmastikainete lagunemine.

Karbamiidi lagundavad aeroobsed urobakterid, näiteks Urobacillus pasteurii (joon. 38). Planosarcina ureae jt. ferment ureaasi toimel.

Karbamiidi hüdroolüüs toimub järgmise võrrandi kohaselt.

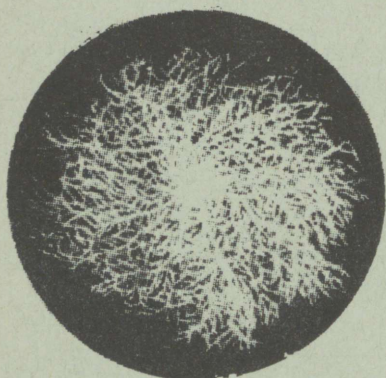


Arvatakse, et Maal aasta jooksul produtseeritud uriin sisaldab umbes 10 miljonit tonni lämmastikku.

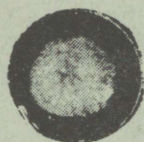
Roisubakterid saavad eluks vajaliku energia valkude la-



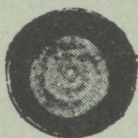
gundamisest, urobakterid aga karbamiidi lagundamisest.



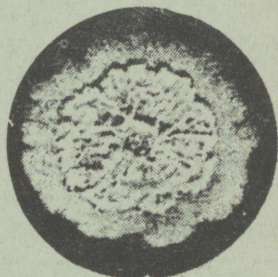
a



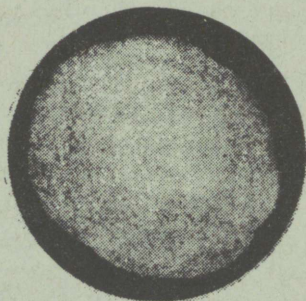
d



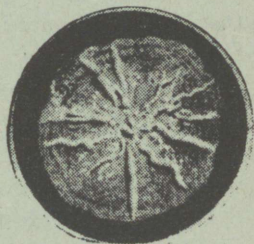
b



e



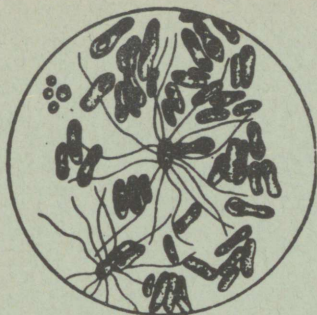
c



f

Joon. 37. Ammonifitseerivate bakterite kolooniad.

a - Bac. mycoides, b - Bac. agglomeratus, c - Bac. cereus,  
d - Bac. megatherium, e - Bac. mesentericus, f - Bac. subtilis.



Joon. 38. Urobacillus pasteurii  
( 1000 x ).

**Roisubakterite** uurimiseks valatakse Erlenmeyeri kolbi (150 ml) 30 ml 3%-lise peptoonisisaldusega linapuljongit, millele lisatakse infitseerimiseks pisut mulda. Kolb suletakse vattkorgiga, mille alla pannakse eralduva väävelvesiniku tuvastamiseks pliiatsetaadi- ja NaOH-lahuste segus niisutatud filterpaber, eralduva  $\text{NH}_3$  kindlakstegemiseks aga Kruppi reaktiivis immutatud filterpaberriba, viimased ei tohi kokku puutuda söötmega. Kolb asetatakse termostaati  $30^\circ\text{C}$  juurde üheks nädalaks.

Väävelvesiniku eraldamise puhul muutub pliiatsetaadi- ja Na-hüdroksiidilahuste segus niisutatud filterpaber mustaks. Ammoniaagi eraldumisel muutub Kruppi reaktiivis immutatud filterpaber aga punaseks. Heterotsüklilise aminohappe - trüptofaani lõhustumisel tekkinud indooli on võimalik kindlaks teha Ehrlich-Pringsheimi reaktiiviga. Kahe-kolme päeva vanusele uuritava mikroobi kultuurile (katseklaasis) lisatakse mõni tilk nimetatud reaktiivi ja loksutatakse ettevaatlikult. Siis lisatakse mõni tilk lahjendatud  $\text{NaNO}_2$ -lahust (1:10.000), mis reaktsiooni tugevdab. Katseklaasi loksutamisel värvub vedelik indooli esinemisel kiiresti roosakaspunaseks.

Kultuurist valmistatud preparaati värvitakse fuksiiniga ja vaadatakse mikroskoobis.

Karbamiidi lagundajate uurimiseks valatakse Erlenmeyeri kolbi (150 ml) 30 ml järgmise koostisega lahust.

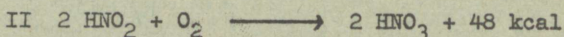
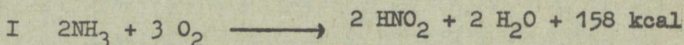


|            |       |
|------------|-------|
| Karbamiid  | 0,5%  |
| $K_2HPO_4$ | 0,05% |
| $MgSO_4$   | 0,02% |

Kolbi lisatakse infitseerimiseks veidi mulda, suletakse vattkorgiga, mille alla pannakse eralduva  $NH_3$  sedastamiseks punane lakmuspaber, mis  $NH_3$  mõjul muutub siniseks.

Mikroskoopiliseks uurimiseks valmistatud preparaat värvitakse fuksiiniga.

Nitrifikatsioon (ammooniumsooladest lämmastikus- ja lämmastikhappe ning nende soolade moodustamine) toimub kahes faasis. Esimeses faasis moodustuvad nitritbakterite (Nitrosomonas - joon. 39) elutegevuse tagajärjel nitritid, mis muutuvad teises faasis nitraatbakterite (Nitrobacter - joon.40) mõjul nitraatideks.



Nitrititseerivad bakterid on aeroobid, mis saavad kemosünteesiks vajaliku energia lihtsate anorgaaniliste  $NH_4$ -soolade hapendamisest. Eluks vajaliku energia saavad nad nagu heterotroofidki anorgaanilise aine hapendamisest hingamisel.

Nitritbakterite rakud on väikesed, ovaalsed, sagedasti kokikujulised, liikumisvõimelised, pika polaarsete viburiga. Nitraatbakterite rakud on väikesed kepikesed, võrdlemisi nitritbakterite taolised, kuid liikumisvõimetud. Mõlemad saavad kemosünteesiks vajalikku energiat lämmastikühendite hapendamisest, süsiniku allikana kasutavad süsihappegaasi ja karbonaate.

Nitrititseerivate bakterite uurimiseks valatakse Erlenmeyer kolbi (150 ml) 30 ml järgmise koostisega söödet.

|                |       |
|----------------|-------|
| $(NH_4)_2SO_4$ | 0,2%  |
| $K_2HPO_4$     | 0,1%  |
| $MgSO_4$       | 0,05% |
| NaCl           | 0,2%  |
| $FeSO_4$       | 0,04% |

CaCO<sub>3</sub> või  
MgCO<sub>3</sub> 0,5%

Kolbi loksutatakse hästi ja lisatakse veidi mulda ning suletakse vattkorgiga ja asetatakse üheks nädalaks termostaat 27-28°C juurde. Selle aja jooksul tekkinud nitritid ja nitraadid tehakse kindlaks difenüüламиинilahusega, mida lisatakse mõni tilk katseklaasi valatud kultuurile. Nitritite ja nitraatide esinemisel värvub lahus siniseks. Nitritite avastamiseks kasutatakse Griessi reaktiiv, mida lisatakse mõni tilk katseklaasi valatud kultuurile. Nitritite esinemisel värvub lahus roosakaspunaseks.

Mikroskoopimisel värvitakse preparaat fuksiiniga.



Joon.39. Nitrosomonas.



Joon. 40. Nitrobacter  
(1000 x)

Denitrifikatsioon on nitrifikatsioonile vastupidine protsess, sest nitrifikatsiooniprotsessis taimedele hästi kättesaadavateks muudetud lämmastikhappe soolad (nitraadid) taandatakse denitrifikatsiooniprotsessis taimedele suhteliselt halvemini omastatavateks lämmastikushappe sooladeks (nitritid) ja ammoniaagiks või taimedele mitteomastatavaks molekularseks lämmastikuks, kusjuures eritub rohkesti gaase (N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> jt.).

Denitrifikatsiooni kindlakstegemiseks valatakse Erlen-



meyeri kolbi (150 ml) modifitseeritud Hiltay söödet.

|                                 |           |
|---------------------------------|-----------|
| Na <sub>2</sub> tsitraat        | - 2 g     |
| KNO <sub>3</sub>                | - 1 g     |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | - 1 g     |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | - 1 g     |
| MgSO <sub>4</sub>               | - 2 g     |
| CaCl <sub>2</sub>               | - 0,2 g   |
| FeCl <sub>3</sub>               | - jäljed  |
| Dest. vesi                      | - 1000 ml |

Söötmesse lisatakse 0,1%-list broomtümoolsinise alkohol-lahust kuni selge rohelise värvuseni. Denitrifitseerivate mikroobide arenedes muutub sööde siniseks.

Kolbi lisatakse veidi mulda ja suletakse vattkorgiga, sest aerobseis tingimuses toimub denitrifikatsioon intensiivsemalt kui hapnikuvaeses keskkonnas. Kolvid asetatakse termostaati 25-30°C juurde.

Alglahuses tõestatakse lämmastik- ja lämmastikushappe olemasolu difenüülamiiniga. Nitritid tehakse kindlaks Griesi reaktiiviga.

Mikroskoopimisel näeme väikesi pulgakujulisi denitrifitseerivaid baktereid.

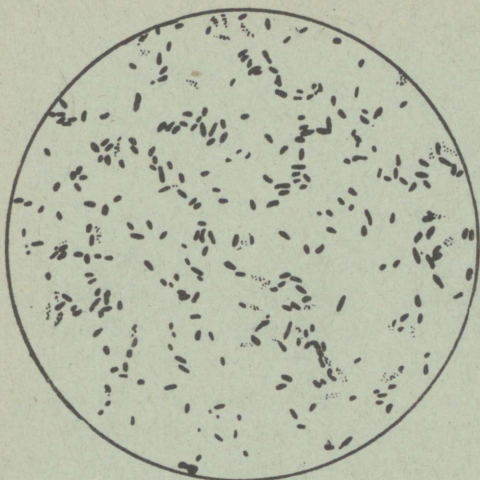
Üheks väga energiliseks denitrifitseerivaks bakteriks on Bact. denitrificans (joon.41) (Achromobacter stutzeri). See on fakultatiivne anaeroob, lühike kepike.

Teistest denitrifitseerivatest mikroobidest tuleks veel nimetada 1) Bact. denitrificans agilis (Achromobacter agile), lühike liikuv kepike.

2) Bac. denitrificans (Chromobacterium denitrificans) liikuv kepike.

3) Pseudomonas pyocyanea (joon.42) - aeroob, kepike.

Sulgudes on toodud Bergey süsteemi nimetused.



Joon.41. Bact. denitrificans  
(1000 x).



Joon.42. Pseudomonas  
pyocyanea (1000 x).

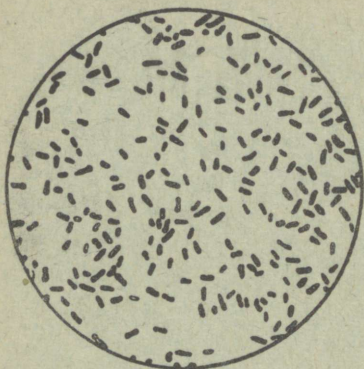
#### Molekulaarse lämmastiku sidumine mikroobide poolt.

Molekulaarset lämmastikku siduvad mikroobid jagatakse kahte gruppi 1) kõrgemate taimedega sümbioosis elavad mügarbakterid (perekond Rhizobium), 2) mullas vabalt elutsevad õhulämmastikku siduvad mikroobid. Viimastest tuleks kõigepealt nimetada Clostridium pasteurianumit ja Azotobacter chroococcum'it.

Mügarbakterid jagunevad liblikõieliste taimede põhigruppide järgi, millel nad mügaraid moodustavad. Nii tuntakse herne, põldoa, viki, seaherne jne. mügarbakterit (Rhizobium leguminosarum), lupiini (Rh. lupini), mesika (Rh. meliloti) aedoa (Rh. phaseoli), soojaoa (Rh. japonicum), ristiku (Rh. trifolii) mügarbaktereid.

Mügarbakterid, elades sümbioosis liblikõieliste taimedega, varustavad viimaseid lämmastikuga, seejuures "vastutasuks" kasutades liblikõieliste produtseeritud orgaaniliste hapete sooli jne.





Joon.43-a. Achromobacter  
stutzeri (1500 x).

Mügarbakterid arenevad liblikõielistel taimedel esinevates mügarates. Rakud on liikumisvõimelised, kõverdunud kepi-kesed ( $0,6 \times 2-3 \mu\text{m}$ ). Mitmeaastaste liblikõieliste mügarbakterid jätavad mulda ka suurel hulgal lämmastikku, rikastades mulda lämmastikuga mitu korda suuremal määral kui mul-  
las vabalt elavad lämmastikku siduvad mikroobid.

Mullas vabalt elutsevad õhulämmastiku sidujad rikastavad ka mulda lämmastikuga. Nad seovad õhulämmastiku oma raku koostisse, kust see vabaneb pärast nende surma teiste mikroobide lagundava tegevuse tagajärjel.

Anaeroobse molekulaarse õhulämmastiku siduja Clostridium pasteurianum'i (joon.43) kindlakstegemiseks ja arvukuse määramiseks mullas tehakse III ja IV mullalahjendusest 3 paral-  
leelset külvi Vinogradski söötmega täidetud katseklaasidesse.

Vinogradski sööde Cl. pasteurianumi kasvatamiseks

|                          |        |
|--------------------------|--------|
| Sahharoos või            |        |
| müügisuhkur              | 20,0 g |
| $\text{K}_2\text{HPO}_4$ | 1,0 g  |
| $\text{MgSO}_4$          | 0,5 g  |
| NaCl                     | 0,01 g |

|                   |         |
|-------------------|---------|
| MnSO <sub>4</sub> | 0,01 g  |
| FeSO <sub>4</sub> | 0,01 g  |
| CaCO <sub>3</sub> | 20,0 g  |
| Agar-agar         | 0,5 g   |
| Dest. vesi        | 1000 ml |

Söödet steriliseeritakse 0,5 atm juures 30 minutit. Agar-agarit lisatakse selleks, et gaaside eraldumine oleks paremini märgatav. Et Cl. pasteurianum on anaeroob, siis täidetakse katseklaasid kolmveerandini ning asetatakse 7 - 10 päevaks termostaati 30° C juurde. Cl. pasteurianum'i kasv põhjustab söötme hägustamist, kusjuures eralduvad gaasid (CO<sub>2</sub> ja H<sub>2</sub>).

Jälgitakse gaasi eraldumist, mullikestega katseklaas loetakse positiivseks, mikroobide hulk määratakse McGrady tabeli abil. Cl. pasteurianum'i iseloomulike vormide tuvastamiseks võetakse materjal katseklaasist sademelt ja valmistatakse preparaat, mida mõjustatakse Lugoli lahusega.

Cl. pasteurianum on obligaatne anaeroob, lagundab süsivesikuid, moodustades vöihapet ja mitmesuguseid teisi happeid ning süsihappegaasi ja vesinikku. Noored Cl. pasteurianum'i rakud on pulgakujulised. Vanemate rakkude kuju muutub spooride moodustamise tõttu klostridiaalseks. Varuainena kogub ta rakku granuloosi, mis värvub joodiga violetseks.

#### Aeroobse molekulaarse lämmastiku siduja.

Azotobacter chroococcum'i (joon. 44 ja 45) sedastamiseks ja arvukuse määramiseks tehakse mullatükikeste külv trafareti abil Petri tassi Ashby söötmele, mille koostis on järgmine.

|                                |        |
|--------------------------------|--------|
| NaCl                           | 0,5 g  |
| MgSO <sub>4</sub>              | 0,3 g  |
| CaCO <sub>3</sub>              | 5,0 g  |
| suhkur või manniit             | 20,0 g |
| K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 0,2 g  |
| CaSO <sub>4</sub>              | 0,1 g  |



|                      |          |
|----------------------|----------|
| $K_2HPO_4$           | 0,5 g    |
| Agar-agar            | 15,0 g   |
| Mikroelementide segu | 1 ml     |
| Dest. vesi           | 1000 ml. |

Sööde steriliseeritakse 0,5 atm juures 30 minutit ja valatakse tuliselt 30 ml kaupa Petri tassidesse. Pärast söötme hangumist kantakse trafaleti abil söötmeplaadile 50 kuni 100 mullatükikest. Tassid asetatakse termostaati 25-30°C juurde. Mõne päeva pärast areneb asotobakterit sisaldava mullatükikese ümber karakterne pruunikas limane koloonia. Loeatakse kolooniatega mullatükikeste arv ja väljendatakse protsentides kogu tükikeste arvu kohta.



Joon. 43. Clostridium  
pasteurianum

a - noored rakud, b - spooridega rakud, c - spoorid,  
d - granuloosi tekkimise algus noortes rakkudes, e - granuloosi tekkimise lõppstaadium, f - granuloosi kadumine spooride moodustumisel.

Looduses kõige levinumaks asotobakteri liigiks on pruunikat pigmenti moodustav Azotobacter chroococcum. Peale selle tuleb nimetada pigmenti mittemoodustavat Az. agile't ja fluorestseeruvat pigmenti moodustavat Az. vinelandii't.

Noores kultuuris on asotobakteri rakud liikumisvõimelised, ümmarguste otstega pulgakesed, mis esinevad kas üksikult

või kahekaupa. Paljunemise tagajärjel kaotavad rakud liikumisvõime, suurenevad mõõtmetelt, muutuvad ovaalseteks või ümmargusteks ja moodustavad kapslid.



Joon. 44.

Azotobacter  
(noored rakud).



Joon. 45.

Azotobacter  
(kapslitega rakud).

Indikaatori difenüülamiini valmistamiseks kaalutakse 0,25 g reaktiivi ja lahustatakse 50 ml-s kontsentreeritud väävelhappes, viimane peab olema keemiliselt puhas. Reaktiiv valmistatakse paar päeva enne kasutamist, säilib paar aastat.

Griessi reaktiivi valmistamine.

|                        |          |
|------------------------|----------|
| Griess I -naftüülamiin | - 0,2 g  |
| dest. vesi             | - 20 ml  |
| äädikhappe 12%-list    |          |
| lahust                 | - 150 ml |



Griess II sulfaniilhape - 0,5 g

äädikhappe 12%-list lahust - 150 ml

Lahustel lastakse mõni päev seista ja filtreeritakse läbi paberfiltri. Mõlemad lahused hoitakse hästi suletud tumedates pudelites. Kasutamisel segatakse mõlemad lahused võrdses koguses.

Kruppi reaktiivi valmistamine. Segatakse üks osa 3%-list väävelhapet kahe osa 1%-lise küllastatud alkoholalahusega.

Ehrlich-Pringsheimi reaktiivi valmistamine.

Paradimetüülamidobensaldehüüd - 5 g

Metüülalkohol (96%) - 50 ml

Soolhape (ek. 1,19) - 50 ml

#### XIV p r a k t i k u m i t ö ö ü l e s a n d e d

1. Uurida mikroskoobiliselt aeroobsete ja anaeroobsete tselluloosi lagundavate mikroobide sedastamiseks tehtud mulla külvi.
2. Uurida tahkele Hutchinsoni söötmele tehtud mulla külvi, värviliste laikude alusel määrata orienteeruvalt tselluloosi lagundavate mikroobide perekonnad.
3. Määrata vedelale Hutchinsoni söötmele tehtud mulla külvis tselluloosi lagundavate mikroobide arvukus McGrady tabeli järgi.
4. Teha mulla külv ammonifitseerivate mikroobide uurimiseks, milles kindlaks teha  $H_2S$  ja  $NH_3$  esinemine.
5. Teha mulla külv karbamiidi lagundavate mikroobide kindlakstegemiseks.
6. Teha mulla külv nitriidbakterite tuvastamiseks.
7. Teha mulla külv denitrifitseerivate mikroobide uurimiseks. Söötmes sedastada nitraatide olemasolu difenüülaminiiga.
8. Tutvuda demonstratsiooniks väljapandud mügarbakterite preparaatidega ja bakteriväetistega.
9. Teha III ja IV mullalahjendusest külv Vinogradski söötmele Cl. pasteurianum'i arvukuse määramiseks.
10. Kanda Petri tassi tahkele Ashby söötmele trafareti abil

50 mullatükikest asotobakteri uurimiseks.

## XV p r a k t i k u m i t ö ö ü l e s a n d e d

1. Uurida mikroskoopiliselt roiskbakterite tuvastamiseks tehtud külvi.
2. Uurida mikroskoopiliselt karbamiidi lagundavate mikroobide tõestamiseks tehtud külvi.
3. Määrata nitraatide olemasolu uuritavas kultuuris difenüülamiiniga.
4. Määrata denitrifitseerivate mikroobide uurimiseks tehtud külvis nitriidide olemasolu Griessi reaktiiviga.
5. Määrata Vinogradski söötlele tehtud mulla külvis Cl. pasteurianum'i arvukus McGrady tabeli järgi.
6. Määrata Ashby söötlele tehtud mulla külvis asotobakteri arenguga mullatükikeste %.



McGrady tabel

| Karak-<br>teerne<br>arv | Paralleelsetes<br>katseklaasides<br>mikroobide tõe-<br>näoline arv |     |     | Karak-<br>teerne<br>arv | Paralleelsetes<br>katseklaasides<br>mikroobide tõe-<br>näoline arv |      |     |
|-------------------------|--------------------------------------------------------------------|-----|-----|-------------------------|--------------------------------------------------------------------|------|-----|
|                         | 3                                                                  | 4   | 5   |                         | 3                                                                  | 4    | 5   |
| 000                     | 0,0                                                                | 0,0 | 0,0 | 222                     | 3,5                                                                | 2,0  | 1,4 |
| 001                     | 0,3                                                                | 0,2 | 0,2 | 223                     | 4,0                                                                | -    | -   |
| 002                     | -                                                                  | 0,5 | 0,4 | 230                     | 3,0                                                                | 1,7  | 1,2 |
| 003                     | -                                                                  | 0,7 | -   | 231                     | 3,5                                                                | 2,0  | 1,4 |
| 010                     | 0,3                                                                | 0,2 | 0,2 | 232                     | 4,0                                                                | -    | -   |
| 011                     | 0,6                                                                | 0,5 | 0,4 | 240                     | -                                                                  | 2,0  | 1,4 |
| 012                     | -                                                                  | 0,7 | 0,6 | 241                     | -                                                                  | 3,0  | -   |
| 013                     | -                                                                  | 0,9 | -   | 300                     | 2,5                                                                | 1,1  | 0,8 |
| 020                     | 0,6                                                                | 0,5 | 0,4 | 301                     | 4,0                                                                | 1,6  | 1,1 |
| 021                     | -                                                                  | 0,7 | 0,6 | 302                     | 6,5                                                                | 2,0  | 1,4 |
| 022                     | -                                                                  | 0,9 | -   | 303                     | -                                                                  | 2,5  | -   |
| 030                     | -                                                                  | 0,7 | 0,6 | 310                     | 4,5                                                                | 1,6  | 1,1 |
| 031                     | -                                                                  | 0,9 | -   | 311                     | 7,5                                                                | 2,0  | 1,4 |
| 040                     | -                                                                  | 0,9 | -   | 312                     | 11,5                                                               | 3,0  | 1,7 |
| 041                     | -                                                                  | 1,2 | -   | 313                     | 16,0                                                               | 3,5  | 2,0 |
| 100                     | 0,4                                                                | 0,3 | 0,2 | 320                     | 9,5                                                                | 2,0  | 1,4 |
| 101                     | 0,7                                                                | 0,5 | 0,4 | 321                     | 15,0                                                               | 3,0  | 1,7 |
| 102                     | 1,1                                                                | 0,8 | 0,6 | 322                     | 20,0                                                               | 3,5  | 2,0 |
| 103                     | -                                                                  | 1,0 | 0,8 | 323                     | 30,0                                                               | -    | -   |
| 110                     | 0,7                                                                | 0,5 | 0,4 | 330                     | 25,0                                                               | 3,0  | 1,7 |
| 111                     | 1,1                                                                | 0,8 | 0,6 | 331                     | 45,0                                                               | 3,5  | 2,0 |
| 112                     | -                                                                  | 1,1 | 0,8 | 332                     | 110,0                                                              | 4,0  | -   |
| 113                     | -                                                                  | 1,3 | -   | 333                     | 140,0                                                              | 5,0  | -   |
| 120                     | 1,1                                                                | 0,8 | 0,6 | 340                     | -                                                                  | 3,5  | 2,0 |
| 121                     | 1,5                                                                | 1,1 | 0,8 | 341                     | -                                                                  | 4,5  | 2,5 |
| 122                     | -                                                                  | 1,3 | 1,0 | 350                     | -                                                                  | -    | 2,5 |
| 123                     | -                                                                  | 1,6 | -   | 400                     | -                                                                  | 2,5  | 1,3 |
| 130                     | 1,6                                                                | 1,1 | 0,8 | 401                     | -                                                                  | 3,5  | 1,7 |
| 131                     | -                                                                  | 1,4 | 1,0 | 402                     | -                                                                  | 5,0  | 2,0 |
| 132                     | -                                                                  | 1,6 | -   | 403                     | -                                                                  | 7,0  | 2,5 |
| 140                     | -                                                                  | 1,4 | 1,1 | 410                     | -                                                                  | 3,5  | 1,7 |
| 141                     | -                                                                  | 1,7 | -   | 411                     | -                                                                  | 5,5  | 2,0 |
| 200                     | 0,9                                                                | 0,6 | 0,5 | 412                     | -                                                                  | 8,0  | 2,5 |
| 201                     | 1,4                                                                | 0,9 | 0,7 | 413                     | -                                                                  | 11,0 | -   |
| 202                     | 2,0                                                                | 1,2 | 0,9 | 414                     | -                                                                  | 14,0 | -   |
| 203                     | -                                                                  | 1,6 | 1,2 | 420                     | -                                                                  | 6,0  | 2,0 |
| 210                     | 1,5                                                                | 0,9 | 0,7 | 421                     | -                                                                  | 9,5  | 2,5 |
| 211                     | 2,0                                                                | 1,3 | 0,9 | 422                     | -                                                                  | 13,0 | 3,0 |
| 212                     | 2,0                                                                | 1,6 | 1,2 | 423                     | -                                                                  | 17,0 | -   |
| 213                     | -                                                                  | 2,0 | -   | 424                     | -                                                                  | 20,0 | -   |
| 220                     | 2,0                                                                | 1,3 | 0,9 | 430                     | -                                                                  | 11,5 | 2,5 |
| 221                     | 3,0                                                                | 1,6 | 1,2 | 431                     | -                                                                  | 16,5 | 3,0 |

| Karak-<br>teerne<br>arv | Paralleelsetes<br>katseklaasides<br>mikroobide tõe-<br>näoline arv |       |     | Karak-<br>teerne<br>arv | Paralleelsetes<br>katseklaasides<br>mikroobide tõe-<br>näoline arv |   |       |
|-------------------------|--------------------------------------------------------------------|-------|-----|-------------------------|--------------------------------------------------------------------|---|-------|
|                         | 3                                                                  | 4     | 5   |                         | 3                                                                  | 4 | 5     |
| 432                     | -                                                                  | 20,0  | 4,0 | 523                     | -                                                                  | - | 12,0  |
| 433                     | -                                                                  | 30,0  | -   | 524                     | -                                                                  | - | 15,0  |
| 434                     | -                                                                  | 35,0  | -   | 525                     | -                                                                  | - | 17,5  |
| 440                     | -                                                                  | 25,0  | 3,5 | 530                     | -                                                                  | - | 8,0   |
| 441                     | -                                                                  | 40,0  | 4,0 | 531                     | -                                                                  | - | 11,0  |
| 442                     | -                                                                  | 70,0  | -   | 532                     | -                                                                  | - | 14,0  |
| 443                     | -                                                                  | 140,0 | -   | 533                     | -                                                                  | - | 17,5  |
| 444                     | -                                                                  | 160,0 | -   | 534                     | -                                                                  | - | 20,0  |
| 450                     | -                                                                  | -     | 4,0 | 535                     | -                                                                  | - | 25,0  |
| 451                     | -                                                                  | -     | 5,0 | 540                     | -                                                                  | - | 13,0  |
| 500                     | -                                                                  | -     | 2,5 | 541                     | -                                                                  | - | 17,0  |
| 501                     | -                                                                  | -     | 3,0 | 542                     | -                                                                  | - | 25,0  |
| 502                     | -                                                                  | -     | 4,0 | 543                     | -                                                                  | - | 30,0  |
| 503                     | -                                                                  | -     | 6,0 | 544                     | -                                                                  | - | 35,0  |
| 504                     | -                                                                  | -     | 7,5 | 545                     | -                                                                  | - | 45,0  |
| 510                     | -                                                                  | -     | 3,5 | 550                     | -                                                                  | - | 25,0  |
| 511                     | -                                                                  | -     | 4,5 | 551                     | -                                                                  | - | 35,0  |
| 512                     | -                                                                  | -     | 6,0 | 552                     | -                                                                  | - | 60,0  |
| 513                     | -                                                                  | -     | 8,5 | 553                     | -                                                                  | - | 90,0  |
| 520                     | -                                                                  | -     | 5,0 | 554                     | -                                                                  | - | 100,0 |
| 521                     | -                                                                  | -     | 7,0 | 555                     | -                                                                  | - | 180,0 |
| 522                     | -                                                                  | -     | 9,5 |                         |                                                                    |   |       |



## Jooniste nimekiri

- Joon. 1. Äigepreparaadi valmistamine.
- Joon. 2. Rippuvtilga valmistamine
- Joon. 3. Stafülokokid ja bakterid, värvitud Grami meetodil
- Joon. 4. Tuberkuloositekitajad rögast, värvitud Zieh-Neelsen meetodil
- Joon. 5. Enamlevinud bakterivormid. a - Mikrococcus, b - Diplococcus, c - Tetracoccus, d - Staphylococcus, e - Streptococcus, f - Sarcina, g - Bacterium, h - Bacillus, i - Diplo-, Strepto-, Staphylobacillus, j - Mycobacterium, Corynebacterium, Clostridium, k - Vibrio, l - Spirillum
- Joon. 6. Spiroheedid
- Joon. 7. Vattkorgi valmistamine
- Joon. 8. Horisontaalne autoklaav
- Joon. 9. Termostaat
- Joon. 10. Seitz'i statiiv imikolbil
- Joon. 11. Gillespie meetodi skeem
- Joon. 12. **Külvi tehnika katseklaasi**  
a - aasata nõela abil pistekülvi tegemine katseklaasi (korraga käes üks katseklaas)  
b - aasaga nõela abil joonkülvi tegemine katseklaasi (korraga käes kaks katseklaasi)
- Joon. 13. Katseklaasi joonkülvi tehnika etapid
- Joon. 14. Söötme Petri tassi valamine ja Drigalski pahtel
- Joon. 15. Bakterkolooniade vertikaalläbilõige
- Joon. 16. Bakterkolooniade servajoon
- Joon. 17. Wolffhügeli kamber
- Joon. 18. Visuaalse nefelomeetri skeem
- Joon. 18-a. Puhaskultuuri saamine pinnahõõrumise meetodil.
- Joon. 19. Lahjendusmeetodi skeem
- Joon. 20. Kromatografeerimise skeem
- Joon. 21. Antibiootikumide bioloogiline ilmutamine
- Joon. 22. Streptococcus lactis (800 x)
- Joon. 23. Lactobacterium bulgaricum (1000 x)
- Joon. 24. Oidium lactis (800 x)

- Joon.25. Acetobacter aceti (1500 x)
- Joon.26. Acetobacter pasteurianum
- Joon.27. Clostridium pasteurianum
- Joon.28. Pekiinaineid lagundavad mikroobid  
 1. Clostridium pectinovorum  
 2. Plectridium pectinovorum (1000 x)
- Joon.29. Perekond Cytophaga esindajad
- Joon.30. 1. Cellvibrio ochracea  
 2. Cellvibrio flavescentis
- Joon. 31. 1. Cellfalcicula viridis  
 2. Cellfalcicula fusca
- Joon.32. 1. Bacillus cellulosaе hydrogenicus  
 a - noored rakud  
 b - trummipulgakujulised rakud  
 c - spoorid  
 2. Bac. cellulosaе methanicus  
 a - noored rakud  
 b - trummipulgakujulised rakud  
 c - spoorid
- Joon.33. Aerobacterales tselluloosi lagundavate mikroobide kasvatamine
- Joon.34. 1. Bac. megatherium (1000 x)  
 2. Chromobacterium prodigiosum
- Joon.35. 1. Proteus vulgaris (1500 x)  
 2. Bac. putrificus (800 x)
- Joon.36. Bac. mycoides (1000 x)
- Joon.37. Ammonifitseerivate bakterite kolooniad  
 a - Bac. mycoides, b - Bac. agglomeratus,  
 c - Bac. cereus, d - Bac. megatherium,  
 e - Bac. mesentericus, f - Bac. subtilis
- Joon.38. Urobacillus pasteurii (1000 x)
- Joon.39. Nitrosomonas
- Joon.40. Nitrobacter (1000 x)
- Joon.41. Bact. denitrificans (1000 x)
- Joon.42. Pseudomonas pyocyanea (1000 x)
- Joon.42-a. Achromobacter stutzeri (1500 x)



- Joon.43. Clostridium pasteurianum  
a - noored rakud  
b - spooridega rakud  
c - spoorid  
d - granuloosi tekkimise algus noortes rakkudes  
e - granuloosi tekkimise lõppstaadium  
f - granuloosi kadumine spooride moodustumisel
- Joon.44. Asotobakteri noored rakud
- Joon.45. Asotobakteri kapslitega rakud.

- Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 7. Seventh Edition, Baltimore, 1957.
- Gunsalus, I.C., Stanier, R.Y., The Bacteria a Treatise on Structure and Function. Academic Press New York and London, 1961.
- Martine, R., Bakteriologisch-serologisches Praktikum. Jena, 1958.
- Oginsky, E.L., Umbreit, W.W., Introduction to Bacterial Physiology. San Francisco, 1959.
- Pelczar, M.J., Hansen, J.P.A., Konetzka, W.A., Quantitative Bacterial Physiology Laboratory Experiments. Burgess Publishing Co, Minneapolis 15, Minnesota, 1961.
- Schlossmann, K., Üldine mikrobioloogia ja immuunsusõpetus. Tartu, 1940.
- Tallmeister, E., Laanes, S., Lenzner, A., Laboratoorses tööd meditsiinilises mikrobioloogias. 1964.
- Utjovski, N., Meditsiiniline mikrobioloogia ja mikrobioloogiline tehnika. Tallinn, 1961.
- Veterinaar-sanitaarne mikrobioloogia. Tallinn, 1962.
- Большой практикум по микробиологии. Гос. изд-во "Высшая школа", Москва, 1962.
- Иерусалимский Н.Д., Основы физиологии микробов, Изд-во АН СССР, 1963.
- Кашкин П.Н., Микробиология. Медгиз, Москва, 1958.
- Лебедева М.Н., Руководство к практическим занятиям по медицинской микробиологии. Медгиз, Москва, 1963.
- Одинцова Е.Н., Микробиологические методы определения витаминов. Москва, 1959.
- Омелянский В.Л., Практическое руководство по микробиологии. Москва - Ленинград, 1940.



- Работнова И.Л., Роль физико-химических условий (рН и  $H_2$ ) в жизнедеятельности микроорганизмов. Москва, 1957.
- Разумовская Э.Г., Чижик Г.Я., Громов Б.В., Лабораторные занятия по почвенной микробиологии. Изд-во Ленинградского университета, 1960.
- Рыжиков Т.Ф., Экономика лесохимической и гидролизной промышленности. Гослесбумизд., 1961.
- Самсонов Г.В., Сорбция и хроматография антибиотиков. Москва - Ленинград, 1960.
- Тец В.И., Санитарная микробиология. Медгиз. Ленинград 1958.
- Федоров М.В., Руководство к практическим занятиям по микробиологии. Сельхозгиз, Москва, 1957.
- Хроматография на бумаге. Изд-во иностр. лит., Москва, 1962.

# S i s u k o r d

|                                                                                                                                                              |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Eessõna . . . . .                                                                                                                                            | 3   |
| I. Laboratooriumis töötamise kord. Mikrobioloogiliste preparaatide valmistamine . . . . .                                                                    | 4   |
| II. Mikroobide ehituse uurimine kombineeritud värvimismeetodite abil . . . . .                                                                               | 12  |
| III. Enamlevinud bakterivormidega tutvumine ja raku suuruse mõõtmine . . . . .                                                                               | 17  |
| IV. Riistade ettevalmistamine steriliseerimiseks ja steriliseerimise viisid . . . . .                                                                        | 22  |
| V. Mikroobide söötmed . . . . .                                                                                                                              | 30  |
| VI. Mikroobide külvi tehnika . . . . .                                                                                                                       | 40  |
| VII. Kultuuride uurimine. Mikroobide arvukuse määramine ja puhaskultuuri eraldamine . . . . .                                                                | 55  |
| VIII ja IX. Siidri rühma ainete määramine pärmseente abil . . . . .                                                                                          | 70  |
| X. Suhkrute määramine paber-kromatograafiliselt mikroorganismide toitekeskkonnast . . . . .                                                                  | 74  |
| XI. Antibiootikumide bakteriostaatilise toime mikroobidele. Antibiootikumide kromatograafilise eraldamine ja kromatogrammi bioloogiline ilmutamine . . . . . | 78  |
| XII. Lämmastikuta aine muutumine mikroorganismide elutegevuse tagajärjel . . . . .                                                                           | 83  |
| XIII. Tselluloosi lagundamine . . . . .                                                                                                                      | 89  |
| XIV. ja XV. Lämmastikainete muutumine mikroobide elutegevuse tagajärjel . . . . .                                                                            | 95  |
| McCrady tabel . . . . .                                                                                                                                      | 110 |
| Jooniste nimekiri . . . . .                                                                                                                                  | 112 |
| Kirjandus . . . . .                                                                                                                                          | 115 |





Тартуский государственный университет  
ЗССР, г. Тарту, ул. Емякосли, 18

Л. Вийлсберг

ПРАКТИКУМ ПО МИКРОБИОЛОГИИ

Издание второе

На эстонском языке

Vastutav toimetaja V. Tohver

Korrektor E. Võhandu

=====

TRU rotaprint 1966. Trükipoognaid 7,3. Tingtrüki-  
poognaid 6,74. Arvestuspoognaid 5,7. Trükiarv 300.  
Faber 30x42.1/4. Paljundamisele antud 19. IX 1966.

MB 07577. Tell. nr. 424.

Hind 17 kop.









Hind 17 kop.

A-28041

TÜ RAAMATUKOGU



1 0300 0041 1094 8