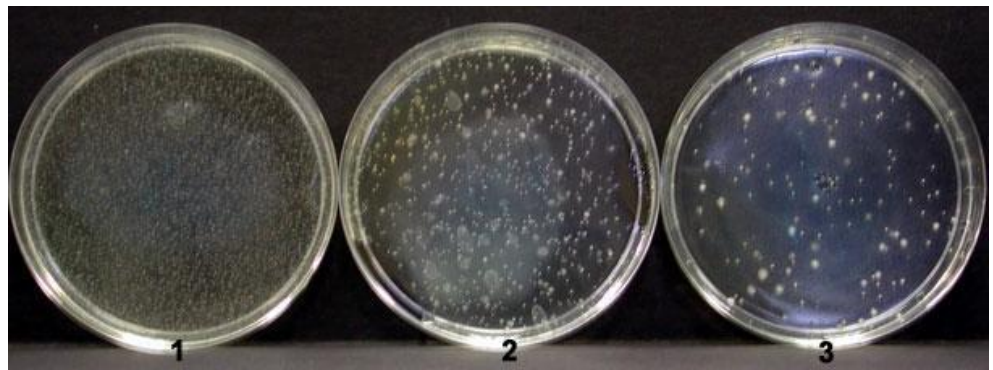


NOLA EBATZI MIKROBIOLOGIAREN GAINEKO ALDERDI PRAKTIKOAK

1. DILUZIO ETA KONTZENTRAZIOAK. LAGIN LIKIDO ETA SOLIDOAK



Inés Arana, Maite Orruño eta Isabel Barcina

Immunologia, Mikrobiologia eta Parasitologia Saila

Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea

1. DILUZIOAK ETA KONTZENTRAZIOAK. LAGIN LIKIDO ETA SOLIDOAK

Ingurumen gehienetan, mikrobio-dentsitatea altuegia edo baxuegia izan ohi da lortzeko laginak zuzenean ereinez mikroorganismoen zenbaketa onak. Egoera hauetan edozein azterketa egin baino lehen beharrezkoa da lagina diluitzea edo kontzentratzea. Gainera, lagin solidoak diluitu egin behar dira bere erabilera errazteko, horrela lagin likidoak izango balira bezala lan egin dezakegu.

Kasu gehienetan diluzio hamartarrekin lan egiten da. Kasu errazena laginaren 1:10 diluzioaren 10 ml prestatzea da. Horretarako, laginaren ml bat hartu eta 9 ml diluitzaile esteril duen saio-hodi batean isuri behar da. Ekuazio baten bidez adierazita:

$$1:10 \text{ diluzioa} = \frac{\text{laginaren ml bat}}{\text{Bolumen osoa (laginaren ml bat + 9 ml diluitzaile)}} = 1:10 \text{ diluzioaren } 10 \text{ ml } (10^{-1})$$

Laginak behin baino gehiagotan diluitu daitezke. 1:10 diluziotik abiatuta, 1:100 diluzioa erraz presta daiteke, hurrengo ekuazioa jarraituz:

$$1:100 \text{ diluzioa} = \frac{10^{-1} \text{ diluzioaren ml bat}}{10^{-1} \text{ diluzioaren ml bat} + 9 \text{ ml diluitzaile}} = 1:100 \text{ diluzioaren } 10 \text{ ml } (10^{-2})$$

Edo zuzenean,

$$1:100 \text{ diluzioa} = \frac{\text{laginaren ml bat}}{\text{laginaren ml bat} + 99 \text{ ml diluitzaile}} = 1:100 \text{ diluzioaren } 100 \text{ ml } (10^{-2})$$

$$1:100 \text{ diluzioa} = \frac{0,1 \text{ ml lagin}}{0,1 \text{ ml lagin} + 9,9 \text{ ml diluitzaile}} = 1:100 \text{ diluzioaren } 10 \text{ ml } (10^{-2})$$

Oinarrizko ezagutza hauekin, erantzun hurrengo galderei:

1.1. Ur-lagin batetik hasita, nola prestatuko zenuke 1:10 diluzioaren 250 ml?

1.2. Zer egingo zenuke 10^{-5} diluzioaren 10 ml prestatzeko 3 urratsetan?

1.3. Ur-lagin baten 10^{-6} diluzioa behar da, baina 3 saio-hodi esteril hutsik eta 30 ml diluitzaile esteril baino ez daukagu eskura, nola prestatuko zenuke diluzio hori? Eta 6 eppendorf (mililitro batekoak) eta 10 ml diluitzaile bagenitu?

1.4. Ur-lagin baten 10^{-1} diluzioaren 150 ml behar dira. Egin eskema bat jarraitu behar diren urratsekin: bolumenak, ... Eta 10^{-3} diluzioaren 150 ml prestatzeko?

1.5. Ur-lagin batetik abiatuta, nola prestatuko zenituzke 1:10, 1:5, 1:4 eta 1:2 diluzioak?

Lagina solidoen kasuan, laginaren mililitroen ordez gramoak erabiltzen dira:

$$1:10 \text{ diluzioa} = \frac{\text{laginaren gramo bat}}{\text{laginaren gramo bat} + 9 \text{ ml diluitzaile}} \iff 1:10 \text{ diluzioaren } 10 \text{ ml } (10^{-1})$$

1.6. Elikagaiaren 1,5 g pisatzen dira, 13,5 ml Ringer soluzio (diluitzailea) gehitzen dira eta homogeneizatu egiten da. Zein da lortutako diluzioa?

1.7. Jogurt baten mikrobio-dentsitatea kalkulatzeko 10^{-2} diluzioa behar da. Azaldu jarraitu behar diren urratsak diluzio hori prestatzeko.

1.8. Ur-lagin batetik abiatuta, nola prestatuko zenuke 1:10 diluzioaren 500 ml? Eta lagina solidoa izango balitz (adibidez, lur-lagina), nola egingo zenuke?

Batzuetan mikroorganismo-dentsitatea oso baxua da, kasu hauetan lagina kontzentratu egin behar da, iragazpen edo zentrifugazioaren bidez. Lortutako iragazkiak edo *pelletak* diluitzailearen bolumen jakin batean esekitzen dira eta informazio honekin kontzentrazio-faktorea zehaztu behar da. Adibidez:

$$\text{kontzentrazio-faktorea} = \frac{\text{iragazitako laginaren } 10 \text{ ml}}{\text{diluitzailearen mililitro bat}} \iff \text{X10 kontzentratutako mililitro bat}$$

1.9. Ur-lagin baten 100 ml iragazi dira eta iragazkian geratu diren zelulak gatz-soluzioaren 10 ml-tan eseki dira gogor astinduz. Zein izango da kontzentrazio-faktorea kasu honetan?

1.10. Bakterioen esekidura baten 100 ml zentrifugatu dira (5.000 rpm), gainjalkina bota eta gero, 2,5 ml diluitzaile gehitu dira *pelleta* esekitzeko. Zein da kontzentrazio-faktorea?

Lagin baten mikrobio-dentsitatea zehazteko ezinbestekoa da diluzio eta kontzentrazio-faktoreak zuzen erabiltzen jakitea. Hemen daude unitate kolonia-eratzaileren (UKE) zenbaketan oinarrituta dauden problema batzuk.

$$\text{UKE/ml} = \frac{\text{zenbatutako koloniak}}{\text{ereindako mililitroak}} \times \text{Diluzio-faktorea}$$

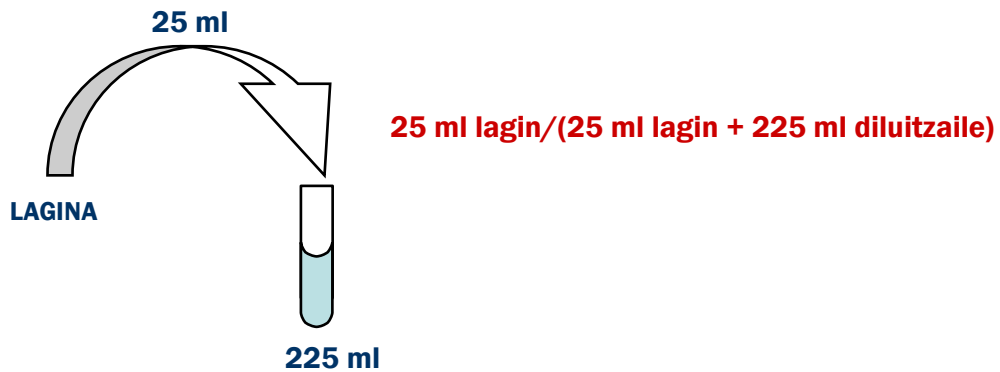
$$\text{UKE/ml} = \frac{\text{zenbatutako koloniak}}{\text{ereindako mililitroak}} \times \frac{1}{\text{Kontzentrazio-faktorea}}$$

- 1.11. Lagin ezberdinetik abiatuta, 1:10, 1:5, 1:4 eta 1:2 diluzioak prestatu dira (diluzio bat lagineko). Gero diluzio bakoitzaren 0,1 ml erein dira hazkuntza-medioa duen Petri kutxa batean. Inkubatu ondoren, 27 kolonia zenbatu dira plakako. Zeintzuk dira lagin bakoitzeko mikrobio-dentsitateak?
- 1.12. Ur-lagin batetik hasita, 10^{-3} diluzioa prestatzen da. 8 ml diluitzaile duen saio-hodi batean diluzioaren 2 ml gehitzen dira eta, nahastu ondoren, 0,5 ml ereiten dira agar elikagarria duen Petri kutxa batean. Inkubatu eta gero 50 kolonia zenbatzen badira, zein da laginaren mikrobio-dentsitatea?
- 1.13. Ur-lagin batetik hasita, 4 ml diluitzaile duen saio-hodi batean 4 ml gehitzen dira. 0,5 ml ereiten dira agar elikagarria duen Petri kutxa batean. Inkubatu eta gero 82 kolonia zenbatzen badira, zein da laginaren mikrobio-dentsitatea?
- 1.14. Elikagai solido baten lagina hartzen da eta hurrengo prozedura jarraitzen da:
- 15 g elikagai pisatu, 135 ml Ringer soluzio gehitu eta ondo nahastu.
 - Pipeta batekin 2 ml hartu eta 18 ml diluitzaile duen ontzi batean bota. Ondo nahastu.
 - Esekidura honen 0,2 ml erein agar elikagarria duen Petri kutxa batean. Inkubatu.
 - Zenbatu koloniak: 100 kolonia
- Aurreko informazioa kontuan hartuta, zein izango da mikroorganismoen dentsitatea UKE/g-tan adierazia?
- 1.15. Nola prestatuko zenuke 1:5 diluzioa sedimentu-lagin batetik abiatuta? Eta 1:8 diluzioa? Plaka batean 0,5 ml erein eta gero, 120 kolonia hazten badira, zein izango da mikrobio-dentsitatea UKE/100 g-tan adierazia?

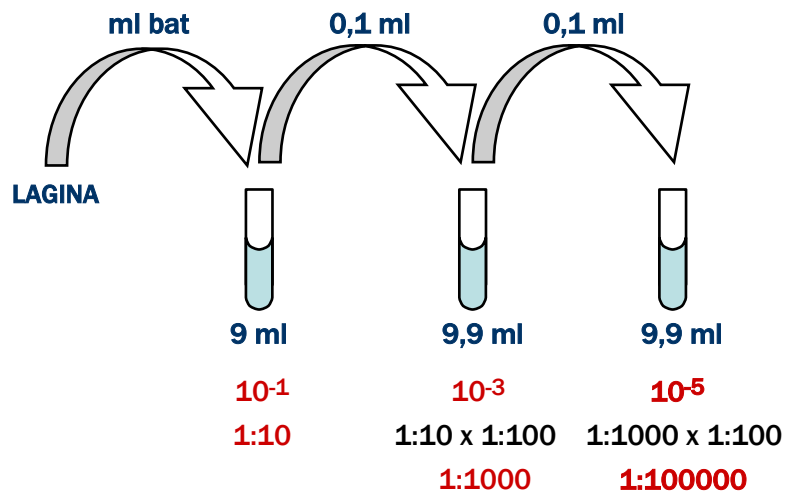
- 1.16. 20 g sedimentu 40 ml gatz-soluzioan esekitzen dira. Gogor astindu eta gero, sonikatu egiten da bakterioak sedimentutik bereizteko. Lortutako esekiduraren 10 ml zentrifugatu egiten dira abiadura baxuan ($>3 \mu\text{m}$ -ko partikulak sedimentatzeko), gainjalkina batu ondoren 1000 aldiz diluitzen da eta diluzioaren 0,2 ml sakoneran ereiten dira agar elikagarrian. Inkubatu eta gero, 126 kolonia zenbatzen dira, zein da bakterioen zenbakia UKE/g-tan adierazia?
- 1.17. Ur-lagin baten 50 ml iragazten dira eta iragazkia 10 ml gatz-soluzioan esekitzen da. Gogor astindu eta gero, esekiduraren 0,1 ml ereiten dira agar elikagarria duen plaka batean. Inkubatu ondoren, 50 kolonia zenbatzen dira. Zein da laginaren mikrobio-dentsitatea?
- 1.18. Ur-lagin baten 50 ml iragazten dira. Iragazkia 15 ml gatz-soluzioan esekitzen da eta gogor astintzen da. Esekidura honen 1:10 diluzioa prestatzen da eta diluzio honetatik abiatuta 1:2 diluzioa egiten da. Azkeneko diluzioaren 0,2 ml ereiten dira agar elikagarria duen plaka batean. Inkubatu ondoren, 35 kolonia zenbatzen dira. Zein da laginaren mikrobio-dentsitatea?
- 1.19. Bilboko itsasadarraren kalitate mikrobiologikoa baloratzeko azterketa bat egingo da, bakterio heterotrofo aerobikoak (BHA) zenbatuz. Horretarako, diluzio hamartarrak prestatuko dira eta diluzioen 100 μl ereingo dira agar elikagarrian. Bibliografia kontsultatuz, BHAREN dentsitatea $5 \cdot 10^7 - 7 \cdot 10^8$ bakterio/ml dela dakigu. Informazio hau kontuan hartuta, zeintzuk izango lirateke erin behar ditugun diluzioak?
- 1.20. Bilboko itsasadarreko sedimentuetan dauden bakterio sulfato-erreduzitzaileen azterketa bat egingo da. Horretarako, sedimentutik 2 g-ko alikuota bat hartuko da eta diluitzailearen 10 ml gehituko dira ondo nahastuz. Gero, lortutako esekiduraren diluzio hamartarrak egingo dira eta diluzio bakoitzeko 100 μl ereingo dira hazkuntza-medio egokia duen plaketan. Bibliografia begiratu eta gero, antzeko inguruetan bakterio sulfato-erreduzitzaileen batezbesteko dentsitatea $5 \cdot 10^4$ bakterio/ml dela dakigu. Informazio hau kontuan hartuta, zeintzuk izango lirateke erin behar ditugun diluzioak?

PROBLEMAK EBAZTEKO PROPOSAMENAK

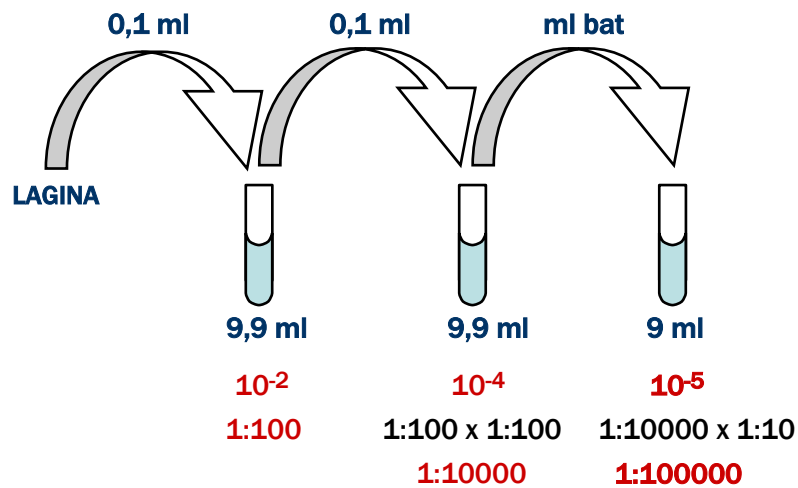
1.1. 10^{-1} diluzioaren 250 ml



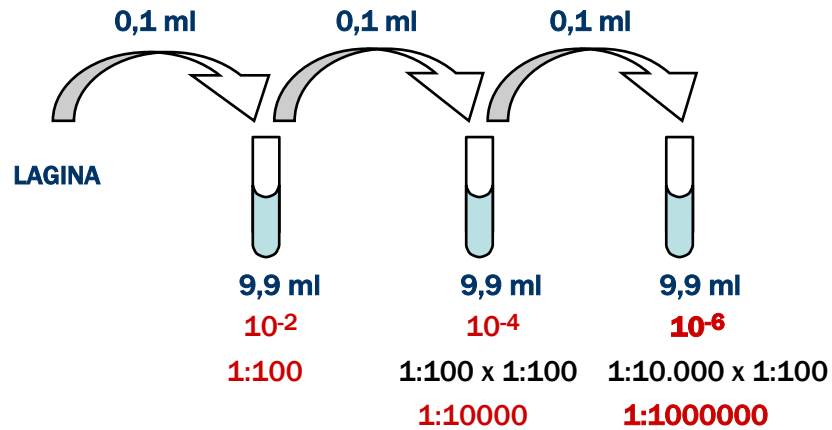
1.2. 10^{-5} diluzioaren 10 ml, 3 urratsetan



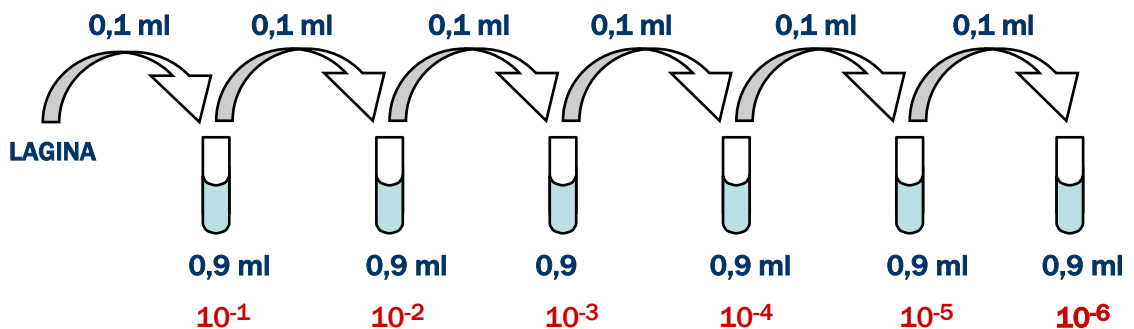
Badaude beste aukera batzuk, adibidez:



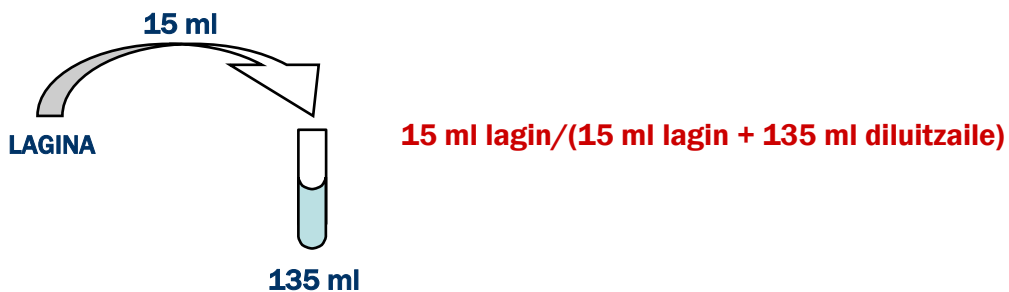
1.3. 10^{-6} diluzioa. 30 ml diluitzaile eta 3 saio-hodi hutsik eta esteril baino ez daukagu



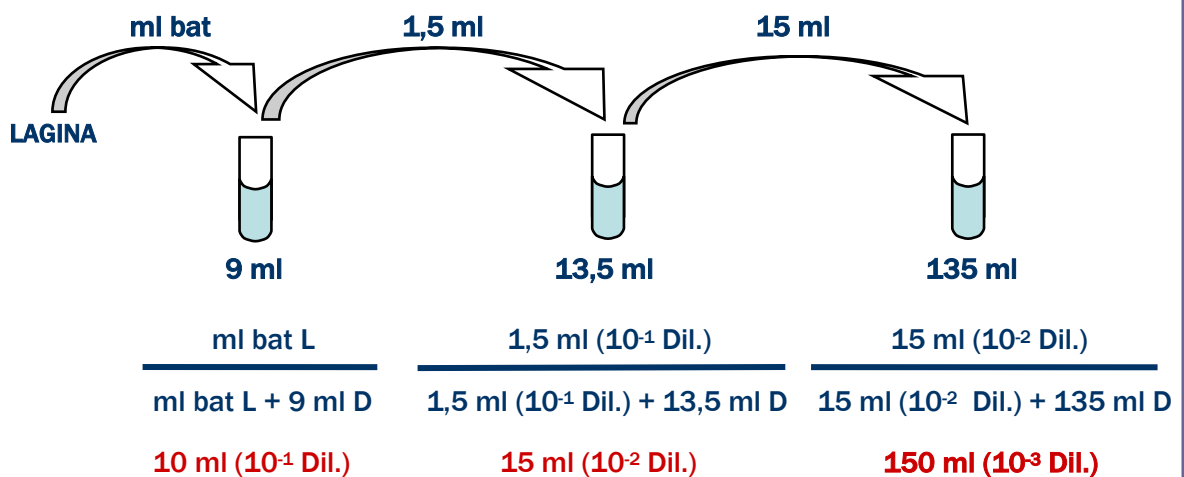
10^{-6} diluzioa. 6 eppendorf hodi (mililitro batekoak) eta 10 ml gatz-soluzio dauzkagu



1.4. 10^{-1} diluzioaren 150 ml



10^{-3} diluzioaren 150 ml



1.5. Nola prestatu hurrengo diluzioak? 1:10, 1:5, 1:4, 1:2

$$1:10 = \text{ml bat lagin}/(\text{ml bat lagin} + 9 \text{ ml diluitzaile})$$

$$1:5 = \text{ml bat lagin}/(\text{ml bat lagin} + 4 \text{ ml diluitzaile})$$

$$1:4 = \text{ml bat lagin}/(\text{ml bat lagin} + 3 \text{ ml diluitzaile})$$

$$1:2 = \text{ml bat lagin}/(\text{ml bat lagin} + \text{ml bat diluitzaile})$$

1.6. 1,5 g elikagai + 13,5 ml diluitzaile. Diluzioa?

$$1,5 \text{ g lagin}/(1,5 \text{ g lagin} + 13,5 \text{ ml diluitzaile}) = 1,5/15 = 1:10$$

1.7. 10^{-2} diluzioa? Jogurt = solidoa

$$1:10 = \text{gramo bat jogurt}/(\text{gramo bat jogurt} + 9 \text{ ml diluitzaile})$$

$$1:100 = 10^{-1} \text{ diluzioaren ml bat}/10^{-1} \text{ diluzioaren ml bat} + 9 \text{ ml diluitzaile})$$

Badaude beste aukera batzuk, adibidez:

$$1:100 = \text{gramo bat jogurt}/(\text{gramo bat jogurt} + 99 \text{ ml diluitzaile})$$

1.8. 10^{-1} diluzioaren 500 ml? Lagin likidoa

$$1:10 = 50 \text{ ml lagin}/(50 \text{ ml lagin} + 450 \text{ ml diluitzaile})$$

10^{-1} diluzioaren 500 ml? Lagin solidoa

$$1:10 = 50 \text{ g lagin}/(50 \text{ g lagin} + 450 \text{ ml diluitzaile})$$

1.9. iragazitako 100 ml, diluitzailearen 10 ml-tan esekiak. Kontzentrazio-faktorea?

$$100 \text{ ml lagin}/10 \text{ ml diluitzaile} = 10$$

1.10. zentrifugatutako 100 ml, diluitzailearen 2,5 ml-tan esekiak. Kontzentrazio-faktorea?

$$100 \text{ ml lagin}/2,5 \text{ ml diluitzaile} = 40$$

1.11. 1:10, 1:5, 1:4 eta 1:2 diluzioak, 1 plaka/diluzio, 0,1 ml /plaka, 27 kolonia/plaka. UKE/ml?

$$1:10 \text{ diluzioa: } \frac{27 \text{ kolonia} \times 10^1}{\text{inokulatutako } 0,1 \text{ ml}} = 2,7 \cdot 10^3 \text{ UKE/ml}$$

$$1:5 \text{ diluzioa: } \frac{27 \text{ kolonia} \times 5}{\text{inokulatutako } 0,1 \text{ ml}} = 1,35 \cdot 10^3 \text{ UKE/ml}$$

$$1:4 \text{ diluzioa: } \frac{27 \text{ kolonia} \times 4}{\text{inokulatutako } 0,1 \text{ ml}} = 1,08 \cdot 10^3 \text{ UKE/ml}$$

$$1:2 \text{ diluzioa: } \frac{27 \text{ kolonia} \times 2}{\text{inokulatutako } 0,1 \text{ ml}} = 5,4 \cdot 10^2 \text{ UKE/ml}$$

1.12. Diluzioa = 10^{-3}

2 ml lagin + 8 ml diluitzaile = 2:10 diluzioa = 1:5

Inokulatutako bolumena = 0,5 ml; Kolonia/plaka = 50. Mikroorganismo/ml lagin?

$$\frac{50 \text{ kolonia} \times 10^3 \times 5}{\text{inokulatutako } 0,5 \text{ ml}} = 5 \cdot 10^5 \text{ UKE/ml}$$

1.13. 4 ml lagin + 4 ml diluitzaile = 4:8 diluzioa = 1:2

Inokulatutako bolumena = 0,5 ml; Kolonia/plaka = 82. Mikroorganismo/ml lagin?

$$\frac{82 \text{ kolonia} \times 2}{\text{inokulatutako } 0,5 \text{ ml}} = 328 \text{ UKE/ml}$$

1.14. 15 g lagin solido + 135 ml diluitzaile = 15/150 diluzioa = 1:10

1:10 diluzioaren 2 ml + 18 ml diluitzaile = 2/20 diluzioa = 1:10

Inokulatutako bolumena = 0,2 ml; kolonia/plaka = 100. Mikroorganismo/g elikagai?

$$\frac{100 \text{ kolonia} \times 10 \times 10}{\text{inokulatutako } 0,2 \text{ ml}} = 5 \cdot 10^4 \text{ UKE/g}$$

1.15. Sedimentu-laginaren 1:5 diluzioa?

1:5 diluzioa = gramo bat sedimentu/(gramo bat sedimentu + 4 ml diluitzaile)

Sedimentu-laginaren 1:8 diluzioa?

1:8 diluzioa = gramo bat sedimentu/(gramo bat sedimentu + 7 ml diluitzaile)

1:5 diluzioa; 0,5 ml inokulatuak/plaka; 120 kolonia/plaka. UKE/g lagin?

$$\frac{120 \text{ kolonia} \times 5}{\text{inokulatutako } 0,5 \text{ ml}} = 1,2 \cdot 10^3 \text{ UKE/g}$$

1:8 diluzioa; 0,5 ml inokulatuak/plaka; 120 kolonia/plaka. UKE/g lagin?

$$\frac{120 \text{ kolonia} \times 8}{\text{inokulatutako } 0,5 \text{ ml}} = 1,92 \cdot 10^3 \text{ UKE/g}$$

1.16. 20 g sedimentu + 40 ml gatz-soluzio = 20/60 = 1:3 diluzioa

10 ml zentrifugatu. Gainjalkina batu (10 ml). Diluitu 1000 aldiz.

Erein 0,2 ml/plaka. 126 kolonia/plaka. Mikroorganismo/g sedimentu?

$$\frac{126 \text{ kolonia} \times 3 \times 10^3}{\text{inokulatutako } 0,2 \text{ ml}} = 1,89 \cdot 10^6 \text{ UKE/g}$$

1.17. Iragazi 50 ml. Eseki 10 ml-tan. 50/10. Kontzentrazio-faktorea = 5

0,1 ml/plaka; 50 kolonia/plaka. Mikroorganismo/ml?

$$\frac{50 \text{ kolonia}}{\text{inokulatutako } 0,1 \text{ ml} \times 5} = 100 \text{ UKE/ml}$$

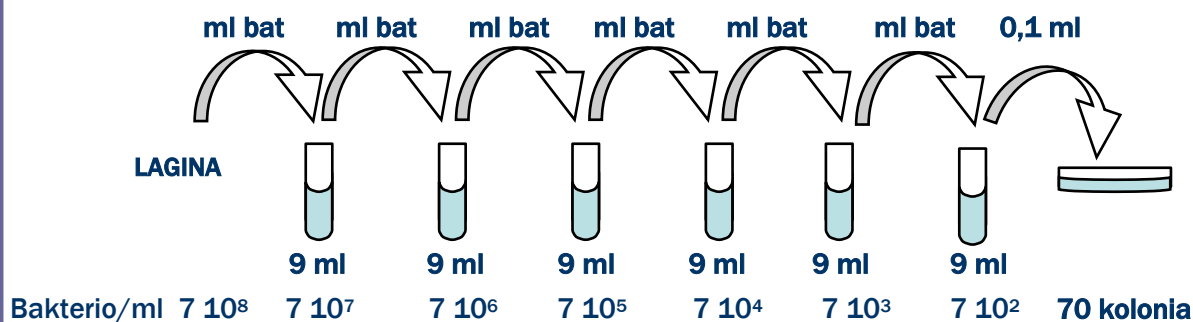
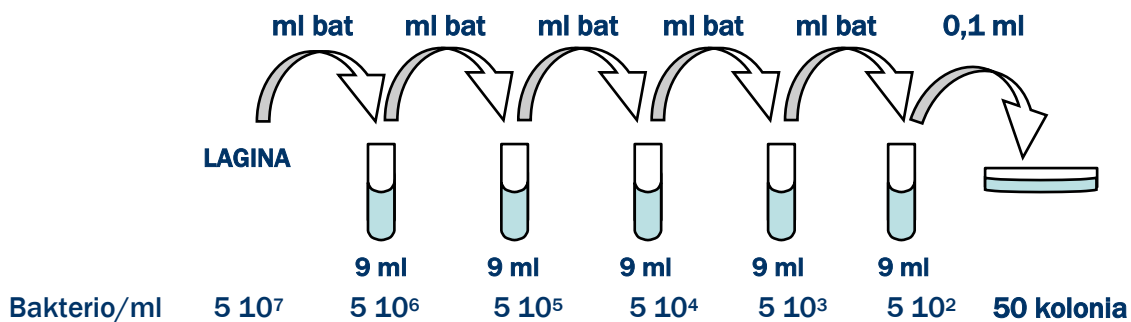
1.18. Iragazi 50 ml. Eseki 15 ml-tan. 50/15. Kontzentrazio-faktorea = 3,33

Prestatu 1 :10 eta 1 :2 diluzioak

0,2 ml/plaka; 35 kolonia/plaka. Mikroorganismo/ml?

$$\frac{35 \text{ kolonia} \times 10 \times 2}{\text{inokulatutako } 0,2 \text{ ml} \times 3,33} = 1,05 \cdot 10^3 \text{ UKE/ml}$$

1.19. $5 \cdot 10^7$ bakterio/ml < Bilboko itsasadarren bakterio heterotrofo aerobikoak (BHA) < $7 \cdot 10^8$ bakterio/ml
Dentsitatea kalkulatzeko, 30-300 kolonia dituzten plakak aukeratu direla kontuan hartuta, hurrengo diluzioak erein behar ditugu:



Aukeratutako diluzioak: 10^{-5} eta 10^{-6}

1.20. $5 \cdot 10^4$ bakterio/ml = Bilboko itsasadarreko sedimentuetan dauden bakterio sulfato-erreduziotzaileak
 Dentsitatea kalkulatzeko, 30-300 kolonia dituzten plakak aukeratu direla kontuan hartuta, hurrengo
 diluzioak erein behar ditugu:

