



**TARTU RIIKLIK ÜLIKOOL**

---

---

**MIKROBIOLOOGIA  
VÄIKEPRAKTIKUM**

**L. Viileberg**

**TARTU 1974**

TARTU RIIKLIK ÜLIKOOL

Taimefüsioloogia ja taimebiokeemia  
kateeder

MIKROBIOLOOGIA  
VÄIKEPRAKTIKUM

L. Viileberg

TARTU 1974

Kinnitatud Bioloogia-Geograafiateaduskonna  
nõukegus 27. juunil 1971.a.

Л.Вишлеберг  
МАЛЫЙ ПРАКТИКУМ ПО МИКРОБИОЛОГИИ  
На эстонском языке  
Тартуский государственный университет  
ЭССР, г. Тарту, ул. Юликооли, 18

Vastutav toimetaja M. Vijak

Korrektor L. Uba

=====

Paljundamisele antud	2.01.74.	Rotaatoripa-	
ber, 30x42. 1/4.	Trükipoognaid	9,25.	
Tingtrükipoognaid	8,6.	Arvestuspoognaid	
	9,62.	Trükiarv	500.

ME 00302. Tell. nr. 99.

Hind 34 kop.

TRÜ rotaprint 1974. ENSV, Tartu, Pälsoni tn.14.

## E E S S Ö N A

Mikrobioloogia väikepraktikum on koostatud Tartu Riikliku Ülikooli bioloogiaosakonna üliõpilaste jaoks, silmas pidades bioloogiaosakonna õppeplaani, mikrobioloogia kursuse õppeprogrammi ja kateedri tehnilist baasi. Et mikrobioloogia väikepraktikumi jaoks on ette nähtud kahetunnilised praktikumid, siis on seda ülesannete jaotamisel ka arvestatud, ent kohati ilmneb sellele vaatamata materjali kokkusuutust. Seega on käesolev raamat koostatud konkreetse praktikumi jaoks ega käsitle kõiki mikrobioloogias kasutatavaid uurimismeetodeid.

Käesoleva praktikumi koostamisel on kasutatud vastavasisulisi eesti-, vene- ja võõrkeelseid erialaseid teoseid, mille 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 tundma õppida mikroobide morfoloogiat ja füsioloogiat. Tutvutakse ka väliskeskkonna tegurite toimega mikroobidesse. Suhteliselt üksikasjalikumat käsitlemist leiavad spetsiifilised süsiniku- ja lämmastikuringest osavõtvad mikroobid.

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

## S I S U K O R D

	Eessõna .....	3
I.	Laboratooriumis töötamise kord. Mikrobio- loogiliste preparaatide valmistamine ....	5
II.	Mikroobide ehituse uurimine kombineeritud värvimismeetodite abil .....	19
III.	Enamlevinud bakterivormidega tutvumine ja raku mõõtmine .....	26
IV.	Riistade ettevalmistus steriilimiseks ja steriilimisviisid .....	33
V.	Mikroobide sõõtmed .....	43
VI.	Mikroobide küilvi tehnika .....	53
VII.	Kultuuride uurimine ja mikroobide arvuku- se määramine .....	71
VIII.	Mikroobide isoleerimine puhaskultuuri ...	89
IX.	Biotiini mõju uurimine pärmseente palju- nemisele .....	98
X.	Pärmseente sahhariidide kasutamisevõime määramine paber-kromatograafiliselt .....	101
XI.	Antibiootikumide bakteriostaatiline toime mikroobidesse .....	108
XII.	Lämmastikuta ainete muutumine mikroobide elutegevuses .....	114
XIII.	Tselluloosi lagundamine .....	122
XIV ja	XV. Lämmastikainete muutumine mikroobide elutegevuses .....	128
	McGrady tabel .....	144
	Jooniste nimekiri .....	146
	Kirjandus .....	148

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

### T e e m a :    L A B O R A T O O R I U M I S  T Ö Ö T A M I S E  K O R D .  M I K R O B I O - L O O G I L I S T E  P R E P A R A A T I D E  V A L M I S T A M I N E

Mikrobioloogia laboratooriumi asukohaks sobib hästi päikese poolest vaasem maja lääne-, ida- või põhjapoolne osa, sest päikesekiired segavad näiteks mikroskoopimist ja mõningaid teisi töid. Mikrobioloogia laboratooriumi seinad ja lagi kaetakse toonitud valge õlivärviga, põranda ja laudade katmiseks kasutatakse linoleumi või plastmasskatet. Laboratooriumi sisustus olgu võimalikult lihtne, otstarbekas ja kergesti desinfitseeritav.

Tööks vajalikud esemed ja reaktiivid asetatakse lauale kindlaks määratud kohale käeulatusse; see soodustab töötamist.

### T ö ö 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 üliõpilane on kohustatud korras hoidma töökoha ja töövahendid ning kasutama ainult temale ettenähtud vahendeid.
3. Tarvitatud külviaasad ja -nõelad tuleb kohe leegis steriilida.
4. Pipettide suupoolsed otsad peavad olema isoleeritud vattfiltritega. Pipettida tuleb ettevaatlikult, kusjuures kasutatud pipetid asetatakse selleks ettenähtud nõusse.

5. Laboratoorseste nõude (katseklaasid, kolvid) vattkorke ei tohi asetada lauale.
6. Patogeensete mikroobidega infitseeritud materjali satumisel töölauale, riinetele, nahale või mujale tuleb kohe informeerida juhendavat õppejõudu vastavate abinõude tarvitusele võtmiseks.
7. Pärast töö lõpetamist desinfitseeritakse käed ning pestakse seebi ja veega.
8. Mikrobioloogia laboratooriumis on keelatud söömine, joomine ja suitsetamine.

### E s m a a b i <sup>II</sup>

Patogeensete mikroobidega infitseeritud materjali satumisel

- 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 soolhappega ja loputusvedelik sülitatakse selleks määratud nõusse. Kor-ratakse suu loputamist ja hiljem juuakse mõned suutäied 0,2 %-list soolhapet;

---

<sup>II</sup>

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

- 3) silma limaskestale: loputatakse silma 0,1 %-lise elavhõbeda oksütsüaniidilahusega selleks ettenähtud loputusnõust. Seejärel määratakse silmalaugude alla silmalahidaga 0,1 %-list elavhõbeda oksütsüaniidsalvi.
- 4) nina limaskestale: viiakse tamponiga nina limaskestale 0,1 %-list elavhõbeda oksütsüaniidsalvi;
- 5) vigastatud nahale: nahavigastust lastakse eelnevalt veritseda. Ei tohi suuga imeda! Seejärel kaetakse vigastatud koht jooditinktuuriga ja asetatakse peale steriilne side ning järgneva töö puhul kasutatakse kummikindaid.

Märkus: vanad haavad kätel kaetakse enne töö algust kolloodiumis niisutatud vatiga.

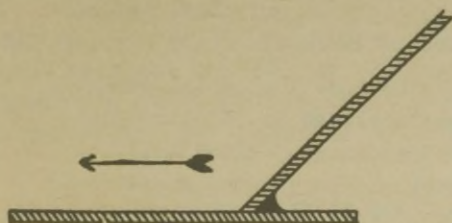
## Mikrobioloogiliste preparaatide valmistamine

Mikroobide morfoloogiat on võimalik mikroobirakkude väikeste mõõtmete tõttu uurida ainult mikroskoobi abil. Mikroobide kuju, suuruse ja liikumisvõime uurimiseks valmistatakse kas äigepreparaat või ripptilk. Mõlemal viisil on võimalik uurida nii elusaid kui ka surmatud mikroobe. Elusatest mikroobidest valmistatud äigepreparaadi ja ripptilga uurimiseks kasutatakse enamasti tavalist läbivalgustust, kuid selleks võib kasutada ka pimeväljameetodit ja faasikontrastmikroskoopi. Surmatud mikroobe aga uuritakse peamiselt värvitud äigepreparaatides.

Äigepreparaadi valmistamine. Äigepreparaadi valmistamiseks kasutatakse platinast või terastraadist külviaasa. Külviaasa valmistamiseks painutatakse nõela ots ümber sobiva diameetriga (2 mm) varda vastu traadi küljeosa.

Preparaatide valmistamiseks kasutatakse alusklaase suurusega 26 x 76 x 1,0...1,2 mm. Ripptilga valmistamiseks vajatakse niisama suuri lohuga alusklaase. Kateklaaside pindala võib olla mitmesugune, paksus aga 0,16...0,18 mm. Külviaasa steriilimine toimub gaasipõleti leegis, kus kuumutatakse seda kuni hõõgumiseni ja siis jahutatakse. Hästi puhastatud alus- ja kateklaasid hoitakse 70<sup>o</sup>-ses etanoolis, kust nad võetakse pintsettide abil ja süüdatakse nende pinnale jäänud etanool põleti leegis. Selliselt ettevalmistatud alus- ja kateklaasid on rasvavabad ja steriilsed.

Külviaasaga kantakse alusklaasile veidi uuritavat materjali (kultuurivedelikku või mikroobimassist tehtud suspensiooni) ja tõmmatakse kas nõelaga, puhta alusklaasi või kateklaasi servaga laiali. Alus- või kateklaas viiakse tilgaga ühendusse ja tõmmatakse tilgast eemalduvas suunas, vt. joonis 1. Nii saadakse õhuke preparaat.



Joon. 1. Äigepreparaadi valmistamine.

Kui uuritav preparaat valmistatakse tardsöötmel kasvatatud kultuurist, siis eelnevalt valmistatakse uuritavate mikroobide suspensioon kas vedelsöötmes või füsioloogilises lahuses (0,9 %-lises NaCl lahuses).

Preparaati võib ka selliselt valmistada, et alusklaasile pandud füsioloogilise lahuse tilka viiakse külviaasaga pisut uuritavat kultuuri, segatakse ja aetakse laiali.

Eespool kirjeldatud viisil valmistatud äigepreparaati võib kohe mikroskoobis uurida. Enamasti aga lastakse äigepreparaadil õhus kuivada, siis fikseeritakse ja värvitakse ning alles pärast seda mikroskoobitakse.

Preparaadi fikseerimine. Preparaadi fikseerimine on vajalik selleks, et

- 1) mikroobe surmata,
- 2) mikroobid kleepuksid alusklaasile,
- 3) mikroobid muutuksid värvidele vastuvõtlikumaks.

Kõige lihtsamaks fikseerimise viisiks on leegil kuumutamine, mis seisneb selles, et õhus kuivatatud äigepreparaat hoitakse paar kuni kolm sekundit leegil, olenevalt alusklaasi paksusest. Parasjagu fikseeritud preparaat (alusklaas) tekitab käeseljal kerge põletustunde.

Et mikroobid kuumutamisel deformeeruvad, siis kasutatakse sageli ka teisi fikseerimismeetodeid, mille puhul alusklaasile valmistatud preparaate pannakse järgmistesse fikseerivatesse lahustesse:

- 1) etanoolisse 10...15 minutiks,
- 2) metanoolisse 2...3 minutiks,
- 3) atsetoonisse 5 minutiks,
- 4) etanooli ja eetri segusse (1:1) 10...15 minutiks,
- 5) osmiumhappe aurudesse 5 minutiks.

### Mikroobide värvimine

Mikroobide värvimiseks kasutatakse kas liht- või liitvärvimise ehk kombineeritud värvimise meetodeid. Lihtvärvimise puhul kasutatakse ainult ühte värvi, liitvärvimise puhul aga mitut värvi. Mikrooskoopilisteks uurimisteks kasutatakse peamiselt aluselisi aniliinvärve, neist sagedamini metüleensinist, fuksiini, neutraalpunast, kristallvioletti ja malahhiitrohelist. Happelistest värvidest kasutatakse eosini ja happelist fuksiini. Aluseliste värvidega värvub hästi tuumaine, happelistega aga tsütoplasma. Mikroobide värvumine sõltub nende isoelektrilisest pH (pI) ja keskkonna reaktsioonist.

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

Värvid on müügil kas amorfise või kristalse pulbrina, millest valmistatakse värvaine suhtes küllastatud etanoolilahus. Lahus filtreeritakse enne destilleeritud veega lahjendamist. Tavaliselt kasutatakse kuni 1%-lise kontsentratsiooniga värvilahuseid, mis on intensiivse värvimisvõimega. Värvilahustele lisatakse intensiivistajatena sageli happed, leelisi, fenooli, aniliinõli jne. Ka soojendamine mõjub intensiivistavalt.

Mitmesugused värvained erinevad värvimistugevuse poolest

lest, näiteks metüleensinine on nõrga, fuksiin keskmise ja gentsiaanviolett tugeva toimega.

Lihtvärvimine fuksiiniga. Fikseeritud äigepreparaadile kallatakse 1...2 minutiks lahjendatud fuksiini. Pärast seda loputatakse preparaat veega ja lastakse õhus kuivada. Siis asetatakse preparaadile tilk seedriõli ja uuritakse mikroskoobiga.

Lihtvärvimine elusate mikroobide uurimiseks. Elusate mikroobide värvimise ehk nn. vitaalvärvimise abil on võimalik uurida mikroobirakkude ehitust, suurust ja paljunemist neid muutmata, surmamata. Vitaalse värvimise puhul kasutatakse mikroobidele indiferentselt mõjuvaid aluselisi (neutraalpunane, niilussinine, bismarkpruun, metüleensinine, alisariin jt.) ja happelisi (püroolsinine, liitiumkarmin jt.) värve. Parimaks vitaalvärviks peetakse kaasajal akriidiinoranži, mis võimaldab ka elusate ja surnud rakkude eristamist luminesentsmikroskoobi abil.

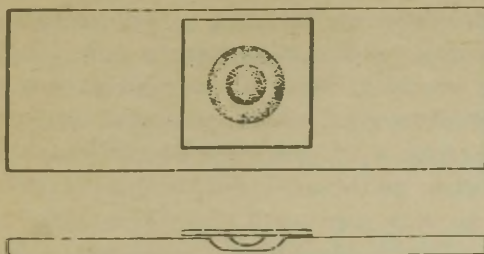
Vitaalvärvimist võib teostada modifitseeritud Fickeri meetodil. Sel puhul viiakse alusklaasile 1 tilk mikroobide suspensiooni füsioloogilises keedusoolalahuses või 2,5 % lises glükoosilahuses ja kaetakse kateklaasiga. Ühe sentimeetri kaugusele kateklaasist asetatakse alusklaasile 1 tilk metüleensinise lahust (1:5000) ja ühendatakse külviaasa abil ettevaatlikult kateklaasi servaga. Nüüd võetakse pintsettidega filterpaberi riba ja viiakse ühendusse kateklaasi vastaspoolse äärega (mikroobide suspensioon imendub paberisse) ning imetakse sel viisil värvilahus kateklaasi alla. Mikroobid värvuvad mõne minuti jooksul. Tuleb hoiduda liiga intensiivsest imemisest, mis võib kaasa tuua ka bakterirakud.

Elusate mikroobide uurimiseks võib kasutada ka tausta värvimise meetodit. Sel puhul kallatakse alusklaasile mõni tilk värvilahust ja tõmmatakse laiali ning lastakse õhus kuivada. Pärast seda pühitakse klaasilt värv marliga, kusjuures klaas peab jääma nõrgalt siniseks või punaseks olenevalt kasutatavast värvist. Kui alusklaas ei värvu, siis ees-

pool nimetatud võtet korratakse. Steriilsele kateklaasile pannakse tilk uuritavat mikroobide suspensiooni ja sellega kaetakse värvunud 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.

Ripptilga valmistamine. Elusate mikroobide kuju, ehituse, liikuvuse ja paljunemise jälgimiseks valmistatakse ripptilk. Ripptilga valmistamiseks kasutatakse steriilset lohuga alusklaasi. Kateklaasile pannakse külviaasaga väike tilk mikroobide suspensiooni. Aurustumise vältimiseks määratakse alusklaasi lohu ümbrus vaseliiniga. Kateklaas pööratakse ümber ja paigutatakse lohu kohale nii, et suspensioonitilk jääks alusklaasi õõnesse rippuma, kuid ei puutuks kokku selle põhjaga (joon. 2). Vaseliinikiht takistab vedeliku kuivamist. Kui tahetakse ripptilgas uurida mikroobide paljunemist, siis asetatakse rasvatustatud kateklaasile tilk vedelsöödet, millesse külvatakse külvinõelaga mõni mikroobirakk. Et tilka ei satuks liiga palju mikroobe, mis raskendab paljunemise jälgimist, siis kasutatakse kõrget lahjendust. Esimesse katseklaasi, milles on 8...10 ml söödet, külvatakse külviaasaga väike hulk mikroobe ja loksutatakse. Esimesest katseklaasist külvatakse külviaasaga teise katseklaasi, milles on ka 8...10 ml söödet ja loksutatakse. Teisest katseklaasist 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 ja ka objektiiv võib saada kannatada. Algul leitakse kuivüsteemi nõrga suurenduse objektiiviga ( $8^x$ ... $10^x$ ) ripptilga servajoon, millest ühel pool paistavad võrdlemisi suured "udutilgad", teisel pool aga väikeseteraline mikroobide suspensioon. Pärast seda uuritakse preparaati õli-immersiooniobjektiiviga.



Joon. 2. Ripptilga valmistamine.

Mikroskoopimine. Arvestades seda, et praktikumist osavõtjad on juba mikroskoobiga töötanud (botaanika ja zooloogia praktikum), antakse järgnevalt meeldetuletuseks vaid olulisimad mikroskoobi kasutusreeglid.

Kondensoriga mikroskoobi puhul kasutatakse alati tasa-peeglit. Reguleerida tuleb nii valgusti kui ka kondensori iirisdiafragmat. Valgusti iirisdiafragma avatakse sedavõrd, et valgusega täituks kogu nägemisväli. Kondensori iirisdiafragmat tuleb kuivüsteemiobjektiiviga vaatluse ajal pidevalt reguleerida olenevalt vaatlusülesandest, pidades silmas allpool toodud asjaolusid.

Põhinäitaja	Kondensori iiris- diafragma avamisel	Kondensori iiris- diafragma ahendamisel
lahutusvõime	tõuseb	langeb
kontrastsus	langeb	tõuseb
sügavusteravus	langeb	tõuseb
valgustatus	tõuseb	langeb
pinnakõverus	tõuseb	langeb
hajunud külgiirte hulk	tõuseb	langeb

Preparaadi uurimist alustatakse kuiv-süsteemiobjektiiviga, mille suurendus on 8...10-kordne ja numbriline apertuur 0,20...0,30 piires. Pärast seda uuritakse preparaati kuiv-süsteemiobjektiiviga, mille suurendus on 40-kordne ja numbriline apertuur 0,65...0,75 (sõltub tüübist). Kuiv-süsteemiobjektiiviga uurimisel lastakse objektiiv fookusest madalamale ja siis aeglaselt tõstetakse, kuni preparaat on selgesti nähtav. Järgnevalt uuritakse preparaati vesi-immersiooniobjektiiviga, mille suurendus on 40-kordne ja numbriline apertuur 0,75...1,0. Sel puhul pannakse objektiivi ja preparaadi ning preparaadi ja kondensori vahele veetilk. Lõpuks uuritakse preparaati õli-immersiooniobjektiiviga, mille suurendus on 90-kordne ja numbriline apertuur 1,25. Joonis töövihikusse tehakse õli-immersiooniobjektiiviga uurimisel.

Objektiivi valikul tuleb lähtuda objekti omadustest (preparaadi paksus, pinnaomadused jne.) ja vaatlusülesandest (kas soovitakse näha rakkude üldpilti või nende detaile). Tähelepanu tuleb pöörata objektiivi numbrilisele apertuurile (NA). Numbriline apertuur on funktsioon nurk-apertuurist ja aine murdumisnäitajast, mida läbib kujutist moodustav valgus.

Seega objektiivi numbriline apertuur

$$NA = n \cdot \sin \varphi,$$

kus

$\varphi$  -  $\frac{1}{2}$  objektiivi apertuuri,  
 $n$  - tihedama keskkonna murdumisnäitaja.

Mikroskoopimisel on eesmärgiks saada otstarbekohane lahutusvõime. Objektiivi suurendus valitakse sellest lähtudes, et rahuldatud oleks nii üldsuurendus kui ka lahutusvõime. Objektiivi lahutusvõime on päripordtsionaalne numbrilise apertuuriga. Suure numbrilise apertuuriga objektiive kasutatakse siis, kui on vaja uurida raku detaile, mille puhul lahutusvõime peab olema maksimaalne. Ob-

Jektiiviga peab koosõlas olema ka kondensor, mille numbriline apertuur ei tohi palju erineda objektiivil numbrilisest apertuurist. Näiteks 8-kordse suurendusega objektiivil puhul ( $NA = 0,20$ ) ei olegi võimalik kondensorit kasutada, sest väli ei täitu valgusega (kondensori  $NA = 1,2$ ). Sel juhul keeratakse kondensoril ülemine lääts ära, järele jääva läätsese numbriline apertuur on  $0,3$ .

Õli-immersiooniobjektiivil kasutamine. Õli-immersiooniobjektiivil kasutamisel pannakse tilk immersiooniõli objektiivil ja preparaadi ning preparaadi ja kondensori vahele. Immersiooniõli vahelpanek muudab süsteemi (kondensor + preparaat + objektiiv) homogeenseks ja väldib valguse hajumist, sest õli murdumisnäitaja on  $1,51$ , mis on lähedane klaasi murdumisnäitajale ( $1,52$ ). Selline homogeenne süsteem võimaldab objektiivil ava täielikku ärakasutamist ja seega ka suurendada mikroskoobi töövõimet. Õli-immersiooniobjektiivil langetatakse aeglaselt (kõrvalt vaadates) ja viiakse ühendusse õliga, siis tõstetakse aeglaselt, kuni preparaat on selgesti nähtav. Reguleerimisel ei tohi katkeda kontakt õli ja objektiivil vahel. Kui see aga peaks juhtuma, siis imatakse objektiivil õli filterpaberiga ära ja puhastatakse objektiivil aviobensiiniga immutatud maisipaberi või flannell-lapi abil (ilma hõõrumiseta tupsutades) õlist täiesti puhtaks ja viiakse uuesti õliga ühendusse. Puhastamisel eemaldatakse objektiivil tekkinud kelme, mis segab mikroskoopimist.

Enne õli-immersiooniobjektiivil kasutamist uuritakse seda luubiga. Kui sellel leidub kuivanud õli, siis teatakse sellest praktikumi juhatajale. Õlist puhastamiseks leotatakse objektiivil aviobensiiniga ja tupsutatakse klaaspulga ümber mähitud maisipaberiga.

Kui süsteemi objektiivil tolmu puhastamiseks kasutatakse spetsiaalseid harjakesi või kummiballoone. Mikroskoobi optika peale ei tohi hingata ega lähedusse viia etanooli.

Okulaari valik toimub objektiivil järgi Abbe reeglile

toetudes. Okulaar suurendab objektiivi poolt loodud kujutist, andes sellest ebakujutise.

Abbe "raudse reegli" järgi valitakse mikroskoobi üldsuurendus nii, et see poleks väiksem kui 500-kordne ega suurem kui 1000-kordne kasutatava objektiivi numbriline aperatuur. Mikroskoobi üldsuurendus võrdub objektiivi ja okulaari suurenduste korrutisega.

Näide: Kui objektiivi suurendus on 40-kordne ja selle NA 0,75, siis üldsuurendus peab olema piirides

$$\begin{array}{r} 500 \cdot 0,75 \dots 1000 \cdot 0,75 \\ 375^x \qquad \qquad \qquad 750^x \\ 375 : 40 \approx 9 \qquad 750 : 40 \approx 19 \end{array}$$

Tööks sobib vastavalt 9- ja 19-kordse suurendusega okulaar.

Kui objektiivi suurendus on 90-kordne ja selle NA 1,25, siis mikroskoobi üldsuurendus võib maksimaalselt olla 1250-kordne.

Et

$$1250 : 90 \approx 15,$$

siis käesoleval juhul tuleb kasutada okulaari, mille suurendus on 15-kordne.

Ainult üldsuurendus ei iseloomusta veel mikroskoobi töövõimsust. Oluline on ka mikroskoobi lahutusvõime, mille all mõistetakse kahe kõrvuti oleva punkti vahelist minimaalset kaugust, mille juures nad on veel eraldi nähtavad. Mikroskoobi suurendus ja lahutusvõime täiendavad teineteist. Hoiduda tuleb parasuitsuurendusest. Lahutusvõime piires on ese selgelt nähtav ja kujutis terav. Esemetest, mille mõõtmed on allpool lahutusvõime piire, saame kas ebaselge kujutise või ei saa üldse mingit kujutist. Mikroskoobi lahutusvõime oleneb objektiivi numbrilisest aperatuurist ja valguse lainepikkusest.

Näiteks kuivsusüsteemi objektiivi kasutamisel läbib valgus kolm erinevat keskkonda, mille murdumisnäitajad erine-

vad (klaasil 1,5; veel 1,33; õhul 1,0), siis läheb osa valgust mikroskoopimiseks kaduma. Kui objekti ja objektiivi vahel on õhk, siis on objektiivi numbriline apertuur ja järelikult ka lahutusvõime väiksem kui sel puhul, kui nende vahel on õli, mille murdumisnäitaja on lähedane klaasi murdumisnäitajale. Sel juhul läheb valgust vähe kaduma. Lahutusvõime oleneb ka läbiva valguse lainepikkusest. Lahutusvõime on seda suurem, mida väiksem on valguse lainepikkus. Tavalise valgusmikroskoobi maksimaalne lahutusvõime on ligikaudu 0,2  $\mu\text{m}$ , seega on bakterite rakud (1-2  $\mu\text{m}$ ) hästi eristatavad, rakkude detailid aga sagedasti mitte, sest nad jäävad allapoole lahutusvõime piiri. Suurim lahutusvõime saadakse sinises valguses.

Mikroskoopimise tehnikaga üksikasjalikumaks tutvumiseks on soovitatav kasutada järgmisi käsiraamatuid.

Дж. Мейнелл, Э. Мейнелл. Экспериментальная микробиология. М., "Мир", 1967.

Т.В. Аристовская и др. Большой практикум по микробиологии. М., "Высшая школа", 1962.

L. Otto. Das Mikroskop. Leipzig 1957.

### T ö ö ü l e s a n d e d

1. Valmistada lihtälgereparaat presspärmist (Saccharomyces cerevisiae) ja vaadata mikroskoobi kuivsüsteemi objektiividega ( $8\times$  ja  $40\times$ ).
2. Valmistada presspärmist ripptilk ja uurida vesi-immersiooniobjektiiviga.
3. Valmistada stafülokokkide kultuurist älgereparaat, fikseerida leegil, värvida Ziehli karboolfuksiiniga ning uurida õli-immersiooniobjektiiviga ja joonistada mõni rakk vihikusse.

4. Teostada sartsiinide vitaalne värvimine modifitseeritud Fickeri meetodil metüleensinisega (1 : 5000) ja tausta värvimine neutraalpunasega (1 : 500). Preparaati uurida mikroskoobis kuivsüsteemi ( $8^x$  ja  $40^x$ ) ja õli-immersiooniobjektiiviga. Joonistada mõni rakkude kobar tööviikuisse.

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

### T e e m a : MIKROOBIDE EHITUSE UURIMINE KOMBINEERITUD VÄRVIMISMEETODI ABIL

Mikroobiraku ehitusega tutvumiseks ning mitmesuguste rakkude eristamiseks kasutatakse liitvärvimismeetodeid, mille tulemused põhinevad bakteriraku füsikokeemilistel omadustel (rakusisaldiste ja struktuurielementide afiinsusel teatud värvidega).

Kombineeritud värvimismeetoditest kasutatakse kõige sagedamini Grami meetodit. Esimesena rakendas seda taani mikrobioloog Chr. Gram 1883.a. Kõik mikroobid jagunevad graamreaktiivsuse alusel kaheks grupiks: graampositiivsed ja graamnegatiivsed.

Graamreaktiivsuse all mõistetakse trifenüülmetaanvärvainetega (kristallviolett, gentsiaanviolett) värvitud bakterirakkude värvuse püsivust etüülalkoholis. Graamreaktiivsus sõltub bakteriraku magneesiumribonukleaadisisaldusest ja RNA ning DNA vahekorrast. Peitse (Iugoli lahus, pikriinhape) kasutatakse värvide kinnitumise soodustamiseks. Graampositiivsed mikroobid rohke magneesiumribonukleaadisisalduse tõttu adsorbeerivad trifenüülmetaanrea värve suuremal hulgal ja peavad neid tugevamini kinni kui graamnegatiivsed mikroobid ega anna neid etanooliga lühiajalisel pesemisel (10...30 sekundit) ära. Graampositiivsed mikroobid värvuvad sinakasvioletseks. Graamnegatiivsed mikroobid muutuvad etanooliga mõjustamisel värvusetuks ja täiendaval värvimisel fuksiiniga punaseks (joon. 3). Graamreaktiivsus näitab mitmeid olulisi füsioloogilisi ja biokeemilisi omadusi ning on rakendatav bakterite olulise süstemaatilise tunnusena.

### Grami meetodi Sinjovi modifikatsioon

1. Fikseeritud äigepreparaadile asetatakse 1 %-lise kristallvioleti etüülalkohollahusega immutatud filterpaber.
2. Paberile tilgutatakse 2 minutiks 2...3 tilka vett.
3. Paber eemaldatakse pintsettidega ja preparaadile kallatakse 1...2 minutiks Lugoli lahus.
4. Preparaati pestakse etüülalkoholiga 10...30 sekundi kestel.
5. Preparaati värvitakse täiendavalt fuksiiniga 1...2 minuti kestel.
6. Loputatakse veega.
7. Kuivatatakse õhu käes ja mikroskoobitakse.



Joon. 3. Stafülokokiid ja pulkpisikud, värvitud Grami järgi.

### Happekindlate mikroobide värvimine

Happekindlate mikroobide värvimise meetod põhineb nende omadusel värvuda kuumutamisel ainult väga tugevate värvilahuste toimel. Et värvunud rakud nõrkade hapetega mõjustamisel säilitavad värvuse, siis on happekindlaid mikroobe võimalik teistest diferentseerida (joon. 4). Kõige sagedamini kasutatakse happekindlate mikroobide värvimiseks Ziehl-Neelseni meetodit.

### Ziehl-Neelseni meetodi modifikatsioon

1. Fikseeritud äigepreparaadile asetatakse karboolfuksiiniga immutatud filterpaber. Värvumise soodustamiseks kuumutatakse preparaati 5 minuti kestel värvi pideva uuenemisega. Pärast seda lastakse preparaadil jahtuda.
2. Filterpaber eemaldatakse pintsettidega ja preparaati pestakse veega.
3. Dekoloreeritakse happelise alkoholilahusega (3 % HCl).
4. Pestakse veega.
5. Pestakse etanooliga 10...15 sekundit.
6. Etanool pestakse veega pealt ära.
7. Värvitakse täiendavalt Löffleri metüleensinise lahusega 3...5 minuti kestel.

Dekoloreerimise tulemusena jäävad happekindlad mikroobid rubiinpunaseks, happe suhtes vastuvõtlikud mikroobid aga värvitakse täiendavalt siniseks.



Joon. 4. Tuberkuloositekitajad rõgast, värvitud Ziehl-Neelseni meetodil.

Metakromatiinterakeste (volutiini) värvimine  
Neisseri meetodil

Värvimiseks kasutatakse metüleensinise (0,1 %) ja kristallvioleti (0,3 %) lahust, mis vahetult enne kasutamist segatakse vahekorras 2 : 1.

Fikseeritud äigepreparaadile kantakse  $\frac{1}{2}$ ...1 minutiks Neisseri metüleensinise lahust, seejärel pestakse värv veega ära ja preparaati värvitakse täiendavalt vesuviini ehk bismarkpruuni lahusega 1...3 minutit. Pärast seda pestakse preparaat veega, kuivatatakse õhus ja mikrokoobitakse. Sellel meetodil värvub raku protoplasma helepruuniks, metakromatiinterakesed aga siniseks.

## Metakromatiinterakeste värvimine Romanowsky-Giems meetodil

Kasutatakse Giemsa värvi (asuuri, eosiini ja metüleensinise segu), mis lahuses on sinine ja värvib raku plasma helesiniseks, kromatiini, lima ja mitmesugused terakesed aga punakas-violetseks.

10 ml neutraalse või nõrgalt aluselise reaktsiooniga destilleeritud veele lisatakse vahetult enne preparaadi värvimist 10 tilka värvilahust (Giemsa värvilahus). Saadud värvilahus kallatakse preparaadile 1 tunniks (preparaadi võib ka värvilahusesse asetada). Pärast seda preparaati pestakse veega, kuivatatakse õhus ja mikroskoobitakse. Kui värvimist teostatakse 37° C juures termostaadis, siis toimub värvimine 30...40 minuti kestel.

Spooride värvimine. Spooride esinemist saab kindlaks teha Schaefferi-Fultoni värvimismeetodi järgi.

1. Fikseeritud äigepreparaadile tilgutatakse 5 %-list malahhiitroheline vesilahust ja soojendatakse 3...4 korda, igakord kuni auru ilmnemiseni. Värvilahusel lastakse toimida 1 minuti kestel.
2. Pestakse veega 30 sekundit.
3. Valatakse preparaadile 0,5 %-list safraniini vesilahust 30 sekundiks.
4. Loputatakse veega.
5. Preparaat kuivatatakse õhus ja mikroskoobitakse.

Spoorid värvuvad malahhiitrohelisega püsivalt roheli-seks, mikroobirakud aga dekoloreeruvad pesemisel kergesti. Safraniiniga täiendaval värvimisel omandavad rakud punase värvuse.

### Kapslite värvimine tušimeetodil

1. Alusklaasi otsale pannakse tilk destilleeritud veega lahjendatud tušši (1:2...1:5). Sellesse suspendeeritakse aasatäis mikroobikultuuri ja tehakse äigepreparaat.
2. Preparaadil lastakse õhus kuivada, fikseeritakse küllastatud  $HgCl_2$  lahusega (1 minut).
3. Pestakse veega.
4. Värvitakse kergelt soojendades 2 %-lise gentsiaanvioleti vesilahusega (2 minutit).
5. Pestakse veega.
6. Lastakse õhus kuivada ja mikroskoobitakse.

Protoplasma värvub violetseks, kapsel jääb värvusetu ning need on tumedal taustal hästi nähtavad.

### Glükogeeni tuvastamine Lugoli lahusega

Valmistatud äigepreparaati mõjustatakse Lugoli lahusega, mille mõjul rakkudes sisalduv glükogeen värvub siniseks. Glükogeenisaldust määratakse erineva vanusega vedel- ja tardkultuurides. Glükogeenisaldusega rakkude arvoendatakse vaateväljas ja võrreldakse mitmesuguse vanusega kultuuride glükogeeni sisaldavate rakkude arvukust omavahel.

### Rasva tuvastamine sudaan III ja osmiumhappega

Mikroobide suspensioonitilgale alusklaasil lisatakse üks tilk formaliini ja üks tilk 0,5 %-list sudaan III lahust (95 %-lises etanoolis või piimhappes). Viie minutipärast vaadatakse preparaati mikroskoobis. Ülitilgad värvuvad oranžiks.

Osmiumhappega mõjustamiseks lastakse äigepreparaadil õhus täielikult kuivada ja siis asetatakse preparaat osmiumhappe aurudesse. Selleks avatakse happe pudel, mille suule pannakse preparaat määritud poolega alla.

Osmiumhappe mõjul muutuvad rakkudes olevad õlitilgad tumehalliks.

#### T ö ö ü l e s a n d e d

1. Valmistada Sarcina flava ja Escherichia coli suspensioonist äigepreparaat ning värvida Grami meetodi Sinjovi modifikatsiooni järgi.
2. Värvida Saccharomyces vini äigepreparaat Neisseri ja Romanowsky-Giemsa meetodil.
3. Värvida Bacillus subtilis'e äigepreparaadis spoorid.
4. Azotobacter chroococcum'i kultuurist valmistatud preparaadis värvida kapslid tušimeetodil.
5. Saccharomyces cerevisiae kultuurist valmistatud äigepreparaadis sedastada glükogeen Lugoli lahusega, rasv sudaan III ja osmiumhappega.

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

#### T e e m a : ENAMIEVINUD BAKTERIVORMIDEGA TUTVUMINE JA RAKU MÕOTMINE

Bakterid jaotatakse raku väliakuju järgi nelja rühma. Esimesse rühma kuuluvad kerapisikud, teise - pulkpisikud, kolmandasse - kruvipisikud ja neljandasse - niitpisikud.

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

Kokkide diameeter on ligikaudu 0,5...2  $\mu$ m. Pooldumisel 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).

Pooldumisel ahelasse asetunud kokke nimetatakse ahel- ehk streptokokkideks - Streptococcus (joonis 5, e), viinamarjakobarate taoliselt asetunud kobarat - stafülokokkideks - Staphylococcus (joonis 5, d), 8-kaupa pakikestena asetunud sartsiinideks - Sarcina (joonis 5, f). Pikki sporigeenseid pulkpisikuid nimetatakse batsillideks - Bacillus (joonis 5, h), graamreaktiivsuselt on nad positiivsed. Ka pulkpisikud võivad esineda kahekaupa (diplobatsillid), ahelatena (streptobatsillid), või kobaratena (stafülobatsillid), (joonis 5, i).

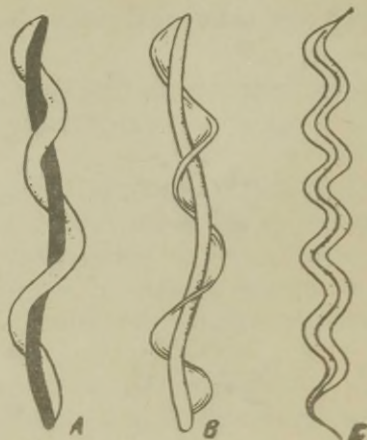
Pulgakujuliste mikroobide raku otsad võivad olla ümarad, sirged või teravad. Pulkpisikute raku otsad võivad olla ka pundunud või harunenud (Mycobacterium) (joonis 5, j). Pulkpisikutel võivad olla ka nuiataolised otsad (Corynebacterium), nad võivad spooride kohalt olla ka paksenenud (Clostridium).

Kruvipisikute hulka kuuluvad komakujulised vibrioonid (Vibrio), keeritsbakterid - spirillid (Spirillum), mille

rakuksa teeb 1...2 keerdu ümber kujuteldava kesktele (joo-  
nis 5, 1 ) ja spiroheesid, millel on kruvisarnaselt piki-  
telje ümber keerdunud või lainetaoliste paljude keerdudega  
niidid (joonis 6).



Joon. 5. Enamlevinud bakterivormid. a - mikrokokid, b - kaksikkokid, c - nelikkokid, d - kobar-  
kokid, e - ahelkokid, f - sartsiinid, g ja  
h - batsillid, i - kaksik-, ahel- ja kobar-  
batsillid, j - Mycobacterium, Corynebacte-  
rium, Clostridium, k - vibrioon, l - spirill.



Joon. 6. Spiroheedid. A - Spirochaeta, B - Cristispira, C - Treponema.

### Mikroobiraku mõõtmine

Mikroobirakkude mõõtmiseks kasutatakse okulaar- ja objektiivmikromeetrit. Okulaarmikromeeter on ümmargune kahest osast koosnev klaasplaat, mille paksemale osale on graveeritud kas võrk- või joonskaala. Okulaarmikromeeter asetatakse Huygensi okulaari ülemise ja alumise läätsse vahele. Veelgi hõlpsam on mikroobiraku mõõtmine kruviokulaarmikromeetri abil (joon. 7), mis kujutab endast okulaari, millesse on juba valmistamisel paigutatud okulaarmikromeeter ja okulaari külge on kinnitatud skaalaga varustatud trummel, mille keeramisel nihkub okulaaris nähtav rist. Mõõtmise puhul asendatakse harilik okulaar kruviokulaarmikromeetriga. Objektiivmikromeeter on joonskaalaga klaas-

ketas, mis on paigutatud alusklaasikujulise metallplaadi keskele. Objektiivmikromeetri 1 mm pikkune skaala on jaotatud 100 võrdseks osaks. Skaala jaotus on reeglina 0,01 mm ehk 10  $\mu\text{m}$ .

Mõõtmise algul tehakse kindlaks okulaarmikromeetri ühe jaotuse näiv pikkus antud optilises süsteemis. Seega okulaarmikromeetri jaotuse näiv väärtus kehtib ainult objektiiv- ja okulaari selle kombinatsiooni kohta, mida kasutati kalibreerimisel. Mikrooskoobi objektilauale asetatakse objektiivmikromeeter ja väikese suurenduse kasutamisel tsentree-ritakse objektiivmikromeetri skaala mikrooskoobi vaateväljal ja minnakse üle mikroobiraku mõõtmiseks kasutatavale optilisele süsteemile (suur suurendus).

Kui näiteks objektiivmikromeetri 6 jaotust (60  $\mu\text{m}$ ) lan-geb kokku okulaarmikromeetri 30 jaotusega, siis on okulaar-  
mikromeetri ühe jaotuse näiv pikkus 2  $\mu\text{m}$  ( $60:30=2$ ). Pärast okulaarmikromeetri jaotuse näiva pikkuse määramist asenda-  
takse objektiivmikromeeter preparaadiga ja vaadatakse mitut okulaarmikromeetri jaotust hõlmab mõõdetav rakk. Kui näi-  
teks pärmirakk mõõda pikitelge hõlmab 4 jaotust, siis on selle pikkus 8  $\mu\text{m}$ .

Kruviokulaarmikromeetri kasutamisel tehakse kindlaks trumli ühe jaotuse näiv pikkus. Okulaarmikromeetri risti lõikepunkt asetakse mikrooskoobi vaateväljal kohakuti objek-  
tiivmikromeetri teatud jaotusega ja loetakse trumlilt oku-  
laarmikromeetri näit, siis pööratakse trumlit, kuni oku-  
laarmikromeetri risti lõikepunkt on kohakuti järgmise ob-  
jektiivmikromeetri jaotusega (kriipsuga) ja loetakse trumli nihke väärtus. Nii mõõdetakse 5...6 objektiivmikromeetri jaotuse pikkus ja arvutatakse trumli ühe jaotuse keskmine näiv pikkus. Silmas tuleb pidada, et trummel teeb tõenäoli-  
selt üle täispöörde. Kui näiteks okulaarmikromeetri rist liikus vaateväljas edasi objektiivmikromeetri 5 jaotuse võr-  
ra (50  $\mu\text{m}$ ), okulaarmikromeetri trummel aga pöördus samal ajal 200 jaotuse võrra, siis trumli ühe jaotuse näiv pikkus antud optilises süsteemis on 0,25  $\mu\text{m}$  ( $50 : 200 = 0,25$ ).

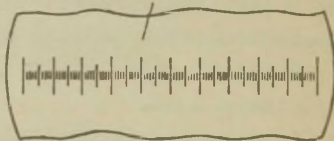
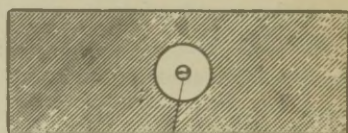
Kruviokulaarmikromeetriga mikroobiraku mõõtmisel asendatakse objektiivmikromeeter preparaadiga ja fikseeritakse suure suurenduse juures. Näiteks raku pikkuse mõõtmisel trumli pööramisega asetatakse okulaarmikromeetri rist raku ühte otsa ja loetakse mikromeetri näit. Rist nihutatakse trumli pööramisega raku teise otsa ja loetakse trumilt uus näit. Kui trumlit pööratakse edasi 23 jaotuse võrra, siis mõõdetava raku pikkus on 6  $\mu\text{m}$ :

$$0,25 \times 23 = 5,75.$$

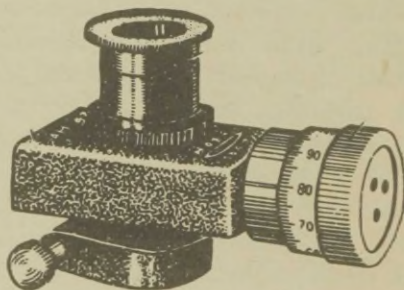
Sel viisil määratakse erinevates vaateväljades vähemalt 10 mikroobiraku pikkus ja leitakse keskmine suurus.



1

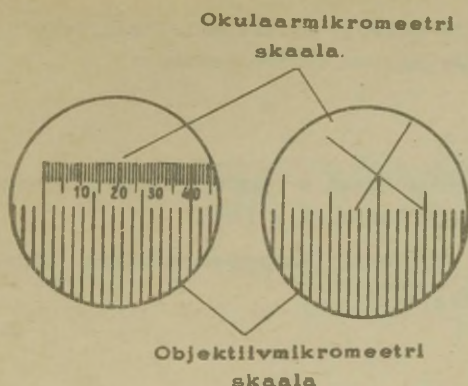


2



3

Joon. 7. Okulaarmikromeeter (1), objektiivmikromeeter (2) ja kruviokulaarmikromeeter (3).



Joon. 8. Okulaarmikromeetri skaala mõõtmine.

### Faasikontrastmikroskoop

Elusate värvimata mikroobide morfoloogia uurimiseks sobib hästi faasikontrastmikroskoop.

Mikroskoopimisel sõltub nähtavus uuritava mikroobi kontrastsusest. Mikroskoopimisel on kõige paremini nähtavad need mikroobid, mille eri osades neeldub valgus ebaühtlaselt, s.t. mille eri osad on kontrastsed. Kui valguskiired läbivad preparaadi erineva kontrastsusega osi, siis on nende intensiivsuse muutus tabatav inimsilmas.

Mikroskoopimisel on halvasti nähtavad need rakud, milles valgus neeldub ühtlaselt. Uuritavate rakkude mitmesugused osad võivad olla erineva optilise tihedusega, mistõttu nende läbimisel valguse intensiivsus ei muutu, küll aga toimuvad valguslaine faasinihked, mida inimese silm ei ole võimeline registreerima.

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

Üksikasjalik seletus faasikontrastmikroskoobi kasutamiseks esineb järgmistes käsiraamatutes:

М.Ф. Федоров. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. М., 1957.

Дж. Мейнелл, Э. Мейнелл. Экспериментальная микробиология. М., 1967.

### T ö ö ü l e s a n d e d

1. Õppida tundma enamlevinud bakterivorme demonstratsiooni korras väljapandud preparaatides ja joonistada töövihkusse igast preparaadist mõni rakk.
2. Mõõta Saccharomyces cerevisiae, Bac. bulgaricus'e ja Sarcina flava rakkude pikkus okulaarmikromeetri ja kruvikulaarmikromeetri abil.
3. Uurida faasikontrastmikroskoobiga Proteus vulgaris'e kultuurist valmistatud preparaati.

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

### T e e m a : RIISTADE ETTEVALMISTUS STERIILIMISEKS JA STERIILIMISVIISID

Steriilimiseks nimetatakse eseme, materjali või söötme täielikku vabastamist elusatest mikroobidest.

#### Klaasanumate ja -riistade ettevalmistus steriilimiseks

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

Enne nõude kasutamist tuleb neid vastavalt töödelda. Nakkuse vältimiseks steriilitakse kasutusel olnud nõusid autoklaavis 30 minutit  $112^{\circ}$  C juures, pärast seda pestakse sooja vee ja harjaga ning uhutakse 2...3 korda destilleeritud veega. Puhtaks pestud nõudel lastakse kuivada kas õhus või soojas kuivatuskapis ( $50^{\circ}$  C). Nõusid võib kuivatada ka alkoholi või eestriga. Soojendamisega kuivatamine ei ole lubatud ühegi mõõteriista, ka mõõtmisel kasutatavate pipettide puhul, sest kuumutamisel muutub nende maht.

Kui nõud tavalise pesemisega hästi puhtaks ei lähe, töödeldakse neid 30 minutit kroomseguga (1 liitri vee kohta võetakse 50 g kaaliumdikromaati -  $K_2Cr_2O_7$  ja 500 g tehnilist väävelhapet), mille järel uhutakse nõud veega hästi puhtaks.

Nõusid võib asetada mõneks minutiks ka 5...10 %-lisse tehnilisse soolhappesse ja seejärel hästi loputada. Uusi nõusid keedetakse 1...2 %-lises soolhappes, 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 leelise lahuses. Värviplekkide eemaldamiseks kasutatakse 3 %-list kloorlubjalahust.

Alusklaaside puhastamiseks rasvast tuleb neid keeta 10...15 minutit 1 %-lises soodalahuses ja loputada destilleeritud vees. Pärast seda pestakse algul nõrgas soolhapelahuses ja siis uuesti destilleeritud vees. Puhtad klaasid säilitatakse vähese ammoniaagilisisandusega 70<sup>o</sup>-ses alkoholis. Varem tarvitatud alusklaase keedetakse 5 %-lises soodalahuses, asetatakse 1...2 päevaks väävelhappesse, seejärel loputatakse destilleeritud veega, keedetakse 15...20 minutit 1 %-lises soodalahuses ja loputatakse uuesti destilleeritud vees. Pärast seda keedetakse veel 1...2 %-lises soolhappes, loputatakse destilleeritud veega ja 70<sup>o</sup>-se etanoolilahusega. Niiviisi ettevalmistatud alusklaase hoitakse 70<sup>o</sup>-ses etanoolilahuses. Enne kasutamist alusklaasid steriilitakse leegis.

Puhastatud ja kuivatatud klaasnõude ettevalmistamine steriilimiseks toimub järgmiselt. Klaasnõude (katseklaasid, kolvid, kultuuripudelid jne.) avad suletakse vattkorgiga, kusjuures pool korgi pikkusest asub avause ja pool väljaspool. Tööks kasutatavad vahendid (Petri tassid, pipetid, uhmrid, spaatlid, alusklaasid ja lehtrid jne.) pakitakse paberisse.

Vattkorgid valmistatakse järgmiselt. Lauale asetatakse avausele vastava suurusega nelinurkne vatitükk, millele asetatakse vatist südamik (väike vatitükk) ja tehakse poolteist kuni kaks keerdu, siis keeratakse sisse vatitüki kaks serva nii, et tekib vattpael, mille laius vastab korgi pikkusele, ja rullitakse siis kokku vastavalt katseklaasi või kolvi avause diameetrile. Vattkorgi võib mähkida ka ühekihilisse marlitükki. Marli servad ühendatakse niidiga korgi peal.

## Steriilimise viisid

Kristatakse järgmisi steriilimisviise: 1) steriilimine kõrge temperatuuriga, 2) mehaaniline steriilimine, 3) keemiline steriilimine, 4) steriilimine ultraviolettkiirgusega.

### I. Steriilimine kõrge temperatuuriga

1) Kuumutamine põleti leegil on kõige lihtsam ja kiirem steriilimismoodus. Bunseni põleti leegi üla- ja küljeosas on temperatuur kuni  $1000^{\circ}\text{C}$ . Kuumutamisega steriilitakse külvinõelad, pipeti otsad, katseklaaside ja kolbide suud, spaatlid, väikesed metall- ja klaasesemed, nagu pintsetid, alus- ja kateklaasid jne. Et aga paljud esemed sellisel kuumutamisel riknevad, on selle meetodi rakendamine piiratud.

2) Keetmine vees hävitab 1...3 minuti jooksul mikroobide vegetatiivsed rakud. Destilleeritud veega täidetud metallsterilisaatoris keedetakse süstlaid, nõelu, pintsette, kääre jne. 15...30 minutit. See moodus ei taga aga steriilsust, sest enamiku bakterite spoorid võivad säilida ka pikaajalisel keetmisel.

3) Steriilimine auruga rõhu all toimub autoklaavis. Kasutatakse elektri abil köetavaid horisontaal- ja vertikaalautoklaave (joon. 9). Autoklaavid on metallist õhukindlalt suletavad riistad, mis on varustatud manomeetri, kaitseventiili ja kraanidega. Mõnedel autoklaavidel on ka termomeeter. Steriilitavad esemed ja sötmed asetatakse autoklaavi ( $2/3$  kambri mahust), kaas suletakse õhukindlalt ja vool lülitatakse sisse. Aurukambris olev vesi aetakse keema, tekki aur lastakse auruventiili kaudu steriilimiskambrisse. Steriilimiskambrisse tulev aur surub riistas oleva õhu väljalaskekraani ja kummivooliku kaudu külma vette. Kui õhk ja toss (kondenseerunud, nähtavaks muutunud

veeaur) on välja lastud, siis suletakse kraan, tekib suletud ruum. Sterilisatsioonikambrisse tuleb aur tõstab rõhku ja koos sellega tõuseb ka temperatuur. Ülerõhku (atü) näitab manomeeter. Esemete ja söötmete steriilimine toimub enamasti kas 0,5 või 1 atü juures. Mikrobioloogia laboratooriumis kasutatavates autoklaavides on lubatud maksimaalne rõhk 2...3 atü. Lubatust kõrgema rõhu teket steriiliskambris väldib kaitseventiil, mis ettenähtud maksimaalse rõhu ületamisel avaneb ja hoiab ära avarii. Sterilisatsiooniga arvatakse sellest momendist, kui on saavutatud ettenähtud rõhk. Steriilimisaja möödumisel katkestatakse vool ja avatakse ettevaatlikult väljavoolukraan, mille otsas oleva kummivooliku kaudu juhitakse autoklaavis olev aur ja toss külma vette. Vooliku ots võetakse välja siis, kui suurem osa aurust on väljunud ja veenõus on märgata veel üksikuid mulle, sellega välditakse vee autoklaavi tungimist (autoklaavis tekib vaakuum). Kui rõhk sterilisatsioonikambris on langenud nullini, siis avatakse autoklaavi kaas ja võetakse steriilitud esemed ja söötmed kambrist välja. Rõhu all oleva kuuma autoklaavi ukse avamine on ohtlik, sest sel juhul põhjustab surve kiire langemine vedelikkude tormilist keemist, mis võib vattkorgid märjaks teha või need katseklaasidest välja suruda.

Kuumas auras hävivad nii mikroobide vegetatiivsed rakud kui ka spoorid. Autoklaavis steriilimise puhul tuleb valida sobiv režiim, silmas pidades steriilitavate esemete ja söötmete omadusi. Näiteks klaastaara autoklaavimisel rakendatakse sagedasti 1-atü rõhku (20...60 min.), sahhariidi sisaldavate söötmete puhul piirduakse 0,5-atü rõhuga poole tunni jooksul, kõrgema rõhu korral toimub suhkrute karamelliseerumine.

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

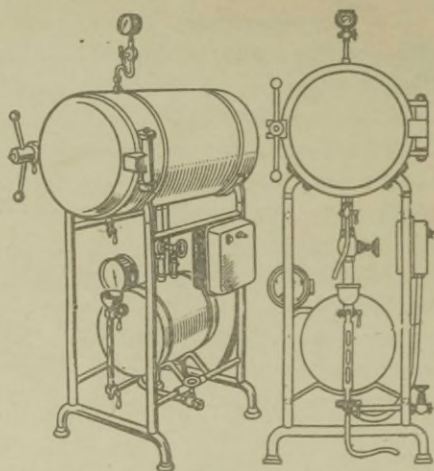
Alljärgnevalt esitatakse temperatuuri vastavus auru rõhule (ülerõhule) atmosfäärides

Manomeetri näit, atü	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 autoklaavi temperatuurid vastavad manomeetri näitudele. Kõige lihtsam on seda teha maksimumtermomeetriga. Selle puudumisel võib autoklaavi asetada klaastorukestesse paigutatud kemikaale (indikaatoreid), mis teatava temperatuuri juures sulavad. Kemikaalidele lisatakse mõni kristallike metüleensinist, fuksiini või mõnda teist värvainet, mis muudavad sulanud indikaatorkemikaali värviliseks. Järgnevalt tuuakse mõned kemikaalid, mis sobivad indikaatoritena kasutamiseks.

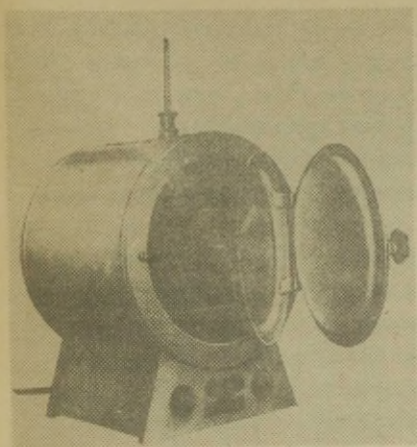
Kemikaal	Sulamistemperatuur ° C
Bensonaftool	110
Antipüriin	114
Väävliõis	115
Bensoehape	121



Joon. 9. Horisontaalautoklaav.

4) Kuuma õhuga kuivsteriilimine toimub spetsiaalsetes kuivsterilisaatorites (joon. 10). Kuivsterilisaatorites steriilitakse kuivi puhtaid pakitud klaasnõusid (katseklaasid, Petri tassid, kolvid, pipetid, pudelid, alusklaasid jne.).

Kuivsterilisaator on metallist kahekordsete seintega temperatuuri automaatse regulatsiooniga kapp, mis on varustatud kontrolltermomeetriga. Pakitud klaasnõusid steriilitakse 1,5...2 tundi  $160^{\circ}$  C juures.  $160^{\circ}$ -st kõrgema temperatuuri juures pole steriilimine soovitatav, sest vatt ja paber söestuvad. Kolbide ja katseklaaside steriilimisel tuleb arvesse ka vati söestumisel vabanev tõrvaine, mis avaldab mikroobide kasvule bakteriostaatilist toimet.



Joon. 10 a. Kuivsterilisaator

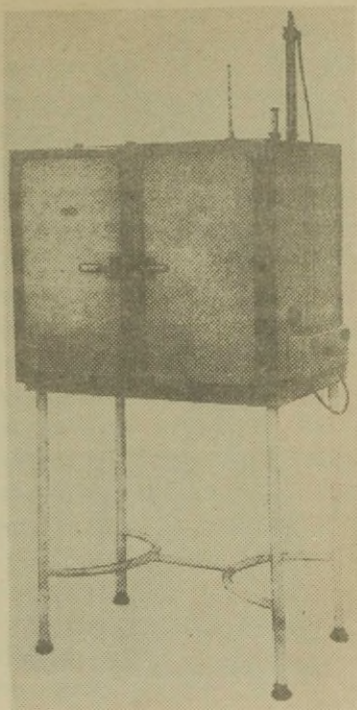
## II. Mehaaniline steriilimine

Mehaanilisel teel steriilimine toimub mikroporsest materjalist valmistatud bakterifiltri abil.

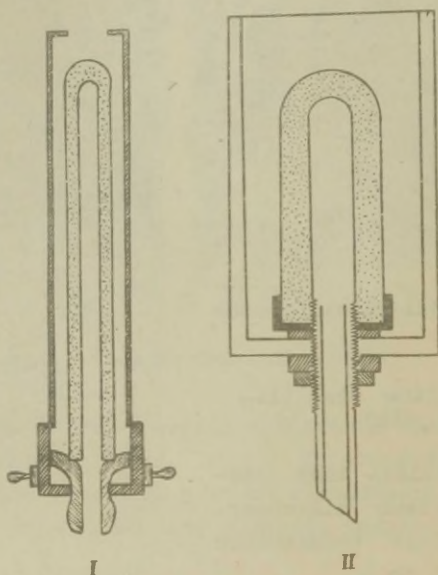
Tänapäeval kasutatakse bakterite eraldamiseks vedelikest ja gaasidest kõvu filtreid, nagu Pasteuri-Chamberlandi küünlaid, mis on valmistatud portselansavi ja räniliiva segust, kus pooride (urvete) läbimõõt reguleeritakse räniliiva hulga (joon.11).

Berkefeldi filtrite valmistamiseks kasutatakse ränihii-  
ba. Kõvu filtreid kasutatakse korduvalt, kusjuures orgaanilisest ainest puhastamiseks kuumutatakse neid muhvelahjudes.

Laboratooriumides kasutatakse kõige sagedamini pehmeid filtreid, eriti Seitzi asbestkettaid, mis asetatakse Seitzi metallstatiivi (joon. 12). Laialt kasutatakse mikroobide eraldamiseks veest membraanfiltreid, mis kujutavad endast



Joon. 10 b. Inkubaator



Joon. 11. Chamberlandi (I) ja Berkefeldi filter (II).

sõõrikujulisi poorseid nitrotselluloosikilekesi. Sõltuvalt pooride suurusest eristatakse filtreid numbritega: 1,2,3,4 ja 5, neist kõige tihedam on nr. 1, kõige hõredam - nr. 5.

Membraanfiltreid on võimalik valmistada igas laboratooriumis tselluloidist. Selleks pannakse kolbi 7 g filmilinti, millele lisatakse 64 ml atsetooni ja 36 ml etüülatsetaati. Kui filmilint on lahustunud, lisatakse 50...55 ml isoamüülalkoholi, segatakse hästi läbi ja filtreeritakse läbi paberfiltri. Filtraati valatakse väga puhtale, rasvavabale (etüüleetriega puhastatud) horisontaalsesse asendis-

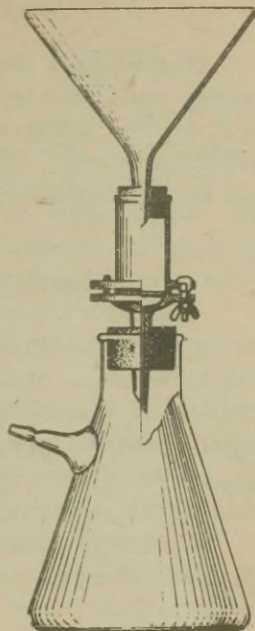
se seatud klaasile. Vedelik tardub seismisel ja klaasi pinnale jääb valge kile, mida veega niisutatud vatitükikesega saab kergesti eraldada. Saadud kilest lõigatakse vajaliku suurusega filtrid.

Enne kasutamist steriilitakse filtrid pooltunnise vees keetmisega ja pannakse pintsettide abil Seitzi statiivi, mis omakorda pannakse steriilsele imikolvile. Imikolb ühendatakse kummivooliku ja klaastoru abil vaakumpumbaga või veejoapumbaga, selleks et filtreerimist kiirendada.

Nii filtrid kui ka kõik teised filtreerimiseks vajalikud seadmed, nagu kolvid, klaastorud, kummivoolikud jne. peavad olema steriilitud ja kuni kasutamiseni säilitatud korralikult paberisse pakituna. Imikolvid ja klaastorud on soovitatav steriilida eta-

nooliga ning loputada steriilse destilleeritud veega. Et kolvis ja torus tekitatakse vaakuum, siis ei tohi neid autoklaavida ega steriilida kuiva kuumutamisega, mis ohustab klaasi ja nad võivad vaakuumi tekitamisel puruneda. Seitzi statiiv steriilitakse etanooliga ja leegis põletamisega.

Eespool kirjeldatud viisil ettevalmistatud membraanfiltrist filtreeritakse steriilitav vedelik imikolvi.



Joon. 12. Seitzi statiiv imikolvil.

### III. Steriilimine keemiliste ainetega

Steriilimist keemiliste ainetega kasutatakse laboratoorses praktikas harva. Kõige sagedamini kasutatakse etanooli (70°), eriti aga etanooli koos leegis põletamisega. Desinfitseerivate ainetena kasutatakse klooramiini (1...3%), joodtinktuuri, kloorlubja lahust (200 g/l) jne.

### IV. Steriilimine ultraviolettkiirgusega

Ultraviolettkiirgust kasutatakse eeskätt ruumide õhu steriilimiseks. Külvibokside ja mikrobioloogia laboratoriumide õhu steriilimiseks kasutatakse bakteriotsiidseid lampe, näiteks NPK-7, mis lülitatakse sisse 15...20 minutiks. Ultraviolettkiirgust rakendatakse ka operatsioonisaalide õhu steriilimiseks.

Et ultraviolettkiired kahjustavad nägemist, siis tuleb lambi töötamise ajal tingimata kanda spetsiaalseid kaitseprille.

### T õ õ ü l e s a n d e d

1. Valmistada klaasnõud steriilimiseks ette, valmistada vattkorgid 6 katseklaasile ja 1 kolvile. Valmistada kahele pipetile vattfilter ning pakkida pipetid paberisse. Pakkida paberisse 3 Petri tassi ja asetada statiivi.
2. Tutvuda inkubaatoriga, horisontaalse autoklaaviga, ultraviolettlambiga ja külviboksiga.
3. Sterilida selleks ettevalmistatud klaasnõud autoklaavis.

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

### T e e m a : M I K R O O B I D E S Ö Ö T M E D

Mikroobide puhaskultuuride eraldamiseks, kasvatamiseks ja säilitamiseks kasutatakse mitmesuguseid söötmeid.

Mikroobid kasutavad toitainetena nii orgaanilisi kui ka mineraalaineid. Sagedasti on vaja söötmesse lisada ka vitamiine ja teisi kasvufaktoreid. Mitmesuguste mikroobide kasvatamiseks sobivad erisuguse koostisega söötmed.

Mikroobide kultiveerimiseks kasutatavad söötmed peavad vastama järgmistele nõuetele.

Sööde peab sisaldama kasvatatava mikroobi toitumiseks vajalikke aineid, olema steriilne, selge ja läbipaistev ning kasvatatavale liigile optimaalse keskkonnareaktsiooniga (pH).

Ka söötme füsikokeemilised omadused (konsistents, Eh, viskoossus jne.) peavad vastama mikroobi nõuetele.

Mikroobide kultiveerimiseks kasutatavaid söötmeid on võimalik klassifitseerida mitmesuguste tunnuste alusel. Klassifitseerimisel on sobiv võtta aluseks näiteks söötme päritolu või konsistents.

Päritolu järgi eristatakse naturaalseid, sünteetilisi ja komplekssoötmeid.

Naturaalsed ehk loodusliku päritoluga ehk määratlemata koostisega söötmed on niisugused, mille täpne koostis pole teada. Sellesse rühma kuuluvad piim, õllevirre, pärmivesi, lihapuljong, kartul jne.

Sünteetilised söötmed ehk määratletud koostisega söötmed on kindla koostisega, mille valmistamiseks kasutatakse kindlas koguses keemiliselt puhtaid aineid. Selliste söötmete kasutamine võimaldab bakteri ainevahetusprotsessi ja tema eluliste mehhanismide uurimist. Jättes sööttest välja mõne aine või murtes selle kontsentratsiooni, on võimalik mikroobikultuuris tekkinud morfoloogiliste ja biokeemiliste muutuste järgi otsustada ühe või teise aine vajalikkuse üle

uuritavale mikroobile. Ainevahetusprotsesside uurimiseks tarvitatakse sünteetiliste söötmete valmistamiseks kasutatakse keemiliselt puhtaid aineid, kvartsnõusid ja bidestilleeritud vett. Sünteetiliste söötmete näitena võib mainida Hissi söödet, tärklisammooniumagarit (TAA) jt.

Komplekssöötmel on segasöötmel, mille valmistamiseks kasutatakse naturaalseid substraate, millele lisatakse keemilisi aineid. Komplekssöötmeteks on lihapeptonpuljong, Hottingeri puljong jt.

Konsistentsi alusel jagatakse söötmel vedel- ja tardsöötmeteks.

Vedelsöötmeid on palju, sagedamini kasutatavateks on lihapuljong, lihapeptonpuljong, mullatõmmis, õllevirre, Vinogradski sööde nitriifitseerijate jaoks jne.

Tardsöötmed saadakse vedelsöötmetest, kui neile lisatakse geelistajat. Parimaks geelistajaks on agar-agar, mida saadakse järgmistesse perekondadesse kuuluvatest merevetikatest: Gelidium, Gracilaria, Pterocladia, Eucheema ja Ahufeltia. Agar-agar on indiferentne aine, absorbeerib 200...250 korda rohkem oma kaalust vett, peptiseerub keemisel 98...100<sup>o</sup>-sel temperatuuril ja jahtudes tardub 45<sup>o</sup>-ses temperatuuris. Tardsöötme saamiseks lisatakse vedelsöötmesse massi järgi 1,5...2 % agar-agarit. Sellist söödet mikroobid ei vedelda ja see püsib geelina vajalikus inkubeerimistemperatuuris.

Mõnede tardsöötmete saamiseks kasutatakse geelistajana želatiini, mida toodetakse põhiliselt kaladest, aga ka vasikakontidest. Kalaluud ja vasikakondid sisaldavad rohkesti kollageeni, mis keetmisel muutub želatiiniks. Želatiin on keerulise struktuuriga lahustuv valk, mille geelistumistemperatuur on 25<sup>o</sup> C. Tardsöötme saamiseks lisatakse vedelsöötmesse 10...15 % želatiini. Sellisel tardsöötmel saab mikroobe kasvatada ainult 23...24<sup>o</sup>-ses temperatuuris.

Mikrobioloogia-alases kirjanduses kohtame sagedasti termineid: säilitussööde, rikastussööde, selektiivsööde ja dehüdraatsööde.

Säilitussöötmed on söötmed, mis võimaldavad mikroobikultuuri elus püsimit pikema aja jooksul madalas temperatuuris (0...+4° C) mitte aga head kasvu. Säilitussöötteks sobib lihapuljong, mullatõmmis jt.

Rikastussöötmed on söötmed, mis võimaldavad kas mikroobide uuritava liigi või füsioloogilise rühma head kasvu ja arenemist. Rikastussöötme valmistamiseks võetakse säilitussööde, millele lisatakse mõnda ainet, mis eriti soodustab bakterite kasvu. Rikastussöötmena võib mainida suhkrupuljongit, Buliri söödet, vereagarit glükoosiga jne.

Selektiivsöötmed on sellised söötmed, mis võimaldavad mikroobide looduslikust või kunstlikult koostatud segust arenema hakata ainult teatavate kindlate füsioloogiliste omadustega mikroobidel. Selektiivsöötmega luuakse uurijat mittehuvitavate mikroobide elutegevuseks ebasoodsad tingimused kas kasvu pidurdavate ainete (värvained, kemikaalid) lisamisega või sel teel, et jäetakse lisamata ained, mis võimaldaksid kasvada ka kõrvalistel vormidel. Ka söötme reaktsiooni on võimalik kohandada ainult ühele liigile.

Dehüdraatsöötmed on tööstuslikult valmistatud kuiv-söötmed. Neid lahustatakse vees 1,5...6 %-lise kontsentratsioonini. Dehüdraatsöötmeid kasutatakse nendes laboratooriumides, kus on raskusi söötmete valmistamisega.

Järgnevalt tuuakse praktikumis valmistatavate ja söötmete klassifitseerimisel näitena toodud söötmete retseptid.

Lihapulgongi (LP) e. lihavee, lihapeptonpuljongi (LPP) ja lihapeptonagari (LPA) valmistamine.

Lihavee valmistamiseks võetakse 500 g noore veise rasvata ja kõõlusteta liha, hakitakse peeneks ja asetatakse 1000 ml kraanivette 12 tunniks või 1 tunniks 50...55° C juurde matsereeruma. Liha võib seisma panna ka kolme- kuni neljakordsesse marlikotti. Matsereerimissegusse on soovitatav lisada pisut pepsiini ja soolhappega hapestada kuni pH 4,5...5,0-ni. Pärast matsereerumist keedetakse liha pool tundi ja filtreeritakse läbi lapi ning paberkeerdfiltri.

Filtraadi maht viiakse ühe liitrini ja siis lisatakse 10 g peptooni ja 5 g NaCl ning keedetakse kuni lisatud ainete lahustumiseni. Kuum vedelik leelistatakse soodaga või 1 N NaOH-ga kuni pH 8-ni (lakmus sinistub, fenoolftaleiin aga veel ei värvu). Pärast seda kuumutatakse veel pool tundi autoklaavis, siis filtreeritakse valgud ja HCl-ga viiakse pH 7-ni. Kui vedelik on hägune, siis loksutatakse kanamunavalguga, kuumutatakse ja filtreeritakse. Rühmaanalüüside jaoks filtraat lahjendatakse veel 2 korda.

LFP steriilitakse autoklaavis 1 atü juures 20 minutit.

LPA valmistamiseks lisatakse LFP-le 2% pestud agarit.

Lihavesi on paljudele söötmetele aluseks, võimaldab mitmesuguste mikroobide kasvu.

Pärmiekstrakti valmistamine. Tärglisevabale värsketele presspärmile lisatakse kaalult 9-kordne kogus vett ja segatakse hästi segi ning autoklaavitakse 3 tundi 1 atü juures. Pärast seda lastakse liigutamata settida mitme päeva jooksul toatemperatuuril. Vedelik eraldatakse sifooniga ja tsentrifugeeritakse. Saadud ekstrakti autoklaavitakse 20 minutit 1 atü juures. Pärmiekstrakti lisatakse teistele söötmetele kui valgu- ja vitamiinirikast substrati.

Mullatõmmise valmistamine. 1 kg aiamauldast suspendeeritakse 1 liitris kraanivees ja segatakse hästi ning autoklaavitakse 1 tund 1,5 atü juures. Pärast seda jäetakse sõõde pikemaks ajaks selginema. Seejärel filtreeritakse läbi kahekordse filterpaberi. Filtraat neutraliseeritakse soodaga pH 7...7,2-ni. 100 ml-le mullatõmmisele lisatakse 900 ml destilleeritud vett ja steriilitakse autoklaavis 1 atü juures 20 minutit. Sobib mullabakterite kasvatamiseks.

Kartuliagari valmistamine. Kooritud ja pestud kartulid lõigatakse viiludeks ja keedetakse pehmeks 10-kordses veekoguses. Pärast keetmist filtreeritakse keedus läbi paberfiltrit ja lisatakse 2% agar-agarit ning kuumutatakse keeval veevannil kuni agar-agar peptiseerub. Hägususe pu-

hul filtreeritakse veel kord. Sööde steriilitakse autoklaavis 1,5 atü juures 30 minuti jooksul. Sobib mitmesuguste mikroobide kasvatamiseks.

Kartulilõigud vöihappebakterite kasvatamiseks. Kasutatakse mädaplekkideta valgeid mugulaid, mis pestakse hästi puhtaks, kooritakse ja lõigatakse 10...15 mm paksusteks lõikudeks. Lõigud höörutakse tekkivate hapete neutraliseerimiseks kriidiga sisse ja asetatakse Petri tassidesse. Lõikudega Petri tassid steriilitakse autoklaavis 2 atü juures 25...30 minutit. Steriilimisreflimist kinnipidamine on väga oluline, sest kartulis on peaaegu alati Bac. subtilise väga vastupidavad spoorid. Kriidiga sissehöörumise asemel võib kartulilõike hoida 6...12 tunni jooksul 1 %-lises soodalahuses.

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

Suhkrupuljongi ja suhkrugari valmistamine. Lihaveele või vesilagarile lisatakse 0,5 kuni 1 % mingit suhkrut. Lõõatav suhkur lahustatakse enne juurdepanekut väheses vees. Sööde steriilitakse autoklaavis 0,5 atü juures 30 minuti jooksul. Sobib hästi bakterite kasvatamiseks.

Buliri sööde sisaldab 1 liitri LPP kohta 12,5 g manniitooli ja 6 ml neutraalpunase 1 %-list vesilahust. Sööde steriilitakse autoklaavis 0,5 atü juures 30 minuti jooksul. Sobib bakterite kasvatamiseks.

Vereagar glükoosiga. Kõrgalt leeliselise reaktsiooniga glükoosagarit (2...3% agar-agarit ja 2% glükoosi) valatakse 60 ml kaupa suurtesse katseklaasidesse (kõrgus 25 cm ja  $\emptyset$  2,5 cm) ja steriilitakse autoklaavis 0,5 atü juures 30 minutit ning säilitatakse selliselt kuni kasutamiseni. Enne kasutamist kuumutatakse glükoosagarit veevannil sulatamise eesmärgil ja siis jahutatakse 45° -ni ning lisatakse igasse katseklaasi 12...15 ml steriilset defibrineeritud looma verd, segatakse läbi ja valatakse 3 või 4 Heidenreichi tassi.

Söötmega täidetud tasse hoitakse enne külvi 2 ööpäeva jooksul toatemperatuuril.

Endo sööde. Sajale milliliitrile IPA-le lisatakse 1 g laktoosi, 0,1 g kristalset soodat ja indikaatorit kuni kahvaturroosa värvuseni. Indikaator valmistatakse järgmiselt. Katseklaasi mõõdetakse 1 ml aluselise fuksiini küllastatud alkoholilahust, millele lisatakse vähehaaval 10 %-list  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  vesilahust kuni fuksiini värvitustumiseni, s.o. kuni kahvaturroosa värvuseni. Endo sööde valmistatakse võimalikult enne tarvitamist ning hoitakse valguse eest kaitselt. E. coli kolooniad omandavad Endo söötmel punase värvuse, mida enamasti iseloomustab veel pronksläige, kuna bakterid, kes laktoosi ei lagunda, annavad oranžiroosa värvusega kolooniad, mille värvus erineb vähe söötme värvusest.

Hissi sööde ehk sahhariidide "kirju rida".

Kasutatakse mikroobide sahhariidide lagundamisvõime määramiseks.

Sajasse milliliitrisse kuuma ( $80\dots90^\circ\text{C}$ ) vette viiakse 1 g peptooni ja 0,5 g NaCl. Need lahustuvad mõne minutiga. Lahus filtreeritakse läbi paberfiltril. Lahuse pH on 7,0. Kui lahus ei ole aga neutraalse reaktsiooniga, siis suunatakse see väävelhappega neutraalseks universaalindikaatorpaberi kasutamisel. Peptoonvesi mõõdetakse 50 või 100 ml kaupa kolbidesse, igasse kolbi lisatakse 1..2% keemiliselt puhast sahhariidi. Sahhariididest kasutatakse pentoose, heksoose, disahhariide, trisahhariide ja polüsahhariide. Peale sahhariidi lisatakse kolbi veel (mõni tilk) sobivat indikaatorit, mis reageerib sahhariidide lagunemisel tekkivatele hapetele. Indikaatorina kasutatakse sagedasti broomtümoolsinist 0,04 %-lise vesilahusena, mida lisatakse söötmele vahekorras 1 : 10. Broomtümoolsinise teoreetiline pöördeala on 6,1...8,1, praktilise pöördealaga 6,0...7,6. Rappelises keskkonnas on indikaator kollase, leeliselises sinise ja neutraalses keskkonnas rohelise värvusega. Sööde valatakse gaasikogumise torukestega varustatud katseklaasidesse ja steriliseeritakse autoklaavis 0,5 atü juures 30 minutit.

Tärklisammooniumagar (TAA). Mulla roisubakterite kasvatamiseks kasutatakse LPA kõrval edukalt TAA söödet, mille koostis on järgmine.

dest. vesi	- 1000 ml
$K_2HPO_4$	- 2,0 g
$(NH_4)_2SO_4$	- 2,0 g
$MgSO_4$	- 1,0 g
NaCl	- 1,0 g
kriit	- 3,0 g
lahustuv tärklis	- 1,0 g
agar-agar	- 1,5...2 %

Sööde steriilitakse 0,5 atü juures 30 minuti jooksul.

Lakmuspiim. Mikroobide elutegevuse tagajärjel muutunud söötme reaktsiooni määramiseks võib kasutada lakmuspiima. Lakmuspiima valmistamiseks kasutatakse pulbrilist lakmust. Kaalutakse 2,5 g lakmust, mis peenestatakse uhmris ja lahustatakse destilleeritud vees. Lahustuvuse suurendamiseks lisatakse mõni milliliiter 1 N leelist. Lakmuse lahus valatakse liitrilisse mõõtsilindrisse, loksutatakse ja lisatakse destilleeritud vett liitrini. Lahuse värvus suunatakse piimhappe lisamisega (tilkhaaval) violetseks. Mõõdetakse 7 ml lakmuselahust, mis lisatakse 93 ml-le kooritud piimale ja loksutatakse. Lakmuspiimaga täidetakse katseklaasid, mis steriilitakse autoklaavis 1 atü juures 12...15 minutit. Pärast autoklaavimist katseklaasid jahutatakse ja inokuleeritakse ettenähtud bakterikultuuriga ning inkubeeritakse 37<sup>o</sup> C juures 2...3 ööpäeva. Kui bakterikultuur muutis söötme reaktsiooni happeliseks, siis lakmuspiim on punase värvusega, aluselise reaktsiooni puhul aga sinise värvusega.

## Söötmete pH määramine

Enamik mikroobe eelistab kasvuks ja arenguks neutraalsed või nõrgalt leeliselisest keskkonnareaktsiooni. Et söötme pH steriilimisel ja mikroobide kasvatamisel tunduvalt ei muutuks, lisatakse söötmesse puhverlahuseid. Puhverlahusteks nimetatakse niisuguseid lahuseid, mis on suutelised piisavalt säilitama oma pH väärtust, vaatamata kontsentratsiooni muutumisele, happe või leelise lisamisele. Seega puhverlahused neutraliseerivad söötmele lisanduva happe ja aluse ning hoiavad söötmes alal esialgse vesinikioonide kontsentratsiooni. Tavaliselt lisatakse laboratooriumides söötmeile puhvritena kas fosforhappe primaarseid või sekundaarseid naatriumi- või kaaliumisoolasid. Ka peptonvesi ja lihavesi on puhvriteks. Et autoklaavimisel langeb pH peaaegu kõigis söötmeis, siis viiakse söötme pH enne autoklaavimist pisut kõrgemale ettenähtust.

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

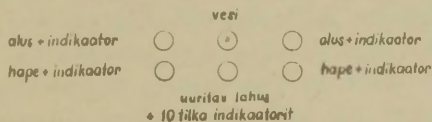
Vedelsöötmete pH määramiseks sobib Gillespie meetod (joon. 13), mis põhineb kolorimeetrial. Määramisel kasutatakse vabalt valitud kontsentratsiooniga happe- ja aluselahust, kuid happe ja aluse kontsentratsioonid peavad olema võrdsed, võrdsed peavad olema ka lahuste ruumalad ja katseklaaside läbimõõdud. Käesoleval praktikumil kasutatakse 0,1 N HCl ja 0,1 N NaOH-lahust ning indikaatorina 0,04 %-list broomtümoolsinist (indikaatori valik oleneb sellest, missuguse pH piirkonnaga on määramisel tegemist). Eelnevalt määratakse uuritava lahuse pH ligikaudselt universaalindikaatorpaberiga.

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, kol-

mandasse - 7 tilka ..... Üheksandasse - 1 tilk).  
 Analoogiliselt 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 erisuguse värvusetooniga lahus, happelises keskkonnas kollane, leelises keskkonnas sinine. Määramisel kasutatakse paare, mis koostatakse happelisest ja leeliselisest seeriast nii, et indikaatori tilkade summa oleks 10. Komparaatoris paari korraga vaadeldes tajume indikaatori pöördeala teatavale pH väärtusele vastavat rohelist värvust. Paaride seeria annab aga terve pöördeala ulatuses roheliste värvuste rea, mis vastab pH muutustele 0,2-liste intervallidega (värvuse intensiivsus jääb

I KATSEKLAASIDE SEERIA 10 ml 0,1N HCl	II KATSEKLAASIDE SEERIA 10 ml 0,1N NaOH	KATSEKLAASIDE PAARI NR.	pH 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 <sub>2</sub>		pH <sub>1</sub> 6,3 - pH <sub>2</sub> 8,0	
IX paar - pH <sub>1</sub>			

### KOMPARAATORISSE ASETAMISE SCHEEM



Joon. 13. Gillespie meetodi skeem.

samaks, muutub värvustoon rohekassinisest üle rohelise rohekaskollaseks). Seega igale erineva värvustooniga katseklaaside paarile vastab kindel pH väärtus, millega võrreldakse uuritava vedelsöötme värvustooni ja leitakse sel teel pH. Söötme pH määratakse broomtümoolsinise teoreetilise pöördela alusel, mis on 6,1...8,1.

Lahuste värvuse intensiivsuse võrdlemine toimub komparaatoris joonisel 13 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 ainetega: agar-agar, želatiin, pepton, lakmoid.
2. Valmistada järgmise praktikumi jaoks mikroobide kultiveerimiseks järgmised söötmed: LPP, LPA, TAA, Endo sööde, lakmuspiim.  
Iga laudkond valmistab nimetatud söötmeid 300 ml. LPP ja LPA valmistamiseks kasutatakse valmis LP-d.
3. Määrata LP ja LPP pH universaalindikaatorpaberi ja Gillespie meetodiga.
4. Iga üliõpilane täidab järgmise praktikumi jaoks 3 katseklaasi lakmuspiimaga, 3 katseklaasi TAA-ga (püstagar), 6 katseklaasi LPA-ga (3 lāngagarit ja 3 püstagarit).

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

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

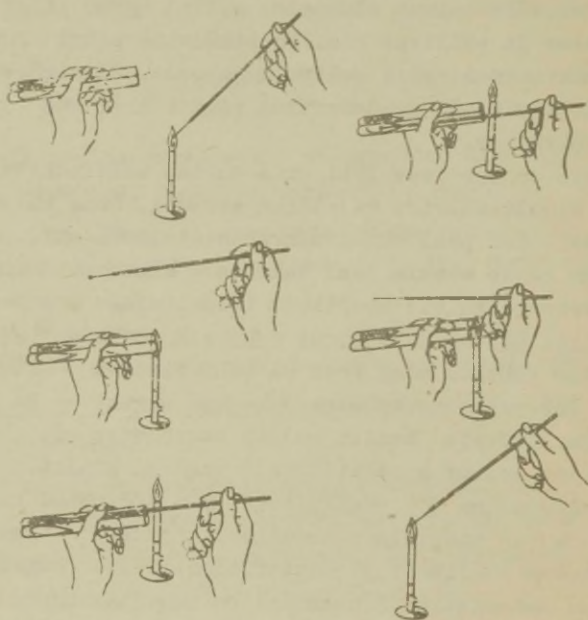
Mikroobide kultiveerimine on vajalik nende morfoloogia, füsioloogia ja biokeemia uurimiseks ning biomassi saamiseks.

Mikroobe tuleb aeg-ajalt ümber külvata eeskätt toitainete ärakasutamise ja ainevahetusproduktide kogunemise tõttu. Edasikülv toimub söötmele, millel antud liigi kasv on normaalne ja säilivus hea. Edasikülvide puhul kontrollitakse mikroskoobi abil kultuuri puhtust. Edasikülvid tehakse külvinoõela või gradueeritud pipeti abil kas vedel- või tardsöötmesse.

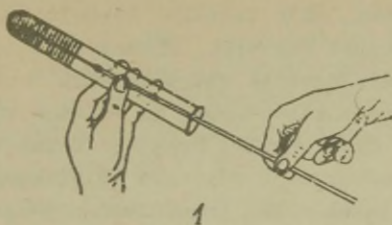
Külvid on soovitatav läbi viia puhtas külviboksis, kus hoitakse ainult külviks vajalikke esemeid. Enne külve steriilitakse boksi pool tundi ultraviolettlambi abil, mille tulemusena hävib enamik seal leiduvaid mikroobe. Boksi puudumisel tehakse külvid hoolikalt tolmuimejaga puhastatud toas, milles külvamise ajal ei tohi aken olla avatud ega ventilaator töötada ning toas ei tohi viibida kõrvalisi isikuid. Töölaud puhastatakse enne töö algust 96 %-lise etanooliga. Külvaja kandku seljas kas pesust või desinfeksioonist tulnud hermeetiliselt pakitud kitlit. Patogeense materjaliga ja puhaskultuuridega töö puhul kantakse suu ja nina ees steriilset marlikatet, juuksed kaetakse, käed pestakse hoolikalt ja desinfitseeritakse (etanooliga). Patogeense materjaliga töötamisel on soovitatav kanda kirurgikindaid. Külvamiseks on kindlad võtted. Külvamisel tuleb vältida ümbritsevast keskkonnast ja õhust juhuslike mikroobide sattumist katseklaasidesse või Petri tassidesse. 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 olevatesse sötmetesse kas külviaasa, külvinõela või pipeti abil. Väiksemate materjalihulkade puhul kasutatakse külvinõela või mikropipetti, suuremate hulkade puhul aga külviaasa või harilikku pipetti. Petri tassi sötmeplaadile kantud materjal aetakse laiali kas külviaasa või Drigalski spaatli abil (joon. 16).

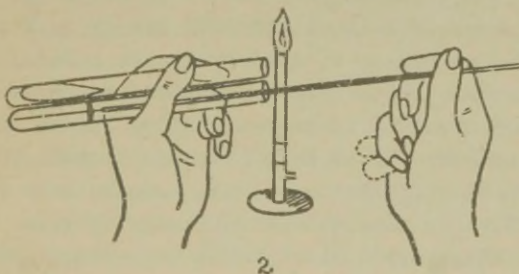
Katseklaasidesse külvatakse kahel viisil. Ühel juhul on korraga käes ainult üks katseklaas, teisel juhul aga kaks katseklaasi (joon. 15).



Joon. 14. Joonkülvi tehnika etapid.



Joon. 15. Katseklaasi külvitehnika. Pistekülv püstagarisse - korruga käes üks katseklaas (1) ja



korruga käes kaks katseklaasi (2).

Kaldagarile (käes üks katseklaas) külvamisel võetakse längasendis katseklaas külvatava materjaliga vasakusse kätte pöidla ja esimese kolme sõrme vahele. Sellise võtte puhul on katseklaasi sisu kogu ulatuses hästi jälgitav. Parema käe esimese kolme sõrme vahele võetakse pliilatai asendis külviaas, nii et külviaas ja selle vars oleksid 15...

...20 cm ulatuses vabad. Külviaasa kuumutatakse leegis kuni hõõgumiseni, siis lastakse kergelt leegist läbi ka külviaasa jootekoht varresse. Pärast seda jahutatakse külviaasa. Siis eemaldatakse katseklaasilt vattkork kruviva liigutusega parema käe peopesa ja viienda sõrme või neljanda ja viienda sõrme vahele. Seejärel kuumutatakse leegil katseklaasi suudmeosa ja võetakse külviaasaga ettevaatlikult ilma katseklaasi seinu ja suudmeosa puudutamata materjal. Pärast seda kuumutatakse katseklaasi suudmeosa jälle leegis ja suletakse katseklaas paar korda läbi leegi tõmmatud vattkorgiga kruviva liigutuse abil ning asetatakse statii- vi. Vattkorgi alumise osa süttimisel asetatakse kork kiiresti katseklaasi või kolvi avasse, mille tulemusena leek hapnikupuudusel kustub. Kui süttib puuvillkorgi ülemine osa, siis asetatakse kork kiiresti avasse ja korgi ülemine osa haaratakse pihku, ei tohi aga peale puhuda. Nüüd võetakse vasakusse kätte lüngagarsöötmeaga katseklaas eespool kirjeldatud asendis, kusjuures oluline on, et söötme pind jääks ülespoole. Pärast seda avatakse katseklaas parema käega eespool kirjeldatud viisil, kuumutatakse suudmeava ja viiakse külvatav materjal katseklaasis olevale söötmele. Külvamist lüngagarile alustatakse katseklaasi põhjast, kusjuures libistatakse aasaga siksakiliselt mööda söötme pin- da. Lõpuks kuumutatakse veelkord katseklaasi suudmeosa leegis ja suletakse paar korda läbi leegi tõmmatud vattkorgi- ga ning asetatakse katseklaas oma kohale.

Et vältida aasa täitumist poorse sademega, loputatakse plaatinatraati koos varre alumise osaga kas vees või etanoolis. Pärast seda kuumutatakse külviaasa leegis kuni hõõgumiseni, kusjuures paar kolm korda lastakse leegist läbi ka varre alumine osa. Alles siis asetatakse külviase ettenähtud kohale.

Kaldagarile (käs kaks katseklaasi) külvamise puhul võetakse vasakusse kätte eespool kirjeldatud asendis kaks katseklaasi. Üks neist on täidetud materjaliga ja teine söötmeaga. Külvimaterjaliga katseklaasilt eemaldatakse vatt-

kork parema käega, kusjuures kork jääb väikese sõrme ja peopesa vahele. Enne ja pärast külvimaterjali võtmist kuumutatakse leegis katseklaasi suudmeosa, mis suletakse paar korda läbi leegi tõmmatud vattkorgiga. Pärast seda avatakse söötmega katseklaas ja külvatakse eespool kirjeldatud viisil (joon. 14.).

Vedelsöötmetesse külvatakse külviaasaga samal põhimõttel, külviaas pistetakse 3...4 korda söötmesse.

Katseklaasis asuvasse püstasendis tardsöötmesse külvatakse külvinõela abil, piste ehk torge tehakse söötmesamba keskosas katseklaasi põhjani (joon. 15). Pistekülvi võib teha ka teisiti. Vasakusse kätte võetud söötmega katseklaas, mille ava on allapoole, lastagu oma raskusega vajuda paremas käes püstasendis olevale külvinõelale.

Petri tasside söötmeplaatidele võib ka külvata külviaasaga. Selleks asetatakse Petri tass lauale leegi lähedusse ja vasaku käega tõstetakse tassi kaas söötmeplaadi kohal nii kõrgele, et on võimalik paremas käes oleva külviaasaga teha külv siksakjoonena söötmele. Kaas takistab mikroobide langemist õhust söötmele.

Petri tassi agarsöötmesse sissekülvi tegemiseks on mitu menetlust. Ühe menetluse puhul asetatakse lauale steriilne Petri tass, mille kaas tõstetakse vasaku käega nii kõrgele, et tassi oleks võimalik steriilse pipetiga leegi läheduses viia kas 0,5 või 1,0 ml mikroobide suspensiooni. Pipett pannakse statiivi ja Petri tassi kallatakse umbes poole sentimeetri paksune ( $45^{\circ}$  C-ni jahutatud) geelistumata LPA kiht. Tass suletakse ja teda liigutatakse laual ringjoont mööda, et mikroobide suspensioon seguneks hästi söötmega.

Petri tassi agarsöötmesse võib sissekülvi teha ka nii, et võetakse püstagariga (LPA) katseklaas, mis pannakse keevasse veevanni, kuni tardsööde sulab, ja siis jahutatakse kuni  $45^{\circ}$  C-ni. Selle temperatuuri juures on agarsööde veel vedel, kuid ei põhjusta mikroobide hävinemist. Sobiva temperatuuriga söötmesse külvatakse mikroobide suspensioon

kas pipetiga või külviaasaga. Katseklaas suletakse vattkorgiga ja võetakse peaaegu horisontaalasendis peopesade vahele ning edasi-tagasi roteerimise abil soodustatakse külvimaterjali segunemist söötmega. Pärast segamist seemldatakse katseklaasil kork ja kuumutatakse selle suudmeosa leegil ning valatakse inokuleeritud sööde Petri tassi. Valamise puhul hoitakse Petri tassi kaant söötme pinna kohal. Pärast Petri tassi sulgemist liigutatakse seda laual ringjoontööda külvimaterjali täielikuks segunemiseks söötmega ja jäetakse horisontaalsele pinnale tarduma.

### Muldkülvi aeroobsete mikroobide uurimiseks

Muld on mikroorganismide poolest kõige rikkam looduslik keskkond. Ühes grammis mullas, sõltuvalt selle omadustest, võib leiduda kuni miljardeid mikroobe. Mullas leidub baktereid, sealhulgas ka kiirikulisi, mikroseeni, algloomi, vetikaid jt. mikroobe, peale selle isegi viirusi, mille omavahelised suhted on väga mitmesugused. Mullas leidub nii aeroobe, fakultatiivseid aeroobe, fakultatiivseid anaeroobe kui ka obligaatseid anaeroobe. Mikroobide peamine mass mullas paikneb pinnalt arvates 5...20 cm sügavusel.

Muldkülvi abil on võimalik määrata mullas esinevate mikroobide hulka. Et muld on väga mikroorganismiderikas, siis on otstarbekohane valmistada mulla lahjendused. Selleks kaalutakse mulla keskmisest proovist 10 g mulda ja pannakse seisukolbi 90 ml-sse steriilsesse vette (arvestades kadu autoklaavimisel võetakse algul 95 ml vett). Pärast seda loksutatakse 15 minutit loksutusaparaadil ja lõpuks 15 sekundit käes. Saadud mullasuspensiooni nimetatakse esimeseks lahjenduseks (1 : 10), millest valmistatakse teine lahjendus. Selleks mõõdetakse steriilselt 5 ml esimese lahjenduse suspensiooni ja kantakse teise seisukolbi, milles on 45 ml steriilset vett ja loksutatakse käes 1 minut. Sel puhul saadakse teine lahjendus (1 : 100). Analoogiliselt sellega valmistatakse kolmas (1 : 1 000), neljas (1 : 10 000), viies

(1 : 100 000), kuues (1 : 1 000 000), seitsmes (1 : 10 000 000) jne. lahjendus.

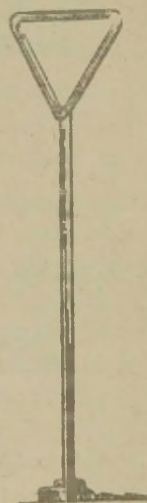
Samaaegselt määratakse mulla kuivainesisaldus.

Steriilsesse Petri tassi valatakse umbes  $\frac{1}{2}$  cm paksune tärglisammooniumagarsöötme kiht, millel lastakse geelistuda. Pärast seda kantakse tardsöötme pinnale steriilse pipetiga 0,05 või 0,1 ml sobivat mullalahjendust (olenevalt mullast sobib selleks sagedasti kas V või VI lahjendus) ja aetakse steriilse Drigalski spaatliga laiali (joon. 16). Petri tass nummerdatakse ja asetatakse  $28^{\circ}$  C juurde termostaati 3 ööpäevaks. Resultaatide arvutamiseks loendatakse kolooniate arv tassis ja arvutatakse mikroobide hulk 1 g mulla kohta.

Mulla aeroobsete mikroobide arvukuse määramiseks sobib hästi ka sissekülv. Sel puhul võetakse Petri tass, millesse mõõdetakse 0,5 või 1,0 ml sobivat mullalahjendust ja sellele lisatakse 10...15 ml vedelat agarsöödet ( $45^{\circ}$  C), mis hoolikalt segatakse mullasuspensiooniga. Selleks liigutatakse Petri tassi laual ringjoont mööda.

#### Muldkülv anaeroobsete mikroobide uurimiseks

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



Joon. 16. Söötme valamine Petri tassi ja Drigalski spaatel.

Enamik anaeroobe ei karda niivõrd hapniku manulust, kuivõrd kõrget redokspotentsiaali.

Anaeroobide kultiveerimismeetodeid võib liigitada järgmiselt:

1. Anaeroobide kultuuri kaitsmine hapniku eest mehhaaniliste võtetega. Näiteks katseklaasis olev vedelsööde kaetakse isoleeriva õlikihiga, mis ei lase läbi õhuhapnikku. Samal eesmärgil tehakse katseklaasis olevasse püstagarisse pistekülv. Püstagari alumisse ossa on raskendatud õhu juurdepääs.

2. Anaeroobe kultiveeritakse vaakuumis või inertsete gaaside (argoon) atmosfääris.

3. Anaeroobide kultiveerimine õhuhapnikku neelavate ainete manulusel. Hapnikku neelavate ainetena kasutatakse sagedasti pürogallooli- ja KOH-lahust.

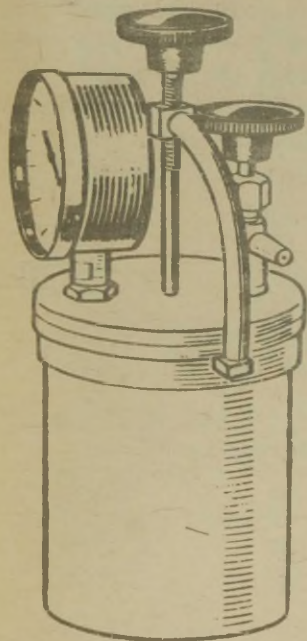
4. Anaeroobide kultiveerimine redutseerivate ainete manulusel. Redutseerivate ainetena võib lisada söötmesse glükooosi, indigokarmini, Na-hüposulfitit jne.

5. Anaeroobe on võimalik kultiveerida ka koos aeroobidega, Anaeroobid saavad arenema hakata pärast seda, kui aeroobid on keskkonnast hapniku ära kasutanud.

Praktikumis kasutatakse anaeroobide kasvatamiseks esitatud meetodite kombinatsioone.

Katseklaasid täidetakse Kitt-Tarozzi söötmega. Kitt-Tarozzi söötmes on hapnikku neelavaks aineks glükogeen, mida sisaldavad maksatükikesed. Söötme pinnale valatakse 2...3 cm paksune vaseliinõli kiht kaitseks hapniku sissepääsemise eest. Katseklaasi kuumutatakse keeval veevannil 10...30 minutit, mille tagajärjel eraldub sööttest õhk, seega ka hapnik. Pärast seda külvatakse söötmesse külvinõelaga mulla II lahjendust. Seejärel kuumutatakse katseklaase veevannil 15...20 minutit 80° C juures, et vegetatiivset mikrofloorat hävitada. Eluvõimelistena säilivad aga mitmesuguste mikroobide, sealhulgas ka anaeroobide spoorid. Asporogeensed anaeroobid sel puhul hävivad.

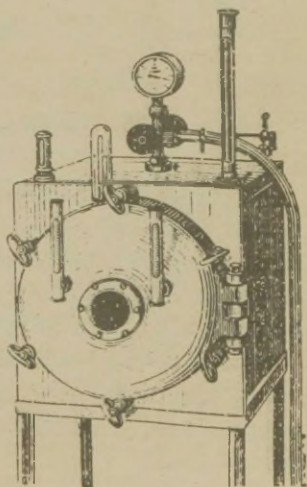
Külve hoitakse 24...28 tundi termostaadis 28° C juures. Tavalistele sötmetele anaeroobide uurimiseks tehtud külvid asetatakse anaerostaati (joon. 17), millest õhk vaakuumpumba abil eemaldatakse. Hapniku täielikuks eemaldamiseks võib seda meetodit kombineerida neelamismeetodiga.



Joon. 17. Anaerostaadid.

### Õhkkülv

Õhu mikrofloora uurimisele pani aluse L. Pasteur oma klassikaliste töödega (1850...



...1862), mis tõestasi, et õhus leidub alati suuremal või vähemal määral mitmesuguseid mikroobe. Mikroobid pole siiski õhu päriselanikud, vaid on sinna sattunud kas mullast tolmuga või veekogudest veepiiskadega. Toitainete purdumine, kuivus ja ultraviolettkiired pidurdavad nende arengut õhus, kuid nende varu täieneb õhku sattunud tolmuga või veepiiskadega. Mida rohkem on õhus tolmu, seda rohkem on ka mikroobe, nende hulgas ka inimese hingamisteedest pärinevaid.

Õhu mikrofloora liigiline koostis on kirju, ülekaalus on sporgeensed bakterid, palju leidub spore.

Siseruumide õhu mikrofloora arvukus oleneb ruumide puhastusest ja aastaajast (vt. tabel 1).

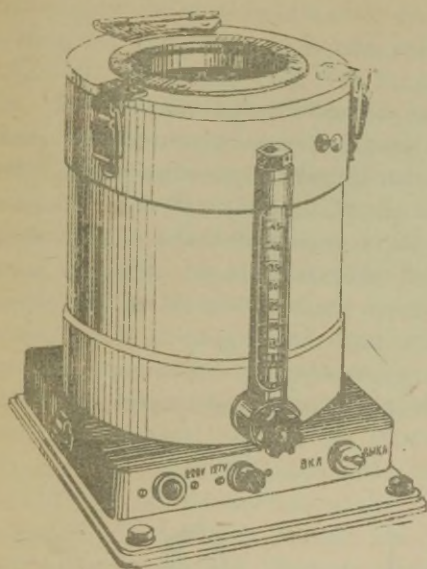
T a b e l 1

Kriteerium eluruumide õhu sanitaarseks hinnanguks Tetsi järgi (mikroobide arv  $1\text{ m}^3$ -s õhus)

Õhu hinnang	Mikroobide üldarv	
	suvel	talvel
Puhas	< 1500	< 4500
Saastunud	> 2500	> 7000

Mikroobide arvukust õhus on võimalik määrata mitmel viisil.

Viimasel ajal on hakatud üha enam rakendama elektrilist Krotovi aparaati (joon. 18). Selle kasutamisel aspireeritakse teatav kindel hulk õhku (25...250 liitrit) Petri tassis olevale tardsöötme pinnale, millele fikseeruvad õhus leiduvad mikroobid ja nende spoorid. Petri tassid suletakse ja asetatakse paariks kuni kolmeks ööpäevaks  $28^{\circ}\text{C}$  juurde inkubaatorisse. Pärast seda loendatakse mikroobikolooniate arv, oletades et iga koloonia on alguse saanud ühest rakust.



Joon. 18. Krotovi aparaat

Järgnevalt tutvustatakse Robert Kochi rakendatud sadestamismeetodit. Steriilse tardsöötmege täidetud Petri tassid hoitakse 5 minuti vältel avatuna uuritavas õhus. Pärast seda tassid suletakse ja pannakse inkubaatorisse  $28^{\circ} \text{C}$  juurde kaheks kuni kolmeks ööpäevaks ning loendatakse söötme pinnal kasvanud kolooniate arv.

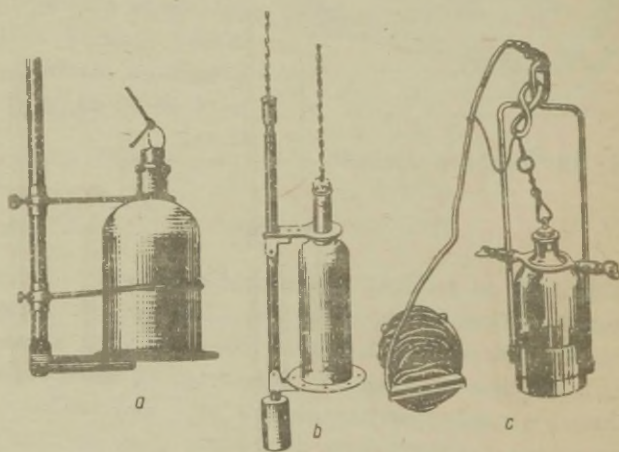
Omeljanski arvestuste kohaselt sadeneb  $100 \text{ cm}^2$  suurusele söötme pinnale 5 minuti jooksul ligikaudu samapalju mikroobe, kui neid on 10 liitris seisvas õhus.

### Vesikülv

Veekogud on paljudele mikroobiliikidele looduslikuks keskkonnaks. Veekogu mikrofloora sõltub suurel määral ümbritseva keskkonna - mulla mikrofloorast, kust pärineb osa veemikroobe. Looduslikkudes veekogudes on mikroobide arv väga kõikumine, oleneb aastaaegadest ja meteoroloogilistest tingimustest. Looduslikkude veekogude vesi on ilma filtreerimiseta harva joogiks kõlblik. Joogivee kõlblikkuse hindamiseks on kehtestatud vastavad normid. Puhas, hea joogivei võib sisaldada milliliitris kuni 100 mikroobi, kusjuures nende hulgas ei tohi esineda patogeenseid.

Et vees esinevate kõigi eluvõimeliste mikroobide üldarvu määramine on seotud raskustega, siis piirduetakse eluvõimeliste aerobsete mesofiilsete mikroobide arvu määramisega 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 vesi külvatakse Petri tassi 45° C-ni jahutatud LPA-sse. Selleks võetakse steriilse pipetiga 1 ml uuritavat vett ja viiakse Petri tassi, kusjuures tõstetakse Petri tassi kaant vaid niipalju, et pipetiots sinna parasjagu sisse mahub. Pärast seda valatakse Petri tassi 10...15 ml 45° C-ni jahutatud LPA-d. Et uuritav veeproov seguneks ühtlaselt söötmege, liigutatakse Petri tassi ettevaatlikult ringliigutuste abil. Pärast seda jäetakse Petri tass lauale kuni söötme geelustumiseni. Petri tassi põhjale märgitakse proovi number, külvimäär ja lahjendus. Kõigi teiste veelahjendustega toimatakse analoogiliselt. Petri tassid pannakse termostaati 28° C juurde paariks ööpäevaks.



Joon. 18-a. Batomeetrid veeproovi võtmiseks.

Veeproovi võtmiseks veekogudest kasutatakse batomeetreid (joon. 18-a).

## Vesikülv kolitiitri ja koliindeksi määramiseks

Vee joogiks kõlblikkus ei olene niivõrd bakteritiitrist, kuivõrd teatavate kindlate bakterite ja orgaaniliste ühendite sisaldusest. Vee fekaalidega reostumise iseloomustajaks peetakse kolitiitrit. Kui uuritavas vees leidub seedetraktis alati esinevat kolibakterit (Escherichia coli), siis on ilmne, et hiljuti pidi toimuma fekaalidega reostumine, sest väliskeskkond ei ole kolibakteri loomulikuks keskkonnaks. Selline vesi on joogiks ohtlik, sest koos normaalse seedetrakti mikroflooraga võib sinna sattuda ka patogeenseid mikroobe. Sanitaarse tähtsusega on ainult püsisoojaste loomade kolibakter. Püsisoojaste kolibakterit on võimalik eraldada kõigusoojaste loomade kolibakterist sahariidide lagundamisvõime alusel. Püsisoojaste kolibakter lagundab 43° C juures sahariide ja moodustab indooli, milleks pole võimalised kõigusoojaste kolibakterid.

Kolitiitri all mõistetakse uuritava vee vähimat hulka, milles leidub eluvõimeline kolibakter. Tavaliselt väljendatakse seda hulka kuupsentimeetrites.

Koliindeksi all mõistetakse Esch. coli rakkude arvu ühes dm<sup>3</sup>-s uuritavas vees.

Koliindeksi määramiseks kasutatakse nitrotselluloosist kilejaid kettakesi - membraanfiltreid. Sanitaar-bakterioloogiliseks uurimiseks kasutatakse membraanfiltreid nr. 2, 3 ja 4, mille poorid on selleks tööks sobiva läbimõõduga.

Määramiseks kasutatavaid membraanfiltreid keedetakse destilleeritud vees 15...20 minutit, Seitzi statiiv aga steriilitakse leegis põletamisel. Keedetud membraanfilter asetatakse steriilsete pintsettidega steriilsesse Seitzi statiivi. Seitzi statiiv koos membraanfiltriga asetatakse imikolville. Läbi filtri imetakse kindel hulk uuritavat vett. Pärast seda võetakse steriilsete pintsettidega membraan-

filter statiivist ja asetatakse pealmise poolega ülespoole Petri tassi Endo söötmele. Filtri söötmele asetamisel tuleb jälgida, et söötme ja filtri vahele ei jääks õhku (õhummullid). Filtri ja söötme vahele jäänud õhust vabanetakse filtri silumisel pintsettidega. Pärast seda asetatakse tasid termostaati 37° C juurde üheks ööpäevaks. Ühte Petri tassi võib asetada 3...4 membraanfiltrit. Filtri pinnale jäänud kolibakterid paljunevad ja moodustavad metalse läikega punaseid kolooniaid. Kolibakterite kasv saab toimuda söötme difusiooni tõttu läbi filtri pooride. Filtreeritud vee hulga ja membraanfiltril kasvanud kolibakterite kolooniate arvu alusel arvutatakse koliindeks.

Külvi puhul membraanfiltritele on võimalik määrata ka kolitiitrit. Selleks filtreeritakse erisugused vee hulgad läbi mitme filtri. Endo söötmele asetatud membraanfiltritel jälgitakse Esch. coli kolooniate kasvu. Kolitiitri ja koliindeksi leidmiseks saab kasutada (Petrovitši koostatud) tabelit 2.

Tabel on koostatud andmete põhjal, mis saadi neljas erisuguses koguses vee külvi puhul membraanfiltritele. Membraanfiltritele külvati (filtreeriti) 0,3; 3; 30 ja 300 ml vett ja filtrid paigutati Petri tassi Endo söötmele. Inkubatsioon toimus 24 tunni jooksul temperatuuril 37° C. Kui nelja erisuguse külvimäära puhul membraanfiltritel kolibakterit ei leidunud, mis on tabelis märgitud miinustega, siis on koliindeks väiksem kui kolm ja kolitiiter suurem kui 333. Kui aga kolibakter leidis (tabelis märgitud plussiga) ainult kas 0,3-s või 3-s või 30 ml-s vees, siis on kõigil juhtudel tabeli järgi koliindeks 3 ja kolitiiter 333. Kui kolibakter leidis nii 0,3-s kui ka 3 ml-s vees, siis koliindeks on 6 ja kolitiiter 166.

Koliindeksit ja -tiitrit on võimalik ka välja arvutada. Kui näiteks kolme väljakülvi puhul (100, 10 ja 1 ml) membraanfiltrile kasvas ühel filtril 3, teisel 2 ja kolmandal 1 kolirühma bakter, siis koliindeks on:

$$(6 \times 1000) : 111 = 54$$

Kui 111 ml väljakülvi puhul kasvu ei ole, siis koliindeks on:

$$(1 \times 1000) : 110 = > 9$$

T a b e l 2

Koliindeksi ja kolitiitri arvutamine  
Petrovitši järgi

Filtreeritud vee hulk ml-tes				Koliindeks	Kolitiiter
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 (püüsoojastel esinevate kolibakterite) identifitseerimiseks kasutatakse vesikülvi Eijkmanni vedelsöötmesse, mis sisaldab glükoosi. Sanitaarse tähtsusega kolibakterite kultuur lagundab 24 tunni jooksul 43<sup>o</sup>-ses temperatuuris glükoosi, millega kaasneb gaasi tootmine.

Uhe veeproovi uurimiseks võetakse 2 kolbi ja 10 suurt

katseklaasi Eijkmanni sõõtmega. Kolbidesse pannakse 10 ml ja katseklaasidesse 1 ml sõõdet ning gaasikogumise toruke ehk ujuk kultiveerimisel eralduva gaasi kogumiseks. Kolbidesse valatakse 100 ml ja katseklaasidesse 10 ml uuritavat vett. Katseklaasid ja kolvid paigutatakse 24 tunniks 43° C temperatuuriga termostaati. Pärast seda uuritakse kas katseklaasides ja kolbides esineb bakterite kasvu (hägusust) ja ujukites gaasi. Tulemused kirjutatakse töövihikusse. Bakterite kasvu ja gaasi esinemisel on tegemist sanitaarse tähtsusega kolibakteriga. Ka Eijkmanni sõõtmesse tehtud külvid võimaldavad kindlaks teha nii koliindeksi kui ka kolitiitrit, mis määratakse tabeli 3 abil. Kui näiteks gaasi- tootmis- ja gaasi kogumise tabeli järgi on koliindeks 18 ja kolitiiter 56. Seega tabeli horisontaalse ja vertikaalse rea lõikumisel saame kätte uuritava veeproovi koliindeksi ja kolitiitri.

Kolitiitrit on võimalik ümber arvutada koliindeksiks ja vastupidi, võttes arvesse, et nende arvuliste väärtuste korrutis peab võrduma 1000-ga või olema sellele maksimaalselt lähedane. Koliindeksi leidmiseks jagatakse arv 1000 kolitiitri arvule ja omakorda kolitiitri saamiseks jagatakse arv 1000 koliindeksi arvule.

Riikliku standardi alusel ei tohi koliindeks olla veevärgi- ja üldkasutatavate kaevude vetes suurem kui 3 ja kolitiiter väiksem kui 300. Suurlinnade veevärgi kolitiiter peab olema vähemalt 500, koliindeks aga mitte üle 2. Lahtised veekogud loetakse joogivee võtu paigana sobivateks, kui kolitiiter on neis vähemalt 111.

Veevärgivee uurimiseks võetakse proov järgmiselt. Kraaniava kuumutatakse leegiga ja lastakse veel voolata 10... ..15 minutit. Pärast seda võetakse steriilsesse liitrilisse pudelisse veeproov. Kaevuvee uurimiseks võetakse vee- proovid batomeetriga.

Külvide läbiviimiseks vajalike sõõtmete - IPA, TAA, Endo sõõde ja lakmusplim - valmistamise retseptid on toodud V praktikumis, kus käsitletakse sõõtmeid. Peale ees-

Vee kolitiitri ja koliindeksi määramine Eijkmanni  
söötmetel gaasiproduksiooni alusel

Positiivsete katseklaaside arv	Positiivsete kolbide arv					
	0		1		2	
	Koli- indeks	Koli- tiiter	Koli- indeks	Koli- tiiter	Koli- indeks	Koli- 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

pool loetletud söötmete kasutatakse veel Kitt-Tarozzi ja Eijkmanni söödet, mille retseptid tuuakse järgnevalt.

Kitt-Tarozzi sööde (modifitseeritud)

8...10 ml 0,3 %-lise glükoosisisaldusega lihapeptoonpuljongile, mis sisaldab 0,1 % agar-agarit, lisatakse katseklaasi 3...5 g küüliku või vasika maksa tükikesi või hakkliha. Sööde kaetakse 2 cm paksuse vaseliinõli kihiga ja autoklaavitakse 1-atü rõhul 30 minutit.

Eijkmanni sööde

Liitrile destilleeritud veele lisatakse 100 g peptooni, 50 g NaCl ja 100 g glükoosi. Sööde autoklaavitakse 0,5-atü rõhul poole tunni jooksul.

Kolbidesse valatakse 10 ja katseklaasidesse 1 ml söödet.

## T ö ö ü l e s a n d e d

1. Teha pistekülv Aerobacter cloacae ja Proteus vulgaris'e kultuurist LPA-st valmistatud püstagarisse.
2. Teha joonkülv Sarcina flava ja Bacillus subtilis'e kultuurist LPA-st valmistatud kaldagarile.
3. Külvata gradueeritud pipetiga 0,1 ml Lactobacillus plantarum'i ja Escherichia coli suspensiooni lakmuspiimasse.
4. Teha sissekülv VI mullalahjendusest (0,5 ml) Petri tassi TAA-sse.
5. Külvata VI mullalahjendusest 0,1 ml Kitt-Tarozzi söötmesse katseklaasis anaeroobide saamiseks. Inokuleeritud katseklaas pannakse anaerostaati.
6. Teha õhkkülv Krotovi aparaadiga Petri tassi TAA-le ja sadestuskülv samale söötmele Petri tassi.
7. Teha vesikülv (1 ml) Petri tassi LPA-sse (sissekülv).
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 JA MIKROOBIDE ARVUKUSE MÄÄRAMINE

Kultuuride uurimine. Eelmisel praktikumil inokuleeritud söötmetel arenenud kultuure uuritakse kõigepealt palja silmaga ja siis luubiga. Puhaskultuuridest kasvatatud kultuuride puhul püütakse veenduda, kas tegemist on ainult ühe mikroobiliigiga või on seal veel muid juhuslikult söötmesse sattunud mikroobe. Selleks jälgitakse kolooniate värvust, kuju, servajoont ja pinnaomadusi. Kultuuridest valmistatakse preparaadid, värvitakse Ziehl'i karboolfuksiiniga ja Grami järgi ning mikroskoobitakse. Preparaadi valmistamiseks võetakse külviaasaga kultuuridest materjal, pannakse alusklaasile füsioloogilise lahuse tilka ja hõõrutakse laiali. Preparaat kuivatatakse õhus, fikseeritakse leegis ja värvitakse.

Kõigepealt võetakse vaatluse alla inokuleeritud püstagarid. Neis jälgitakse, kas kultuur on arenenud kogu piste ulatuses või osaliselt (ülemises või alumises osas), kas püstagari pealispinnal piste ümbruses on kultuur arenenud, kas mikroobiliik on eraldanud söötmesse gaase ja pigmente. Gaaside eraldumise puhul on geelistunud söötmes märgata lõhesid.

Aerobacter cloacae kultuurist valmistatud preparaadis on näha lühikesi graamnegatiivseid pulkpisikuid. Nimetatud liik on fakultatiivne anaeroob. A. cloacae eluneb sooltorus ja sõnnikus, teda esineb ka taimedel ja mullas, kuhu ta satub koos sõnnikuga. Silohoidlates võib teda leiduda sileerimise esimestel päevadel, kus ta pidurdab piimhappebakterite arengut.

Proteus vulgaris'e kultuurist valmistatud preparaadis on näha mitmesuguse kujuga rakke, sest tegemist on väga muutliku liigiga. Nii on noortes kultuurides (16...24 tun-

di) ülekaalus väikesed liikuvad pulkpisikud ( $1...3 \times 0,5 \mu\text{m}$ ), vanades kultuurides aga esineb sageli kuni 10 korda pikemaid viburitega rakke. Pr.vulgaris esineb mädanevais orgaanilisis jäätmeis (ka toiduainetes), loomade sooltorus, vees, mullas jm. Pr.vulgaris on graamnegatiivne aeroob, redutseerib nitraadid nitrititeks, lagundab sahhariidid hapeteks, mispuhul eraldub gaas. Kasutab ainult valgu lämmastikku, loomsete valkude lagundamisel eraldub  $\text{H}_2\text{S}$ . Optimaalne temperatuur on  $30...37^\circ \text{C}$ .

Sarcina flava ehk kuld kollase sartsiiini kultuurist valmistatud preparaadis esinevad kokid suurte pakenditena, milles on mõnikord isegi 64 ja rohkem kokki. Tavaline mikroobirakkude paigutus on siiski 4-kaupa. Kolooniad on helekollased ja ümmargused, läbimõõduga  $1,0...1,5 \text{ mm}$ . S.flava on aeroob, esineb õhus, mullas ja taimejäätmel. Optimaalne temperatuur on  $30...35^\circ \text{C}$ .

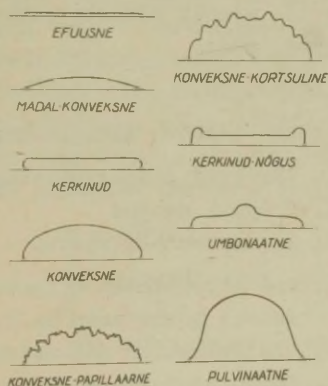
Bacillus subtilis'e ehk heinapisiku kultuurist valmistatud preparaadis näeme liikumisvõimelisi pulgakesi ( $3,5 \times 0,6 \mu\text{m}$ ), mis sagedasti moodustavad ahelaid. Vanemates kultuurides esineb ka ovaalseid spoore. Kolooniad on väikesed, värvusetud, kuiva kortsulise pinnaga. Bac.subtilis on aeroobne ammonifitseerija. Optimaalne temperatuur on  $25^\circ \text{C}$ . Looduses laialt levinud, esineb mullas, vees, taimsetel ja loomsetel produktidel.

Lakmuspiimasse külvatud Escherichia coli kultuurist valmistatud preparaadis on näha graamnegatiivseid, liikumisvõimelisi ümmarguste otstega pulkpisikuid ( $1...3 \times 0,5 \mu\text{m}$ ) kas ühekaupa või ahelatena. E.coli kolooniad on valged või määrdunud valged, pealt sileda pinnaga. Kalgendab piima ja kasutab sahhariide (välja arvatud sahharoos), mille arvel moodustab keskkonda happeid ja gaase. Seega E.coli kalgendab ka lakmuspiima ja muudab värvuselt punaseks, esineb rohkesti gaasi. E.coli on fakultatiivne aeroob, optimaalne temperatuur on  $30...37^\circ \text{C}$ , elab loomade sooltorus, vees ja mullas.

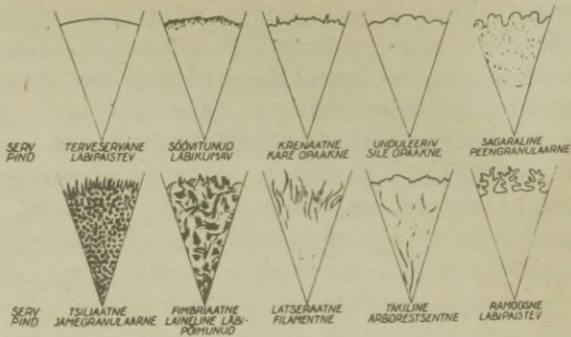
Lakmuspiimas arenenud Lactobacillus plantarum'i kul-

tuurist valmistatud preparaadis on näha liikumisvõimetuid graampositiivseid pulkpisikuid ( $3...8 \times 0,3...1,0 \mu\text{m}$ ) kas üksikult või ahelatena. Happelises keskkonnas kultiveerimisel on rakud märgatavalt pikemad tavalistest. Lactobac. plantarum kalgendab piima ja kääritab mõningaid sahhariide (glükoos, sahharoos, maltoos), mille arvel moodustab happeid, eriti piimhapet, on mikroaerofiil. Seega ka lakmuspim kalgendub ja muutub värvuselt punaseks Lactobac. plantarum'i tegevuse mõjul. Optimaalne temperatuur on  $30^{\circ} \text{C}$ . Esineb taimsetel produktidel ja hapendatud aedviljade soolvees. Talub kuni 5,5 %-list soola kontsentratsiooni.

Püst- ja kaldagaril arenenud kultuuridel jälgida luubiga kultuuritunnuseid. Kultuuritunnuste uurimisel jälgida kultuuri iseloomu (üksikud kolooniad, kattekultuur), värvust, pinna iseloomu (jahujas, limajas, läikiv jne.), söötmes laiustumist, ainete moodustamist (gaasid, pigmendid jne.), kolooniate vertikaalläbilõiget (joon. 19) ja servajoont (joon. 20).



Joon. 19. Kolooniate vertikaalläbilõige.



Joon. 20. Kolooniade servajoon.

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. Tähtsamad neist on järgmised:

I. Totaalarvestus

A. Otsene loendus mikroskoobis

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

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

2. Üldlämmastiku määramine
3. Tsentrifuugimismeetod
4. Mitmesugused muud meetodid (tiitritav happesus, kaal, refraktiivindeks jne.)

## II. Elusate rakkude arvestus

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

Muldkülv. Külvitehnika on toodud VI praktikumis lk. 58. Kui Petri tassis söötmeplaadil on kasvanud kuni 300 kolooniat, siis loendatakse kolooniate arv kas kogu tassil või Wolffhügeli kambri 10 ruudus. Iga loendatud koloonia märgitakse tindi või tušiga (täpikene) Petri tassi põhjal, mis väldib kolooniate korduvat loendamist. Loendada võib palja silmaga, luubi või binokulaarluubi abil. Ei ole soovitatav, et Petri tassil oleks kolooniate arv üle 300, sest siis on nende eristamine sagedasti raske, saadud andmed pole usaldusväärsed. Kolooniate arvu (100...300) Petri tassil on võimalik reguleerida külviks kasutatava mullalahjenduse valikuga ja hulga.

Wolffhügeli kambriks (joon. 21) nimetatakse 1 cm<sup>2</sup> suurusteks ruutudeks jagatud mustale alusele paigutatud klaasplaati. Uuritav Petri tass paigutatakse põhjaga ülespoole aluse ja klaasplaadi vahele. Petri tassil loendatakse kolooniate arv vähemalt kümnes eraldi asuvas ruudus. Kolooniate üldarv arvutatakse järgmiselt. Kümnes ruudus loendatud kolooniate arv jagatakse 10-ga, millega saadakse keskmine kolooniate arv ühes ruudus (1 cm<sup>2</sup>). Kolooniate üldarv (X) kogu tassil leitakse võrrandi järgi

$$X = n\pi r^2,$$

kus

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

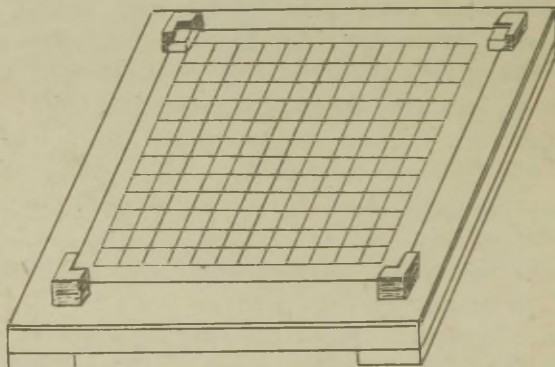
$\pi$  - 3,14;

r - tassi raadius cm-tes.

Leitud kolooniate arv korrutatakse veel mullalahuse lahjendusemääraga, kusjuures 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, mis leitakse võrdusest

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

kus  $g$  - mulla kaal g-des enne kuumutamist;  
 $g_1$  - mulla kaal g-des pärast 103° C juures kuumutamist.



Joon. 21. Wolffhügeli kamber.

Kolooniate arvu loendamiseks Petri tassil võib kasutada spetsiaalset elektrilist seadeldist MPTY 42 2401-64 (joon. 22), mis on varustatud loendaja, luubi ja Wolffhügeli kambriga. Seadeldis on nii konstrueeritud, et Petri tassile täpi tegemisel lisandub loendajas olevale arvule 1, nii toimub see iga täpi tegemisel. Kolooniate loendamisele asumisel märgitakse töövihikusse loendaja algseis ja loendamise lõpetamisel lõppseis. Loendaja lõppseisust (arvust) algnäitaja lahutamisel saadakse kolooniate arv Petri tassil. Loendada võib kogu tassil või kümnes 1 cm<sup>2</sup> suuruses ruudus olevad kolooniad, nagu eespool (lk. 75) Wolffhügeli kambri puhul juba kirjeldatud.

Tutvuda seadeldise juures oleva instruksiooniga.



Joon. 22. Bakterikolooniate elektriline loendaja.

Õhkkülv. Külvitehnika on toodud lk. 62 . Õhkkülvist Petri tassis arenenud kultuuri puhul loendatakse kolooniate arv kogu söötmeplaadil. Õhkkülvide puhul väljendatakse mikroobide arv  $1 \text{ m}^3$  õhu kohta.

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

Näide:

$78,5\text{-cm}^2$  söötmeplaadil on 50 kolooniat,  
 $100,0\text{-cm}^2$  söötmeplaadil on X kolooniat,  
 $X = 50\ 000 : 785 = 64;$   
 $10 \text{ dm}^3$  õhus - 64 mikroobi,  
 $1000 \text{ dm}^3$  õhus - 6400 mikroobi.

Nii õhk-, vesi- kui ka muldkülvidega saadakse Petri tassides tardsöötmel tavaliselt mitmesuguse välisilme ja si-

sestruktuuriga mikroobikolooniad. Erisuguste liikide kolooniad erinevad üksteisest kaju, konsistentsi, värvuse, pinna iseloomu ja servajoone poolest. Kolooniate vaatlemiseks on sobiv kasutada binokulaarluupi. Väikeste kolooniate läbimõõt on 0,1...0,2 mm, keskmise suurusega kolooniatel 0,3... ..4 mm, kuna suurtel võib see olla 5 mm ja enam. Gigantkolooniate diameeter ületab mitu korda suurte kolooniate diameetri. Osa kolooniaid on värvusetud, teised aga värvilised. Värvus sõltub pigmentide loomusest, mida vastavad mikroobid produtseerivad. Jälgitakse kolooniate kultuuritunnuseid (kaju, servajoont, vertikaalläbilõiget ja struktuuri). Loetletud tunnuste määramisel kasutada jooniste 19 ja 20 abi.

Mikroobikolooniate kaju ja muud tunnused tardsöötmel on liigile teataval määral iseloomulikud ning neid tuleb arvestada liikide identifitseerimisel, kuigi tuleb ka silmas pidada kolooniate välisilme üsna hõlpsat varieeruvust.

Vesikülv. Külvitehnika on kirjeldatud lk. 64. Vesikülvi puhul väljendatakse mikroobide arvu 1 cm<sup>3</sup> vee kohta. Et meie eespoelses tööülesandes (vt. lk. 70.) oli külvimääraks antud 1 cm<sup>3</sup>, siis Petri tassil loendatud kolooniate arv väljendabki mikroobide arvu 1 cm<sup>3</sup> vees. Lahjendatud vee külvide puhul tuleb kolooniate arv korrutada lahjendusmääraga. Leitakse erinevate lahjendustega saadud tulemuste aritmeetiline keskmine.

Vee puhtuse hindamisel kasutatakse Miqueli koostatud tabelit.

0...10 mikroobi 1 cm <sup>3</sup> vees	-	äärmiselt puhas
10...100	"-"	"-"
100...1000	"-"	"-"
1000...10000	"-"	"-"
10000...100000	"-"	"-"
100000 ja rohkem	"-"	"-"

- väga puhas  
- puhas  
- keskmine  
- joogiks kõlbmatu  
- joogiks täiesti kõlbmatu.

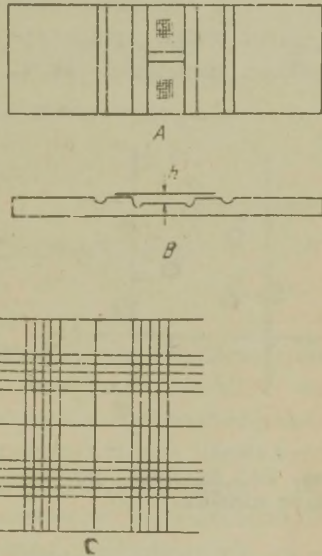
Järgnevalt tuuakse mikroobide arvu määramiseks eespool kirjeldamata, kuid sagedasti kasutatavate meetodite kirjeldus.

## Mikroobirakkude loendamine suspensioonis

Mikroobirakkude arvu määramiseks suspensioonis kasutatakse spetsiaalseid loenduskambreid. Laialdaselt kasutatakse Gorjajevi kambrit (joon. 23).

Gorjajevi kamber kujutab endast klaasplaati, millele on graveeritud kehesuguse suurusega kambriid. Suuremate pindala on 0,04 ja väiksematel 0,0025 mm<sup>2</sup> ning mõlemate sügavus 0,1 mm. Klaasplaadil on sügavad vaod liigse suspensiooni kogunemiseks.

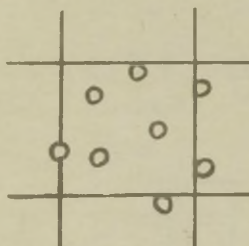
Loenduskambriisse pannakse (kummalgipool keskoont asuvasse kambrikestesse) pipeti või klaaspulga abil tilk uuritavat mikroobisuspensiooni ja kaetakse kateklaasidega. Kateklaasi paigutamisel surutakse seda klaaspulga abil vastu klaasplaati kuni vikerkaare ilmumiseni äärealadel. Sel juhul võib arvestada, et kambrites on suspensiooni kihi paksus 0,1 mm. Mikroobide loendamine väiksemas ruudus (0,0025 mm<sup>2</sup>) viiakse läbi siis, kui ühe ruudu kohta tuleb kuni 10 raku; suuremas ruudus (0,04 mm<sup>2</sup>) siis, kui ühe ruudu kohta tuleb kuni 30 raku. Kui suspensioon on liiga



Joon. 23. Gorjajevi kamber. A - pealtvaade, B - külgsuurendus, C - väikesel suurendusel mikrooskoobi all.

tihe, siis tuleb seda lahjendada vajaduse järgi kas steriilse füsioloogilise lahuse või steriilse veega.

Uuritavat mikroobisuspensiooni tuleb vähemalt 3 korda kambrisse panna, iga kord loendada ruutude kaupa vähemalt 10 ruudus rakkude arv. Rakkude arv loendatakse kambri kumbagi diagonaali mööda 5 ruudus. Rakkude loendamiseks on välja kujunenud kindel tehnika. Loendatakse kõik täielikult ruudu sees olevad rakud ja lisaks neile veel ruudu külgi (piirjooni) puudutavatest rakkudest, kas ülemist ja vasakut ruudu külge puudutavad rakud või alumist ja paremat ruudu külge puudutavad rakud.



Joon. 24. Rakkude loendamine ruudus.

Arvutada. Arvutamisel tuleb lähtuda sellest, et 1 cm<sup>3</sup>-s on mikroobe kambrikeses keskmiselt esinevate rakkude arvuga võrreldes nii mitu korda rohkem, mitu korda 1 cm<sup>3</sup> on suurem kambrikese ruumalast.

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

kus N - mikroobide arv 1 cm<sup>3</sup>-s suspensioonis,  
a - kambri ruudu pindala mm<sup>2</sup>-tes (0,04 või 0,0025 mm<sup>2</sup>),  
T - kambri sügavus mm-tes (0,1 mm),  
n - mikroobirakkude keskmine arv ühes ruudus.

Wrighti meetod võimaldab värvitud älgereparaadis mikroobide arvukust määrata proportsionaalse loenduse abil. Älgereparaadi valmistamisel segatakse uuritavat suspensiooni ja mehe verd võrdses koguses. Mehe normaalse vere punaliblede arv on suhteliselt konstantne, 5 miljonit  $1 \text{ mm}^3$ -s. Okulaarmikromeetri abil loendatakse punaliblesid nii mitmes vaateväljas, et kokku saadakse ligikaudu 500 punaliblet. Samal ajal loendatakse nendes vaateväljades ka mikroobide arv ning arvutatakse selle alusel mikroobide arv  $1 \text{ cm}^3$ -s suspensioonis.

Kui näiteks 500 punalible kohta esines 600 mikroobirakku, siis  $1 \text{ mm}^3$ -s on neid 6 miljonit,  $1 \text{ cm}^3$ -s aga 1000 korda rohkem (võrdses koguses suspensiooni segamisel), s. o.  $6 \cdot 10^8$  mikroobi.

#### Mikroobide arvu määramine suspensiooni hägususe abil

Mikroobide arvu määramine suspensiooni hägususe järgi toimub nefelomeetriga (joon. 25). Nefelomeetrimisel võrreldakse külvalgustuse puhul mikroobide standardsuspensiooni hägusust mikroobide uuritava suspensiooni hägususega. Teiste sõnadega, võrreldakse standardsuspensioonist läbi pääsenud valguse intensiivsust uuritavast suspensioonist läbi pääsenud valguse intensiivsusega. Suspensiooni hägusus sõltub otseselt mikroobide valguse hajutamise võimest ja suspensiooni kihi paksusest. Nefelomeeter võimaldab visuaalselt võrdsustada uuritava ja standardsuspensiooni optilist efekti suspensiooni kihi paksuse reguleerimisega. Teades mikroobide arvu standardsuspensioonis ja selle kihi paksust ning uuritava suspensiooni kihi paksust, saab arvutada mikroobide kontsentratsiooni uuritavas suspensioonis. Baeri seaduse põhjal on kahe lahuse ühesuguse hägususe puhul ühe lahuse kontsentratsiooni ja kihi paksuse korrutis võrdne teise lahuse kontsentratsiooni ja kihi paksuse korrutisega:

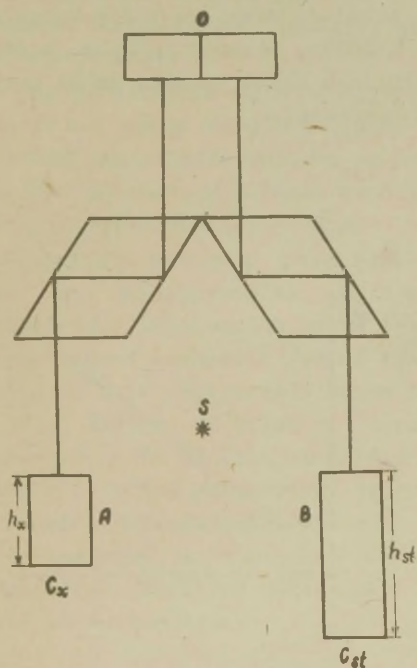
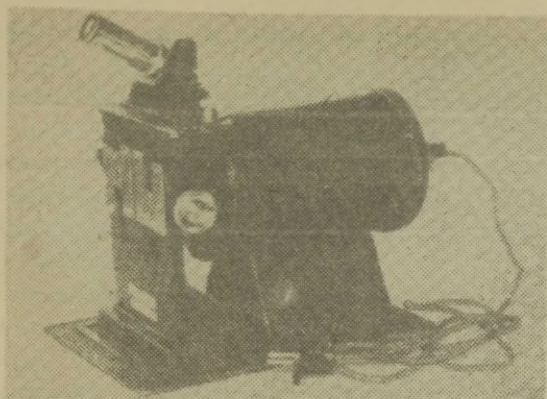
$$C_x \cdot h_x = C_{st} \cdot h_{st} ,$$

kus  $C_{st}$  - standardsuspensiooni kontsentratsioon,  
 $h_{st}$  - standardsuspensiooni kihi paksus,  
 $C_x$  - uuritava suspensiooni kontsentratsioon,  
 $h_x$  - uuritava suspensiooni kihi paksus.

Uuritavas suspensioonis arvutatakse rakkude kontsentratsioon järgmiselt:

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

Uuritavas suspensioonis tehakse kindlaks rakkude arv visuaalse nefelomeetriga. Analüüside täpsus sõltub tingimustest. Tuleb silmas pidada, et uuritava suspensiooni kontsentratsioon ei tohi liiga erineda standardsuspensiooni kontsentratsioonist, mis tehakse kindlaks Gorjajevi kambri abil. Standardsuspensioon valmistatakse uuritavast suspensioonist. Ka suspensioonide temperatuurid peavad olema ligilähedased. Nefelomeetrimisel kasutatakse läbipaistmatu põhjaga kuvette. Nefelomeetri täpsuse kontrollimiseks pannakse mõlematesse kuvettidesse ühesuguse hügususega standardsuspensioon ja võrreldakse läbi tuleva valguse intensiivsust. Okulaaris võib vaatevälja mõlemate poolte ühesuguse värvuse saavutamiseks kuvettide kõrgus (suspensioonide kihi paksus) erineda maksimaalselt 0,2 mm võrra. Suspensiooni kuvetti panekul tuleb jälgida, et õhumulle ei jääks objektsilindri alumise otsa külge. Vasakpoolsesse kuvetti pannakse standardsuspensioon (kuvetid täita kuni klaasil märgitud jooneni) ja parempoolsesse uuritav suspensioon. Standardiga kuvett pannakse harilikult skaala 15 kuni 20 mm jaotuse vahele, uuritava suspensiooniga kuvetti keeratakse eelmisest madalamale seni, kuni vaatevälja mõlemad pooled on okulaaris võrdse värvusega. Siis loetakse nooniuuse abil suspensiooni kihi paksus täpsusega 0,1 mm. Soovitav on läbi viia 3 vaatlust ja võtta lugemite keskm-



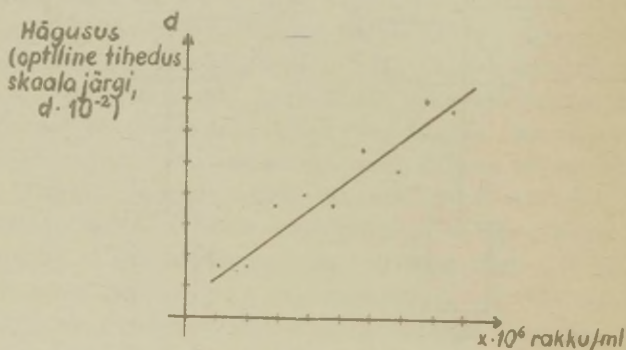
Joon. 25. Visuaalne nefelomeeter ja selle skeem.

ne. Uuritava suspensiooni rakkude kontsentratsioon arvutatakse eespool toodud valemi abil.

Pärast tööd küvetid ja objektsilindrid loputatakse destilleeritud veega ning kuivatatakse pehme lapiga.

Peale visuaalse nefelomeetri kasutatakse mikroobide arvukuse määramiseks suspensioonis ka fotoelektronefelomeetrit, mille abil jälgitakse suspensiooni valguse läbilaskvust.

Kindla liigi erisuguse tihedusega suspensioonide määramise hõlbustamiseks on soovitatav koostada standardkõver (joon. 26). Selleks valmistatakse hulk järjest langeva teada oleva kontsentratsiooniga suspensioone (määratakse Gorjajevi kambris) ja määratakse fotoelektronefelomeetriga nende optiline tihedus. Graafiku ühele koordinaadile kantakse optiline tihedus, teisele rakkude kontsentratsioon. Sellelt kõveralt saab kerge vaevaga leida uuritava suspensiooni kontsentratsiooni.



Joon. 26. Standardkõver rakkude arvu määramiseks fotoelektronefelomeetriga.

Tööstustingimustes kasutatakse mikroobide paljunemise (arvukuse) jälgimiseks ka standardsuspensiooni ampulle, milles mikroobide arv milliliitri kohta on teada. Standardsuspensiooni ampullide hädusust võrreldakse uuritava suspensiooni hädususega ja leitakse niimoodi ligilähedane arvukus. Standardsuspensioone on hõlpus valmistada kampsolist. Standardsuspensioonide asemel on hakatud kasutama ka flintklaasist prismaid.

#### Piirlahjenduste meetod (McGrady)

Valmistatud lahjendustest (näiteks mullalahjendustest) tehakse väljakülvid katseklaasidesse vedelsöötmesse (igast lahjendusest vähemalt 3 väljakülvi) ja tulemused registreeritakse töövihikusse.

Tulemuste registreerimise näide denitrifitseerijate arvukuse määramiseks on toodud tabelina (tabel 4). Jälgitakse gaasi eraldumist ning sinise värvuse ja kile esinemist. Nimetatud näitajate esinemisel tehakse tabeli vastavasse lahtrisse + märk, mitteesinemisel - märk.

Denitrifitseerijate arvukuse määramisel kõige olulisemaks näitajaks on vedelkultuuris gaasi teke. Rohelise värvusega vedelkultuuri sinistumine on täiendavaks näitajaks, mis kinnitab gaasi esinemise põhjal saadud tulemust. Sinise värvuse teket võib põhjustada peale denitrifitseerijate ka mõni muu bakter. Et kilet ei moodusta denitrifitseerijad bakterid, siis on kile olemasolu denitrifikatsiooni seisukohalt lähtudes ebasoovitav nähtus, mis viitab niisuguste mikroobide olemasolule, kes neis tingimuses ei hakenud denitrifitseerima, vaid elasid söötme pinnal hapnikuga hingamise arvel. Mõnikord pakub huvi kilet moodustavate bakterite lähem uurimine.

## Denitrifitseerijate arvukuse määramine

Lahjendus	Katseklaasi nr.	72 tundi			120 tundi			Kokkuvõtlik tingnäitaja
		gaas	värvus	kile	gaas	värvus	kile	
IV	1	+	+	-	+	+	-	321
	2	+	+	-	+	+	-	
	3	+	+	+	+	+	+	
V	4	+	+	-	+	+	-	
	5	+	+	-	+	+	-	
	6	-	-	-	-	-	-	
VI	7	+	+	-	+	+	-	
	8	-	-	-	-	-	-	
	9	-	-	-	-	-	-	
VII	10	-	-	-	-	-	-	
	11	-	-	-	-	-	-	
	12	-	-	-	-	-	-	

Mikroobide arv leitakse McGrady tabeli abil (lisa 1).

## McGrady tabeli kasutamise näide

Katses esines 5 mullalahjendust. Igast lahjendusest tehti 3 väljakülvi katseklaasidesse. Vaatluste tulemused tunksse järgnevalt:

Lahjendused:	4	5	6	7
Katseklaaside arv, milles esineb bakterite kasv:	3	2	1	0

Käesoleva näite puhul on tingnäitajaks 321. McGrady tabelis vastab sellele tõenäoline arv 15. Järelikult ühes

cm<sup>3</sup>-s neljanda lahjendusega katseklaasis on 15 bakterirakku, 1 g mullas vastavalt  $15 \times 10000 = 150000$  rakku.

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

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

kus g - mulla kaal g-des enne kuivatamist,

g<sub>1</sub> - mulla kaal g-des pärast kuivatamist (103° C).

Tingnait on kolmekohaline. Tingnaidus on numbriteks positiivsete katseklaaside arvule vastav number teatava lahjenduse paralleelsete katseklaaside üldhulgast. Esimeks numbriks võetakse positiivse reaktsiooniga katseklaaside maksimaalne arv selle lahjenduse puhul, kus see viimast korda esineb. 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 nende arv liidetakse kolmandale numbrile juurde.

#### T ö ö ü l e s a n d e d

1. Valmistada eelmisel praktikumil tehtud joon- ja piste-külvidest arenenud kultuuridest preparaadid, värvida need Ziehli karboolfuksiiniga ja Grami järgi ning kirjeldada rakkude morfoloogilisi tunnuseid.
2. Jälgida lakmuspiimkultuuri värvust, konsistentsi ja gaasi eraldumist. Valmistada preparaadid lakmuspiimkultuurist, värvida need Ziehli karboolfuksiiniga ja joonistada kummastki preparaadist 4...5 tüüpilist rakku vihkusse.
3. Loendada mikroobide arv muldkultuuris ja väljendada 1 g kuiva mulla kohta.

4. Loendada mikroobide arv õhkkultuuris ja väljendada V.I. Omeljanski järgi  $1 \text{ m}^3$  õhu kohta.
5. Loendada mikroobide arv vesikultuuris ja väljendada vee puhtusaste Miqueli järgi.
6. Määrata vee kolitiiter ja koliindeks.

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

### T e e m a : MIKROOBIDE ISOLEERIMINE PUHASKULTUURI

Mikroobide morfoloogia, füsioloogia ja biokeemia uurimiseks kasutatakse puhaskultuure. Mikroobide puhaskultuuriks nimetatakse ühe raku järglastest koosnevat kultuuri.

Puhaskultuuri eraldamisel eristatakse 3 etappi:

- 1) rikastuskultuuri saamine,
- 2) eraldamine puhaskultuuri,
- 3) puhaskultuuri määramine.

Rikastuskultuur võib koosneda kas mikroobide ühe rühma või ainult ühe liigi esindajatest. Rikastuskultuuri saamiseks luuakse uurijat huvitavate, eraldamisele kuuluvate mikroobide arenemiseks selektiivsed tingimused. Selleks et luua selektiivseid tingimusi, tuleb hästi tunda eraldatavate mikroobide ainevahetust. Näiteks autotroofsete organismide eraldamine toimub niisuguses söötmes, milles ainsaks C-allikaks on  $CO_2$ . Sellises söötmes pärstitakse heterotroofide areng. Selektiivsed tingimused ei ole kaugeltki eraldatavatele mikroobidele kasvuks optimaalsed.

Rikastuskultuure jälgitakse kõigepealt visuaalselt, vaadatakse eraldatavale kultuurile omaseid karakterseid tunnuseid, näiteks pigmentide moodustamise võimet, kile, sademe, gaasi esinemist jne. Peale selle valmistatakse kultuurist preparaat ja mikroskoobitakse. Tehakse kindlaks, kas selles leidub eraldamisele kuuluva liigi rakke. Mõnikord on kasulik rikastuskultuuris jälgida söötme keemilises koostises toimuvaid muutusi, mis kaasnevad teatud mikroobide arvukuse tõusuga, näiteks ammoniaagi, väävelvesiniku jne. moodustumist.

Färast seda, kui on saadud rikastuskultuur, asutakse mikroobide eraldamisele puhaskultuuri.

Meetodid mikroobide isoleerimiseks puhaskultuuridesse jagatakse kahte rühma:

- 1) mehaanilised meetodid, mille puhul eraldatakse mikroobide liike välistunnuste järgi (üksikust kolooniast eraldamine ja üherakukultuur),
  - 2) bioloogilised meetodid, mis võimaldavad uuritavat mikroobi eraldada omaduste järgi.
- Esimesse rühma kuuluvad järgmised meetodid.

#### Külvi Drigalski spaatli abil söötmeplaadile

Petri tassi tardsöötmele kantakse steriilse jahtunud külviaasaga uuritavat materjali, näiteks mullasuspensiooni. Selleks tõstetakse vasaku käega Petri tassi kaant niipalju, et külviaasaga saab materjali kanda söötmeplaadile. Pärast seda hõõrutakse külvimaterjal tardsöötme pinnal steriilse ja täielikult jahtunud Drigalski spaatliga laiali. Seejuures avatakse vasaku käe pöidla ja esimese sõrmega Petri tass, parema käega viiakse Drigalski spaatel tardsöötme pinnale ja liigutatakse õrnalt ilma sellele vajutamata ringjoont mööda. Nii hõõrutakse külvimaterjal laiali üle kogu söötmeplaadi. Et osa külvimaterjali koos mikroobidega jääb spaatli külge, siis võib vajaduse korral sellega hõõruda ka teise ja kolmanda Petri tassi tardsöötme pinda. See on vajalik suure mikroobisisaldusega külvimaterjali puhul. Mikroobidega inokuleeritud ja etiketitud Petri tassid asetatakse põhjaga ülespoole 24 tunniks inkubaatorisse (37° C).

Järgmisel päeval võetakse termostaadist Petri tass ja asetatakse läbivalgustusseadmele või vertikaalselt põhjaga enda poole ning tehakse vaatlus. Kui inokulumi laialihõõrumine on õnnestunud, siis on näha kogu söötmeplaadil mitmesuguse ehitusega kolooniaid. Kolooniate vaatlemisel tuleb silmas pidada kuju, värvust, servajoont ja suurust. Inokulumi puuduliku laialihõõrumise puhul võib näha tassi mõnes osas erisuguseid kolooniaid tihedalt koos limase katuna, samal ajal aga mõned söötme osad on ilma ühegi kolooniata.

Kui ühe spaatliga sama külvimaterjali puhul inokulee-

riti järgemööda kolm Petri tassi, siis esimeses neist esineb kõige rohkem kolooniaid, mis võivad tihedalt üksteise kõrval asuda. Teises tassis on kolooniaid vähem kui esimeses ja nad asuvad hõredamalt, kolmandas Petri tassis on aga kolooniaid veelgi vähem kui teises tassis ja nad paiknevad hästi isoleeritult kogu söötmeplaadi pinnal. Vaatlused tehakse kõigepealt palja silmaga, siis luubiga ja lõpuks mikroskoobiga.

Mullasuspensiooniga inokuleeritud ja inkubeeritud Petri tassidele tehakse klaasipliatsiga eraldi asetsevate erisuguste kolooniate kohale märk, millest võetakse steriilise külvinõelaga materjali ja külvatakse eraldi katseklaasidesse lihapeptonagarile (igast märgitud kolooniast 3 katseklaasi). Inokuleeritud katseklaas inkubeeritakse 2...3 ööpäeva temperatuuril 30° C.

Ühtlasi viiakse läbi kolooniate mikroskoopiline analüüs. Preparaadid valmistatakse nendest kolooniatest ja värvitakse Grami järgi, millest tehti külvid katseklaasidesse kaldagarile. Püütakse kindlaks teha, kas on tegemist kuju poolest ainult ühesuguste rakkudega. Joonistatakse töövihikusse 4... ..5 tüüpilist rakku. Külvimaterjaliga Petri tassid säilitatakse järgmise praktikumini, et vajaduse korral oleks võimalik veelkord preparaati valmistada.

Järgmisel praktikumil jälgitakse kaldagaril kasvanud kultuuri visuaalselt palja silmaga ja luubi abil. Vaadatakse, kas esineb yõõrmikroobide kolooniaid. Pärast seda tehakse preparaadid ja värvitakse Grami järgi ning uuritakse, kas tegemist on ühesuguste rakkudega ja kas nad sarnanevad külvimaterjali rakkudega. Sageasti ei õnnestu selle meetodiga ühekordsel menetlusel saada puhaskultuure, sel puhul tuleb menetlust korrata ja rakendada ka selektiivsõetmeid.

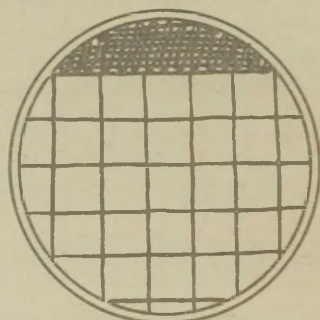
### Joonkülv söötmeplaadile

Petri tassilt eemaldatakse vasaku käega kaas ja asetatakse leegi lähedusse. Pärast seda võetakse lihapeptonagarplaadiga Petri tassi põhi vasakusse kätte ning hoitakse ver-

tikaalselt leegi läheduses. Paremas käes lapiti hoitud uuritava materjaliga külviaasa abil tõmmatakse ettevaatlikult söötme pinnale üksteisest vähemalt poole sentimeetri kaugusele paralleelsed jooned. Esimestel joontel on mikroobe palju rohkem kui viimastel joontel. Üksteisest isoleeritud kolooniaid leidub peamiselt viimastes joontes, kust edasikülvid toimuvad nii, nagu eespool kirjeldatud. Viimasel ajal kasutatakse seda meetodit praktikas harva.

#### Pinna hõõrumise meetod

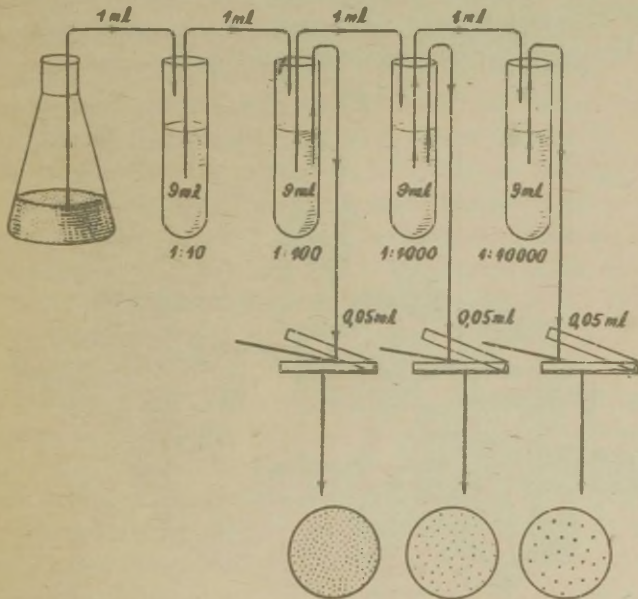
Võetakse tardsöötme Petri tass, millelt eemaldatakse kaas. Söötme Petri tassi põhi hoitakse vertikaalselt leegi läheduses ja sellele kantakse uuritavat materjali külviaasaga ning hõõrutakse 1/6 Petri tassi pinnal laiali. Pärast seda steriilitakse külviaas leegis, jahutatakse ja tõmmatakse joon, külviaas steriilitakse uuesti jne. Jooned on soovitatav tõmmata poolesentimeetriste vahedega. Kui jooned on tõmmatud, siis pööratakse Petri tassi põhi nii, et järgnevat jooni oleks võimalik tõmmata eelmistega risti. Steriilse aasaga tõmmatakse jälle joon, aas steriilitakse uuesti ja tõmmatakse eelmisest joonest  $\frac{1}{2}$  cm kaugusele järgmine joon jne., kuni tassil on tekkinud külvihoontest ruudustik (joon. 27). Selle meetodi puhul õnnestub saada üksikuid kolooniaid Petri tassi mõnes äärmises osas.



Joon. 27. Mikroobide eraldamine puhaskultuuri pinna hõõrumise meetodil.

## Lahjendusmeetod

Lahjendusmeetodi modifikatsioon, kus katseklaasides on tarre poolvedelas sooliseisundis, leiab viimasel ajal üha laialdasemat kasutamist praktikas. Joonisel 28 on toodud lahjendusmeetodi skeem. Kolvis olgu kolme mikroobiliigi segu, kusjuures üks kuulub kera-, teine pulk- ja kolmas kruvipisikute hulka. Kolvist võetud suspensiooni igas tilgas on erisuguse kujuga mikroobe palju. Kolvist viiakse 1 ml katseklaasi A, milles on 9 ml steriilset vett ja loksutatakse. Katseklaasis A on uuritavate mikroobide segu kontsentratsioon 10 korda nõrgem kui kolvis. Sellest katseklaasist viiakse 1 ml järgmisse katseklaasi B, milles on ka 9 ml steriilset vett. Katseklaasis B on jälle mikroobide kontsentratsi-

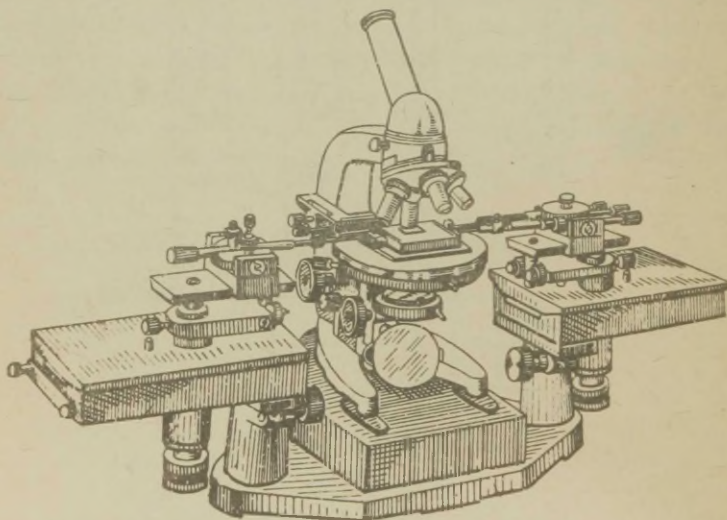


Joon. 28. Lahjendusmeetodi skeem.

oon 10 korda nõrgem kui katseklaasis A. Katseklaasist B kantakse 1 ml katseklaasi C jne., kuni saadakse küllalt madala kontsentratsiooniga suspensioon, millest tehakse tardsöötmele külv (0,05 ml) või sulatatud ja 45° C-ni jahutatud samasse söötmesse sissekülv (1 ml). Tardsöötmes ei saa mikroobid enam laiali minna, vaid jäävad samasse kohta, kuhu nad sattusid ja moodustavad paljunemisel nähtavaid kolooniaid. Tekkinud kolooniaid kontrollitakse mikroskoobis ja nendest tehakse uued külvivid selektiivsöötmetele, kuni saadakse puhaskultuur.

### Üherakukultuur

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



Joon. 29. Mikromanipulaator.

Bioloogilised meetodid puhaskultuuri saamiseks on järgmised.

### Isoleerimine kuumutamise teel

Aeroobseid sporogeenseid baktereid on võimalik eraldada asporogeensetest bakteritest seetõttu, et spoorid taluvad kõrgemat temperatuuri kui vegetatiivsed rakud.

Aeroobsete bakterite rikastuskultuuri saamiseks võetakse 1 g kuivatatud heinu ja pannakse 100-ml kolbi, kuhu lisatakse 15...20 ml sooja ( $40...50^{\circ}\text{C}$ ) kraanivett ja jäetakse 30 minutiks seisma. Selle aja jooksul ekstraheeruvad heinest ained, mida mikroobid vajavad toitumiseks. Pärast pooltunnilist leotamist eraldatakse kõrred läbi marli kurnamise teel. Võetakse 2 katseklaasi, mõlemasse mõõdetakse 5 ml leotist ja suletakse vattkorgiga ning pannakse veevanni keevasse vette ja keedetakse 40 minutit. Enamik batsillide vegetatiivseid rakke ja spore hävib selle aja jooksul. Eluvõimelisteks jäävad ainult kestvat kuumutamist taluvad spoorid, nende seas ka *Bac. subtilis*'e spoorid. Pärast kuumutamist pannakse katseklaasid termostaati ( $30^{\circ}\text{C}$ ) ja jälgitakse neis kultuuri arenemist. Edasiseks tööks valitakse katseklaas, milles leotise pinnal on moodustunud bakterite õhuke kile. Kilest võetakse steriilse külviaasaga materjali ja valmistatakse riiptilk. Kui riiptilgas on näha väikesi üksikuid pulkpisikuid, siis sellest rikastuskultuurist on sobiv teha külv Petri tassi LPA-le. Selleks valatakse vedel LPA 6 steriilsesse Petri tassi ja lastakse geelistuda.

Külviks võetakse kilest aasaga materjali ja pannakse katseklaasi steriilsesse vette, suletakse vattkorgiga ja loksutatakse ning sellest viiakse aasaga materjal Petri tassi LPA-le, kus mikroobide laialihõõrumine toimub spaatliga. Spaatliga töödeldakse 3 Petri tassi. Teine külv tehakse aasaga otseselt rikastuskultuurist Petri tassi LPA-le, kus materjali laialihõõrumine toimub samuti spaatli abil. Spaatliga hõõrutakse üksteise järel 3 Petri tassi. Inokuleeritud Petri tassid pannakse põhjaga ülespoole inkubaatorisse ( $30^{\circ}\text{C}$ ).

Jälgitakse kolooniate moodustumist. Valitakse Petri tass, kus kolooniad asuvad üksikult ja tehakse 2...3 kolooniast aasaga külv katseklaasidesse kaldagarile (LPA) ja katseklaasid pannakse inkubaatorisse (30° C). Katseklaasides arenenud kultuuri puhtust kontrollitakse visuaalselt palja silmaga ja mikroskoopiliselt. Mikroskoopimiseks valmistatakse 3 preparaati. Vaadatakse kolooniate suurust, kuju, profiili, servajoont, värvust, pinna- ja optilisi omadusi ning konsistentsi. 10...12 tunnisest kultuurist valmistatud preparaati ei fikseerita ega värvita, selles jälgitakse liikumisvõimet. Rakkude kuju ja suurust hinnatakse ning värvitakse Grami järgi 1...2-ööpäevasest kultuurist valmistatud preparaate. Kolmas preparaat valmistatakse spooride moodustamisvõime kindlakstegemiseks 3...4-ööpäevasest kultuurist.

Peale selle tehakse veel kontrollkülv 4 Petri tassi LPA-le. Kõlvimaterjal võetakse kaldagarilt aasaga ja pannakse katseklaasi steriilsesse vette, suletakse vattkorgiga ning loksutatakse. Aasaga võetakse tilk suspensiooni ja pannakse Petri tassi ning hõõrutakse spaatliga laiali. Petri tassid pannakse inkubaatorisse (30° C) ja jäetakse sinna, kuni kultuur on arenenud. Pärast seda uuritakse üksikasjalikult kultuuri- ja rakutunnuseid. Oluline on, et kultuuris esineks ainult üks liik - Bacillus subtilis. Bacillus subtilis'e tunnuste kirjeldus on toodud lk. 73. Võrreldakse kaldagaril saadud kultuuri tunnuseid kontrollkülvist Petri tassis arenenud kultuuri tunnustega.

#### Isoleerimine selektiivsöötme abil

Puhaskultuuri saamiseks kasutatakse sageli niisuguseid söötmeid, mis soodustavad ühtede mikroobiliikide kasvu ja pidurdavad tugevalt teiste liikide arenemist. Niisuguseid söötmeid kasutatakse tavaliselt rikastuskultuuride kasvatamiseks, kust omakorda tehakse ümberkülve mitmesugustele söötmetele.

## Inokuleerimine katseloomadesse

Teatud patogeensete mikroobiliikide puhaskultuure on võimalik saada, kui uuritava materjaliga inokuleeritakse nende suhtes vastuvõtlikke katseloomi. Selleks süstitakse uuritav materjal katseloomadesse, kus patogeenne mikroob paljuneb kõige kiiremini ja sageli peaaegu puhaskultuurina. Inokuleeritud looma verega tehakse väljakülv vastavale tardsöötmele, kust toimub puhaskultuuri isoleerimine pinna hõõrumise meetodil.

## T ö ö ü l e s a n d e d

1. Uurida õhkkultuurides kolooniate struktuuri binokulaar-mikroskoobiga ning eraldada üksikust kolooniast bakteriliik külvivaasaga ja Drigalski spaatli abil 3 Petri tassi LPA-le. Külviks kasutatud kolooniast valmistada preparaat ja uurida rakutunnuseid.
2. Eraldada muldkultuurist üks mikroobiliik eraldi asuvast kolooniast pinna hõõrumise meetodil Petri tassi LPA-le. Uurida külviks kasutatud liigi koloonia- ja rakutunnuseid.
3. Valmistada kuivatatud heinast aeroobsete sporoogeensete bakterite rikastuskultuur kuumutamise abil.

## IX praktikum

### T e e m a : BIOTIINI MÕJU UURIMINE PÄRMSEENTE PALJUNEMISELE

Pärmseened, nagu muudki organismid vajavad C, N, H, O, P, S, Fe, Mg jt. elemente. Peale eespool loetletud kättesaadavas vormis olevate toiteelementide vajavad pärmseened ka vitamiine. Mitmesuguste pärmide vitamiinide vajadus on erisugune. Näiteks Saccharomyces cerevisiae vajab sünteetilisel söötmel kasvatamise puhul kindlasti biotiini. Ka inositooli ja pantotenaadi lisamine soodustab paljunemist. Tiamiin aga tuleb arvesse vaid stardikogusena, sest kord kasvama hakanud pärmikultuur sünteesib seda ise.

Biotiini on sobiv lisada sünteetilisele söötmele kaalulises kontsentratsioonis -  $29 \cdot 10^{-6}$ , pantotenaati -  $50 \cdot 10^{-6}$  ja inositooli -  $115 \cdot 10^{-6}$ .

Biotiini mõju uurimiseks paljunemisele kasutatakse pärmiliiki Saccharomyces cerevisiae. Võetakse ööpäevane kultuur ja sellest valmistatakse sobiva tihedusega suspensioon, mis sisaldaks ligikaudu 20 000 rakku  $1 \text{ cm}^3$ -s. Sellise suspensiooni valmistamiseks võetakse kolb ( $100 \text{ cm}^3$ ), kuhu valatakse  $50 \text{ cm}^3$  steriilset kraanivett, millesse pannakse kaldagarkultuurist külviaasaga 10 korda pärmiseeni ja loksutatakse 20 minutit loksutajal ühtlase tihedusega suspensiooni saamiseks. Pärast seda loendatakse rakkude arv Gorjajevi kambris.

Kui suspensioon on liiga hõre, siis lisatakse külviaasaga veel materjali ja loksutatakse 20 minutit. Liiga tiheda suspensiooni puhul lahjendatakse seda vajaduse järgi. Selleks võetakse steriilse veega katseklaas ja lisatakse sinna vajaduse järgi kas 1 või rohkem kuupsentimeetrit suspensiooni ning loksutatakse kões täieliku segunemiseni. Sellist suspensiooni lisatakse  $0,5 \text{ cm}^3$  igasse kolbi.

Toitekeskkonnana kasutatakse sünteetilist söödet A ja biotiiniga sünteetilist söödet B. Söötmel valmistatakse järgmiselt.

<u>A-sööde:</u> Dest. vesi - 1000 cm <sup>3</sup>		<u>Mikroelementide segu:</u>	
Glükoos	12 g	Dest. vesi - 1000 cm <sup>3</sup>	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	5 g
MgSO <sub>4</sub>	0,3 g	KJ	0,5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 g	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	5 g
CaCl <sub>2</sub>	0,1 g	NaBr	0,5 g
Mikroelemen-		ZnSO	0,2 g
tide segu	1 cm <sup>3</sup>	Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	0,3 g
pH 4,5...5,0			

B-sööde: A söötmele lisatakse 0,029 mg biotiini cm<sup>3</sup> kohta.

Biotiinilahuse valmistamiseks kaalutakse 14,5 mg biotiini ja lahustatakse 50 cm<sup>3</sup> destilleeritud vees.

450 cm<sup>3</sup>-le A-söötmele lisatakse 50 cm<sup>3</sup> biotiinilahust, nii saadakse B-sööde.

Võetakse 6 nummerdatud Erlenmeyeri kolbi (250 cm<sup>3</sup>), kolme neist mõõdetakse 50 cm<sup>3</sup> A-söödet (kontroll) ja kolme B-söödet (katse). Kolvid suletakse vattkorkidega ja autoklaavitakse 35 minutit 0,6-atü rõhu juures. Pärast seda kolvid jahutatakse ja inokuleeritakse pärmisuspensiooniga, mida lisatakse 0,5 ml kolvi kohta. Infitseeritud kolvid pannakse 24...36 tunniks inkubaatorisse (28° C). Selle aja jooksul loksutatakse kolbe 2...3 korda aeratsiooni soodustamiseks.

Pärast inkubatsiooni lõppu loksutatakse kolbe 3 minutit ja määratakse igas kolvis eraldi rakkude arv Gorjajevi kambri abil. Leitakse pärmseente keskmine arvukus 1 cm<sup>3</sup>-s nii kontroll- kui ka katsekolbides ja võrreldakse tulemusi omavahel.

## T ö ö ü l e s a n d e d

1. S. cerevisiae 24-tunnisest kultuurist valmistada steriilsesse kraanivette 50 cm<sup>3</sup> suspensiooni (ligikaudu 20 000 rakku cm<sup>3</sup>-s).
2. Valmistada 0,5 liitrit A- ja B-söödet.
3. Pärmseentega inokuleerida 3 kontroll- ja 3 katsekolbi (0,5 ml kolvi kohta) ning panna inkubaatorisse.
4. Õhk- ja muldkultuuridest Petri tassi isoleeritud bakterikultuuridest teha joonkülvid katseklaasi kaldagarile (VIII praktikumil alustatud töö).
5. Aeroobsete sporogeensete bakterite rikastuskultuurist (ki-lest) valmistada preparaat ja mikroskoopimisel püüda kindlaks teha Bac. subtilis'e olemasolu. Bac. subtilis'e esinemisel viia aasaga uuritavat materjali Petri tassi LPA-le ja hõõruda spaatliga laiali. Sama spaatliga töödelda veel 2 Petri tassi (VIII praktikumil alustatud töö).

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

### T e e m a : PÄRMSEENTE SAHHARIIDIDE KASUTAMISVÕIME MÄÄRAMINE PABERKROMATOGRAAFILISELT

Missuguseid orgaanilisi aineid ja kui suures koguses mikroobid toitekeskkonnast kasutavad, seda on võimalik kindlaks teha paberchromatograafiliselt. Paberchromatograafiline meetod sobib eriti hästi sahhariidide, sahhariidderivaatide ja aminohapete uurimiseks.

Kromatograafiliste meetodite puhul toimub kas uuritava aine puhastamine või ainesegu lahutamine komponentideks korduva jaotamise teel kahe keskkonnafaasi vahel. Segude komponentideks lahutamine võimaldab neid individuaalselt uurida. Paberchromatograafilise meetodi eelis seisneb 1) lihtsuses, 2) analüüsiks kulub väga vähe uuritavat materjali, 3) uurimistingimused on nehmeh, mistõttu ei rikota labiilseid struktuure.

Paberchromatograafia puhul on kandjaks väga kvaliteetne ja ühtlase paksuse ning tihedusega filterpaber, mille veesisaldus on ligikaudu 25 %. Paberchromatograafias kantakse sobiva suurusega filterpaberi lehe ühele servale (nn. stardiservale) mõni tilk uuritavate aine lahust ja lastakse kuivada. Filterpaber riputatakse kromatografeerimisnõusse (joon. 30) niitide abil nii, et stardiserv ulatuks mõne millimeetri ulatuses orgaanilise solvendi veega küllastatud lahusesse (solvendi kihi paksus 1...2 cm). Vooluti hakkab mööda filterpaberi kapillaare tõusma, vedades uuritava ainesegu püstsuunas laiali, mistõttu menetlust nimetatakse tõusvaks voolutuseks. Ainesegu komponentide jaotumine kandjaosakestel faaside vahel (liikuv faas - orgaaniline solvent, statsionaarne faas - vesi) oleneb aine lahustuvusest solvendis ja vees. Protsess peatatakse, kui solvent on frondiga jõudnud teatavale sobivale kaugusele stardijoonest. Koos sellega jäävad paberile ka uuritava aine komponendid, mis protsessi lõpul asuvad paberil enam

või vähem eristunud, enam või vähem teravapiiriliste laikudena. Need laigud võivad olla kas värvilised või värvusetud. Laigud ilmutatakse spetsiaalse menetluse abil - töödeldakse teatavate lahustega. Paberil määratakse kindlaks laikude frondisuhe ehk  $R_f$ , mis peegeldab antud aine migratsioonimäära võetud solventisüsteemis.  $R_f$ -i arvväärus kujutab endast solvendi ja solvendifrondi migratsioonikauguste jagatist. Vastavaid liikumiskaugusi mõõdetakse stardijoonest alates. On selge, et mistahes aine  $R_f \leq 1$ . See, kui kaugale stardijoonest kandub mingi aine antud solventisüsteemis antud paberitüübi korral jäävates tingimustes, oleneb aine iseloomust - selle afiinsusest ühest küljest liikumatu vesifaasi, teisest küljest liikuva orgaanilise solvendi suhtes.

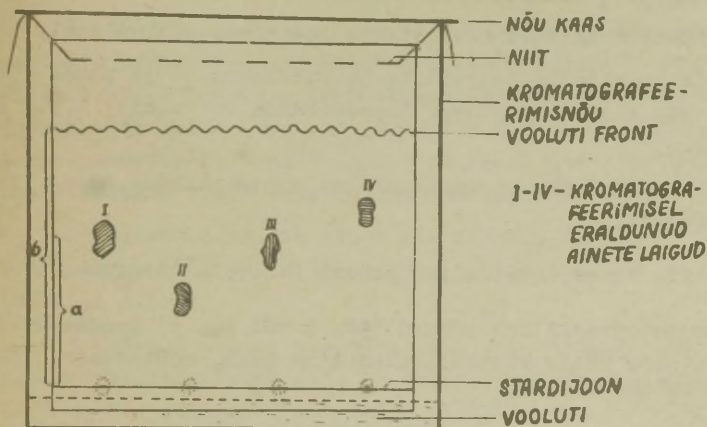
Kui paberkromatograafiat rakendatakse ainete identifitseerimiseks, on vaja samades tingimustes voolutada ka vastavaid tõendaineid, s.o. puhtaid aineid, mille seas tõenäoliselt esineb ka identifitseerimisele kuuluv tundmatu aine, ning võrrelda vastavaid  $R_f$  väärtusi. Silmas tuleb aga pidada seda, et sagedasti ei piisa ühendite identifitseerimisel ainult  $R_f$  väärtuse määramisest.

Kvantitatiivseks määramiseks lõigatakse ilmutatud laigud paberist välja, peenestatakse ja värvunud aine elueeritakse sobiva vedeliku kindlas koguses. Selle värvumisintensiivsust võrreldakse standardintensiivsustega, mis vastavad sama aine tuntud kontsentratsiooniga lahustele, ja leitakse sel teel elueerunud aine hulk. Värvumisintensiivsus määratakse optiliste mõõteriistade, fotokolorimeetri või spektrofotomeetri abil.

Lähedaste ainete hea lahutamine saavutatakse kolme-, neljakordse voolutuse korral. Iga voolutuse vahel paber kuivatatakse.

Paberkromatograafia annab stabiilseid, võrreldavaid tulemusi siis, kui protsessid toimuvad kindlates tingimustes, eriti tuleb silmas pidada temperatuuri.

Praktikumis kasutatakse S. cerevisiae 36-tunnilist kul-



Joon. 30. Kromatografeerimise skeem.

tuuri. Kromatografeeritakse nii söödet (enne kultiveerimist) kui ka kultuurifiltraati (pärast kultiveerimist). Sööttest ja kultuurifiltraadist valmistatud kromatogrammide võrdlemine võimaldab kindlaks teha, missuguseid söötmes olevaid sahharide pärmseened kasutavad.

#### Määramise käik:

##### I. Kromatografeerimislahuste valmistamine

1. Tsentrifuugiklaasi mõõdetakse 4...5 cm<sup>3</sup> 36-tunnist pärmseente kultuuri ja tsentrifugeeritakse (2000 pööret minutis) 10 minutit. Läbipaistev kultuurifiltraat valatakse kas 50-ml Erlenmeyeri kolbi või suurde katseklaasi.
2. Mõõdetakse 4...5 cm<sup>3</sup> pärmseente kasvatamiseks tarvitavat söödet kas 50-ml Erlenmeyeri kolbi või suurde katseklaasi.
3. Kultuurifiltraadile ja söötmele lisatakse valkude sadestamiseks 10 %-list Pb(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> kuni sadestumine kestab.
4. Tekkinud sademed eraldatakse tsentrifugeerimise teel.

5.  $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$  liia kõrvaldamiseks lisatakse küllastatud  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  lahust, kuni sadestumine kestab.
6. Tekkinud sademed eraldatakse tsentrifuugimise teel.
7. Läbipaistev kultuurifiltraat (töölahus I) ja sööde (töölahus II) tihendatakse (aurutatakse veevannil) 1...2  $\text{cm}^3$ -ni.
8. Tihendatud lahustele lisatakse antiseptikuna paar tilka tümooli.

## II. Kromatograafilise paberi ettevalmistamine

1. Kromatograafilise paberi (nr. 1 või nr. 3) poognast lõigatakse välja ristkülikukujuline tükk, mõõtmetega 32 x x 36 cm.
2. Paberi pikemale alumisele küljele tõmmatakse grafiitpiliatsiga servast 4 cm kaugusele joon, mis jagatakse kahe sentimeetriliste vahedega kümneks 1,5 cm pikkuseks lõiguks. Nendele lõikudele (1,5 cm) kantakse kromatografeerimislahused.
3. Paberi pikemast ülemisest küljest, umbes 2 cm kauguselt servast, aetakse nõelaga valge niit läbi (pikkade pistetega). Ümblemisel jäetakse kummalegi poole nii pikk niidiots, et selle abil cleks võimalik riputada paber kromatografeerimisnõusse. Niidiotsad kinnitatakse nõu seinetele plastiliiniga.

## III. Tõendlahused ja solvent

Tõendlahustena kasutatakse 0,2 %-list rafinoosi, sahharoosi, maltoosi, fruktoosi, glükoosi, galaktoosi, ksüloosi ja arabinoosi etanoolilahuseid.

Voolutina kasutatakse n-butanool : jää-äädikhape : vesi (vahekorras 5 : 1 : 2) solventi.

Solvendi valmistamine toimub jaotuslehttris. Butanoolile lisatakse vesi ja äädikhape ning loksutatakse 30 minutit. Jaotuslehttris tekib selle aja jooksul 2 fraktsiooni. Solvendina kasutatakse ülemist fraktsiooni.

#### IV. Kromatografeerimine

1. Spetsiaalsel kromatografeerimislaual kantakse eespool kirjeldatud viisil ettevalmistatud paberile mikropipettide abil  $0,1 \text{ cm}^3$  I ja II töölahust ning kõik tõendlahused. Pealekantav kogus ( $0,1 \text{ cm}^3$ ) imetakse korraga pipetti ja kantakse paberile (1,5-cm lõigule) väikeste portsjonitena. Iga pealekandmise järel laik kuivatatakse.

2. Paberi pikemale alumisele küljele, umbes 1,5 cm kaugusele servast, iga laigu kohale kirjutatakse pealekantud aine nimetus.

3. Pärast ainete pealekandmist riputatakse paber kromatografeerimisnõusse nii, et selle stardiserv ulatuks 2...3 mm voolutisse. Voolutamine kestab umbes 20 tundi. Selle aja jooksul tõuseb solvendi front sobivale kõrgusele (umbes 3 cm kaugusele ülemisest servast).

Paber võetakse niitide abil nõust välja, märgitakse pliitsiga frondi asukoht ja kuivatatakse tõmbekapi all kuivaks (butanooli aurud on mürgised) ning pannakse uuesti voolutisse. Voolutamist korratakse kolm korda.

#### V. Kromatogrammi ilmutamine

1. Kromatogramm ilmutatakse p-aminofenoolililmutiga (1 g p-aminofenoolile lisatakse uhmris 2 ml ortofosforhapet ja osade kaupa 60 ml 96 %-list etanooli). Ilmuti pritsitakse pulverisaatori abil kromatogrammile nii, et see üleni märguks ja paber kuivatatakse.

2. Pärast seda asetatakse rulli keeratud kromatogramm 5...7 minutiks termostaati ( $103^{\circ} \text{C}$ ). Selle aja jooksul laiugud "ilmuvad".

Kasutatud ilmuti puhul värvuvad sahhariidid järgniselt:

fruktoos	-	sidrunkollane
glükoos	-	keskmise pruun
galaktoos	}	- punakaspruun
ksüloos		
arabinoos		
sahharoos	}	- kollakaspruun
maltoos		
rafinoos		

Kromatogrammidele kantud sahhariidid jaotuvad järgmiselt. Stardijoonele kõige lähemale jääb rafinoos, sellele järgnevad maltoos ja sahharoos. Neist veel kaugemal asuvad glükoos, fruktoos ja galaktoos. Vooluti frondile kõige lähemal asuvad ksüloos ja arabinoos.

#### VI. Ainete identifitseerimine ja nende $R_f$

1. Pärast ilmutamist viirutatakse kromatogrammil olevad ainete laigud ja märgitakse laigu keskkohat pliiatsiga. Pärast seda mõõdetakse laikude keskkoha ja vooluti frondi kaugus stardijoonest ning arvutatakse ainete  $R_f$ .

2. Tõendlahuste laikude abil püütakse identifitseerida nii söötmes kui ka kultuurifiltraadis olevad ained.

3. Võrreldakse kultuurifiltraadi (tõelühus I) ja söötme (tõelühus II) kromatograferimisel saadud ainete laike omavahel. Jälgitakse: 1) kas kõik söötmes esinevad ained on ka kultuurifiltraadis olemas, 2) kas erinevusi on ka laikude suuruses ja värvuse intensiivsuses.

Kromatogrammide võrdlemine võimaldab hinnata pärmseente S. cerevisiae sahhariidide kasutamisevõimet antud koostisega söötmetest.

## T ö ö ü l e s a n d e d

1. Ette valmistada kromatografeerimislahused (sööde ja 36-tunniline S.cerevisiae kultuurifiltraat).
2. Ette valmistada kromatografeerimispaber.
3. Kanda kromatografeerimispaberile sööde, kultuurifiltraat ja tõendlahused ( $0,1 \text{ cm}^3$ ).
4. Voolutada kromatogramm 3 korda voolutis (n-butanool : jää-äädikhape : vesi; vahekorras 5 : 1 : 2).
5. Teha Bac. subtilis'e isoleerimiseks Petri tassis kasvatatud kultuuri eraldi asuvast kolooniast joonkülv katseklaasi kaldagarile (VIII praktikumil alustatud töö).
6. Määrata pärmseente arvukus Gorjajevi kambri abil kontroll- ja katsekolbides (IX praktikumil alustatud töö).

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

### T e e m a : ANTIBIOOTIKUMIDE BAKTERIOSTAATILINE TOIME MIKROOBIDESSE

Antibiootikum on mikroobse päritoluga toimeaine, mis pärssib teiste mikroobide elutegevust või surmab neid. Antibiootikumid on peamiselt mulla mikrofloorasse kuuluvate mikroobide (aktinomütseetide, bakterite, hallitusseente) ainevahetusproduktid.

Antibiootikumid toimivad mikroobidesse madalates kontsentratsioonides.

Eristatakse antibiootikumide bakteriostaatilist ja bakteriotsiidset toimet. Kui antibiootikum pärssib mikroobi kasvu ja arengut teda surmamata, siis nimetatakse seda bakteriostaatiliseks toimeks. Kui antibiootikum aga hävitab mikroobi, siis nimetatakse seda antibiootikumi bakteriotsiidseks toimeks.

Termini "antibiootikum" õigeks mõistmiseks on vaja liisada, et tervet rida mikroobide poolt produtseeritavaid aineid, millel on teiste mikroobide suhtes kasvu pidurdav toime, ei saa lugeda antibiootikumideks. Niisugusteks aineteks on orgaanilised happed, etanool,  $H_2O_2$  jpt. Need ained avaldavad mikroobidesse kasvu pidurdavat toimet aga märksa kõrgemas kontsentratsioonis kui antibiootikumid.

Antibiootikumide kõrval on olemas veel antibiootilised ained. Nende hulka kuuluvad roheliste taimede poolt eraldatavad ained, fütontsiidid (allitsiin, tomatiin jne.) ja loomade poolt produtseeritavad antibiootilised ained (ekmoliin, lüsotsüüm jne.). Ka keemilisel teel toodetud kemoteraapilised ained kuuluvad antibiootiliste ainete hulka.

Antibiootikumide mõju mehhanism mikroobidesse on keeruline. Antibiootikumide mõjul muutub mikroobiraku ainevahetus, tekivad häired ensüümsüsteemide tegevuses. Et häiritud saab ensüümsüsteemide tegevus, siis tekivad häired ka

eluks vajalike toitainete omastamisel, mis omakorda põhjustab häireid paljunemises.

Antibiootikumid mõjuvad valikuliselt. Teatud antibiootikum avaldab mitmesugustesse mikroobidesse erisugust toimet. Suur osa antibiootikume on aktiivsed graampositiivsetesse mikroobidesse. Ühed antibiootikumid on kitsa, teised laia mõju spektriga.

Mikroobide tundlikkus kindla antibiootikumi suhtes on erisugune mitte üksnes erinevatel liikidel vaid ka sama liigi tüvedel. Erinevusi on kindlaks tehtud ka ühe tüve rakudel.

Mikroobide tundlikkus võib muutuda antibiootikumidega mõjustamise kestel. Tihti mikroobid harjuvad teatud antibiootikumidega ja tekivad vastupidavad variandid. Mikroobid muutuvad teatud antibiootikumi suhtes resistentseks. Antibiootikumide suhtes tekib resistentsus seda kiiremini, mida nõrgemaid annuseid kasutatakse, või siis, kui antibiootikumi tarvitamisel peetakse vaheajaga.

Haigustekitajate tundlikkuse määramine antibiootikumide ja antibiootiliste ainete preparaate suhtes on väga tähtis kliinikus, see võimaldab määrata õiget ravimit. Ise-ainumaks meetodiks tundlikkuse kindlakstegemisel on nn. diagnostiliste kettakeste meetod, mis sobib peale haigustekitajate ka teiste mikroobide tundlikkuse määramiseks.

Järgnevalt kirjeldatakse diagnostiliste kettakeste meetodit.

1. Steriilsesse Petri tassi valatakse 12...15 cm<sup>3</sup> tulist IPA-d ja lastakse geelistuda. Nii saadakse agarplaat. Petri tassi pöhi pööratakse ülespoole ja jagatakse klaasipliatsi abil neljaks sektoriks.
2. Petri tassi agarplaadile külvatakse pipeti abil 0,05 ml uuritava mikroobiliigi tihedat suspensiooni ja asetatakse spaatliga laiali. Petri tassi iga (4) sektori keskele asetatakse pintsettide abil erisuguse antibiootikumiga tüüdelatud kettake.

Kasutatakse järgmiste antibiootikumidega töödeldud kettaid:

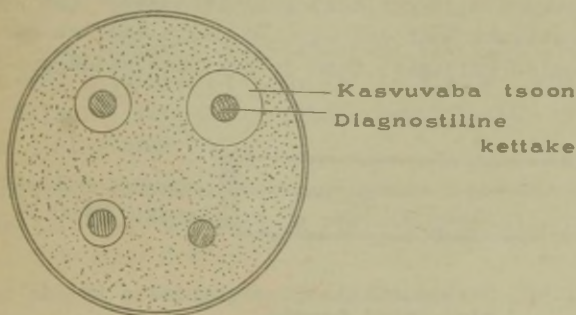
- 1) hüdroksütetratsükliin (oranž),
- 2) kloortetratsükliin (kollane),
- 3) penitsilliin (roheline),
- 4) kloroamfenikool (sinine).

3. Bakteritega inokuleeritud Petri tassid pannakse 2...3 tunniks külmutuskappi, et antibiootikumid saaksid difundeeruda söötmesse enne mikroobide aktiivset paljunemist. Pärast seda pannakse Petri tassid 18...20 tunniks inkubaatorisse ( $37^{\circ}$  C).

Kettakestest söötmesse imunud antibiootikumid pärsvad nende suhtes tundlike mikroobide kasvu. Selle tulemuse-na jääb vastava ketta alla ja ümber kasvuvaba tsoon, mille läbimõõt võimaldab hinnata uuritava mikroobi tundlikkust antibiootikumi suhtes (joon. 31).

4. Kasvuvaba tsooni läbimõõt (koos ketta läbimõõduga) mõõdetakse joonlauaga. Mikroobide tundlikkust hinnatakse järgmiselt:

- a) kasvuvaba tsooni läbimõõt üle 25 mm - uuritav mikroob on antibiootikumi suhtes väga tundlik (+++);
- b) kasvuvaba tsooni läbimõõt 15...25 mm - uuritav mikroob on antibiootikumi suhtes tundlik (++);
- c) kasvuvaba tsooni läbimõõt kuni 15 mm - uuritav mikroob on antibiootikumi suhtes vähetundlik (+);
- d) kasvuvaba tsoon puudub - uuritav mikroob pole antibiootikumi suhtes tundlik, s.t. on selle antibiootikumi suhtes resistentne.



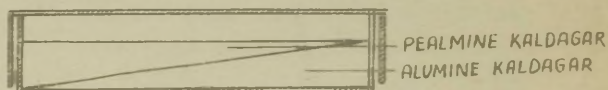
Joon. 31. Antibiootikumide bakteriostaatilise toime määramine diagnostiliste kettastega.

### Streptomütsiiniresistentsete tüvede saamine

Steriilsesse Petri tassi valatakse  $15 \text{ cm}^3$  tulist sööd-  
 det (LPA + 33 mg % ammooniumlämmastikku + 0,2 %  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  
 pH 7,8...8,0) ja tass pannakse kaldasendisse nii, et saa-  
 dakse kaldagar. Pärast söötme geelistumist pannakse Petri  
 tass lauale harilikus asendis ja sellesse valatakse strep-  
 tomütsiiniga tuline agarsööde. Streptomütsiiniga söötme  
 valmistamiseks valatakse katseklaasi  $15 \text{ cm}^3$  tulist agar-  
 sööd-  
 et, millele lisatakse 1 ml streptomütsiinilahust, mis  
 sisaldab  $\text{cm}^3$ -s 400  $\mu\text{g}$  antibiootikumi. Streptomütsiin se-  
 gatakse hästi toiteagariga (loksutatakse) ja pärast seda  
 segu valatakse Petri tassi kaldagarile. Esimese kaldagari  
 peale saadakse teine antibiootikumiga kaldagar.

Pärast geelistumist pannakse Petri tassid 20 tunniks  
 külmutuskappi, et streptomütsiin saaks pealmisest kaldaga-

rist difundeeruda alumisse kaldagarisse. Selle tulemusena kujuneb nii, et Petri tassis agarplaadi ulatuses antibiootikumi kontsentratsioon on erisugune. Näiteks alumise kaldagari paksema osa ja pealmise kaldagari õhema osa ulatuses on antibiootikumi kontsentratsioon palju madalam kui seal, kus on alumise kaldagari õhem ja pealmise kaldagari paksem osa.



Joon. 32. Streptomütsiiniresistentsete tüvede saamine Petri tassis.

Külmutuskapist võetud Petri tassi agarplaadile mõõdetakse pipetiga  $0,1 \text{ cm}^3$  bakterite suspensiooni ja aetakse spaatliga laiali. Bakteritega inokuleeritud Petri tassid pannakse 24 tunniks inkubaatorisse ( $37^\circ \text{ C}$ ).

Pärast seda jälgitakse bakterite kasvu Petri tassis. Suhteliselt streptomütsiiniresistentseteks osutuvad need kolooniad, mis arenesid antibiootikumi kõige kõrgema kontsentratsiooniga söötmeplaadi osas. Ühest sellisest, teisest eraldi asuvast kolooniast külvatakse katseklaasi kaldagarile, mis sisaldab antibiootikumi  $15 \mu\text{g}/\text{cm}^3$  söötme kohta.

Selle töö puhul on sobiv kasutada bakteriliike P.vulgaris, Bac.cereus ja E.coli.

## T ö ö ü l e s a n d e d

1. Määrata bakteriliikide Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Proteus vulgaris ja Pseudomonas aeruginosa penitsilliini-, kloortetratsükliini-, hüdroksütetratsükliini- ja kloroamfenikoolitundlikkus diagnostiliste

kettakeste abil (teha LPA-le pealekülv ja asetada sellele kettakesed).

2. Teha Bac. cereus'e streptomütsiiniresistentse tüve saamiseks külv Petri tassi antibiootikumiga söötmele.
3. Uurida kaldagaril kasvatatud Bac. subtilis'e kultuuritunnuseid, valmistada preparaate ja jälgida rakutunnuseid. Kaldagarilt teha kontrollkülv Petri tassi (VIII praktikumil alustatud töö).
4. Ilmutada sahhariidide kromatogramm p-aminofenoolilmutiga, identifitseerida ained ja määrata nende  $R_f$  (X praktikumil alustatud töö).

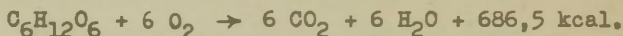
### XIII p r a k t i k u m

#### T e e m a : LÄMMASTIKUTA AINETE MUUTUMINE MIKROOBIDE ELUTEGEVUSES

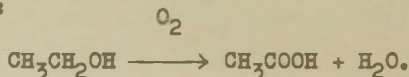
Looduses toimub lakkamatult mitmesuguste ainete ringlus mikroobide kaasabil. Mikroobid on olulisemaid agente nii ainete dissimilatsioonil kui ka sünteesil.

Orgaaniliste ainete lagunemine võib toimuda mitut viisi:

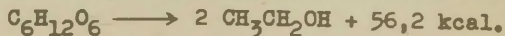
1. Orgaanilist ainet oksüdeeritakse aeroobselt absoluutsete lõpp-produktideni ( $H_2O$ ,  $CO_2$ ,  $NH_3$ ), mille puhul vabaneb maksimaalne kogus metaboolselt kasutatavat energiat (selle arvel sünteesitakse ATP-d). Elektronide transpordi lõpetab hingamine (moodustub vesi). Orgaanilise aine aeroobne oksüdatsioon:



2. Orgaanilist ainet oksüdeeritakse küll aerobioosis, kuid oksüdatsioon ei lähe lõpuni (peatub suhteliselt lihtsetel energiarikastel produktidel). Õhuhapnikuni jõuab ainult osa üldisest vesiniku- resp. elektronivarust. Niisugust protsessi nimetatakse oksüdatiivseks e. oksübiontiliseks käärimiseks:



3. Orgaanilist ainet oksüdeeritakse anaeroobsetes tingimustes, mille tõttu oksüdatsioon peatub juba vähelagunenud süsinikahelaga produktidel. Vesiniku- (elektroni-) akseptoriks on orgaanilised metaboliidid. Moodustuvad mitmesugused happed, alkoholid jm. ühendid. Orgaanilise aine anaeroobne oksüdatsioon:



Vastavalt käärimise kemismile ja lõpp-produktidele jaotatakse käärimised tüüpideks, näiteks piimhape-, etanool-, võihape- ja butanoolatsetoonkäärimine.

Missuguse tüübi järgi käärimine toimub, oleneb mikroobi loomusest (ensüümisüsteemist). Millisel määral ja mis vahekorras tekivad tüübi piires lõpp-produktid, sõltub keskkonatingimustest (temperatuur, pH) ja kääritatava aine omadustest.

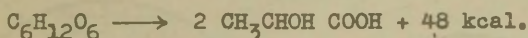
### Piimhapekäärimist põhjustavate mikroobide uurimine

Piimhapekäärimise tavaliseks substraadiks on piimas esinev laktoos, mis mikroobienstüümide toimel hüdrolyüsitakse galaktoosiks ja glükoosiks. Edasises protsessis muundatakse ka galaktoos glükoosiks, millest moodustub vahereaktsioonidega piimhape. Tekkinud piimhappe mõjul kaseiin sadestub.

Tuntumaid piimhappebaktereid on Streptococcus lactis, Lactobacillus bulgaricus, Lactobacillus plantarum jt.

Piimhappebakterid osalevad ka leivataigna kergitamises, kapsaste ja kurkide hapendamises, juustu valmistamises, silleerimises jm.

Homofermentatiivsete piimhappebakterite toimel moodustub laktoosist peamiselt piimhapet, selle kõrval vähesel määral ka muidprodukte:



Piimhapekäärimist põhjustavate bakterite tundmaõppimiseks valatakse 100 ml piima Erlenmeyeri kolbi, suletakse vattkorgiga ja pannakse 5...6 päevaks termostaati (28° C). Selle aja jooksul muutub piim temas leiduvate piimhappebakterite elutegevuse tulemusena konsistentsilt paksuks ja eraldub piimaleem ehk vadak. Külviaasaga võetakse üks tilk vadakut ja pannakse alusklaasile veetilka ning aetakse laiali. Preparaadil lastakse õhu käes kuivada. Kuivale preparaadile lisatakse üheks minutiks paar tilka fiksaatorit (etanooli-estri segu vahekorras 1 : 1). Fiksaator surmab mikroobid, kin-

nitab need alusklaasile ja vabastab preparaadi rasvatilkadest, mis segavad mikroskoopimist. Pärast fiksaatori toimimist pestakse preparaati veega ja värvitakse 5 minutit metüleensinisega ning mikroskoobitakse.

Preparaadis on näha mitmesuguse kujuga mikroobe:

- 1) väikesed kokid, sageli lühikests ahelatena - Str.lactis (joon. 33);
- 2) pikad pulk'pisikud - Lactobac. bulgaricus (joon. 34);
- 3) suured ovaalsed rakud - Saccharomyces fragilis;
- 4) jämedad lühikesed pulk'pisikud - Geotrichum candidum (joon. 35).

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

Kõiki kirjeldatud mikroobe ei pruugi igas preparaadis esineda.

Lactobacillus plantarum'i saamiseks valmistatakse rikastuskultuur ehk "laboratoorne kartulisilo" järgmiselt.

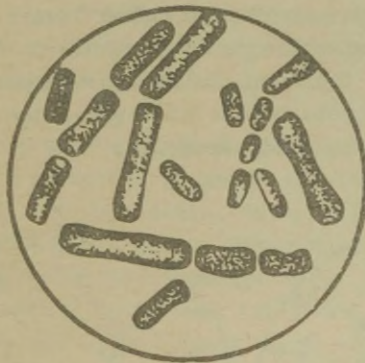
Võetakse 4...5 väikest pestud ja keedetud kartulit ning tükeldatakse. Tükid asetatakse purki ja kallatakse peale kraanivett nii palju, et see kataks tükid paari sentimeetri paksuse kihina. Purk suletakse õhukindlalt ja asetatakse üheks nädalaks termostaati ( $30^{\circ}$  C). Selle aja jooksul arenevad eeskätt piimhappebakterid (L.plantarum), võihappebakterite paljunemist pidurdab esialgu substraadis sisalduv hapnik.



Joon. 33. Streptococcus lactis.  
a - puhaskultuurist, b - hapust piimast



Joon. 34. Lactobacillus bulgaricus.  
a - puhaskultuurist, b - hapust piimast



Joon. 35. Geotrichum candidum.

L. plantarum uurimiseks võetakse purgist aasaga tilk vedelikku, pannakse alusklaasile ja aetakse laiali. Preparaat fikseeritakse leegis ja värvitakse 5 minutit metüleensinisega. Preparaadis on näha hulgaliselt siniseks värvunud pulkpisikuid (L. plantarum) kas üksikult või ahelate-na. Nende kõrval võib esineda ka mitmesuguste teiste mikroobide üksikuid rakke.

Oksübiontilist äädikhappeäärimist e. atsetifikat-  
siooni põhjustavate mikroobide uurimine

Äädikhappebakterid on spetsialiseerunud etanooli oksübiontilisele transformeerimisele äädikhappeks.

Äädikhappebakterite rikastuskultuuri saamiseks valatakse Petri tassi kas lahjendatud veini (1 : 1) või õlut ja jäetakse ilma kaaneta laboratooriumi lauale seisma. Ohust satuvad äädikhappebakterid veinisse ja hakkavad paljunema, moodustades mõne päeva jooksul vedeliku pinnale õrna sileda kile, mis aegamööda muutub paksemaks. Ühtlasi on tunda nõrka äädikhappe lõhna. Vedeliku pinnal arenevad kõige sagedamini äädikhappebakterite liigid Acetobacter aceti (joon. 36) ja A. pasteurianum (joon. 37).

Äädikhappebakterite uurimiseks võetakse vedeliku pinnalt aasaga materjali ja pannakse alusklaasile veetilka ning aetakse laiali. Preparaat fikseeritakse leegis ja värvitakse 5 minutit metüleensinisega. Preparaadis on näha lühikesed pulkpisikud kas üksikult, kahekaupa või pikemate aheladena. Peale äädikhappebakterite võib preparaadis sageli näha suhteliselt suuri ovaalseid pärmseeni.



Joon. 36. Acetobacter aceti. Joon. 37. Acetobacter pas-  
teurianum.

## Võihapekäärimist põhjustavate mikroobide uurimine

Võihapekäärimisel tekib sahhariididest, etanoolist, piimhapest (tagasiviiduna püroviinamarihappeks või üle atsetaadi) ja selle sooladest võihape, sipelghape, piimhape, äädikhape, propioonhape, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, butanool jt. Võihapekäärimist põhjustavad mikroobid on graampositiivsed obligaat-  
sed anaeroobid, neid leidub rohkesti mullas, sõnnikus, juustus ja mujal. Tuntuimad on Clostridium butyricum, Cl. pasteurianum (joon. 38) jt.

Võihappebakterite rikastuskultuuri saamiseks asetatakse klaaspulgaga läbitorgitud väikesed mullased kartulid vesilukuga suletavasse kolbi kraanivette, kuhu lisatakse skalpelliotsaga tekkiiva võihappe sidumiseks kriiti, kolb pastööratakse ja pärast seda inkubeeritakse 5...6 päeva (35°C). Pastöörimisel enamik käärimissubstraadis esinevaid aspregeenseid mikroobe hävib, jäävad ainult sporegeensed bakterid, nende seas ka võihappebakterid.

Võihappebakterite uurimiseks võetakse haisvast rikastuskultuurist (meenutab roiskunud või lõhna) aasaga materjali ja pannakse alusklaasile, aetakse laiali, fikseeritakse ja värvitakse Grami järgi. Mikrooskoopimisel on preparaadis näha graampositiivseid pulkpisikuid kas üksikult, kahekaupa või lühikeste ahelatena. Osa pulki on käävjalt paisunud, neis asub spoor, mis Grami järgi värvimismenetlusel ei värvu ning paistab helelda täpina.

Võihappebakterite uurimisel osutub sobivaks ka granuloosreaktsioon. Selle läbiviimiseks pannakse alusklaasile tilk käärimisvedelikku, millele lisatakse tilk Lugoli lahust ja kaetakse kateklaasiga ning uuritakse õli-immersiooniobjektiiviga. Preparaadis on näha pulkade kõrval ka käävjaid spooriga rakke. Rakud sisaldavad rohkesti granuloosi, mis Lugoli lahuse toimel värvub siniseks ja on mikrooskoopimisel hästi eristatav muust raku osast.



Joon. 38. Clostridium pasteurianum.

Pektiinainete käärimist põhjustavate mikroobide uurimine

Pektiinainete poolest on rikkad kiudtaimede - lina ja kanepi varred. Linavarte pektiinainete käärimisel eristatakse 3 faasi: 1) linavarte ligunemine; 2) segakäärimine, milles osalevad mitmesugused mikroobid; 3) puhas pektiinainete käärimine, mis olenevalt keskkonnatingimustest võib kesta mõnekümnest tunnist kuni paari nädalani. Pektiinainete käärimisel tekib hulk lõpp-produkte (võihape, äädikhape, atsetoon, butanool,  $H_2$ ,  $CO_2$  jne.).

Pektiinainete käärimist põhjustavate mikroobide rikastuskultuuri saamiseks pannakse linavarte 5...6 väikest kimbukest (neli 3...4 cm pikkust vart niidiga kokkuseotult) Er-lenmayeri kolbi destilleeritud vette ja keedetakse 2 korda á 3...4 minutit. Keetmisel hävitatakse enamik vartel olevaid mikroobe. Jahtunud kolbi lisatakse 2...3 keetmata linavarre tükkikest pektiinainete kääritajatega nakatamiseks. Kolb sulletakse vattkorgia ja asetatakse termostaati kaheks



Joon. 39. Clostridium pectinovorum ja Cl. felsineum.

nädalaks. Selle aja jooksul jõuab käärimine kolmandasse faasi.

Preparaadi valmistamiseks võetakse kimbukesest üks linavars ja sellega tõmmatakse üle alusklaasi keskmise osa, kuhu lisatakse ka veel tilk käärimisvedelikku ning kaetakse kateklaasiga. Preparaadis on näha trummipulgakujulisi Cl. pectinovorum'i ja Cl. felsineum'i rakke (joon. 39). Cl. pectinovorum moodustab vői- ja äädikhapet ning  $H_2$  ja  $CO_2$ . Cl. felsineum moodustab eespool öeldule veel lisaks vähesel määral neutraalseidprodukte nagu atsetooni ja butanooli.

#### T ü ö ü l e s a n d e d

1. Valmistada piimhappe-, äädikhappe- ja vőihappebakterite ning pektiinainete kääritajate rikastuskultuurid.
2. Mõõta joonlauaga antibiootikumide bakteriostaatilise mõju uurimiseks kasvatatud kultuurides diagnostiliste keetaste ja nende ümber moodustunud kasvuvaba tsooni diameeter (XI praktikumil alustatud töö).
3. Streptomütsiini suhtes resistentsemaks osutunud kolooniast teha külv katseklaasi kaldagarile, mis sisaldab  $15 \mu g/cm^3$  antibiootikumi (XI praktikumil alustatud töö).

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

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

Tselluloos on polüsahhariid, mida hüdroliüsivad aeroobsed ja anaeroobsed tselluloosilagundajad mikroobid (peamiselt mõned seened, aga ka mitmed spetsiifilised bakterid). Hüdroliüsil tekib osalt vaba glükoosi, selle kõrval aga ka tsellubioosi jt. kõrgemat järku  $\beta$ -oligoglükaane.

Tselluloos moodustab taimede rakukestade põhilise osa. Taimejäätmetes toimub nende pidev lagundamine, mille tõttu vabanevad rakusisaldised, mida hakkavad lagundama juba teised mikroobid. Tselluloosilagundajad teevad just kui tee teiste mikroobide tegevuseks lahti taimsete jäätmete lagundamisel. Mitmesugused mikroobid, kes ise ei suuda tselluloosi lagundada, kasutavad oma elutegevuseks tselluloosi lagunemise madalamolekulaarseid sahhariidprodukte. Eriti tuntud on selles mõttes tselluloosilagundajate sümbioos lämmastikufikseerijatega. Aeroobsete tselluloosilagundajate arvukuse järgi hinnatakse sagedasti mulla biogeensust ja kultuuristatusastet.

Looduses on puidu tselluloosi põhilised lagundajad mitmed seened. Mullas esinevaid taimejäätmeid aga lagundavad energiliselt ka bakterid. Aerobioosis lagundavad selliste jäätmete tselluloosi eeskätt limabakteriliste seltsi kuuluvad perekonnad: Cytophaga (joon. 40, I), kelle esindajate rakud on teritunud otstega pulgad, ei moodusta mikrotsüste; Sporocytophaga, kelle esindajad on teritunud otstega pulkpisikud, moodustavad ümmargusi ja ovaalseid mikrotsüste; Sorrangium, kelle esindajad on ümmarguste otstega pulkpisikud, moodustavad mikrotsüste, osa mikrotsüste moodustavad viljakehi (rakkude kogumikud), mis on palja silmaga nähtavad.

Peale limabakteriliste lagundavad aerobioosis tselluloosi perekonda Cellvibrio (joon. 40, II) kuuluvad vibrio-

nid, kelle esindajad on ühe viburiga, moodustavad värvilisi pigmente, ei kasuta aga tselluloosi kuigi täielikult.

Anaerobioosis on tselluloosi peamine lagundaja Bac. omelianskii (joon. 41), kelle rakud on pikad ja peenikesed. Raku ühes otsas tekib spoor, mille tõttu kuju muutub trummipulga taoliseks. Rakud on liikumisvõimetud, graamnegatiivsed. Nende bakterite tegevuse toimel moodustuvad lõppproduktidena metaan, äädik-, või-, piim- ja sipelghape ning  $CO_2$  ja  $H_2$ .



I

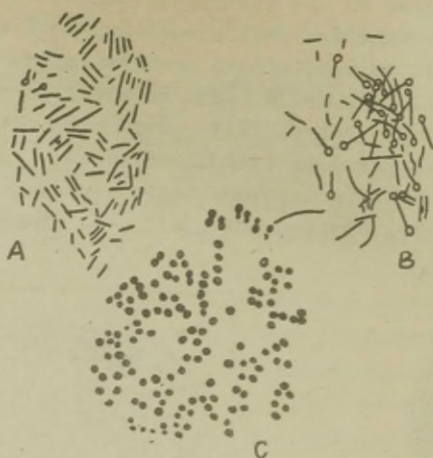


II



III

Joon. 40. Perekondade Cytophaga (I), Cellvibrio (II) ja Cellfalcicula (III) esindajad.



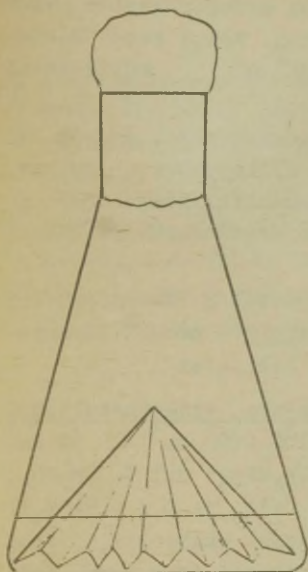
Joon. 41. Bacillus omelianskii. A - noored rakud, B - spooridega rakud, C - spoorid.

Aeroobsete tselluloosilagundajate rikastuskultuuri saamiseks valatakse Erlenmeyeri kolbi ( $100\text{ cm}^3$ )  $30\text{ cm}^3$  vett, millele lisatakse  $0,1\%$   $\text{NH}_4\text{Cl}$  ja  $0,5\%$   $\text{K}_2\text{HPO}_4$ . Süüde kaetakse koonilise volditud filterpaberiga, mille koonuse tipp ulatub üle poole kolvi kõrguse (joon. 42). Kolbi lisatakse veidi kriiti ja tselluloosilagundajate mikroobidega infitseerimiseks pisut mulda. Kolb asetatakse üheks nädalaks termostaati ( $30^\circ\text{ C}$ ).

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

Aeroobsete tselluloosilagundajate mikroobide uurimiseks võetakse aasaga filterpaberilt lima ja pannakse alusklaasil asuvasse veetilka, aetakse laiali ja värvitakse fuksiiniga (5 minutit). Mikroskoopimisel on näha eespool kirjeldatud aeroobseid tselluloosilagundajaid.

Aeroobsete tselluloosila-  
gundajate mikroobide ar-  
vukuse määramine mullas



Joon. 42. Aeroobsete tselluloosilagundajate rikastuskultuur.

Arvukuse määramiseks kasutatakse modifitseeritud Hutchin-soni söödet (1 l vee kohta lisatakse 1 g  $K_2HPO_4$ ; 0,1 g  $CaCl_2$ ; 0,2 g  $MgSO_4$ ; 0,1 g  $NaCl$ , 0,01 g  $FeCl_3$ ; 2,5 g  $NaNO_3$  ja 2,5 g  $CaCO_3$ . SöötmepH reguleeritakse 7,2... ..7,3). Sööde valatakse 5 ml kaupa katseklaasidesse, kuhu lisatakse filterpaberiribad (6 x 1 cm). Katseklaasid koos söötmega autoklaavitakse 20 minuti jooksul (1 atü), jahutatakse ja infitseeritakse pipeti abil uuritava materjaliga teisest kuni kuuendast mullalahjendusest. Igast lahjendusest tehakse väljakülv (1 ml) kolme katseklaasi.

Katseklaasid nummerdatakse ja asetatakse 2...3 nädalaks termostaati ( $28^{\circ}C$ ). Vaatlustega alustatakse 1 nädala pärast. Jälgitakse filterpaberiribal pigmendi ja lima teket ning paberi purunemist. Arvukuse määramisel on kõige olulisemaks näitajaks paberi purunemine.

Aeroobsete tselluloosilagundajate mikroobide arvukus määratakse McGrady tabeli järgi (lisa 1). Tabeli kasutamise juhised on toodud VII praktikumis lk. 86 .

Mulla aeroobsete tselluloosilagundajate mikroobide kolooniate ilmeks demonstreerimiseks külvatakse 0,05 ml teisest ja kolmandast mullalahjendusest (viljakate muldade puhul 3. ja 4. lahjendusest) Petri tassi modifitseeritud Hutchin-soni tardsöötmel (sisaldab 2 % agar-agarit) ja ae-

takse spaatliga laiali. Inokuleeritud söötmeplaadile asetatakse steriilne filterpaberist ketas. Petri tass asetatakse kaheks nädalaks termostaati ( $28^{\circ}\text{C}$ ) küllastatud niiskusega atmosfääri (eksikaatorisse).

Kolooniate teket ja värvust vaadatakse 5., 10. ja 14. päeval. Kahe nädala pärast võetakse filterpaber tassist välja, kuivatatakse ja kleebitakse kaseiinliimiga tööviikusse. Kolooniate värvuse järgi võib orienteeruvalt määrata perekondi.

Näiteks perekond Cytophaga moodustab filterpaberil kollase värvusega kolooniaid, Cellvibrio - pruuni värvusega ja Mycobacterium roosa värvusega kolooniaid.

Anaeroobsete tselluloosilagundajate rikastuskultuuri saamiseks kallatakse Erlenmeyeri kolbi ( $100\text{ cm}^3$ )  $50\text{ cm}^3$  söödet (1 l kohta lisatakse  $0,2\%$   $\text{KNH}_4\text{HPO}_3$ ;  $0,1\%$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ;  $0,03\%$   $\text{CaCl}_2$ ;  $0,1\%$  peptooni;  $0,5\%$   $\text{CaCO}_3$  ja  $0,5\%$   $\text{MgSO}_4$ ). Sööde infitseeritakse mullaga (lisatakse skalpelli otsa täis) ja lisatakse 1 g filterpaberiribasid ( $3 \times 1\text{ cm}$ ). Kolb suletakse kautšukkorgiga, millest pannakse läbi kõveraks painutatud klaastoru, mille ots asetatakse veega täidetud kolbi. Selle kaudu juhitakse käärimisel tekkinud gaasid vette. Kolvid asetatakse üheks nädalaks termostaati ( $35^{\circ}\text{C}$ ). Filterpaberiribad kattuvad limaga ja pikkamisi lagunevad kiududeks.

Kultuurist valmistatakse preparaat. Aasaga võetakse filterpaberi pinnalt materjali ja pannakse alusklaasile, aetakse laiali ja värvitakse fuksiiniga. Preparaadis on näha anaeroobseid tselluloosilagundajaid, keda eespool kirjeldati.

#### T ö ö ü l e s a n d e d

1. Valmistada aeroobsete ja anaeroobsete tselluloosilagundajate rikastuskultuurid.

2. Määrata aeroobsete tselluloosilagundajate arvukus mul-  
las.
3. Aeroobsete tselluloosilagundajate kolooniate uurimiseks  
teha külv Petri tassi modifitseeritud Hutchinsoni tard-  
söötmele. Infitseeritud söötmeplaadile asetada filter-  
paberist ketas.
4. Valmistada piimhappe-, äädikhappe- ja võihappebakterite  
rikastuskultuurist preparaadid, värvida ja mikroskoopi-  
da. Joonistada vihikusse 3...4 tüüpilist rakku. (XII  
praktilikumil alustatud töö.)

## XIV ja XV praktikum

### T e e m a : LÄMMASTIKAINETE MUUTUMINE MIKROOBIDE ELU- TEGEVUSES

Taimede ja loomade jäätmeis leiduvaid lämmastikaineid lagundavad ammonifitseerijad bakterid. Ammonifitseerijate bakterite seas eristatakse aeroobseid mädanemisbaktereid ja anaeroobseid roisubaktereid. Lämmastikaineid lagundatakse järk-järgult lihtsamateks ühenditeks. Aerobioosis tekivad mädanemisbakterite toimel lämmastikainetest (näiteks amino-  
hapete desamiinimine) lõpp-produktid -  $\text{NH}_3$ ,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{H}_2\text{S}$ ,  $\text{N}_2$ ,  $\text{H}_2$  jt. Anaerobioosis on roisubakterite toimel lõpp-produktideks liitsemad ühendid, mille seas esineb halvasti lõhnavaid ühendeid (merkaptaanid, amiinid, rasvhapped, indool,  $\text{H}_2\text{S}$  jt.).

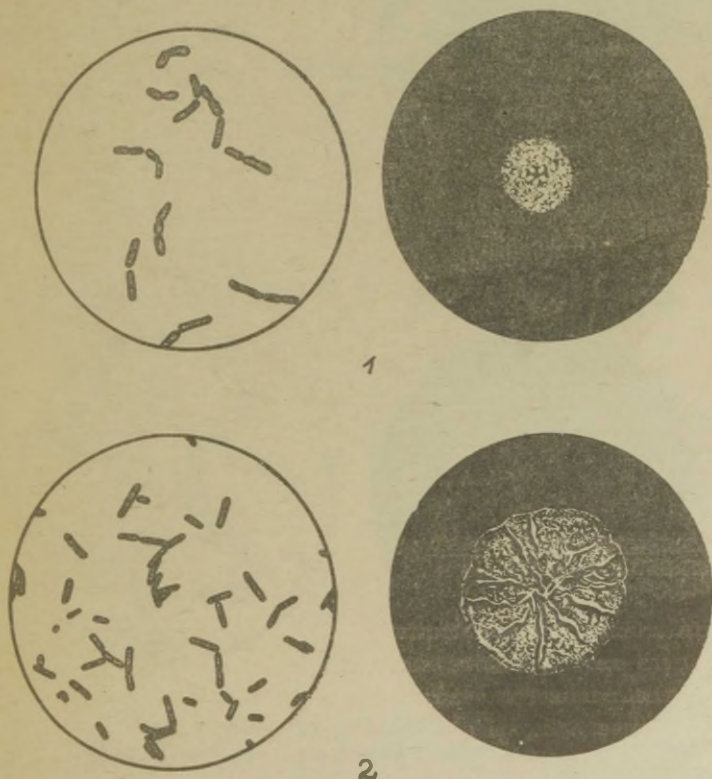
Valkude lagundamine on anaeroobne hüdrolüütiline protsess, milles osalevad bakteriensüümid - peptidüülpeptiidide, peptidüülaminohapete, aminoatsetüülpeptiidide ja dipeptiidide hüdrolaasid. Valkude hüdrolüüsil tekivad kõigepealt proteaanid, mis lagunevad albumoosideks, need omakorda peptoonideks, viimased polüpeptiidideks ja lõpuks tekivad aminohapped. Suur osa valgulämmastikust muutub roiskumisel ammoniaagiks (millest moodustuvad ammoniumsoolad), mida oksüdeerivad mullas leiduvad nitrifitseerijad bakterid lämmastikus- ja lämmastikhappeks (mullas moodustuvad ka nimetatud hapete soolad). Tekkinud happeid ja nende sooli kasutavad kergesti taimed, sünteesides neist keerukaid valke.

Bakterid on lämmastikuringes vahendajateks anorgaanilise maailma ( $\text{NH}_3$ ,  $\text{HNO}_2$ ,  $\text{HNO}_3$ ) ja teiste organismide vahel.

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

Ammonifikatsiooni all mõistetakse lämmastikainete la-

gunemist ammonifitseerijate bakterite toimel. Ammonifitseerijaid (joon. 43 - 46) mikroobe leidub looduses kõikjal. Aeroobsetest ammonifitseerijatest mikroobidest on sagedamini esinevateks: 1) Bac. megaterium - moodustab valgeid silledaid kumeraid kolooniaid, 2) Bac. subtilis'e variant mesentericus (kartulikepike) - moodustab tardsöötmel čukesi kuivi kortsulisi kolooniaid, 3) Bac. subtilis - moodustab peenekortsulisi kuivi või teralisi kolooniaid, 4) Bac. cereus'e variant mycoides - moodustab tardsöötmel valgeid seente mütsele meenutavaid kolooniaid.

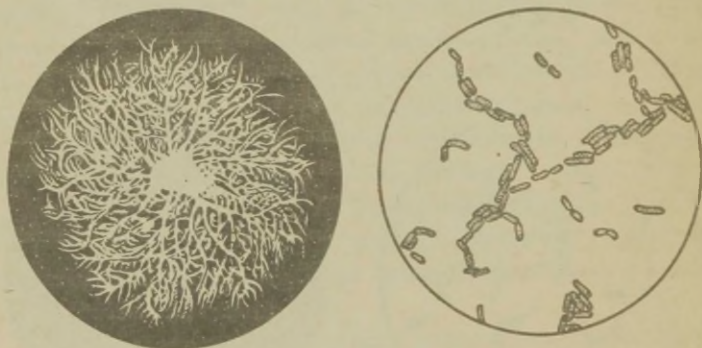


Joon. 43. Bacillus megaterium (1) ja Bacillus subtilis (2)

Peale batsillide ammonifitseerivad aerobioosis veel mitmete perekondade (Pseudomonas, Proteus jt.) esindajad. Perekonna Proteus liikidest esineb sagedasti muutliku kujuga P. vulgaris, kes tardsöötmel moodustab väikesi õhukesi sil- ledaid kolooniaid.

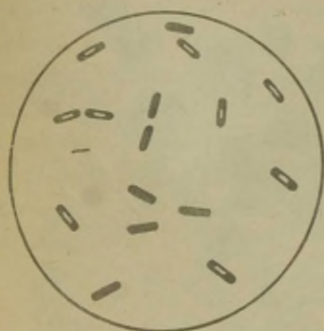


Joon. 44. Proteus vulgaris (1) ja Bac. lentoputrescens (2)



Joon. 45. Bacillus mycoides.

Anaerobsetest roisubakteritest tuleks nimetada Cl. lentoputrescens'it, kelle sporangiumid meenutavad kuju pool- lest trummipulka. Rakud esinevad sageli ahelatena. Moodustab agari sees helbetaolisi kohevaid kolooniaid.



1



2

3

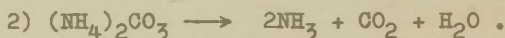
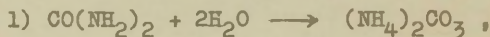
Joon. 46. Bac. mesentericus (1), Serratia marcescens (2) ja Bac. cereus (3).



Joon. 47. Urobacillus pasteurii (1) ja Planosarcina ureae (2).

Lämmastikainetest väärrib märkimist karbamiid, mida lagundavad aeroobsed urobakterid, näiteks Urobacillus pasteurii, Planosarcina ureae (joon. 47) jt. ensüüm 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 lagundamisest, urobakterid aga karbamiidi lagundamisest.

Mädanemisbakterite uurimiseks valatakse 150-cm<sup>3</sup> Erlenmeyeri kolbi 30 cm<sup>3</sup> 3 %-lise peptoonisisaldusega lihapuljongit, millele lisatakse infitseerimiseks pisut mulda. Kolb suletakse vattkorgiga, mille alla pannakse eralduva divesiniksulfiidi sedastamiseks pliiatsetaadi- ja NaOH-lahuste segus niisutatud filterpabeririba, eralduva NH<sub>3</sub> kindlakstegemiseks aga Kruppi reaktiivis immutatud filterpabeririba. Ribad ei tohi kokku puutuda söötmega. Kolb asetatakse üheks nädalaks termostaati (30° C).

Divesiniksulfiidi eraldumise puhul muutub pliiatsetaadi- ja Na-hüdroksiidilahuste segus niisutatud filterpaber mustaks. Ammoniaagi eraldumisel muutub Kruppi reaktiivis immutatud filterpaber punaseks.

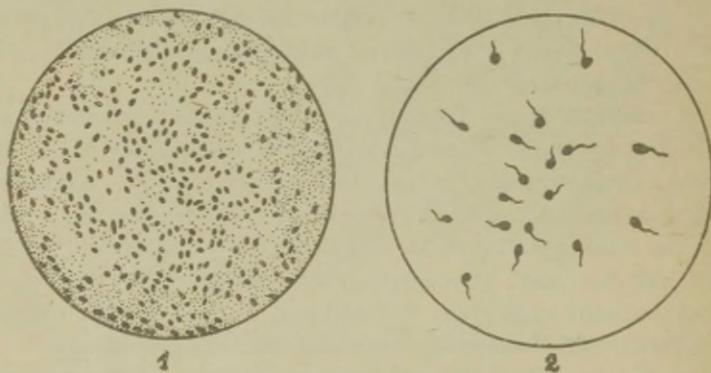
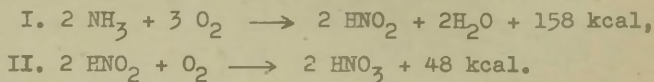
Heterotsüklilise aminohappe trüptofaani lõhustumisel tekkinud indooli on võimalik kultuurides kindlaks teha Erlich-Pringsheimi reaktiiviga. Kahe-kolme päeva vanusele uuritava mikroobi kultuurile lisatakse katseklaasis mõni tilk nimetatud reaktiivi ja loksutatakse ettevaatlikult. Siis lisatakse mõni tilk nõrka NaNO<sub>2</sub>-lahust (1 : 10 000), mis reaktsiooni tugevdab. Katseklaasi loksutamisel värvub vedelik indooli esinemisel kiiresti roosakaspunaseks.

Kultuurist võetakse aasaga materjali ja pannakse alusklaasile, aetakse laiali, värvitakse fuksiiniga ning mikrokoobitakse.

Urea lagundajate (urobakterite) uurimiseks valatakse 150-cm<sup>3</sup> Erlenmeyeri kolbi 30 ml lahust, milles on ureat 0,5 %, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,05 % ja MgSO<sub>4</sub> 0,02 %. Infitseerimiseks lisatakse kolbi veidi mulda, kolb suletakse vattkorgiga, mille alla pannakse eralduva NH<sub>3</sub> tuvastamiseks punane lakmuspaber, NH<sub>3</sub> mõjul muutub see siniseks.

Urobakterite kultuurist valmistatakse preparaata ja värvitakse fuksiiniga (5 minutit). Preparaadis võib näha Urobac. pasteurii rakke (sporgeensed pulkpisikud - 4...5 x x 1,0...1,5 μm, spoor asub raku ühes otsas ja Planosarcina ureae rakke (väikesed - 0,7 x 1,2 μm, liikumisvõimelised peritrihhid, moodustavad kas suuremaid või väiksemaid paken-deid).

Nitrifikatsioon (ammoniaagi oksüdeerimine nitrititaks ja edasi nitraatideks) toimub kahes faasis. Esimeses faasis moodustuvad nitritibakterite (Nitrosomonas - joon. 48, 1) elutegevuse tagajärjel nitritid, mis muutuvad teises faasis nitraadibakterite (Nitrobacter - joon. 48, 2) mõjul nitraatideks:



Joon. 48. Nitrifitseerijate perekonnad - Nitrosomonas (1) ja Nitrobacter (2).

Nitrifitseerijad bakterid on aeroobid, kes saavad elutegevuseks vajaliku energia ammoniaagi ja ammoniumsoolade lämmastiku oksüdeerimisest. Selle energia arvel sünteesivad nad kõiki rakus esinevaid orgaanilisi aineid. Nende baasil toimub ka nitrifitseerijate hingamine, eksogeensed orgaanilised ained toimivad toksiliselt.

Nitritibakterite rakud on väikesed, ovaalsed, sagedasti kokikujulised, liikumisvõimelised, pika polaarsete viburiga. Nitraadibakterid on väikesed liikumisvõimetud pulkpisikud.

Nitrifitseerijate bakterite uurimiseks valatakse

150-cm<sup>3</sup> Erlenmeyeri kolbi järgmise koostisega söödet. Söötmel valmistamisel lisatakse 1 liitri vee kohta 0,2 % (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0,1 % K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,05 % MgSO<sub>4</sub>; 0,2 % NaCl; 0,04 % FeSO<sub>4</sub> ja 0,5 % CaCO<sub>3</sub> või MgCO<sub>3</sub>.

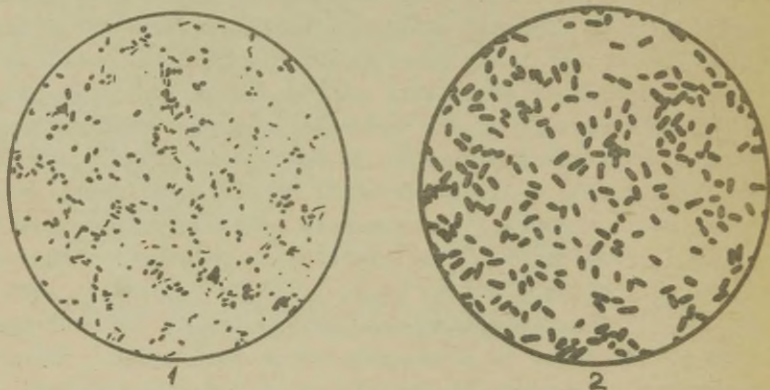
Kolbi loksutatakse hästi, lisatakse veidi mulda, kolb suletakse vattkorgiga ja asetatakse üheks nädalaks termos- taati (28° C). Selle aja jooksul tekkinud nitritid ja nitraadid tehakse kindlaks difenüülamiinilahusega, mida lisatakse mõni tilk katseklaasi valatud kultuurivedelikku. Nitritite ja nitraatide esinemisel värvub lahus siniseks. Nitritite avastamiseks kasutatakse Griessi reaktiivi, mida lisatakse mõni tilk katseklaasi valatud kultuurile. Nitritite esinemisel värvub lahus roosakaspunaseks kuni sügavpunaseks. Meetod on väga tundlik, nitritite kontsentratsiooni korral üle 25 µg/100 cm<sup>3</sup> tekib juba sade (siis on vaja uuritavat lahust lahjendada). Nitritite ja nitraatide kindlakstegemise paremaks võtteks on nn. alusklaasimeetod. Pintsettidega võetakse väga puhas alusklaas ja asetatakse valgele paberile. Alusklaasile pannakse üks tilk nitrifitseerijate kultuuri, millest umbes 1 cm kaugusele pannakse tilk kontsenteeritud väävelhapet. Väävelhappe tilka pannakse skalpelli otsaga mõni difenüülamiini kristallike ja segatakse. Pärast seda ühendatakse külviaasa abil kultuuritilk väävelhappetilgaga. Nitritite ja nitraatide esinemisel tekib lahuste kokkupuute piirkonnas sinine värvus, mis valgel alusel on hästi märgatav.

Mikroskoopimisel värvitakse preparaat fuksiiniga.

Denitrifikatsioon on nitrifikatsioonile vastupidine protsess, milles lämmastikhappe soolad (nitraadid) redutseeritakse algul lämmastikhappe sooladeks (nitritid), edasi aga üle mitmesuguste, osalt halvasti tuntud vaheühendite gaasilisteks lõpp-produktideks, mis haihtuvad keskkonnast (NO, N<sub>2</sub>O, peamiselt N<sub>2</sub>).

Denitrifikatsiooni kindlakstegemiseks valatakse 150-cm<sup>3</sup> vesilukuga Erlenmeyeri kolbi 30 cm<sup>3</sup> Hiltay modifitseeritud

söödet (ühe liitri dest. vee kohta lisatakse 2 g Na-tsit-raati, 1 g  $\text{KNO}_3$ ; 1 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 1 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 2 g  $\text{MgSO}_4$ ; 0,2 g  $\text{CaCl}_2$  ja  $\text{FeCl}_3$  jäljed). Söötmesse lisatakse veel 0,1% list broomtümoolsinise lahust 20 %-lises etanoolis kuni selge rohelise värvuseni. Kolbi lisatakse veidi mulda ja suletakse kolb õhukindlalt ning asetatakse 1 nädalaks termostaati ( $30^\circ \text{C}$ ). Denitrifitseerijate mikroobide arenedes muutub sööde siniseks, ometi ei ole see veel spetsiifiline tõend denitrifitseerijate arengu kohta (võib toimuda ka mõne muu bakteri elutegevuse tagajärjel). Otsustav tunnus on gaaside eraldumine (mullid) koos sinistumisega, mis peab ulatuma põhjakihini.



Joon. 49. Pseudomonas denitrificans (1) ja Achromobacter stutzeri (2).

Kultuuris tehakse kindlaks nitritid Griessi reaktiiviga nitrifikatsiooni juures kirjeldatud viisil.

Denitrifitseerijate uurimiseks mikroskoobis tehakse preparaat, milles on näha sageli väikesi pulkpisikuid.

Spetsiifilisi denitrifitseerijaid tuntakse üle paarikümne liigi. Väga aktiivne denitrifitseerija anaerobioosis on Pseudomonas denitrificans (liikumisvõimelised 2...5 vi-

buriga pulkpisikud - 2...5 x 0,6  $\mu$ m) (joon. 49.). Laialt levinud on Achromobacter agile, kelle alaliik A. stutzeri on samuti väga aktiivne denitritseeriija (peritrihhaalsed liikumisvõimelised pulkpisikud - 2...4 x 0,5  $\mu$ m).

Väga huvitav on Thiobacillus denitrificans, kes koos nitraatide redutseerimisega oksüdeerib väävliühendeid ( $H_2S$ , S, tetrationsaadid) sulfaatideks. Thiobac. denitrificans'i rakk on energiliselt liikuv, väga väike, ühe pika viburiga rakk.

### Molekulaarse lämmastiku sidumine mikroobide poolt

Molekulaarset lämmastikku siduvad mikroobid jagunevad kahte rühma: 1) kõrgemate taimedega sümbioosis elavad mügarbakterid (perekond Rhizobium), 2) mullas vabalt elutsevad õhulämmastikusidujad (Clostridium pasteurianum, perekondade Azotobacter ja Beijerinckia liigid jt.). Tuleb märkida, et minimaalsetes kogustes  $N_2$  sidumine on uuemate andmete valgusel omane väga paljudele nn. oligonitrofiilsetele bakteritele, kes massiliselt asustavad mitmesuguseid muldi.



Joon. 50. Pseudomonas aeruginosa.  
(oligonitrofiil)

Mügarbakterid jagunevad liblikõieliste taimede põhiriühmade järgi, mille juurteil moodustuvad mügarad. Nii tuntakse herne, põldoa, viki, seaherne jne. mügarbakterit (Rhizobium leguminosarum), lupiini (Rh. lupini), mesika (Rh. meliloti), aedoa (Rh. phaseoli), sojaoa (Rh. japonicum), ristiku (Rh. trifolii) mügarbaktereid jt. Seejuures tuleb märkida, et spetsiifika peremeestaimeliigi suhtes ei tarvitse olla väga rangete.

Mügarbakterid, elades sümbioosis liblikõieliste taime-  
dega, varustavad neid lämmastikuga, seejuures "vastutasuks"  
kasutades liblikõieliste produtseeritud orgaaniliste hapete  
sooli jne.

Mügarbakteritega infitseerunud liblikõieliste taime-  
juurtel moodustuvad iseloomuliku kuju ja suurusega juuremü-  
garad e. noodulid. Nendes ongi mügarbakterid koondunud.  
Siin moodustub mikroobi ja taime koostöös  $N_2$  fikseerimisel  
oluline punane pigment - leghemoglobiin.

Mügarbakterite rakud on liikumisvõimelised, kõverdunud  
pulgad ( $0,6 \times 2...3 \mu m$ ). Mitmeaastaste liblikõieliste mü-  
garbakterid jätavad mulda suurel hulgal lämmastikku. Mügar-  
bakterid on palju efektiivsemad kui mullas vabalt elavad  
lämmastikusüüajad bakterid.

Anaeroobse molekulaarse õhulämmastiku siduja Clostri-  
dium pasteurianum'i (joon. 51) kindlakstegemiseks ja arvu-  
kuse määramiseks mullas tehakse III ja IV mullalahjendusest  
3 paralleelset külvi (1 ml) Vinogradski söötmega katseklaa-  
sidesse.

Cl. pasteurianum'i kasvatamiseks tehtava Vinogradski  
söötme valmistamisel lisatakse ühe liitri destilleeritud vee  
kohta 20 g sahharoosi või roosuhkrut, 1 g  $K_2HPO_4$ ; 0,5 g  
 $MgSO_4$ ; 0,01 g NaCl; 0,01 g  $MnO_4$ ; 0,01 g  $FeSO_4$ ; 20 g  $CaCO_3$   
ja 0,5 g agar-agarit (söötme viskoossuse tõstmiseks, et gaa-  
side eraldumine oleks hästi märgatav). Söödet steriili-  
takse pool tundi 0,5-atü rõhul. Et tegemist on anaeroobiga,  
siis täidetakse katseklaasid kolmveerandini, infitseeritakse  
1 ml mullalahjendusega ja asetatakse 7...10 päevaks termos-  
taati ( $30^\circ C$ ). Cl. pasteurianum põhjustab söötme hägustumist  
ja gaaside ( $CO_2$  ja  $H_2$ ) teket.

Pärast inkubatsiooni jälgitakse katseklaasides gaasi  
eraldumist. Mullikestega katseklaas loetakse positiivseks.  
Mikroobide hulk määratakse McGrady tabeli abil.

Cl. pasteurianumi tuvastamiseks võetakse katseklaasist  
sademest aasaga materjali ja valmistatakse preparaat, mida



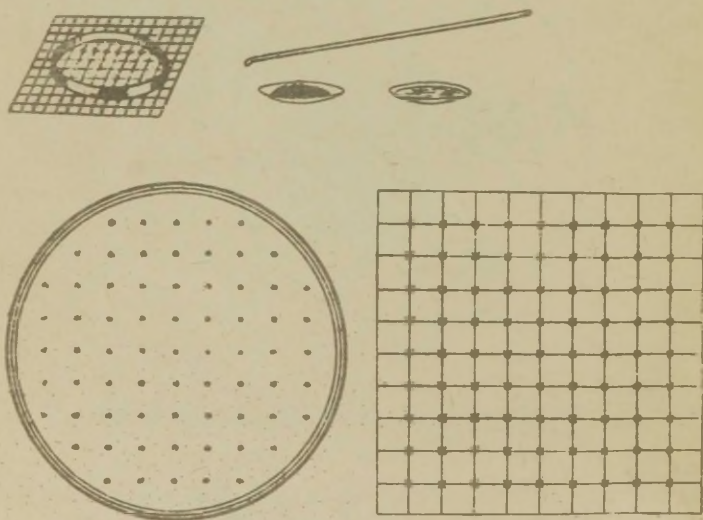
Joon. 51. Mõgarbakterid (1, 2) ja Clostridium pasteurianum (3).

mõjustatakse Lugoli lahusega. Nimelt pannakse preparaadile paar tilka Lugoli lahust ja mikroskoobitakse.

Cl.pasteurianum on obligaatne anaeroob, kes lagundab sahhariide, moodustades võihapet ja mitmesuguseid teisi

happeid ning süsinikdioksiidi ja vesinikku. Noored rakud on pulgakujulised, vanad rakud on värtnakujulised (klostridi-aalsed). Varuainena koguneb rakku granuloosi, mis joodiga värvub violetseks.

Aeroobse molekulaarse lämmastiku siduja *Azotobacter chroococcum* (joon. 52, 53) tuvastamiseks ja suhtelise arvukuse määramiseks tehakse trafareti abil mullatükikeste külv Petri tassi Ashby söötmele. Ashby söötme valmistamiseks asotobakterile lisatakse liitri destilleeritud vee kohta 0,5 g NaCl; 0,3 g MgSO<sub>4</sub>; 5 g CaCO<sub>3</sub>; 20 g sahharoosi või mannitooli; 0,2 g K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0,1 g CaSO<sub>4</sub>; 0,5 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1 cm<sup>3</sup> mikroelementide segu ja 20 g agar-agarit. Söödet steriiliseks 0,5-atü rõhul 30 minutit ja valatakse tuliselt 20 ml kaupa Petri tassidesse.



Joon. 52. Asotobakteri suhtelise arvukuse määramine mullas.



Joon. 53. Asotobakteri noored ja kapslitega rakud.

Pärast söötme geelistumist pannakse trafareti abil söötmeplaadile pintsettidega 50...100 mullatükikest. Tassid asetatakse termostaati ( $30^{\circ}\text{C}$ ). Mõne päeva pärast areneb asotobakterit sisaldava mullatükikese ümber karakterne pruunikas lima. Loetakse positiivse arenguga mullatükikeste arv ja väljendatakse nende osa protsentides.

Eestis on levinenuimaks asotobakteri liigiks 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 pulgad, mis esinevad kas üksikult või kahekaupa. Paljunedes kaotavad rakud liikumisvõime, suurenevad mõõtmelalt, muutuvad ovaalseteks või ümmargusteks ja moodustavad kapslid.

Difenüülamiinindikaatori valmistamiseks kaalutakse 0,25 g reaktiivi ja lahustatakse  $50\text{ cm}^3$  kontsentreeritud väävelhappes, mis peab olema keemiliselt puhas. Reaktiiv valmistatakse paar päeva enne kasutamist, säilib paar aastat.

### Griessi reaktiiv

Griess I valmistamiseks lisatakse 150 cm<sup>3</sup> äädikhappe lahusele (12 %) 20 cm<sup>3</sup> destilleeritud vett ja 0,2 g  $\alpha$ -naftüülamiini.

Griess II valmistamiseks lisatakse 150 cm<sup>3</sup> äädikhappe lahusele (12 %) 0,5 g sulfaniilhapet.

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

Kruppi reaktiivi valmistamiseks segatakse üks osa 3% list väävelhapet kahe osa 1%-lise fuksiini vesilahusega, mis on valmistatud küllastatud etanoolilahusest.

Ehrlichi-Pringsheimi reaktiivi valmistamiseks võetakse 50 cm<sup>3</sup> metüülalkoholi (96 %), millele lisatakse 50 cm<sup>3</sup> soolhapet (e. 1,19) ja 5 g paradimetüülamidobensaldehüüdi.

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

1. Teha muldkülv roisubakterite uurimiseks, milles kindlaks teha H<sub>2</sub>S ja NH<sub>3</sub> moodustumine.
2. Teha muldkülv ureat lagundavate mikroobide kindlakstegemiseks.
3. Teha muldkülv nitrifitseerijate ja denitrifitseerijate bakterite uurimiseks.
4. Tutvuda demonstratsiooniks väljapandud mügarbakterite preparaatide ja bakteriväetistega.
5. Määrata Cl.pasteurianumi arvukus mullas Vinogradski söötmege (III ja IV mullalahjendusest).
6. Kanda Petri tassi Ashby tardsöötmele trafareti abil 50 mullatükikest asotobakteri uurimiseks.

7. Valmistada aeroobsete ja anaeroobsete tselluloosilagundajate rikastuskultuurist preparaadid ja uurida neid mikrooskoobiga (XIII praktikumil alustatud töö).
8. Uurida Hutchinsoni tardsootmel arenenud kultuure, määrata värviliste laikude alusel orienteeruvalt tselluloosilagundajate mikroobide perekonnad (XIII praktikumil alustatud töö).
9. Määrata Hutchinsoni vedelsöotmel arenenud kultuurist tselluloosilagundajate arvukus McGrady tabeli järgi (XIII praktikumil alustatud töö).

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

1. Teha roisubakterite rikastuskultuurist preparaat ja uurida mikrooskoobiga. Jälgida  $H_2S$  ja  $NH_3$  moodustumist.
2. Valmistada ureat lagundavate mikroobide rikastuskultuurist preparaat, uurida mikrooskoobiga.
3. Valmistada nitriifitseerijate bakterite rikastuskultuurist preparaat ja uurida mikrooskoobiga. Tõestada nitraatide olemasolu kultuuris difenüülamiiniga.
4. Valmistada denitriifitseerijate mikroobide rikastuskultuurist preparaat ja uurida mikrooskoobiga. Tõestada nitritite olemasolu kultuuris Griessi reaktiiviga.
5. Määrata Vinogradski söötmele tehtud muldkülvis Cl. pasteurianum'i arvukus McGrady tabeli järgi.
6. Määrata Ashby söotmel kasvatatud kultuuris asotobakteri arenguga mullatükikeste protsent.

McGrady tabel

Ting- näitaja	Paralleelsetes katseklassides mikroobide tõe- näoline arv			Ting- näitaja	Paralleelsetes katseklassides mikroobide tõe- 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

Lisa 1 (järg)

Ting- näitaja	Paralleelsetes katseklaasides mikroobide tõe- näoline arv			Ting- näitaja	Paralleelsetes katseklaasides mikroobide tõe- 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				

## J O O N I S T E N I M E K I R I

1. Äigepreparaadi valmistamine
2. Ripptilga valmistamine
3. Stafülokokid ja pulkpisikud, värvitud Grami järgi
4. Tuberkuloositekitajad rögast, värvitud Ziehl-Neelseni meetodil
5. Enamlevinud bakterivormid
6. Spiroheedid
7. Objektmikromeeter, okulaarmikromeeter ja kruviokulaar-mikromeeter
8. Okulaarmikromeetri skaala mõõtmise
9. Horisontaalautoklaav
10. Kuivsterilisaator ja inkubaator
11. Chamberlandi ja Berkefeldi filtrid
12. Seitzi statiiv imikolvil
13. Gillespie meetodi skeem
14. Joonkülvi tehnika etapid
15. Katseklaasi külvitehnika. Pistekülv püstagarisse - korraga käes üks katseklaas (1), korraga käes kaks katseklaasi (2).
16. Söötme valamine Petri tassi ja Drigalski spaatel
17. Anaerostaadid
18. Krotovi aparaat
- 18-a. Batomeetrid veeproovi võtmiseks
19. Kolooniade vertikaalläbilõige
20. Kolooniade servajoon
21. Wolffhügeli kamber
22. Bakterikolooniade elektriline loendaja
23. Gorjajevi kamber
24. Rakkude loendamine ruudus
25. Visuaalne nefelomeeter ja selle skeem
26. Standardkõver rakkude arvu määramiseks **fotoelektronefelomeetriga**
27. Mikroobide eraldamine puhaskultuuri pinnahõõrumise meetodil

28. Lahjendusmeetodi skeem
29. Mikromanipulaator
30. Kromatografeerimise skeem
31. Antibiootikumide bakteriostaatilise toime määramine diagnostiliste ketastega
32. Streptomütsiiniresistentsete tüvede saamine Petri tassis
33. Streptococcus lactis
34. Lactobacillus bulgaricus
35. Geotrichum candidum
36. Acetobacter aceti
37. Acetobacter pasteurianum
38. Clostridium pasteurianum
39. Clostridium pectinovorum ja Cl.felsineum
40. Perekondade Cytophaga (I), Cellvibrio (II) ja Cellfalicula (III) erindajad
41. Bac.omelianskii
42. Aeroobsete tselluloosilagundajate rikastuskultuur
43. Bac.megaterium ja Bac.subtilis
44. Proteus vulgaris ja Bac.lentoputrescens
45. Bac.mycoides
46. Bac.mesentericus ja Serratia marcescens, Bac. cereus
47. Urobacillus pasteurii ja Planosarcina ureae
48. Nitrititseerijate perekonnad - Nitrosomonas ja Nitrobacter
49. Pseudomonas denitrificans ja Achromobacter stutzeri
50. Pseudomonas aeruginosa
51. Mügarbakterid ja Clostridium pasteurianum
52. Asotobakteri suhtelise arvukuse määramine mullas
53. Asotobakteri noored rakud ja kapslitega rakud

K I R J A N D U S

- Manual of microbiological methods by the Society of American Bacteriologists. Committee on bacteriological technic. New York-Toronto-London, 1957.
- Pelczar, M.J., I.P.A. Hansen, W.A. Konetzka. Quantitative Bacterial Physiology Laboratory Experiments. Burgess Publishing Co, Minneapolis 15, Minnesota, 1961.
- Tallmeister, E., S. Laanes, A. Lenzner. Laboratoorsed t  d meditsiinilises mikrobioloogias. ERK. Tallinn, 1964.
- Большой практикум по микробиологии. Под ред. Г.Л. Селибера. М., "Высшая школа", 1962.
- Грегори Ф. Микробиология атмосферы. М., "Мир", 1964.
- Лебедева М.Н. Руководство к практическим занятиям по медицинской микробиологии. М., Медгиз, 1963.
- Методы изучения почвенных микроорганизмов и их метаболитов. Под ред. проф. Н.А. Красильникова. М., МГУ, 1966.
- Мишустин Е.Н., В.Т. Емцев. Микробиология. М., "Колос", 1970.
- Омелянский В.Л. Практическое руководство по микробиологии. М.-Л., АН СССР, 1940.
- Пименова М.Н., Н.Н. Гречушкина, Л.Г. Азова. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. М., МГУ, 1971.
- Родина А.Г. Методы водной микробиологии. М.-Л., "Наука", 1965.
- Теппер Е.З., В.К. Шильникова, Г.И. Переверзева. Практикум по микробиологии. М., "Колос", 1972.
- Федоров М.В. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. М., Сельхозгиз, 1957.