



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

Katalazės ir oksidazės aktyvumo nustatymas. Amilazių, nukleazių ir proteazių išskyrimo nustatymas.

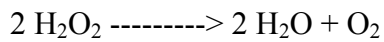
Mikroorganizmų fiziologinės ir biocheminės savybės

Mikroorganizmų fiziologinės ir biocheminės savybės apibūdinamos pagal mikroorganizmų sugebėjimą augti įvairiose mitybinėse terpėse ir vykdyti cheminių medžiagų, įeinančių į terpės sudėtį, transformacijas. Dažniausiai vertinamas įvairių anglies ir azoto junginių vartojimas, deguonies poreikis, mikroorganizmų sugebėjimas gaminti antibiotines medžiagas ir fermentus, mikroorganizmų apykaitos produktų – sieros vandenilio, amoniako, indolio, organinių rūgščių, dujų išskyrimas.

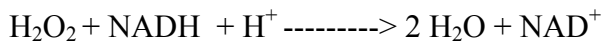
1.dalis Katalazės aktyvumo nustatymas

Esant deguonies ląstelėje susidaro keletas toksiškų produktų – vandenilio peroksidas, superoksidas, hidroksilo radikalas. Keli fermentai skaido šiuos junginius.

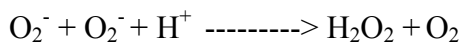
Katalazė skatina vandenilio peroksido skaidymą, susidarant deguoniui:



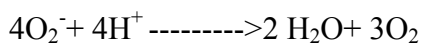
Kitas fermentas skaidantis vandenilio peroksidą yra **peroksidazė**:



Superoksidismutazė (SOD) transformuoja superoksidą:



Bendra SOD ir katalazės reakcija:



Beveik visi aerobai (ir fakultatyviniai) paprastai turi tiek SOD, tiek katalazę. Obligatiniai anaerobai ir daugelis mikroaerofilų katalazės negamina arba turi jo labai mažai, dėl to deguonis jiems toksiškas.

Darbo priemonės:

Objektinis stiklelis

Vandenilio peroksido tirpalas

Tiriamos bakterijų kultūros

Darbo eiga:

1. ant objektinio stiklelio užlašinkite lašą vandens ir paruošite tirštą tiriamų bakterijų suspensiją
2. užlašinkite vandenilio peroksido lašą; jei *iš karto* pradeda kilti burbuliukai – mėginyje veikia katalazė.

2.dalis Oksidazės aktyvumo nustatymas

Oksidacijos reakcija padeda atskirti *Enterobacteriaceae* šeimos bakterijas, kurios šio fermento neturi, nuo *Pseudomonaceae* ir kitų saprofitinių bakterijų, gaminančių šį fermentą.

Pozityvus oksidazės testas rodo citochromo oksidazės aktyvumą, oksidazė gali oksiduoti aromatinis aminos, pvz., TPD, susidarant spalvotiems galutiniams produktams.

Darbo priemonės:

1% TPD (metil - para- fenileno – diamino – dihidrochlorido) tirpalas

filtrinis popierius

plastmasinė kilpelė arba plastmasinė (arba medinė) lazdelė

Tiriamos bakterijų kultūros

Darbo eiga:

1. ant filtrinio popieriaus (ar stiklelio) užlašinkite lašą TPD
2. plastmasine kilpele paimkite bakterijų biomasės ir patrinkite į reagento lašo vietą; jei 30 sekundžių bėgyje atsiranda purpurinė spalva, testas teigiamas, bakterijos turi oksidazės;

Pastaba:

Nenaudokite metalinių įrankių, dėl galima gauti klaidingą teigiamą testo rezultatą. Spalvos pakitimas po 30 sekundžių reiškia kad testas neigiamas, oksidazės aktyvumo nėra.

Naudokite tik šviežią reagentą, jis turi būti bespalvis.

Mikroorganizmų sekretuojami fermentai.

Mikroorganizmai gali sekretuoti fermentus į aplinką.

Krakkolas – polisacharidas, gliukozės polimeras. Kai kurie mikroorganizmai jį naudoja kaip anglies šaltinį, tam jie turi suskaidyti krakkolą iki gliukozės monomerų, kurie gali patekti į ląstelę.

Fermentai, skaidantys krakkolą – α -amilazė, oligo-1,6-gliukozidaze.

Patogeniniai mikroorganizmai dažnai sekretuoja fermentus (egzotoksinus) į aplinką, kur jie skaido aplinkinius audinius. Tai gali būti lipazės, proteazės, nukleazės ir kt.

3.dalis Sekretuojamų amilazių aktyvumo nustatymas

Darbo priemonės:

Inkubatorius mikroorganizmų kultivavimui

Laminarinis boksas steriliam sėjimui

Spiritinė lempelė

Mikrobiologinė kilpelė

Petri lėkštelės su agarizuota LB terpe, į kurią papildomai įdėta 1 krakmolo;

Liugolio tirpalas;

Tiriamos bakterijų kultūros

Darbo eiga:

1. Žymekliu padalykite Petri lėkštelę su krakmolo turinčia terpe į sekcijas;
2. kilpele brūkšniu užsėkite tiriamas kultūras;
3. inkubuojame 12 – 48val;
4. po inkubacijos ant lėkštelėse išaugusių bakterijų kultūrų užpilama Liugolio tirpalas; Terpė, turinti krakmolo, nusidažo mėlynai, o hidrolizės zonos prie bakterijų kultūrų lieka bespalvės arba, jeigu krakmolai yra suskilę iki dekstrinų, nusidažo raudonai ruda spalva.

4.dalis Nukleazių (DNRazių) aktyvumo nustatymas

Darbo priemonės:

Petri lėkštelės su agarizuota LB terpe, į kurią papildomai įdedama DNR

1M HCl ;

Tiriamos bakterijų kultūros

Darbo eiga:

1. Žymekliu padalykite Petri lėkštelę su krakmolo turinčia terpe į sekcijas
2. kilpele brūkšniu užsėkite tiriamas
3. inkubuojame 12 – 48val;
4. po inkubacijos lėkštelė užliejama 1M HCl – DNR precipituoja, atsiranda drumstumas, skaidrios zonos aplink mikroorganizmus rodo DNR nukleazės veikimą – DNR hidrolizuota.

5. dalis Proteazių aktyvumo nustatymas

Daugelis bakterijų gali skaidyti baltymus į peptidus, po to iki amino rūgščių. Tai atlieka proteazės. Amino rūgštys gali patekti į bakterijos ląstelės vidų per membraną ir sunaudojamos.

Kazeino skaidymas

Darbo priemonės:

Petri lėkštelės su agarizuota LB terpe, į kurią papildomai įdedama pieno miltelių;
Tiriamos bakterijų kultūros

Darbo eiga:

5. Žymekliu padalykite Petri lėkštelę į sekcijas
6. kilpele brūkšniu užsėkite tiriamas kultūras
7. inkubuojame 12 – 48val;
8. po inkubacijos, jei veikia sekretuojamos proteazės, aplink kolonijas bus skaidresnės zonos

Želatinos skaidymas

Darbo priemonės:

Mėgintuvėliai su LB terpe, į kurią kaip standiklio vietoj agaro įdedama želatinos;
Tiriamos bakterijų kultūros

Darbo eiga:

1. kilpele užsėkite tiriamas kultūras į mėgintuvėlius;
2. inkubuojame 12 – 48val;
3. po inkubacijos, jei veikia sekretuojamos proteazės, želatina bus suskaidyta iki peptidų, o terpė suskystėjusi;

Apibendrinkite tyrimų rezultatus lentelėje:

	Kultūra nr.1	Kultūra nr.2
Kultūros pavadinimas		
Katalazē		
Oksidazē		
Amilazēs		
Nukleazēs		
Proteazēs		