

TARTU JAAN POSKA GÜMNAASIUM

HELEN ÕUNAPUU

11.E KLASS

BAKTERITE ARVUKUS TARTU JAAN POSKA GÜMNAASIUMI ÕPILASTE JA ÕPETEJATE KÄTEL NING KONTAKTPINDADEL

JUHENDAJAD LAURI MÄLLO JA DR EVE (VEDLER) NAANURI

SISSEJUHATUS

Iga päev puudutavad inimesed erinevaid pindu ja esemeid, mille tulemusena kandub kontaktpindadelt inimese nahale palju erinevaid mikroobe. Antud uurimistöö eesmärk oli katsete käigus kindlaks teha, kui suur oli bakterite ülekannet kontaktpinnalt (WC ukselingid) inimese nahale, ja kui suure osa bakteritest, mis olid sattunud ukselingile, hävitab selle desinfitseerimine. Samuti uuriti inimeste käte väljakuulutatud bakterite resistentsust kuue laialdaselt kasutatava antibiootikumi suhtes.

Kokku püstitati neli hüpoteesi, mille tõesust kontrolliti katsetega. Hüpoteesid on järgmised:

- 1) käte pesemine leige veega ning ilma seebita vähendab oluliselt bakterite üldarvukust kätel;
- 2) WC ukselingilt kätele on märkimisväärne bakterite ülekannet;
- 3) desinfitseerimise tõttu bakterite arvukus kontaktpindadel väheneb oluliselt;
- 4) inimese käte bakterid, mis on mõne antibiootikumi suhtes resistentsed.

Hüpoteesid püstitati lähtuvalt üldlevinud arvamustest mikroobide kohta ja inimeste hirmust WC ukselingidel leiduvate bakterite suhtes. Antibiootikumiresistentsuse hüpotees tuleneb asjaolust, et paljud potentsiaalselt ohtlikud bakterid on mitmele antibiootikumile resistentsed

ning suudavad resistentsust kandvaid geene üksteisele edasi anda plasmiidide abil ja horisontaalse geeniülekanega.

Antud töös kasutatud meetodikaga sai isoleerida valdavalt kiirekasvulisi aeroobseid (õhuhapniku juuresolekul kasvavaid) heterotroofe (tarbivad valmis orgaanilist ainet, mis pärineb pärmiekstraktist ja trüptonist). Vaatlusgrupina kasutati Tartu Jaan Poska gümnaasiumi õpilasi ja õpetajaid ning kontaktpindade proovid võeti Jaan Poska gümnaasiumi WC ukselinkidelt. Uurimistöö ülejäänud praktiline osa tehti Tartu Ülikooli molekulaar- ja rakubioloogia instituudis. Söötmed saadi Tartu Ülikooli tehnoloogiainstituudist Reet Kure käest. Autor tänab töö valmimisele kaasaaitamises TUMRI teadurit Eve (Vedler) Naanurit ja teisi TUMRI töötajaid.

Uurimistöö praktiline osa on jaotatud kronoloogilises järjestuses töö etappide kaupa. Kõigepealt antakse ülevaade bakteritest, söötmetest ning katsetes kasutatavatest antibiootikumidest. Järgmisena kirjeldatakse proovide võtmist, bakterite külvamist, kasvatamist ja arvukuste hindamist ning antibiootikumide mõju testimist isoleeritud bakterikülvidele. Uurimistöö kolmas osa sisaldab vaatluste tulemusi ja analüüsi. Töö lõpuks tehakse kokkuvõtte saadud tulemustest.

MÕISTED JA LÜHENDID

AG – Aminoglükosiidid. Antibiootikumide rühm, millel on lai toimespekter ning mida kasutatakse eluohtlike infektsioonide raviks (Leclercq jt 1999).

CFU – *Colony forming unit* ehk kolooniaid moodustav ühik. Kasutatakse elusate bakterite arvukuse iseloomustamiseks külvides. Eeldatakse, et üks bakterirakk moodustab ühe koloonia. Rikkale söötmele külvatud proovist loetakse kolooniad ning leitakse bakterite arvukus.

DNA güraas – ensüüm, mis vastutab DNA lahtikeerdumise eest (Gellert jt 1976).

Eukarüoot – päristuumne organism. Neil rakkudel on olemas membraaniga piiritletud rakutuum (Alamäe jt 2000: 35).

LPS – Lipopolüsahhariid. Bakteriraku välismembraani oluline koostisosa gram-negatiivsetel bakteritel (Patil, Sonti 2004).

PBP – Transpeptidaas. Tegu on ensüümiga, mis seob bakterite rakuseina moodustavaid peptidoglükaanahelaid omavahel. (Mikelsaar jt 2006: 119)

Peptidoglükaan – Polümeer, mis moodustab bakterite rakuseina. Gram-negatiivsetel bakteritel moodustab peptidoglükaan alla 10% bakteriraku kuivmassist. Gram-positiivsetel bakteritel moodustab peptidoglükaan 30-70% raku kuivmassist (Schleifer; Kandler 1972).

Prokarüoot – ehk eeltuumne rakk. Neil puudub membraaniga piiritletud rakutuum (Alamäe jt 2000: 35).

Protistid – grupp organisme, kuhu kuuluvad primitiivsed vetikad, amööbid, limaseened ja algloomad (Mikelsaar jt 2006: 13).

β -laktamaas – ensüüm, mis tekitab bakteril resistentsuse β -laktaamsete antibiootikumide suhtes neid lagundades (Reading, Cole 1977; Mikelsaar jt 2006: 120).

1. BAKTERID, SÖÖTMED JA ANTIBIOOTIKUMID

1.1. MIKROORGANISMID

Seened, protistid, arhebakterid ja bakterid on mikroobid (Mikelsaar jt 2006: 13). Enamik inimese kehas ja nahal olevatest mikroobidest on osa inimese normaalset mikrofloorast, mis kaitseb meid väliskeskkonnast pärinevate kahjulike mikroobide eest (Mikelsaar jt 2006: 15). Mikroobide elutegevusel on kolm põhieesmärki: toituda, kasvada ja paljuneda (Mikelsaar jt 2006: 53).

Käesolevas töös on vaatluse all vaid bakterid. Bakterirakud on prokarüootsed ainuraksed organismid, kes on iseseisvalt võimelised teostama kõiki eluks vajalikke funktsioone (Mikelsaar jt 2006: 41). Eeltuumsete rakkude ehitus on lihtsam kui päristuumsetel rakkudel. Enamasti on eeltuumsete rakud väiksemad kui päristuumsete rakud. Päristuumsete rakud on näiteks inimese keharakud. Põhilised erinevused päristuumsete ja eeltuumsete rakkude vahel seisnevad DNA ning raku ehituses. Prokarüootsetes rakkudes asub üks rõngakujuline kromosoom rakusiseses piirkonnas, mida nimetatakse nukleoidiks. Eukarüootsete rakkude DNA on enamasti ümbritsetud tuumamembraaniga. Plasmiidides säilitavad bakterid selle osa DNA-st, mis pole tavaolukorras bakteritele eluks hädavajalik, kuid osutub oluliseks muutuvate keskkonnatingimuste korral (Alamäe jt 2000: 35).

1.2. LB-SÖÖDE

Bakterid vajavad kasvuks väga mitmeid orgaanilisi ja anorgaanilisi ühendeid. Laboritingimustes saavad bakterid kõik eluks vajalikud ühendid söötmest, millele nad külvatud on. Selleks on vajalik täpselt teada bakterite toitumistüüpi. Bakterid jagunevad toitumiselt heterotroofseteks ja autotroofseteks. Heterotroofsed bakterid toituvad

väliskeskkonnas leiduvast orgaanikast, autotroofsed bakterid on suutelised anorgaanilistest ühenditest tootma orgaanilisi ühendeid, kasutades selleks fotosünteesi või kemosünteesi. Kõikidele bakterirühmadele sobivaid universaalsöötmehid ei ole teada, kuid on välja töötatud mitmeid toitainerikkaid söötmehid, mis sobivad paljude bakteriliikide kasvatamiseks. Söötmehid jagatakse konsistentsi järgi vedelsöötmeteks, tardsöötmeteks ja poolvedelateks söötmeteks. Tardsöötmed saadakse vedelsöötmetest, millele lisatakse geelistavat ainet: agarit või želatiini (Heinaru, Vedler 2011:24). Antud uurimistöös kasutati LB-söödet, kuna see on kõige laialdasemalt levinud tardsööde ja töö autorile kergesti kättesaadav. Seega eeldatakse, et töös kasutatud söötmel kasvasid heterotroofsed bakterid. Vedel LB-sööde koosneb destilleeritud veest, naatriumkloriidist, trüptonist ja pärmiekstraktist (TÜMRI 2000). Sellele lisatakse agarit, et sööde tarduks.

1.3. ANTIBIOOTIKUMID JA NENDE TOIME

Antimikroobsete ainte hulka kuuluvad antibiootikumid, sulfoonamiinid ja antiseptilised vahendid, mis on kas looduslikult esinevad või sünteetilised keemilised ühendid. Need pidurdavad mikroobide kasvu või hävitavad neid (Mikelsaar jt 2006: 112). Antibiootikumide tõhususe uurimiseks kasutati uurimistöös kuut antibiootikumi: amoksitsilliini, streptomütsiini, gentamütsiini, tsiprofloksatsiini, karbenitsilliini ja polümüksiin B-d.

1.3.1. Amoksitsilliin ja karbenitsilliin

Amoksitsilliini ja karbenitsilliin on laia toimespektriga penitsilliinid, mis sisaldava β -laktaamtuuma (Mikelsaar jt 2006: 121). Tegu on poolsünteetiliste antibiootikumidega (E. T. Knudsen jt 1967; Heinsaar jt 2006: 119). Amoksitsilliin ja karbenitsilliin toimivad ka kui β -laktamaasi inhibiitorid (Mikelsaar jt 2006: 119).

Antud preparaadid pidurdavad peptidoglükaanist koosneva rakuseina sünteesi ja uuendamist, mis teeb omakorda bakteriraku vastuvõtlikumaks väliskeskkonna mõjudele. Ensüüm transpeptidaas (edaspidi PBP) seob peptidoglükaani ahelaid omavahel rakuseinaks, kuid penitsilliinid seostuvad end ise PBP-ga, takistades peptidoglükaani ühinemist rakuseinaga.

β -laktamaaside produktsioon on kõige sagedasem resistentsuse põhjus, kusjuures aja jooksul on sellise resistentsuse saavutanud bakterite arv oluliselt suurenenud. (Mikelsaar jt 2006: 119) PBP muteerumine on teiseks resistentsust põhjustav mehhanismiks (Mikelsaar jt 2006: 120).

1.3.2. Streptomütsiin ja gentamütsiin

Streptomütsiin ja gentamütsiin on antibiootikumid, mis kuuluvad aminoglükosiidide (AG) hulka. Aminoglükosiidid pidurdavad bakterirakus valgu sünteesi. Enamasti kasutatakse aminoglükosiide koos β -laktaamide või glükopeptiididega, mis mõjutavad rakuseina ning see lihtsustab aminoglükosiidide sattumist tsütoplasmasse. Gentamütsiini kasutatakse tänapäeval põhiliselt tuberkuloosi, brutselloosi, tulareemia ja katku korral (Mikelsaar jt 2006: 124).

Resistentsus AG-de suhtes võib tekkida mitmel erineval põhjusel. Nendeks on ribosoomides seostumiskohtade muundumine, ravimi kiire väljaviimine rakust, rakumembraani läbilaskvuse vähenemine ja AG-de ensümaatilise modifikatsioon. Väljatoodud resistentsusmehhanismidest on viimane kõige levinum (Mikelsaar jt 2006: 124).

1.3.3. Tsiprofloksatsiin

Tsiprofloksatsiin on uuem ja laia toimespektriga kinoloon, mis pidurdab nukleiinhapete, DNA ja RNA, sünteesi. Tegu on sünteetilise antibiootikumiga. Kinoloonid seovad ennast DNA güraasiga, hoides ära bakteriaalse DNA lahtikeerumise ja replikatsiooni, kuid ei mõjuta samas keharakke (Mikelsaar jt 2006: 127).

Resistentsus kinoonide suhtes tekib mutatsioonidest DNA güraasis või raku välismembraani läbilaskvuse vähenemisest. Samuti võib antibiootikumi mõju väheneda juhul, kui rakust pumbatakse antibiootikum kiiresti välja (Heinaru jt 2006: 127).

1.3.4. Polümüksiin B

Polümüksiin B kuulub polümüksiinide hulka. Polümüksiinid seovad end raku välismembraanis olevate lipopolüsahhariidide (LPS) ja fosfolipiididega. See põhjustab rakumembraani läbilaskvuse suurenemist ning raku surma. Polümüksiin B mõjub vaid mikroobidele, kellel on õhuke rakukest ning kaks membraani. Selliseid organisme nimetatakse gram-negatiivseteks. Gram-positiivsel rakkudel on paks rakukest ning puudub välismembraan, seega ei saa antibiootikum raku nii palju kahjustada. Polümüksiin B on toksilise toimega patsiendi neerudele (Mikelsaar jt 2006:123).

Polümüksiinidele resistentsuse tekkimise peamiseks põhjuseks on muutused LPS-ides või kindla lipiidi laengu vähendamine bakteriraku poolt. Mõlemal juhul ei saa polümüksiin enam raku välismembraanis olevate LPS-idega ega fosfolipiididega piisavalt efektiivselt seostuda (Zavascki jt 2007).

1.3.5. Antibiootikumide efektiivsuse hindamine

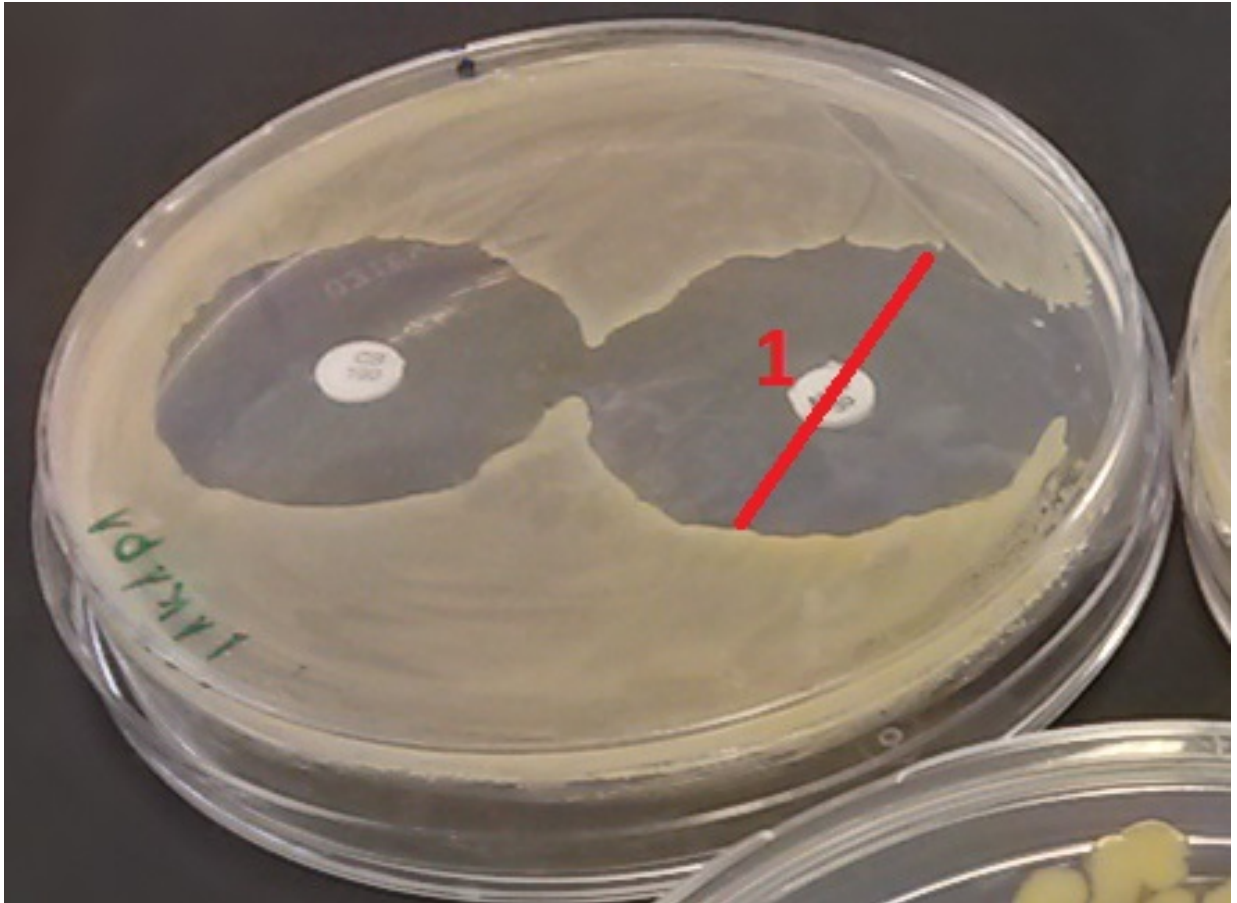
Antibiootikumide efektiivsust saab hinnata Kirby-Baueri (agari difusiooni) testi abil. Kirby-Baueri meetodi puhul kasutatakse kindla kontsentratsiooniga antibiootikumidega läbiimmutatud paberdiske, mis asetatakse pindkülviga söötmele (Heinaru, Vedler 2011: 71). Igal paberdiskil on kirjas antibiootikumi lühend ja selle kontsentratsioon diskil. Söötmetasse hoitakse mõned tunnid jahedas, et antibiootikum agarisse difundeeruks. Hiljem, peale tasside inkubeerimist bakteri optimumtemperatuuril, mõõdetakse antibiootikumidiski ümber tekkinud kasvuvaba tsooni diameeter (vt Joonis 1). Kasvuvabade tsoonide diameetrit mõõdetakse millimeetrites (vt Tabel 1).

Tabel 1. Antibiootikumide efektiivsuse hindamine kasvuvabade tsoonide järgi Kirby-Baueri meetodil (ei vasta kindlale bakteriliigile, vaid on universaalsed)

Antibiootikum	Lühendid	Kontsentratsioon diskidel µg või Ü	Inhibitsiooni tsooni diameeter (mm)		
			Resistentne	Keskmine	Tundlik
Amoksitsilliin + klavulaanhape*	AMC	20 +10 µg	≤13	14-17	≥18
Gentamütsiin	GM	10 µg	≤12	13-14	≥15
Streptomütsiin	S	10 µg	≤12	12-14	≥14
Tsiprofloksatsiin	CIP	5 µg	≤15	16-20	≥21
Karbenitsilliin (<i>P. aeruginosa</i>)	CB	100 µg	≤13	14-16	≥17
Polümüksiin B	PB	300 Ü	≤9	9-11	≥11

Allikas: Heinaru, Vedler 2011: 72

*Klavulaanhape lisatakse, kuna see on β-laktamaasi inhibiitor (Mackenzie jt 2009)



Joonis 1. Kasvuvaba tsoon antibiootikumide karbenitsiliini ja amoksiitsilliini (vasakult paremale) korral. Number 1 täistab kasvuvaba tsooni diameetrit. (Autori foto)

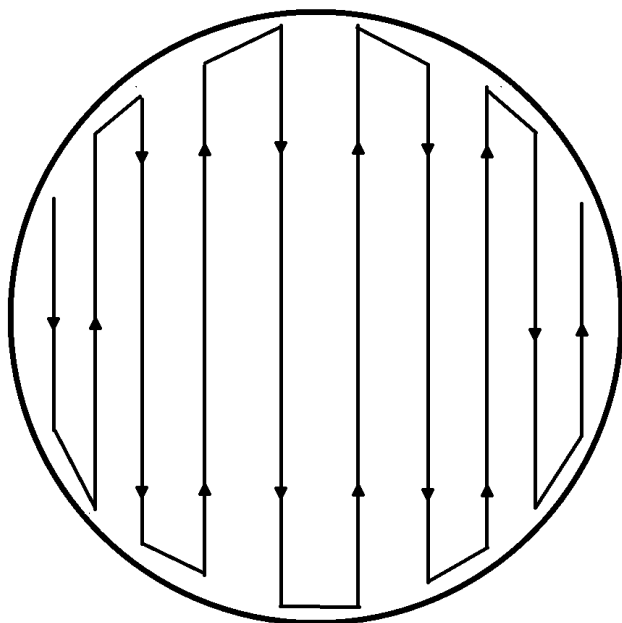
2. MATERJAL JA METOODIKA

2.1. BAKTERITE KÜLVID

Kõikideks katseteks võeti bakterikülvide tarbeks proovid Tartu Jaan Poska gümnaasiumi (JPG) WC ukselinkidelt ning katsetes osalenud 16 inimest olid JPG õpilased ning õpetajad. WC ukselingid desinfitseeriti koolis kasutatava Säästu puhastusvahendiga Klaasipuhastusvahend Värskelõhnaline, mis sisaldab 5–15% alkoholi. Pilootkatses võeti proovid kahelt inimeselt ja kahelt erinevalt ukselingilt. Mõlemas põhikatses võeti proovid seitsmelt inimeselt ja seitsmelt erinevalt ukselingilt. Tartu Jaan Poska Gümnaasiumi ukselingid sisaldavad vaske.

Inimeste käelt võeti proov eelnevalt steriilitud vatitikuga peopesa kõige kõrgemalt kohalt sõrmede alt, kuna enamustel inimestel puutub see koht kõige rohkem kokku ukselingiga. Iga proovi jaoks tõmmati vatitikuga viis korda üle käe paremalt vasakule. Ukselinkidelt võeti proovid samuti steriilse vatitikuga, kusjuures üle lingi pealmise osa tõmmati ühe proovi jaoks

vatitikuga viis korda, aga nii, et proovivõtmise ala otseselt ei kattuks. Nii ukselingiproov kui ka käeproov kanti vatitikult LB-söötmele alati sama mustriga ja üks proov ühele tassile (vt Joonis 2). LB-söötmed saadi valmiskujul Tartu Ülikooli tehnoloogia instituudist Reet Kure käest. Ukselingi desinfitseerimiseks pihustati ukselinki kolm korda puhastusvahendiga ja seejärel hõõruti puhastusvahend paberrätiku abil ukselingile laiali ning kuivatati.



Joonis 2. Külvide kandmine LB-tassile

Kõikides katsetes võeti kokku viis proovi järgmiselt:

- 1) inimese käelt enne pesemist;
- 2) inimese käelt peale käte pesemist ilma seebita;
- 3) ukselingilt enne kontakti ja desinfitseerimist;
- 4) inimese käelt peale kontakti ukselingiga;
- 5) ukselingilt peale desinfitseerimist.

Pilootkatses ja esimeses põhikatses võeti esimene käeproov kuivalt käelt. Teises põhikatses tehti käsi enne proovi võtmist niiskeks, et teha kindlaks, kas märjalt käelt ja kuivalt käelt proovi võttes tulemused erinevad. Kätepesu kestis ligikaudu üks minut ning vee temperatuur oli umbes 30 °C. Peale kätepesu käsi ei kuivatatud. Pilootkatse puhul hoiti LB-tasse peale bakterite külvamist toatemperatuurist soojemas keskkonnas (vahemikus 25 °C kuni 30 °C) 3 päeva. Mõlema põhikatses korral hoiti söötmeid peale külvide võtmist termokapis umbes 24 tundi 33 °C juures ning seejärel loeti üle söötmele kasvanud bakterikolooniate arv.

2.2. PUHASKÜLVID JA RESISTENTSUS ANTIBIOOTIKUMIDELE

Puhaskülvid tehti esimeses ja teises põhikatses. Kõigepealt valiti eelnevatest inimeste kätelt võetud bakterikülvidest pärinevat viis välimuselt erinevat bakterikolooniat. Esimeses põhikatses valiti antibiootikumitesti jaoks sobivad kolooniad 24 tundi peale nende esmast külvamist LB-tassidele. Kuna osad bakterid moodustavad kolooniaid aeglasemalt kui teised, valiti teises põhikatses bakterikolooniad välja 48 tundi peale nende esmast külvamist.

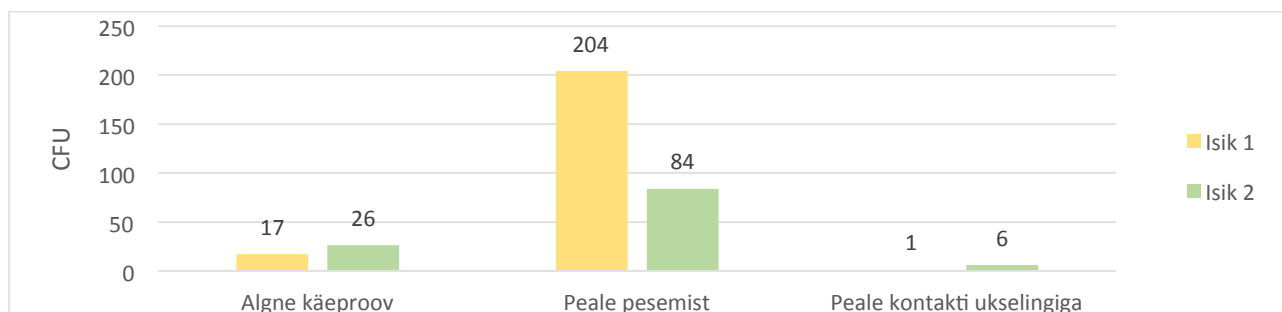
Lisaks oli oluline, et väljavalitud bakterikolooniad oleksid võimalikult suured ning asetseksid teistest kolooniatest eraldi. See lihtsustas puhaskülvi bakterimassi kättesaamist. Valitud kolooniad külvati osaliselt või täielikult külviaasa abil eraldi LB-tassidele joonkülvi põhimõttel. Seejärel pandi LB-tassid termokappi 33 °C juurde 24 tunniks kasvama.

24 tunni möödudes võeti laminaarboksis steriilse pipetiotsikuga söötmelt baktereid ning segati eraldi steriilses tuubis 400 µl steriilse destilleeritud veega – saadi suspensioon. Suspensioon pipeteeriti 100 µl kaupa kolmele LB-söötmele. Söötmele kantud suspensioon hõõruti steriilse spaatliga söötme sisse. Seda nimetatakse pindkülviks. Seejärel asetati igale söötmele Kirby-Baueri testi jaoks kaks antibiootikumidega läbiimmutatud paberdiski. Antibiootikumidiskidega LB-tassid asetati ~5 °C juurde 3 tunniks, et antibiootikumid söötme sisse difuseeruksid, seejärel viidi tassid termokappi 33 °C 24 tunniks ning pärast seda mõõdeti ära bakterite vaba tsooni diameeter antibiootikumidiskide ümber.

TULEMUSED JA ARUTELU

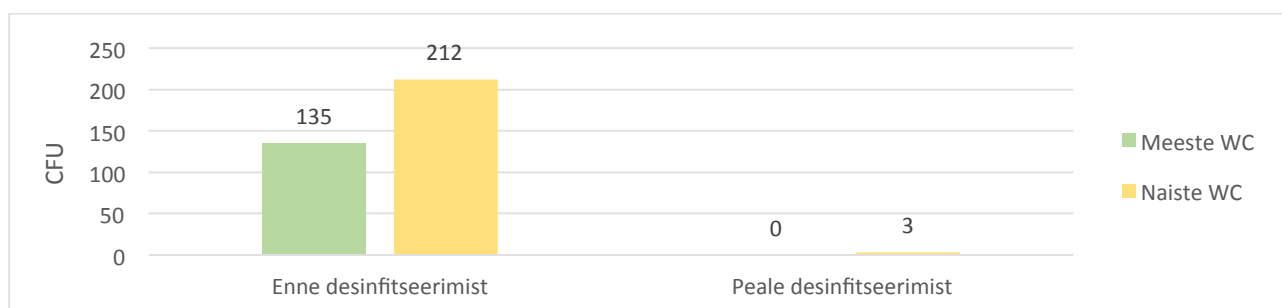
3.1. PILOOTKATSE TULEMUSED

Pilootkatse jaoks võeti käetelt proovid kahelt JPG õpilaselt ning ukselingi proovid võeti JPG neljanda korruse WC-de ukselinkidelt. Joonistel 3 ja 4 on toodud CFU LB-tassi kohta.



Joonis 3. Pilootkatse katseisikute käetelt võetud proovidest väljakasvanud kasvanud bakterikolooniate arv

Jooniselt 3 on näha, et peale käte pesemist veega suurenes bakterikolooniate arv märgatavalt, kuid peale kontakti ukselingiga vähenes bakterikolooniate hulk alla kümne. Tõenäoliselt oli tegu katseveaga, mis tulenes vatitiku keerlemisega proovivõtmise ja külvamise vahel. Seetõttu markeeriti (märgiti markeriga) põhikatses ära vatitiku ülemine pool, et tagada maksimaalne külvamine.



Joonis 4. Ukselinkidelt võetud proovidest väljakasvanud bakterikolooniate arv

Joonisel 4 on näha, et ukselinkide desinfitseerimine vähendas oluliselt väljakasvavate bakterikolooniate hulka. Samas ei hävitanud desinfitseerimine kõiki naiste WC ukselingil leiduvaid baktereid. Tõenäoliselt ei olnud bakterid piisavalt tundlikud desinfitseerimisvahendis leiduvatele mikroobe hävitavatele mürkidele nagu näiteks alkohol.

3.2. ESIMESE JA TEISE PÕHIKATSE BAKTERIKÜLVIDE TULEMUSED

Esimeses ja teises põhikatses võeti proovid seitsmelt JPG õpilaselt ja õpetajalt ning bakterikülvide jaoks võeti proove esimese kuni neljanda korruse ukselinkidelt. Tabelites 2 ja 3 on välja toodud CFU arvukused LB-tassi kohta.

Tabel 2. Esimese ja teise põhikatse tulemused. Inimeste kätelt võetud proovides bakterikolooniate arvukused (CFU)

		Käsi enne pesemist	Käsi peale pesemist	Käsi peale kontakti ukselingiga
Esimene põhikatse	Isik 1	80	182	15
	Isik 2	375	465	73
	Isik 3	28	186	48
	Isik 4	10	38	72
	Isik 5	46	46	13
	Isik 6	1208	2161	1812
	Isik 7	51	82	162
Teine põhikatse	Isik 1	45	257	37
	Isik 2	104	135	13
	Isik 3	436	1892	392
	Isik 4	49	348	176
	Isik 5	112	288	119
	Isik 6	67	124	12
	Isik 7	Loendamatu (>5000)	Loendamatu (>5000)	504

Tabelist 2 on näha, kolooniate arvukus enne käte pesemist oli kõikide külvide puhul väiksem kui kolooniate arvukus peale käte pesemist. Seega käte pesemise järel kasvas kätel kolooniaid moodustavate bakterite hulk. Samas kolooniate hulk enne kontakti ukselingiga (ehk peale käte pesemist) on kõikide külvide puhul suurem kui peale kontakti ukselingiga. Seega peale kontakti ukselingiga kolooniaid moodustavate bakterite hulk käel kahanes.

Käte pesemise järel ei saanud külvide CFU kasvamise põhjuseks olla suur bakterite rohkus kraanivees, sest visuaalselt nägid kolooniad nii enne käte pesemist kui ka peale käte pesemist võetud külvidel samasugused välja. See võiks viidata sellele, et kätele ei sattunud pesemise käigus uusi baktereid, kes oleksid olnud võimelised kolooniaid moodustama. CFU võis külvidel peale käte pesemist tõusta, kuna veega pestes võisid bakterid käelt kergemini lahti tulla ja selle pärast sattus proovi võtmisel vatitikule ja seega ka bakterisöötmele rohkem baktereid.

Peale kontakti ukselingiga võis CFU arvukus järsult langeda, sest JPG WC ukselingid sisaldavad vaske, millel on antimikroobne toime. Kuna kõik kolm proovi inimeste kätelt võeti enamvähem samalt kohalt, võis enamus baktereid kätelt söötmele sattuda esimese ja teise külvi käigus (käed enne ja pärast pesemist) ning seega ei jäänud kolmandaks külviks (käsi peale kontakti ukselingiga) enam käele piisavalt baktereid, kes oleksid olnud võimelised söötmel kolooniaid moodustama.

Tabelist 3 on näha, et ukselinkide desinfitseerimise tagajärjel vähenes enamikul ukselinkidel CFU arv. Ühel ukselingil suurenes CFU ühe võrra. Neljal juhul seitsmest ei kasvanud peale ukselingi desinfitseerimist enam LB-tassile ühtegi bakterikolooniat, mis näitab, et antud puhastusvahend on tõhus testitud heterotroofsete kiirekasvuliste bakterite arvukuse vähendamiseks.

Tabel 3. Esimese ja teise põhikatse tulemused. Ukselinkidelt võetud võetud proovides bakterite arvukused (CFU)

		Ukselink enne desinfitseerimist	Ukselink peale desinfitseerimist
Esimene põhikatse	Ukselink 1	5	1
	Ukselink 2	23	10
	Ukselink 3	21	0
	Ukselink 4	13	0
	Ukselink 5	23	0
	Ukselink 6	9	5
	Ukselink 7	21	0
Teine põhikatse	Ukselink 1	39	0
	Ukselink 2	1	2
	Ukselink 3	3	0
	Ukselink 4	9	1
	Ukselink 5	15	0
	Ukselink 6	42	0
	Ukselink 7	322	0

3.3. ANTIBIOOTIKUMIDE TOIME ISOLEERITUD TÜVEDELE

Esimeses ja teises põhikatses tehti lisaks bakterikülvidele ka isoleeritud tüvedele antibiootikumi tundlikkuse test. Kõik pindkülvideks valitud bakterikolooniad erinesid teineteisest välimuse poolest ning pärinesid erinevate isikute kätelt võetud külvidest ning olid seega tõenäoliselt erinevatest bakterirühmadest ja liikidest.

Tabelis 4 on rohelisega tähistatud need kasvuvabade tsoonide diameetri suurused, mille suuruse järgi võib öelda, et bakter on antibiootikumi suhtes tundlik. Kollase taustaga on märgitud need kasvuvabade tsoonide diameetri suurused, mille korral bakter on testitud antibiootikumile keskmiselt tundlik ja punasega on märgitud need kasvuvabade tsoonide diameetri suurused, mille korral bakter on antibiootikumi suhtes resistentne.

Antibiootikumide lühendid on toodud tabelis 1. Külvide nimetused sisaldavad isiku numbrit (Isik 1–6), proovi järjekorranumbrit (Proov 1, Proov 2 või Proov 3) ja kolmel juhul koloonia numbrit (K1, K2 ja K3). Külvi number näitab, mitmendast proovist bakter valitud on (Külv 1 – käsi enne pesemist; Külv 2 – käsi peale pesemist; Külv 3 – käsi peale kontakti WC ukselingiga). Koloonia number on välja kirjutatud juhul, kui ühelt käelt võetud bakterikülvist valiti välja mitu erinevat kolooniat. Lihtsuse mõttes nummerdati bakterid ära.

Tabelist 4 on näha, et enamus baktereid, mis pindkülvide jaoks välja valiti, olid kõikide antibiootikumide suhtes tundlikud. Fotol 1 on näitena toodud bakteri 1.3 kõik külvid. Bakter 1.3 oli kõikide antibiootikumide suhtes tundlik. Bakter 2.3 oli resistentne ainult streptomütsiini suhtes. Bakter 1.2 oli resistentne amoksitsilliini, karbenitsilliini ja polümüksiin B suhtes ning tundlik streptomütsiini suhtes. Bakter 2.2 oli kõige vastupidavam bakter, ta oli resistentne antibiootikumide amoksitsilliini, gentamütsiini, streptomütsiini ja karbenitsilliini suhtes ning tundlik tsiprofloksatsiini suhtes (vt Foto 2).

Tabel 4. Puhaskülvidel bakteritüvede kasvuvabad tsoonid (mm) antibiootikumidiskide ümber

	Nr.	Külv	AMC 30	GM 10	S 10	CIP 5	CB 100	PB 300
Esimene põhikatse	1.1	Isik 1 Proov 1 K1	36	20	21	31	32	14
	1.2	Isik 1 Proov 1 K2	6	16	14	27	6	6
	1.3	Isik 1 Proov 1 K3	27	23	20	30	25	16

Teine põhikats	1.4	Isik Proov 1	4	43	22	19	27	34	13
	1.5	Isik Proov 1	6	45	32	31	43	48	16
	2.1	Isik Proov 3	6	35	29	22	20	19	15
	2.2	Isik Proov 1	3	6	6	6	21	6	11
	2.3	Isik 6 Proov 1		43	24	6	36	45	19
	2.4	Isik 1 Proov 3		37	26	25	35	32	14
	2.5	Isik Proov 1	5	28	18	20	38	18	12

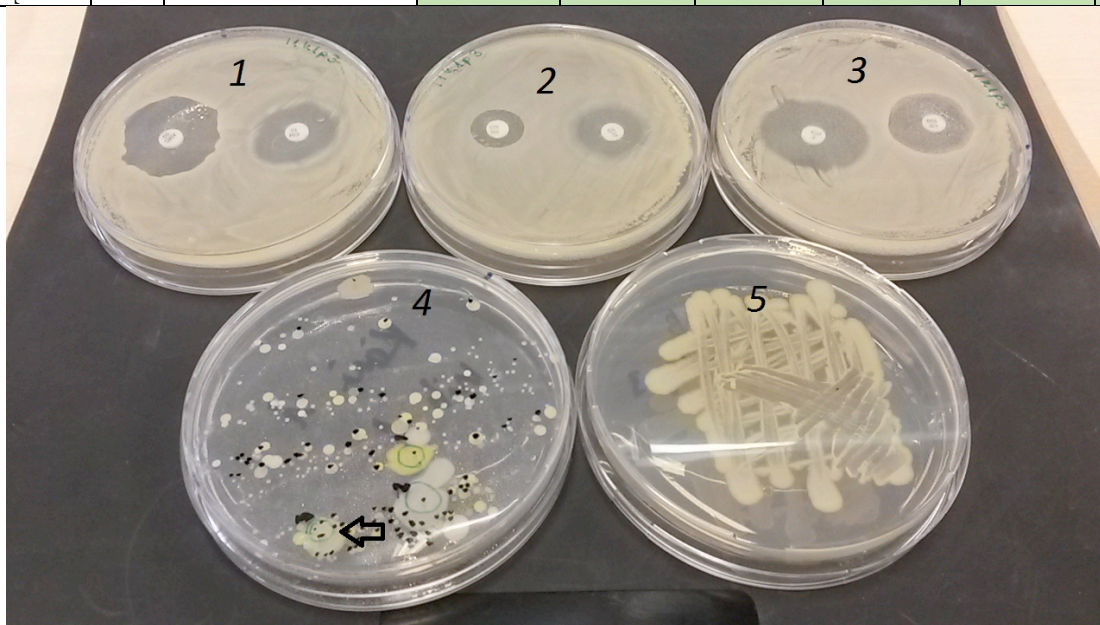


Foto 1. Bakter 1.3 külvid LB-tassidel. Tassil 4 on inimese käelt võetud külv ning noolega on näidatud koloonia, millest võeti bakterimassi puhaskülvi jaoks. Tassil 5 on puhaskülv ning tassidel 1 kuni 3 on pindkülvid antibiootikumidega. (Autori foto)

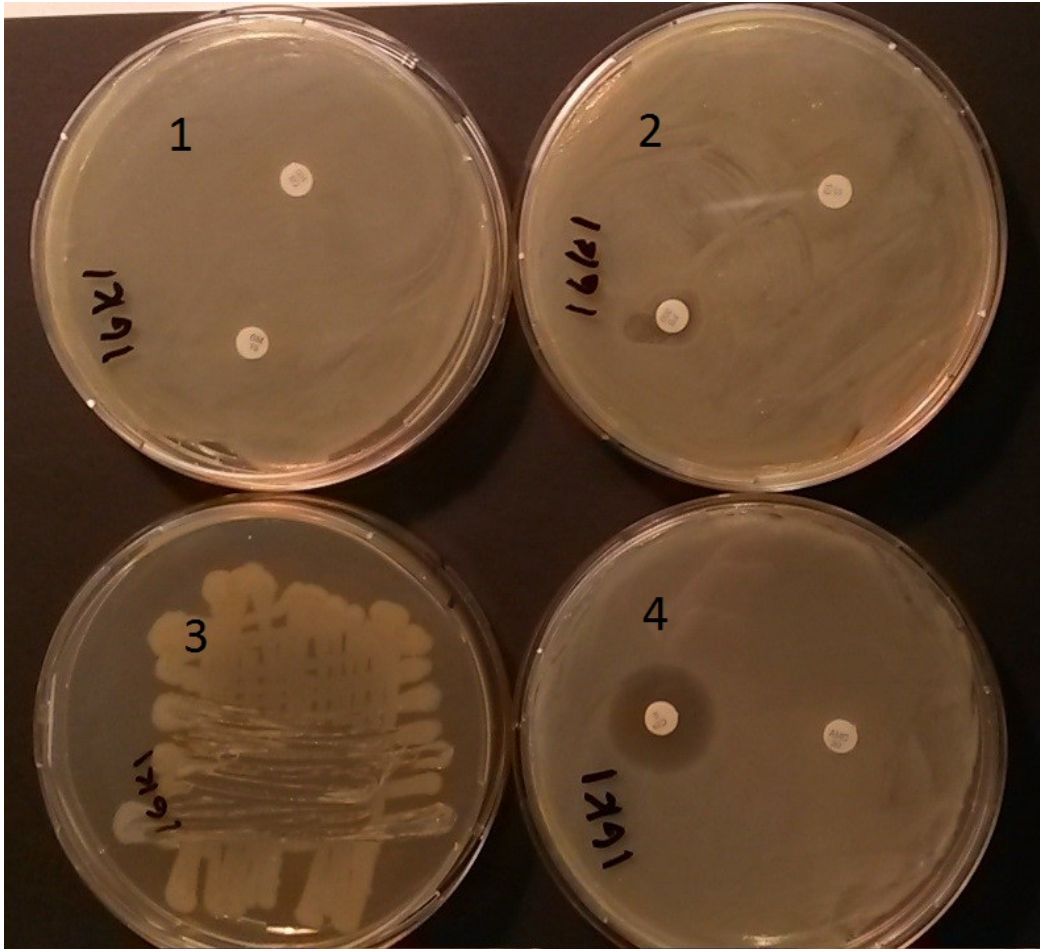


Foto 2. Bakter 2.2 külvid LB-tassidel. Tassidel 1,2 ja 4 on pindkülvid antibiootikumidiskidega. Tassil 3 on bakteri puhaskülv. (Autori foto)

Kõige vähem mõjutas baktereid streptomüsiin, sest kaks bakteritüve olid selle suhtes resistentsed ning üks bakter keskmiselt tundlik. Kõige rohkem mõjutas baktereid tsiprofloksatsiin – selle antibiootikumi suhtes ei olnud ükski vaadeldud bakter resistentne, vaid tüved olid tundlikud. Valdavalt olid isoleeritud bakterid testitud antibiootikumide suhtes tundlikud.

KOKKUVÕTE

Uurimistöö käigus leidis kinnitust kaks eelnevalt püstitatud hüpoteesi: inimeste kätel leidub baktereid, mis on mõnele tänapäeval kasutuses olevale antibiootikumile resistentsed ja desinfitseerimise tõttu bakterite arvukus kontaktpindadel vähenes oluliselt. Seega on ukse linkide desinfitseerimine heterotroofsete bakterite arvukuse vähendamiseks vajalik.

Käte ilma seebita pesemise järel bakterite arvukus käte samas piirkonnas aga tõusis, seega püstitatud hüpotees, et pesemise järel bakterite arvukus kätel väheneb, ei pidanud paika. Hüpotees, et peale kontakti ukse lingiga toimub oluline bakterite ülekande ukse lingilt käele, ei

pidanud samuti paika, sest peale kontakti ukseingiga bakterite arvukus kätel vähenes oluliselt. Seega ei toimunud suurt bakterite ülekannet ukseingilt käele, pigem võiks eeldada vastupidist ülekannet – inimeste käelt ukseingile.

Tulevikus tuleks teha mitmeid kordusvaatlusi bakterite arvukuse muutuse kohta inimeste kätel peale erineva meetodikaga pesemist ning peale kontakti vaske sisaldavate ukseingidega, et kontrollida uurimistöös saadud tulemusi. Asjaolu, et peale käte pesemist bakterite arvukus käte samas piirkonnas suurenes, vajaks erilist tähelepanu. Samuti tuleks fenotüüp- ja genotüüpiliste meetoditega ära määrata bakteriliigid, et teada saada, milliseid liike võib leida inimeste käelt ja ukseingidelt. Bakterite määramine oleks eriti oluline selleks, et teada, millised neist bakterid on antibiootikumidele resistentsed ja võimalikud haigusttekitajad.

KASUTATUD MATERJALID

Alamäe jt = Tiina Alamäe, Kalevi Kull, Urmas Kõljalg, Raivo Masso, Mart Ustav 2000. Bioloogia gümnaasiumile II osa. Kalle Hein. Tartu: Eesti Loodusfoto.

Mackenzie jt = Alasdair K. Mackenzie, Karin Valegård, Aman Iqbal, Matthew E.C. Caines, Nadia J. Kershaw, Susan E. Jensen, Christopher J. Schofield 2009. Crystal Structures of an Oligopeptide-Binding Protein from the Biosynthetic Pathway of the β -Lactamase Inhibitor Clavulanic Acid. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283609014399>

Vaadatud 27.01.2016

Gellert jt = M. Gellert, K.Mizuuchi, M.H.O'Dea, H.A.Nash 1976. DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC431247/> Vaadatud 28.03.2015.

Heinaru, Eeva; Vedler, Eve 2011. Praktilisi töid mikrobioloogist. Tartu: AS Atlex.

Knudsen jt = E. T. Knudsen, G.N. Rolinson, R. Sutherland 1967. Carbenicillin: A New Semisynthetic Penicillin Active against *Pseudomonas pyocyanea* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1842342/?page=1> Vaadatud 19.11.2014.

Leclercq jt = Marie-Paule Mingeot-Leclercq, Youri Glupczynski, Paul M. Tulkens 1999. Aminoglycosides: Activity and Resistance <http://aac.asm.org/content/43/4/727.short> Vaadatud 29.03.2015.

Mikelsaar jt = Marika Mikelsaar, Tõnis Karki, Irja Lutsar, Reet Mändar 2006. Meditsiiniline mikrobioloogia. Tartu: Tartu Ülikooli Kirjastus.

Patil, Prabhu B; Sonti, Ramesh V 2004. Variation suggestive of horizontal gene transfer at a lipopolysaccharide (lps) biosynthetic locus in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, the bacterial

leaf blight pathogen of rice <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC524487/> Vaadatud 29.03.2015.

Reading, Cole 1977. Clavulanic Acid: a Beta-Lactamase-Inhibiting Beta-Lactam from *Streptomyces clavuligerus* <http://aac.asm.org/content/11/5/852.short> Vaadatud 29.03.2015.

Schleifer; Kandler 1972. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC408328/?page=2> Vaadatud 29.03.2015.

Zavascki jt = Alexandre Prehn Zavascki, Luciano Zubaran Goldani, Jian Li, Roger L. Nation 2007. Polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant pathogens: a critical review <http://jac.oxfordjournals.org/content/60/6/1206.full.pdf> Vaadatud 16.01.2015

TÜMRI 2000. Tartu Ülikooli molekulaar- ja rakubioloogia instituut. Biotehnoloogia õppetool 2000. Molekulaarse biotehnoloogia praktikumi juhend <http://www.biotech.ebc.ee/praktikum/lisad.html> Vaadatud 28.03.2015.