



2004-2006 m. Bendrojo programavimo dokumento 2 prioriteto „Žmogiškųjų išteklių plėtra“ 4 priemonė „Mokymosi visą gyvenimą sąlygų plėtra“

Projekto sutarties numeris: ESF/2004/2.4.0-K01-160/SUT-261

Projekto pavadinimas: **Inovatyvūs mokymosi metodai ir naujausios technologijos gamtos mokslų bakalauro rengimui**

BIO 312. MIKROBIOLOGIJA

Laboratorinis darbas

Endosporų dažymas. Kapsulių dažymas. Dažymas fluorescentiniais dažais

Mikroorganizmų paviršiaus struktūros.

Mikroskopu galima stebėti mikroorganizmų ląstelės paviršiuje esančias struktūras. Tai gali būti žiuželiai, blakstienėlės, gleivių sluoksniai ir kt.

Dalis bakterijų turi specialią struktūrą – *flagellum* – žiuželį. Žiuželiai apie 20nm storio, todėl paprastu mikroskopu nematomi be specialaus dažymo, gali būti matomi elektroninio mikroskopo pagalba. Skirtingose bakterijose žiuželiai išsidėstę skirtingai. Gali būti iš vieno ar abiejų bakterijos galų (polinis išsidėstymas), viename gale gali būti grupė žiuželių, žiuželiai taip pat gali būti įterpti į daug vietų ląstelės paviršiuje (peritrichinis išsidėstymas).

Žiuželis – spiralinės struktūros. Atstumas tarp spiralės vijų pastovus tam tikram organizmui (vadinamas bangos ilgiu). Žiuželį sudarantys filamentai yra iš baltymo flagelino. Žiuželio forma priklauso nuo flagelino sudėties ir jo vijimosi krypties. Kiek žinoma, archėjų žiuželio struktūra gana smarkiai skiriasi nuo bakterijų. Bakterijose flagelino seka yra labai konservatyvi. Žiuželis pamate yra platesnis – tai vadinamas kablys. Jis sudarytas iš vieno baltymo tipo ir jungia filamentą su motorine žiuželio dalimi. Pastaroji sudaryta iš mažo strypo, kuris perveria žiedų sistemą. Gram neigiamose bakterijose išorinis žiedas yra išitvirtinęs išorinėje membranoje, kitas – peptidoglikano sluoksnyje, vidinis – citoplazminėje membranoje. Gram teigiamos bakterijos turi tik vidinį žiedą.

Vidinį žiedą supa Mot baltymai, įsitvirtinę membranoje. Šie baltymai ir suka žiuželį. Baltymai Fli veikia kaip motoro perjungėjas keisdami sukimaši priklausomai nuo viduląstelinių signalų.

Žiuželis auga ne iš pagrindo, kaip gyvūnų plaukai, o nuo viršūnės. Flagelino molekulės susiformavusios ląstelėje išeina per tuščiaavidurę žiuželio šerdį ir prisideda prie žiuželio galo. Visa informacija apie žiuželio formą yra pačiame baltyme, kuris savaime susirenka, suformuodamas žiuželį.

Energija žiuželiui sukti gaunama iš protonų judėjimo energijos. Protonai juda per membraną per Mot kompleksą. Apskaičiuota, kad apie 1000 protonų turi būti pernešti, kad energijos pakaktų vienam žiuželio apsisukimui. Bakterijos greitis – 0.00017 km/h, tačiau tai yra 60 ląstelės ilgių per sekundę (tuo tarpu gepardas nubėga 25 kūno ilgių per sekundę). Mikroorganizmai, kurių žiuželiai išsidėstę poliškai juda greičiau nei tie, kurių žiuželiai išsidėstę keliose vietose ląstelėje (peritrichiniai).

Fimbriae – blakstienėlės. Taip pat kaip ir žiuželiai, baltymų dariniai, tik trumpesni ir gausesni. Ne visais atvejais aiški jų funkcija, bet patogeninių baterijų atveju jos naudojamos prisitvirtinimui prie šeimininko audinių. Taip pat reikalingos bioplėvelių formavimuisi ant įvairių paviršių.

Piliai – panašios struktūros. Jos tarnauja kaip receptoriai kai kurioms virusinėms dalelėms, taip pat dalyvauja konjugacijoje.

S-sluoksniai (parakristaliniai paviršiaus sluoksniai). Sudaryti iš plokštumoje išsidėsčiusių baltymų ir glikoproteinų. Šie dariniai aptikti pas įvairių bakterijų grupių atstovus, taip pat paplitę archėjose, sudaro kai kurių archėjų rūšių ląstelės sienelę. Gali būti susiję su įvairiomis ląstelės sienelės struktūromis, pvz., LPS (gram neigiamų bakterijų lipopolisacharidais), peptidoglikanu (gram teigiamose) ir tiesiog su citoplazmine membrana (archėjose). Funkcija nėra žinoma. Manoma, kad gali veikti kaip tam tikras pralaidumo barjeras arba, patogeniniuose mikroorganizmuose, kaip apsauga nuo šeimininkų apsauginių mechanizmų.

Glikokaliksas - polisacharidų turinti medžiaga, supanti ląstelę. Sudėtis skirtinga įvairiuose mikroorganizmuose, į ją įeina glikoproteinai ir įvairūs polisacharidai, įskaitant polialkoholius ir amino cukrus. Sluoksnis gali būti storas ar plonas, kietesnis ar skystesnis. Kietesnis, nepralaidus, turintis formą sluoksnis paprastai vadinamas **kapsule**, lengvai deformuojamas – **gleivių sluoksniu**. Reikalingas kai kurių patogeninių bakterijų prisitvirtinimui prie šeimininko. Bakterijas su kapsulėmis yra sunkiau atpažinti ir sunaikinti imuninės sistemos fagocitinėms ląstelėms. Be to, glikokaliksas gali sulaikyti tam tikrą vandens kiekį.

Endosporos

Tai specialios struktūros ląstelių viduje. Jos yra labai atsparios karščiui ir kitokiam išoriniam poveikiui išdžiovinimui, radiacijai, rūgštims, dezinfekuojančioms medžiagoms, be to, gali išlikti

gyvybingos ilgą laiką. Daugiausia sporas formuojančių bakterijų yra dirvoje. Geriausiai ištirtos sporinės bakterijos – *Bacillus* ir *Clostridium*. *Clostridium* sporos, išskirtos 1947m., patalpintos į augimo terpę išaugo 1981m., praėjus 31 –iems metams. Iš archeologinės radimvietės Didžiojoje Britanijoje paimtos 2000 metų senumo *Thermoactinomyces* sporos buvo gyvybingos. Iš 7000 metų senumo Minesotos ežero nuosėdų paimtos šio mikroorganizmo sporos taip pat buvo atgaivintos. Atliekant tokius eksperimentus visada yra užkrėtimo “šiuolaikinėmis” sporomis tikimybė. Manoma, kad sporos gali išlikti gyvybingos šimtus tūkstančių metų. 1995m. grupė mokslininkų paskelbė, kad atgaivino žinomo geologinio amžius gintare užkonservuoto vabzdžio žarnyne buvusias sporas – joms 25-40 milijonų metų. Gintare buvo ir giminingų *Bacillus* genčiai bakterijų DNR. Atgaivinus sporas buvo palyginta iš jų išaugusių bakterijų ir gintare buvusi DNR – ji atitiko.

Sporos nelaidžios dažams, todėl dažant mėginį baziniais dažais, pavyzdžiui, metileno mėliu, jas kartais galima pamatyti kaip nenusidažiusias vietas.

Sporos struktūra daug sudėtingesnė nei vegetatyvinės ląstelės. Išorinis sluoksnis – egzosporiumas, plonas, pagamintas iš baltymo. Po juo yra sporos apvalkalėliai, sudaryti iš sporoms specifinių baltymų sluoksnių. Po to – korteksas, sudarytas iš proteoglikano, o viduje yra šerdis arba sporos protoplastas, kuris turi sienelę, citoplazminę membraną, nukleoidą.

Dipikolininė rūgštis (DPA) yra būdinga sporoms, bet neaptinkama vegetatyvinėse ląstelėse yra. Ji randama šerdyje. Sporose taip pat daug kalcio jonų, kurie jungiasi su DPA. DPA – kalcio kompleksai sudaro 10% sauso endosporos svorio.

Šerdis citoplazma gelio pavidalo, nes sporoje yra tik 10-30% vegetatyvinės ląstelės vandens kiekio. Dėl dehidratacijos spora atspari kaitinimui ir vandenilio peroksidui, o joje esantys fermentai yra neaktyvūs. Šerdis citoplazmos pH yra mažesnis nei vegetatyvinės ląstelės, be to joje yra specifinių baltymų – mažų rūgštinėjų terpių sporos baltymų – SASP („small acid soluble proteins“). SASP jungiasi prie DNR ir apsaugo ją nuo radiacijos ir karščio. Be to, jie yra anglies ir energijos šaltinis.

Endosporų susidarymas

Sporos susidaro ne tada, kai bakterijos dauginasi eksponentiškai, o kai augimas sulėtėja dėl maisto medžiagų išsekimo. Pvz., *Bacillus* pradeda sudaryti sporas, kuomet pradeda trūkti anglies arba azoto.

Sporuliacijos procese dalyvauja apie 200 genų. Aktyvuojami specifiniai sporoms genai, tarp jų ir *ssp*, *spo* (SASP). Vykstant sporuliacijai iš pradžių sutankėja DNR, po to formuojasi sporos pertvara, kuri apauga protoplastą. Iš pradžių apgaubtas protoplastas turi išorinę ir vidinę membranas. Po to išsivysto egzosporiumas. Tarp membranų formuojasi korteksas. Vyskta dehidratacija, gaminami

SASP ir DPA, susiformuoja apvalkalėlių sluoksniai. Galiausiai ląstelė lizuoja ir spora išeina į terpę.

1 lentelė. Endosporos ir vegetatyvinės ląstelės palyginimas

| Palyginimas | Vegetatyvinė ląstelė | spora |
|--|----------------------|-------------------|
| Kalcio kiekis | mažas | didelis |
| Dipikolininė rūgštis | - | + |
| Fermentų aktyvumas | aukštas | žemas |
| Metabolizmas (deguonies suvartojimas) | aktyvus | silpnas arba nėra |
| Makromolekulių sintezė | + | - |
| mRNR | + | Mažai arba nėra |
| Atsparumas karščiui, radiacijai, cheminėms veiksniam | žemas | aukštas |
| Lizocimo poveikis | Jautrios | atsparios |
| Vandens kiekis | 80-90% | 10-25% |
| Citoplazmos pH | 7.0 | 5.5-6.0 |
| SASP | - | + |

1. dalis Kapsulių dažymas

Darbo priemonės:

Mikroskopas su 100x didinančiu imersiniu objektyvu

imersinis aliejus

objektiniai stikleliai

spiritinė lempelė

mikrobiologinė kilpelė arba automatinė pipetė ir sterilūs antgaliai

1% Vandeningas kristalinio violeto tirpalas

20% vario sulfato ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) tirpalas

1.1 Dažymas Antonio metodu

Dažymo eiga:

1. Padaromas plonas bakterijų tepinėlis, išdžiovinamas ore
2. 2min dažomas kristaliniu violetu
3. dažai nuplaunami vario sulfato tirpalu
4. preparatas išdžiovinamas

1.2. Dažymas tušu

Darbo priemonės:

dengiamieji stikleliai

3x skiestas tušas

Karbolinis fuksinas: vanduo 1:1

Dažymo eiga:

1. Ant objektinio stiklelio užlašinama karbolio fuksino, į kurią pridedama bakterijų kultūros
2. Po 2-3min. užlašinama tušo, išmaišoma ir uždengiama dengiamuoju stikleliu

2 dalis. Sporų dažymas

2.1. Dažymas Šeferio būdu

Darbo priemonės:

Mikroskopas su 100x didinančiu imersiniu objektyvu

imersinis aliejus

objektiniai stikleliai

spiritinė lempelė

mikrobiologinė kilpelė arba automatinė pipetė ir sterilūs antgaliai

5 %malachito vandeninis tirpalas

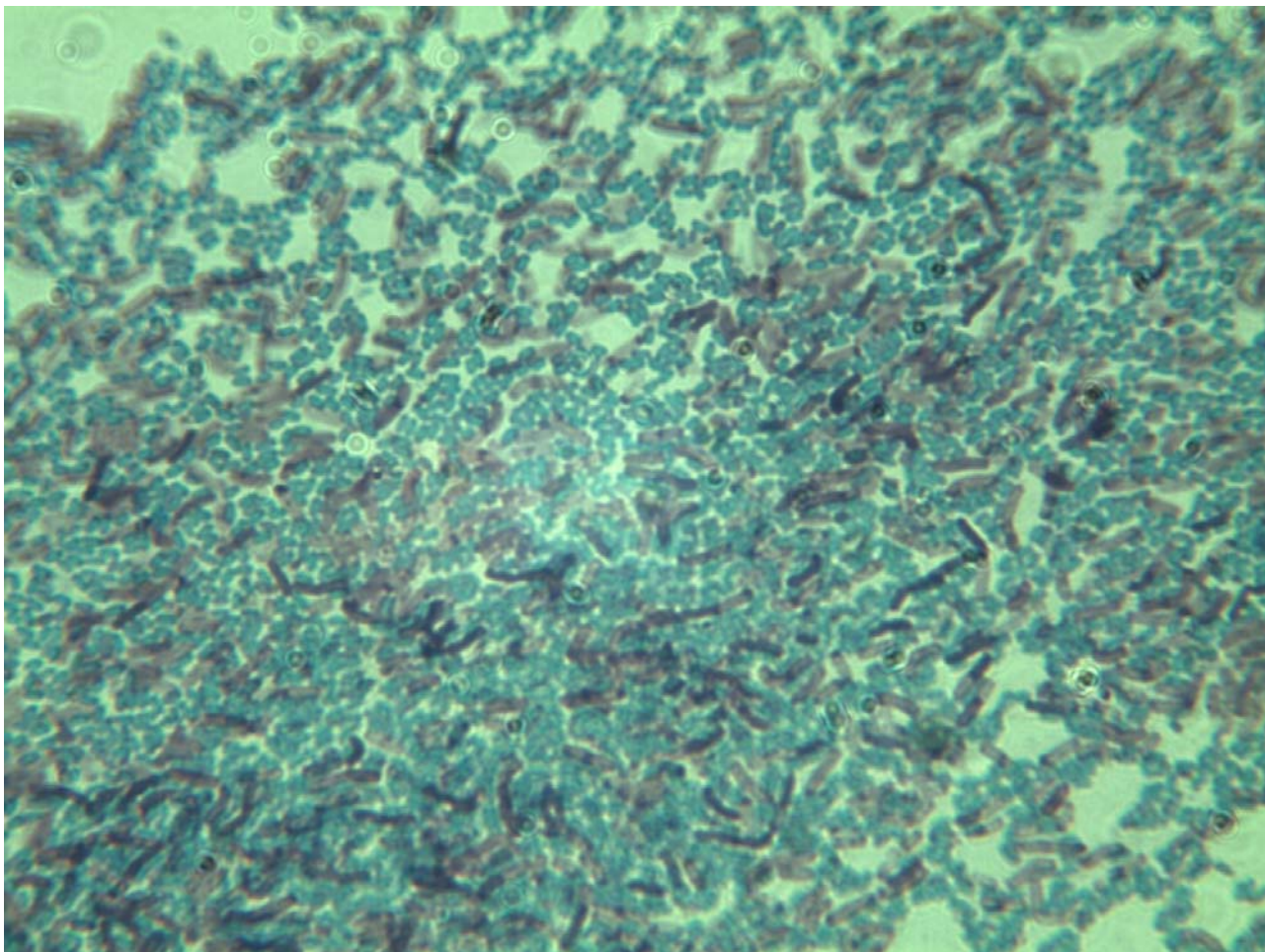
0,5% fuksino vandeninis tirpalas

Dažymo eiga:

1. padaromas *senos* kultūros tepinėlis, išdžiovinamas ore
2. fiksuojama spiritinės lempelės liepsnoje

3. 30-60s dažoma malachito tirpalu; 3-4 kartus pakaitinama, kol pradeda garuoti
4. dažnai nuplaunami vandeniu
5. 30s dažoma fuksino tirpalu
6. nuplaunama vandeniu ir nudžiovinama

1pav. Šeferio būdu nudažytos bakterijos *Bacillus subtilis*. Rausva spalva (fuksinu) nusidažiusios lazdelės formos vegetatyvinės ląstelės, žaliai (malachitu) – endosporos.



2.2. Ožėško būdas

Darbo priemonės:

0,5% HCl

karbolinis fuksinas (0.5% bazinio fuksino, 2,5% fenolio, 5%etanolio)

spiritinė lempelė

1% H₂SO₄

2,5% metileno mėlynojo tirpalas

Dažymo eiga:

1. Padaromas *senos* kultūros tepinėlis, išdžiovinamas ore
2. *nefiksuotas* tepinėlis užpilamas HCl
3. 2min kaitinamas virš liepsnos (kol pasirodys garai)
4. rūgštis perteklių nupilamas, preparatas uždengiamas filtrinio popieriaus juostele ir užpilama s fuksinu
5. dažoma 3-5min, kaitinant virš liepsnos, kol pradeda garuoti. Kad tepinėlis neįdžiūtų ant jo laikas nuo laiko lašinama dažų
6. preparatas praplaunamas vandeniu
7. užlašinama sieros rūgštis, laikoma 1-2min
8. tepinėlis vėl dažomas metileno mėlynojo tirpalu

Apibendrinkite rezultatus, gautus skirtingai dažant lentelėje:

| | Kultūra nr.1 | Kultūra nr.2 |
|-----------------------|--------------|--------------|
| | | |
| Kultūros pavadinimas | | |
| Ląstelių forma | | |
| Dažymasis pagal Gramą | | |
| Endosporos | | |
| Kapsulės | | |

Fluorescentinė mikroskopija. Dažymas fluorescentiniais dažais.

Stebint mėginius fluorescentiniu mikroskopu, mėginiai matomi dėl juose esančių fluorescuojančių medžiagų. Kad vyktų fluorescencija, mėginiai apšviečiami atitinkamo bangos ilgio šviesa. Fluorescuojančių dažų pavyzdžiai – akridino oranžinis, etidžio bromidas. Kai kuriais atvejais galima stebėti preparatus fluorescentiniu mikroskopu ir jų nedažant, dėl autofluorescencijos – natūralių ląstelių medžiagų, pavyzdžiui chlorofilo ir kitų pigmentų.

3 dalis Fluorescentinė mikroskopija. Cianobakterijų ir eukariotinių dumblių autofluorescencijos stebėjimas

Darbo priemonės:

Fluorescentinis mikroskopas su imersiniu objektyvu
objektiniai stikleliai
mikrobiologinė kilpelė arba automatinė pipetė ir sterilūs antgaliai
dumblių ir cianobakterijų kultūra

Darbo eiga:

1. Ant objektinio stiklelio užlašinkite lašą su cianobakterijų ar dumblių suspensija;
2. stebėkite mėginį naudodami imersinį objektyvą;
3. apšvieskite mėginį 546nm bangos ilgio šviesa ir stebėkite jo fluorescenciją;
4. palyginkite abu vaizdus, schematiškai nupieškite arba nufotografuokite juos.