

MIKROBIOLOGIA 1. LABORATEGI PRAKTIKA

AURKIBIDEA

1. Oinarrizko kontzeptuak
2. Laborategiko arauak
3. Hazkuntza media
4. Autoklabea
5. Mikrobiologiako laborategian jarraitu beharreko segurtasun-arauak
6. Mikroorganismoen ubikuotasuna
7. Mikroorganismoen ereintza
 - 7.1 Ereintza kultibo-medio likidoan
 - 7.2 Ereintza Petri kutxetan: agorpen- edo murrizketa-ereintza

1. OINARRIZKO KONTZEPTUAK

MIKROORGANISMOAK

- **Koloniak:** Medio solido batean hazi den mikroorganismo talde ikusgai eta isolatua, non, teoriarik, denak berdinak diren, mikroorganismo beretik sortu direlako. Onddo edo bakterioenak izan daitezke. Puntuak bezala ikusten dira, eta puntu bakoitza kolonia bat izango da.
- **Kultibo mixtoa:** Mikroorganismo edo kolonia mota desberdinak dituen kultiboa. Kolonia hauek ezaugarri eta morfologia desberdina dute (puntu mota desberdinak izango ditugu).
- **Kultibo purua:** Mikroorganismo mota bakarra dituen kultiboa. Kultibo mixto batetik kolonia bakarra aukeratuz kultibo purua lortu dezakegu.

KONTROLA

- **Esterilizazioa:** honen bitartez bizi forma GUZTIAK suntsitzen dira, forma erresistenteak (esporak, adibidez) barne. Beraz, ez da mikroorganismorik geratzen.
- **Desinfekzioa:** honen bitartez patogeno gehienak desagerrarazi edo murrizten dira. Beraz, mikroorganismoen karga jaisten dugu. Maila altuko desinfekzioa ia esterilizazioaren parekoa izan daiteke.
- **Asespsia:** infekzio bat sor dezakeen mikroorganismorik ez dagoela. Praktika hauen testuinguruan, mikroorganismoak laginera heltzea ekiditzen duten teknikak dira.

Esterilizazio zein desinfekzio prozesu hauek burutzeko, hainbat eragile daude. Eragile horiek fisikoak zein kimikoak izan daitezke. Esaterako:

- Eragile fisikoak:
 - Bero hezea (autoklabea, tindalizazioa)
 - Bero lehorra (flanbeatzea, erretzea, pasteur labea)
 - Filtrazioa
 - Izpi ultramoreak

- Erradiazio ionizatzailea
- Eragile kimikoak:
 - Alkohola...

Laborategian gehien erabiltzen dena **autoklabea** da. Hala ere, guk laborategian ereintza-euskarria erabili dugu, eta hori sugarran jarriz esterilizatu dugu (flanbeatzea). Beste era bat kabina erabiltzea izango litzateke, aire filtratuarekin.

2. LABORATEGIKO ARAUAK

- Lan egin behar da **mantala jantzita eta ondo lotuta**, gu eta gure arropak babesteko (kutsadura, koloratzaile eta substantzia kimikoetatik). Ez da irten behar laborategitik laborategiko mantalarekin (kafea hartzera, hitz egitera, klasera...).
- Lan-eremua beti egon behar da **ahal bezain garbi**, txukun eta huts (bai praktika hasterakoan, bai amaitutakoan). Lan-eremutik kanpo egon behar dira liburu, poltsa eta arropa guztiak. Laneremuan soilik egon daitezke lanerako beharrezko gauzak (koadernoak, protokoloak, materialak).
- **Debekatuta dago laborategian jatea** (txiklea murtzikatzea barne), edatea edo erretzea. Ekidin ahoratzea eskuak zein beste edozein objektu. Ez haginka egin boligrafoari, eta ez ukitu aurpegia, begiak eta abar. Laborategian gomendatzen da ile luzea bilduta eramatea, eta ahal den neurrian, betaurrekoak erabiltzea lentillak eraman beharrean.
- Ez hasi lanean azalpenak adi entzun eta **protokoloa ondo irakurri** arte. Galdetu irakasleari metodoa edo esperimentuaren helburua ulertzen ez duzunean. Zer egin eta nola egin behar den aurrez ezagutzeak istripuak gutxitzen ditu eta denbora hobeto erabiltzea ahalbidetzen du.
- Praktikan zehar:
 - Mikroorganismoak beti maneiatu behar dira sugarraren inguruko gune aseptikoan.
 - Kontuz metxeroekin, batez ere metxeroaren atzealdean dagoen zerbait hartu nahi denean. Beharrezkoa ez denean, metxeroa itzali istripuak ekiditeko.
 - Ekidin kutsadurak erraz ditzaketen aire korronteak. Ekidin behar da aerosolen sorrera edozein teknika egitean.
 - Era berean, ez hitz egin materiala manipulatzekoan, kutsatu ez dadin.
 - Egokiro errotulatu (izena, taldea, data...) erabilitako gauza guztiak materialaren erabilera ez-zuzena ekiditeko.
 - Mantendu saiodiak bertikalki euskarrietan, inoiz ez mahai gainean etzanda.
 - Idatzi laborategiko koadernoan egindakoaren ohar guztiak praktika egin ahala.
- **Eliminatu egoki hondakin guztiak** (laborategian dauden kartelak begiratu):
 - Bota kutsaturiko materiala biosegurtasun-kontainerretara, inoiz ez harraskara edo zakarrontzi arruntera.
 - Bota material ebakitzaila edo zorrotza (adibidez portak eta estalkiak) mahai gainean dauden biosegurtasun-kontainerretara.
 - Egin tindaketak horretarako prestatutako kubetetan, eta bota koloratzaileen

hondarrak dagozkion bidoietan (hondakin kimikoentzat) bota behar dira kontu handiz gainezka ez egiteko.

- Bota zakarrontzi beltzera paperak, pospoloak eta beste material ez-kutsagarriak, inoiz ere ez harraskara edo kontainer ez egokietara.
- **Egiaztatu gasa ondo amatatuta dagoela** saio bakoitza amaitzerakoan, batu eta txukundu lan-eremua, garbitu erabilitako mikroskopioaren lenteak eta estali mikroskopioa.
- Laborategitik atera baino lehen, bai aldi batez edo behin betiko, **garbitu eskuak** xaboi germizidaz.
- Edozein istripuren edo arazoren aurrean (ebaketak, erredurak, kultiboen isurketak...), jakinarazi berehala irakasleari beharrezko neurriak har daitezten.

3. HAZKUNTZA MEDIOA

Mikroorganismoek hazteko beharrezko elikagaiak eta gehigarriak dituen ingurunea.

Konposizio fisikoaren arabera:

- **Hazkuntza inguru solidoak**→ agar-agarra du.
- **Hazkuntza inguru likidoak**→ solidoaren konposaketa (hazkuntza ingurua) bera du baina agar-agarrik ez. Koloniak ezin dira ikusi likidoan.
- **Hazkuntza inguru semisolidoak**→ agar-agarren kopuruaren arabera, zenbat eta agar-agar gutxiago, likidoagoa izango da.

Konposizio kimikoaren arabera:

- **Hazkuntza inguru sintetikoak edo definituak**→ zehazki dakigu zerez osatuta dauden, osagaien zehastasuna oso handia da.
- **Hazkuntza inguru konplexuak**→ ez dakigu zehazki zerez osatuta dauden (askotan erositakoak dira, eta osagaiak ez daude hain zehaztuta).

Honen arabera definituko da hazkuntza-medioaren kolorea. Praktikan erabilitako Petri plaken hazkuntza-medioei dagokienez, adibidez, gorri koloredunak bere konposizioan odola duelako du kolore hori.

Funtzioaren arabera: identifikazioa egiteko baliagarria

- **Elikagarriak/orokorrak**→ mikroorganismo asko hazteko baliagarriak.
- **Hautakorrak**→ mikroorganismo mota batzuen hazkuntza inhibitzeko baliagarria, guk nahi dugunak hazteko. Adb. antibiotikoa.
- **Bereizgarriak**→ mikroorganismoen ezaugarri bereziak ikusteko baliagarria.
- **Aberasgarriak**→ gehigarriak eta halakoak dituztenak. Adb. plaka gorria, odola du.

**Kontuan hartu hazkuntza medio bat aldi berean 2 motakoa izan daitekeela. Adibidez, hautakorra eta bereizgarria.*

4. AUTOKLABEA

Esan bezala, mikrobiologiako laborategian *esterilizatorako* gehien erabiltzen den teknika da. Horma sendoak eta itxiera hermetikoa ditu, eta presio zein temperatura handiko ur-lurruna erabiltzen duena (121°C eta 15-20 minutuko zikloak izaten dira). Oso eraginkorra da, baina presio eta temperatura altuengatik hainbat material ezin dira bertan sartu.

Autoklabeko prozesua kontrolatua da eta bertan adierazle kimiko zein biologikoak sartzen dira. Esan dugun bezala esterilizazioan forma bizi guztiak hiltzen dira. Adierazle biologikoak esporak dituzten dial batzuk izaten dira, eta behin autoklabearen prozesu amaitzean irakiten dira. Momentu horretan berriro hazten badira, esan nahi du prozesua ez dela ondo joan, ez direlako forma bizi guztiak hil. Adierazle kimikoein egiten dena tindaketa desberdinak sartzea da eta ematen diren aldaketekin beste gauza batzuen artean, temperatura aldaketak kontrolatzea da.

Kultiboak guztiz esterilizatu diren ala ez kontrolatzeko, begi-bistaz ezin denez ikusi, sarritan pegatina berezi batzuk erabiltzen dira, indikatzaileak, zeintzuk kolorez aldatzen diren behin esterilizazio-prozesua bukatzen denean, temperaturaren igoeraren ondorioz.

5. MIKROORGANISMOEN UBIKUOTASUNA (1. esperimentua)

Sarritan, mikroorganismoak leku “zikinetatik” eratorritako organismo patogenotzat dauzkagu, baina hori ez da batere zuzena. Mikroorganismoak habitat askotan eta oso desberdinetan bizi dira, ura, lurra eta airea barne. Beraien ubikuotasuna hain anitza izanik, goi-mailako bizidunentzako egokiak diren inguruneetan bizitzeko ahalmena izateaz gain, habitat gogorrenak ere (egoera fisiko edota kimikoei dagokienez) bizitzeko egokiak izan daitezke zenbait mikroorganismorentzat.

Bestalde, mikroorganismoak, goi-mailako organismoak bizi diren ingurumenetan bizitzeaz gain, organismo horien azalean eta barnealdean ere bizi daitezke. Horrelako habitat organikoetan, mikroorganismo-populazioak oso garrantzitsuak izan daitezke eta goi-mailako organismoen eta mikroorganismoen arteko harremana mesedegarria zein kaltegarria izan daiteke lehenengoentzat. Izan ere, mikroorganismoek elikagaiak erabiltzeko duten ahalmenari esker, edozein motatako azalerak (organikoak zein ez-organikoak) mikroorganismoen bizilekuak izan daitezke. Praktika honekin egiaztatuko dugu mikroorganismoak daudela gure ingurumenean zein gure gorputzari lotuta.

Egin beharreko urratsak, bikote bakoitzeko Petri kutxa bat erabiliz:

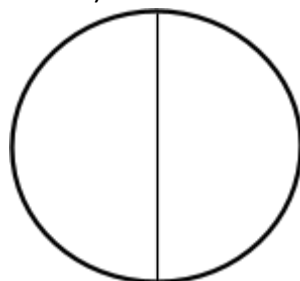
1. Bereizi lau zatitan agar elikagarridun Petri kutxa bat, markatu kanpotik (agar-agarraren aldetik) errotuladore baten bidez irudian adierazten den bezala. Ikasle bakoitzak, agarreko zati batean, jarri beharko du agarraren gainean atzamar bat eta beste zatian berriro jarriko du atzamarra baina, oraingo honetan, eskuak garbitu* ondoren (agarreko bi zati bikoteko kide bakoitzeko).

**Eskuak garbitzeko teknika anotatu behar da (ura eta xaboia + lehortu, ura eta xaboia, gel hidroalkoholikoa...)*

KONTUZ! Gel-a hauskorra da, hatza kontuz jarri. Era berean, bi kasuetan hatza era berean jarri behar da



2. Bigarren agar elikagarridun Petri kutxa bat bi zatitan bereizi, markatu kanpotik errotuladore baten bidez. Ikasle bakoitzak *torunda* esteril batekin aztertu nahi duen azaleraren lagin bat hartuko du. Plakaren zatian aztertu beharreko gainazaletik igaro den *torundarekin* ereintza egingo du (zati bat bikoteko kide bakoitzeko).



3. Itxi kutxak eta sartu berogailura inkubatzeko (24-48 orduz 37 °C-tan).

*Praktikan euskarri batean sartu dugu, irakasleak gero berogailura eramateko. Euskarrian tapa beheara jarri behar dira, **agar-agarra** duen atala **goian** (itxita noski). Zergatik? Kondentsazioa dela-eta, sortzen diren ur-tantak kultiboan erortzea ekiditeko. Bestela, mikroorganismoak aplikatutako lekuetatik hedatu daitezke.*

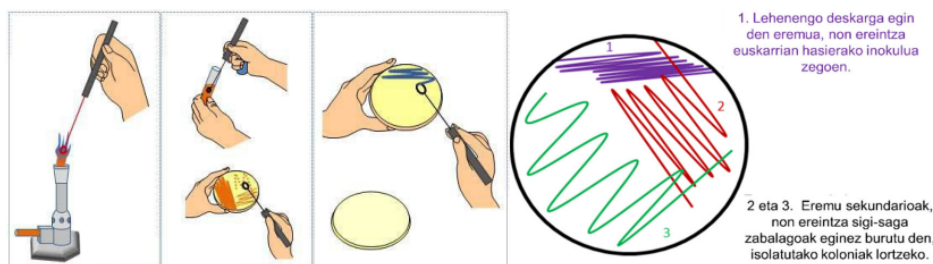
6. MIKROORGANISMOEN EREINTZA (2. esperimntua)

Gehienetan, mikroorganismoak ikertzeko laborategian, beharrezkoa da mikroorganismoak haztea kultibo-medio egokietan. Horretarako, ikertu nahi dugun mikroorganismoa ikerketaren helbururako egokia den medioan inokulatu behar dugu. Ereintza aproposa eta kutsadura ekiditeko, inokulazioan zehar teknika aseptikoa erabili behar da. Medioak esterilak egon behar dira, eta inokulazio-prozesua metxeroaren sugarraren ondoan egin behar da. Mikroorganismoen transferentzia modu desberdinetan egin daiteke ereintzaren helburuaren edota inokuluaren iturriaren arabera. Inokulua medio solidotik hartzen denean gehienetan ereintza-euskarriaz* edo torunda* batez egiten da eta medio likidotik hartzen denean, ereintza ere pipeta batez egin daiteke, eta horrek inokuluaren kuantifikazio zehatza ahalbidetzen du.

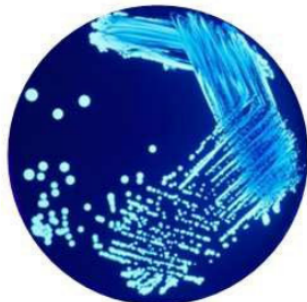
6.2 Ereintza Petri kutxetan: agorpen- edo murrizketa-ereintza

Erabiltzen da kultibo puruak edo kolonia isolatuak lortzeko, eta kolonia horien ezaugarriak ikertzeko.

1. Jarri izenak ereintzarako erabiliko ditugun Petri kutxetan, eta utzi metxeroaren ondoan mahai gainean "buruz behera" (kutxaren tapakia oinarrian egon behar da eta agarra goiko aldean). Egin ereintza zein kultiboekin manipulazio guztiak sugarraren inguruko gune aseptikoan; jarri materiala lana erraztuko duen sugarrarekiko distantzia egokian.
2. Esterilizatu ereintza-euskarria (3.1. ataleko 2. urratsa) inokulua Petri kutxa batetik hartzen bada; hartu eskuarekin, eta beti sugarraren ondoan, plakaren oinarri agarduna, eman buelta eta hartu kolonia bat edo kultibotik kopuru txiki bat; bueltatu plaka hasierako posiziora.
3. Ireki medio esterila duen plaka berri bat aurreko urratsean deskribatu den bezala.
4. Deskargatu inokulua plakaren agarraren goiko aldean sigi-saga estua eginez (2. irudia).
5. Itxi plaka, esterilizatu ereintza-euskarria sugarrean eta itxaron sugarraren ondoan hoztu arte.
6. Ireki plaka berriro eskuarekin, eta hoztu ereintza-euskarria erein gabeko agarraren gainean. Egin sigi-saga berri bat, hasierakoarekiko perpendikularra, lehenengo sigi-sagarekin azkeneko marrak bakarrik ukitzen dituen. Bigarren sigi-saga horrekin gelditzen den agar esterilaren azaleraren erdia bete behar da.
7. Itxi plaka, esterilizatu ereintza-euskarria berriz, eta utzi hozten sugarraren ondoan.
8. Egin hirugarren sigi-saga, bigarrenarekiko perpendikularra, eta gelditzen den agar esterila okupatzen duena. Azken sigi-saga hori egiteko bigarrenaren bakarrik azkeneko marrak ukitu behar dira.
9. Inkubatu plakak dagozkien baldintzatan (adibidez 24-48 orduz 37 °C-tan) eta buruz behera, kondentsazio-urak ereindutako agarraren azalera jausi ez dadin.
10. Inkubazio denbora pasa ondoren, ereintzaren emaitza eta kolonia isolatuen morfologia behatu (3. irudia).



2. irudia. Petri kutxan agorpen-ereintza



3. Irudia. Agorpen-ereintza egin ondorengo hazkuntza Petri kutxan