

3. GAIA: LAGINKETA ETA LAGINEN PROZESAKETA

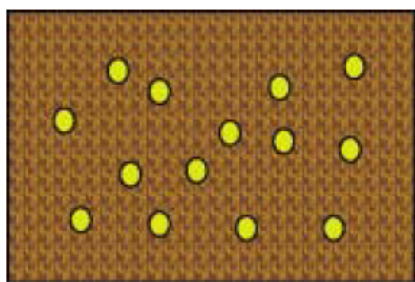
Ingurumen mikrobiologian, kanpo-medioan hartu egiten dira laginak eta hauek laborategian prozesatuak dira. Laginketa lekutik laborategiraino pasatzen den denbora tarte ezin da oso handia izan, denbora tarte horretan aldaketak eman baitaitezke eta gure laginaren natura aldatu. Beraz, laginaren garraioa eta biltegia ezinbestekoa da laborategian laginen prozesamendu eta parametroen estimazio egokia egiteko.

- Laginketa
 - Prozesuan zehar mikroorganismoen zenbakia eta aktibitatea ezin da aldatu.
 - Beste lekuetako mikroorganismoekin ezin da kutsatu, nahiz eta Sistema berdineko mikroorganismoak izan. (Itsasko ura hartzen badugu, gure lagin indibiduala ezin dugu beste tokiko itsasoko urarekin kutsatu)
 - Laginketa lekuko lagin adierazgarria izango da:
 - ✓ Laginketa adierazgarrien mapa: Intereseko puntutik gertu dauden lekutik ere hartu behar dira laginak, aurretik eta atzetik.
 - ✓ Laginen zenbakia eta maiztasuna: Kontzentrazioa kalkulatu eta eraginaren aldaketa neurtu.
- Zeren menpe dago?
 - Ekosistemaren ezaugarri fisiko eta kimikoak.
 - Mikroorganismoen ugaritasuna: lurrean mikroorganismo asko daude, beraz hartu beharreko lagina txikia izan beharko da.
 - Zenbaketa eta neurketarako prozedurak: zer ikertu nahi dugu eta zelan egingo dugu.

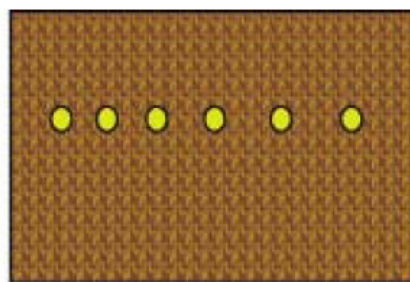
Ez dago baliozko laginketa metodo bakarra eta ez dago neurtzeko metodo unibertsal bakarra.

Laginak hartzeko teknika edo mekanismo ezberdinak:

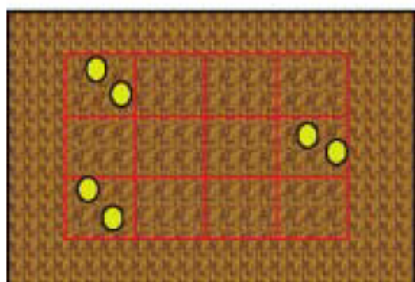
Bi dimentsiotako laginketa



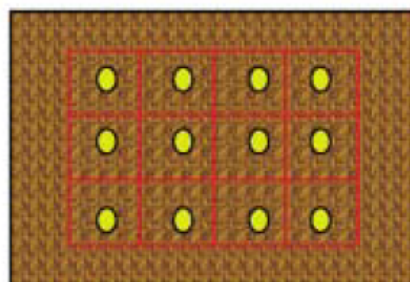
(A) Simple random



(B) Transect



(C) Two-stage



(D) Systematic grid

Prozesu eta lagin ezberdinentzako teknikak:

Ingurumena	Eskuraketa	Zenbakia	Tresnak	Laginen prozedura
Airea	Zuzena	Baxua	Iragazkiak Andersen lagingailua	Iragazkietan kontzentrazioa
Ura	Zuzena edo urrutiko kontrola bidez, gainazaletik zuzen baina sakontasuneko laginak hartzeko urrutiko kontrola	Ertaina (altua edo baxua, bitartean dago)	Sareak, ontziak, iragaziak	Diluzioa edo kontzentrazioa
Sedimentua	Urrutiko kontrola	altua	Dragak, lagingailu zilindrikoak (corer)	Diluzio seriatua
Lurra	zuzena	Altua	Palak, lagingailu zilindrikoak.	Diluzio seriatua

Lagin motak

1. Leku eta une bakarrean harturikoak.
2. Une desberdinetan baina leku berdinetik lorturikoak.
3. Leku desberdinetakoak baina leku berdinetik harturikoak.
4. Une eta leku desberdinetakoak.

Mikroorganismoen populazioak (batez ere bakterioak) hartzeko lagingailuak “izan behar dira”:

- Esterilizagarriak
- Esterilitate-baldintzak mantentzen dituzten tresnak
- Ez toxikoak

Laginaren naturaren arabera laginketa metodo eta tresna ezberdinak erabili behar dira. Bost lagin mota daude hauen ezaugarri fisiko-kimikoen arabera: U-laginak, Lur-laginak, Aire-laginak, Lagin biologikoak eta Fomiteak.

UR LAGINAK

- Aire-ur interfasea
- Gainazala
- Sakontasuna

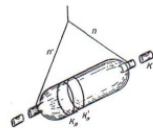
- Lurrekoak baino laginketa errazagoz lortzen dira
- Lurra baino homogenoagoa da
- Tresna sinpleagoak erabiltzen dira: botilak, ponpa xurgatzaileak, tutuak...
- Adierazgarritasuna lortzeko:
 - ✓ Lagin batzukleku batean une desberdinetan (Adb. Ibaia)

1. Aire-Ur Interfasea

- Airearekin kontaktuan dagoen ur-geruza
- Hartzeko zaila da: Oso geruza mehea baita
- Lagingailu motak: Ez jarraikiak edo jarraikiak izan daitezke

Lagintzaile ezjarraiki motak

- Botila irekia



- Pasteur pipeta



- Beirazko lamina

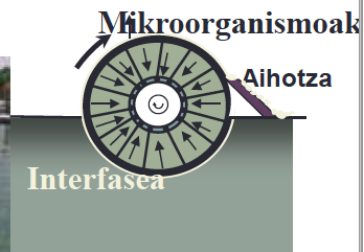


- Fly-Screen edo Garretten lagingailua



Lagingailu jarraikiak

- Harvey-ren lagingailua



2. Gainazala

Erabiltzen diren lagintzaileak:

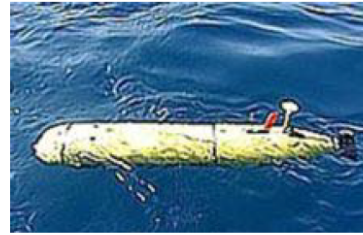
- Botila
 - Esterilizagarria
 - Maneiu erreza
 - Mikroorganismo mota guztiak

- Sareak
 - Ez bakterioentzat
 - Populazio hauskorak
 - Populazioen hautaketa
 - Ez esterilizagarria
 - Erabilera erreza

Sare konbentzionalak, Itzierarekin sareak, Neuston patina, USGS lagingailua, Helley-Smith lagingailua, Gulf-Stream lagingailua, Clarke-Bumpus-en lagingailua



- Azpiuretako ibilgailu automatikoak

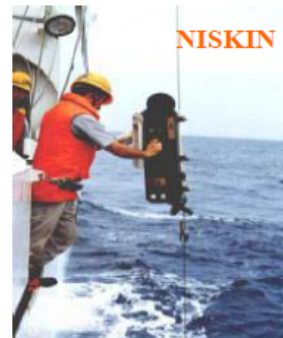


3. Sakontasuna

- Ur-ponpak
- Botila ez esterilizagarriak:
 - ✓ Ruttner
 - ✓ Nansen
 - ✓ Van Dorn
 - ✓ Niskin
 - ✓ Go-Flo



- Niskin botila: bi muturretan zabalik daude. Botila uretara botatzen da eta 100 metrrotara (edo nahi den distantziara) gelditu egiten da. Mezulari bat bidatzen da (automatikoa edo eskuz) eta botilarekin tope egiten duenean estalkiak bi muturretan itxi egiten dira eta bertako sakontasuna neurtu daiteke.
- Erroseta geografikoa; niskin botila asko eta distantzia ezberdinetan itxi egiten dira distantzi ezberidneko laginak hartzek. Sondak (CTD) ere badituzte eta horrela klorofila temperature eta sakontasuna neurtuko dituzte.

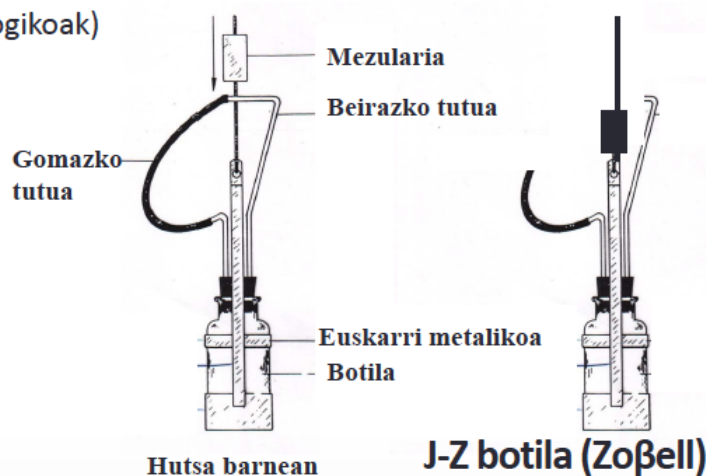


Sakontasun baxua:

□ Botila esterilizagarriak

(ikerketa bakteriologikoak)

- ✓ J-Z (Zobell)
- ✓ Niskin
- ✓ Sieburth



Sakontasun handia:



<http://www.whoi.edu/marops/vehicles/alvin/index.html>



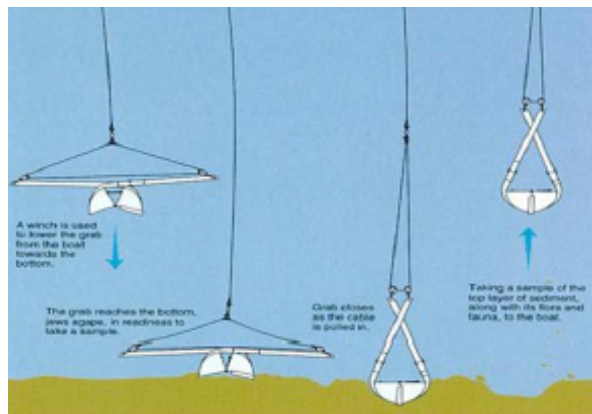
Itsaspeko txikiak

- ❑ **Batisfera** Aitzindaria (1934). Mugimendu autonomirik gabe. 908 m Bermudasen
- ❑ **Batiskafoa** (1948) Mugimendu autonomoa. 4.050 m Afrikan
- ❑ **Trieste Batiskafoa** (1960) 10.900 m Marianaseko fosan
- ❑ **Alvin** (1977) Haspide hidrotermalak
- ❑ **RDV Kaiko** (1995) Challenger-ren sima

LUR-LAGINAK

- Sedimentu
- Gainazala
- Azpigainazala

1. Sedimentu laginak
 - Dragak
 - Esterilitaterik ez
 - Sedimentuaren egituraren desantolaketa
 - Laginaren nahasketa
 - Laginaren garbiketa
 - Erabilera erreza



• Draga Van Veen

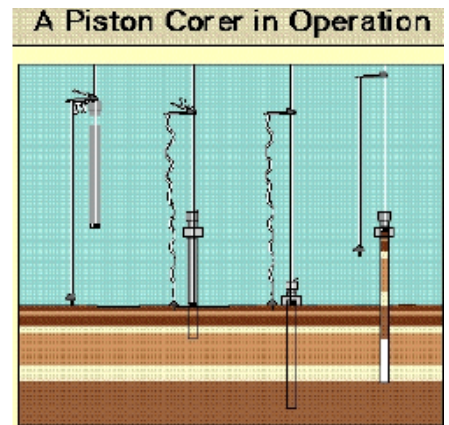
Draga Van Deen eta Ekman dragak dira erabilienak.

Van Deen: erraza eta sinplea. Bi kubeta bi beso luzeekin lagina hartzeko. Substratu bigunetan erabiltzea da gomendagarria eta ez gogorretan, ez baitu hainbesteko indarrik.



• Draga Ekman

- Corers: multipleki ere erabili daiteke. Urperatu egiten da itsaso ondoan, orduan lur zati bat aspiratzen du eta kanpora atera. Metanoaren produkzio eta kontsumoa neurtzeko erabiltzen da.



- Esterilizagarria
- Sedimentuen desantolaketa gutxi
- Sakontasun desberinetako profila
- Sedimentu gogorretan zailtasunak

- Urpekari edo aparatu urpegarriak

2. Gainazala

- Corers
- Sarturiko mikroskopioko portak edo saretxoak
- Kapilarrak portaren ordeztu
 - ✓ Peedoskopioa lurzoruan
 - ✓ Pedoskopia sedimentuetan

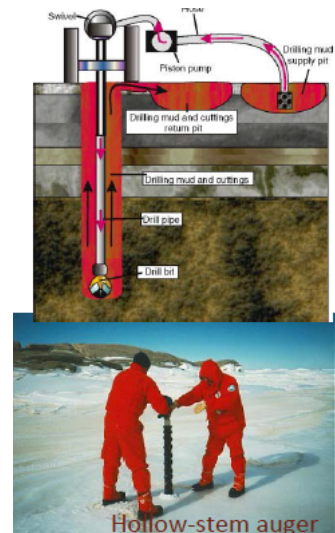
3. Errizosfera

- Landareen sustrairen inguruan lagina hartzen da
 - ✓ Mikrobio-aktibitate altua
 - ✓ Mikrobio-landarea harremana
- Zailtasuna:
 - ✓ Sustraia ateratzea
 - ✓ Aztinketa lehuna itsatsita ez dagoen lurra kentzeko

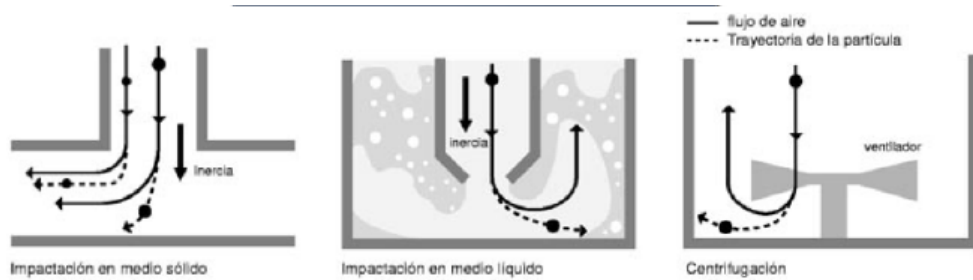
4. Azpigainazala

Azpigainazaletik laginak hartzeko zulatze sistemak erabiltzen dira. Biraketaren bidezko zulatzearen lantresna pneumatikoak erabiltzen dira. Teknika honek baditu zenbait arazo:

- Garestitia dira
- Lantresna
- Baimenak behar dira
- Ingenieritza-taldearen laguntza beharrezkoa da
- LAGinaren beroketa emate da
- Ura eta produktu desberdinen kutsadura
- Laginak batzuetan ez dira adierazgarriak



AIRE LAGINAK



3 teknika bitartez lortu egiten dira aireko laginak:

1. Inpaktuaren bidez:

- Impringers (medio likidoan): Medio likidoan mikroorganismoak txertatzen dira. Garrantzitsua da jakitea zenbat medio likido iragazten den.
- Andersen, SAS, Biocassete lagingailua (medio solidoan): Inpaktua medio solidoan egiten da.
- Zentrifugazioaren bidez (Fluxu-lagingailua) (medio-solidoan)

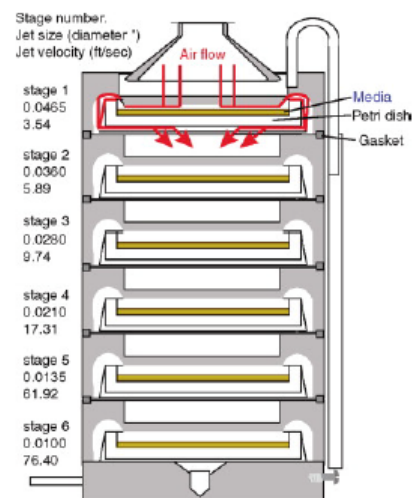
Aire-laginak

INPAKTUA (likidoan): IMPINGERS

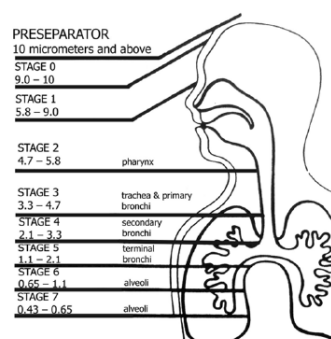


<http://www.youtube.com/watch?v=mr7F0KRrHxg>
(Gatz sol, peptona sol)

INPAKTUA (solidoan): Andersen lagingailua



INPAKTUA (solidoan): Andersen lagingailua

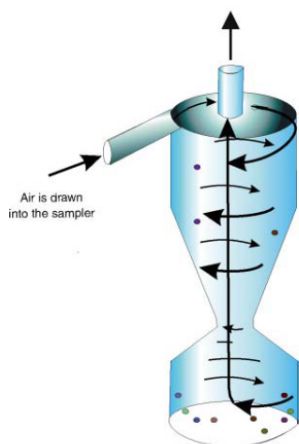


Biocassete lagingailua



2. Iragazketaren bidez
 - Iragazgailuak

Cyclone (fluxu tangenzialeko lagingailua)



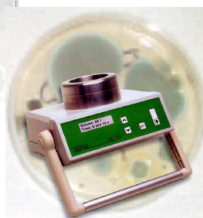
Reuter centrifugal Sampler (RCS)



Iragazkina Petri kutxa jartzeko lekua



Hutsune-ponpa



Tamainagatik banaketa
Iragazkiak: polibinilo-
kloruroa edo beira-zuntza

3. Grabitatea
 - Petri kutxa irekietan hauspeatzea (onddo-espora ez bakterianoak hazteko)

LAGIN BIOLOGIKOAK

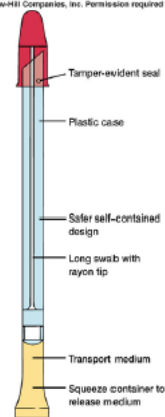
Lagin motaren arabera lagintzailea ezberdina izango da.

- Bizi-jariakinen hartzea (izerdia, odola)
- Ehunen disezioa, biopsia
- Eskrezio-produktuen hartzea (gernua, gorozkiak)
- Gainazaleko ehunen laginketa
- Frotisa edo garbiketa

FORMITEAK

- Bizigabeko gauzak (jostailuak, orratzak, kutxak, jantziak, sukaldeko lantresnak) zeinek izan daitezkeen izaki infekziotsuekin kutsaturik eta beraien transmisioan parte hartu.
- Rodac kutxak
- Agarrezko pelikulak (laminokultiboak)

Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. Permission required for reproduction or display.



GARRAIOA ETA BILTEGIRATZEA

- Garraioa azkarra izan beharko du, zenbat eta azkarrago egin, aldaketa gutxiago egongo dira lagindutako mikroorganismoetan.
- Hoztuta edo baldintza hotzetan garraiatuak izan behar dira. Ez ditugu parametroak aldatu behar. Garrantzitsua da lagina hartu bezain laster hoztea, mikroorganismoen hazkuntza eteteko.
- Berehalako prozedura izan behar du.
- Berehalako prozedura ezinezkoa baldin bada, biltegiratu beharko dira:
 - ✓ Hoztuta (4°C)
 - ✓ Prozedura hurrengo 4 ordutan
 - ✓ Finka daitezke zenbaketak egitekoak eta ez aktibitateak neurtzekoak baldin badir laginak (formaldehido aedo glutaraldehidoa)

PROZESAKETA

- Desberdina izango da segun zertarako. Askotan:
 1. Kontzentrazioa (Mikroorganismo gutxi daudenean; ura)
 - ✓ Iragazketa: Mililitro gehiago jar daitezke.
 - ✓ Zentrifugazioa: Bidu eta kontzentratzeko.
 - ✓ Absortzio-eluzioa: Birusen kasuan erabilzten da.

2. Diluzioa

Kontzentrazio ezberdinak erabiltzen dira segun zein den erabilitako mikroorganismoa.

- Lur laginen prozesaketa

Gainazala

- EZ da beharrezkoa esterilitatea
- Partikula handiak kendu 2 mm-ko iragazki baten bidez
- Biltegiratu egiten dira 4 °C-tan
 - ✓ Lehorketa ekidin
 - ✓ Anaerobiosia ekidin

Sakona

- Kutsadura saihesteko neurriak hartu
- Zilindroaren barrualdetik laginak hartu eta azaleko baztertu egiten da

- Izoztu laginak eta prozesatu egiten dira laborategian
- Ur-laginak

Ur-laginetan mikroorganismoen kontzentrazioa baxua da. Kontzentrazioa neurtzeko beraz zentrifugazioa eta iragazketa teknika bitartez aztertzen da.

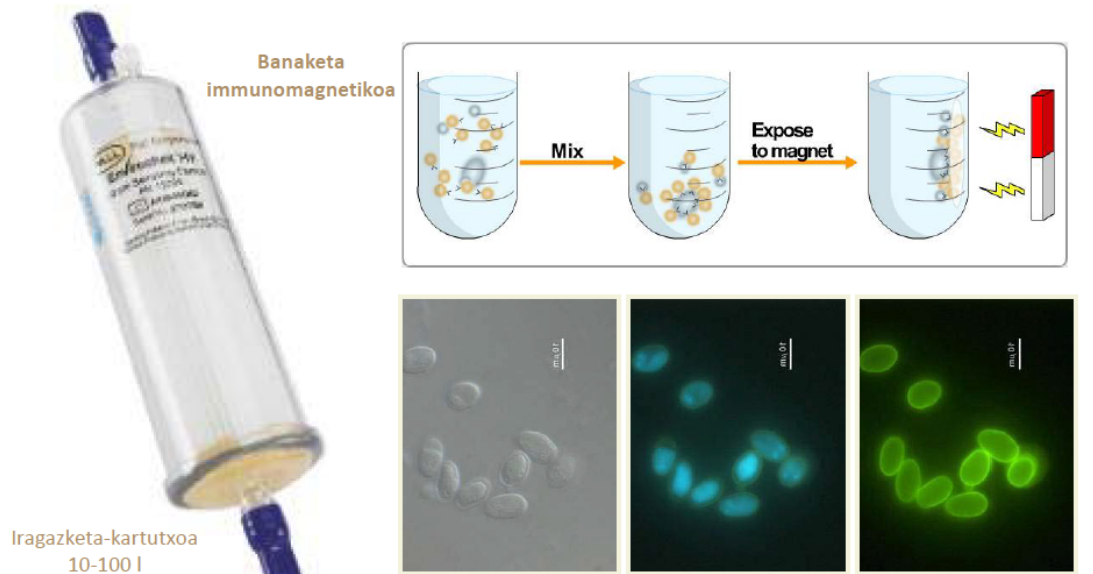
Kontzentratzeko estrategiak:

Bakterioak: Iragazketa bitartez tratatzen dira, 0,2-0,45 μm -ko iragazkia erabiliz.

Protozooak: Iragazketa zuntzeko kartutxoak erabiliz.

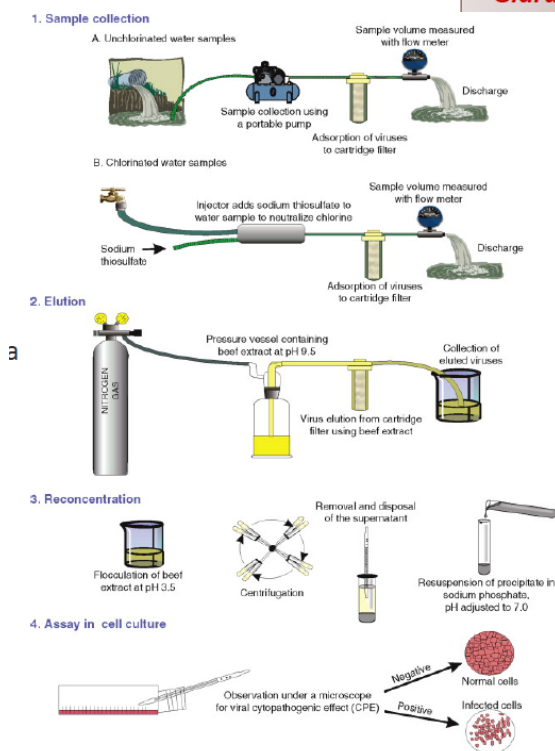
Birusak: VIRADEL (virus adsorption-elution)

Protozooak



Giardiaren kisteak

Detekzio immunologikoa



Birusak:

- Iragazketa
- ✓ Adsortzio iragazkinak-eluzioa
- ✓ Ultrairagazketa
- ✓ Alderantzizko osmosia
- Detekzioa
- ✓ Zelula-hazkuntza
- ✓ PCR

Ur-birusak kontzentratzeko prozedura (VIRADEL SISTEMA)



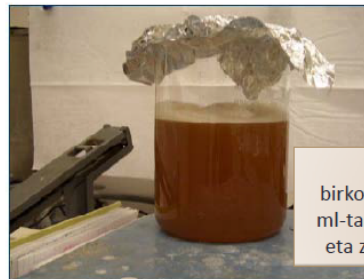
Elkarrekintza hidrofobiko eta elektrostatikoei esker adsortzioa



Iragazi 100-1000 l



Eluzioa (haragi-aterakinarekin 1.5% pH=9.5)



Eluitzailearen birkontzentrazioa 20-30 ml-tan flokulazio pH=3.5 eta zentrifugazio bidez

LAGINEN PROZESAKETA

Banaketa: Mikroorganismoak-partikulak

- Sonikazioa
- Substantzia tensoaktiboak

Frakzionamendua: Itsasoko mikroorganismoak aztertzeko teknika. Mikroorganismo bakoitzak zer egiten duen poro-tamaina ezberdineko iragazkiak erabilzten dira.

- Mikrobioen taldeen hautaketa iragazketaren bidez (oro-tamainu desberdinetako iragazkiak erabiliz)

3 μ m : Ziliatuak
0,8 μ m: Flagelatuak
0,45 μ m: Agregatuak
0,22 μ m: Bakterio askeak