



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

Mikroorganizmų kvėpavimo būdo nustatymas. Azoto fiksavimo nustatymas.

Mikroorganizmų kvėpavimo būdas.

Pagal deguonies panaudojimą mikroorganizmai skirstomi į aerobus, kuriems deguonis yra reikalingas (naudoja jį kvėpavimo proceso metu) ir anaerobus, kurių metabolizmui deguonis nėra reikalingas.

Obligatiniai aerobai negali augti nesant deguonies. **Fakultatyviniai aerobai** gali augti ir anaerobinėmis sąlygomis, nesant deguonies jie gauna energijos alternatyviu būdu (pvz., vykdo fermentaciją). Auginant aerobus reikalinga aeracija – į fermentatorius tiekiamas deguonis, auginant skystoje terpėje kolbose jos purtomos kratyklėje.

Griežti (obligatiniai) anaerobai neturi fermentų, galinčių detoksikuoti deguonies metabolizmo produktus peroksidą, superoksidą ir kt. (plačiau aprašyta laboratorinio darbo katalazės nustatymas aprašyme). Dėl to aerobinėse sąlygose jie žūsta. Auginant anaerobus, laboratoriniai indai užpildomi terpe iki viršaus. Pavirinus terpę iš jos pašalinama didžioji dalis dujų, tame tarpe ir deguonis. Norint pašalinti deguonį iš terpės, galima į terpę įdėti redukuojančio agento, pvz., tioglikato, kuris reaguoja su deguonimi ir redukuoja jį iki vandens. Į terpę įdėjus dažo reazurino, kuris esant deguonies, keičia spalvą, galima matyti, kiek giliai į terpę yra įsiskverbęs deguonis. Ypatingai jautrūs griežti anaerobai žūsta net nuo trumpo kontakto su deguonimi, jie persėjami ir auginami specialiuose įrenginiuose užpildytuose dujomis be deguonies.

Gamtoje anaerobai paplitę anoksinėje aplinkoje – tai gali ežerų nuosėdos, pelkės, požeminiai vandenys, užtvindytos pievos, o taip pat gyvūnų žarnynas, sandariai užkonservuoti indai su maistu.

Aerotolerantiniai anaerobai gali augti aerobinėse sąlygose (sugeba detoksikuoti deguonies produktus), tačiau nenaudoja deguonies kvėpavimo grandinėje.

Mikroaerofilai – tai aerobai, kurių augimui reikalinga mažesnė deguonies koncentracija, negu yra atmosferoje (21%), dažniausiai tarp 5% ir 15%. Mikroaerofilinės sąlygos gamtoje susidaro ties aerobinės ir anaerobinės aplinkos riba, taip pat, pvz., gyvūnų organizmuose.

Mikroorganizmai gali vykdyti respiraciją ir augdami anaerobinėmis sąlygomis, jei kaip galutinį elektronų pernešimo grandinėje atlieka ne O_2 , o kitos medžiagos, kaip SO_4^{2-} arba NO_3^- . Tai vadinama anaerobine respiracija.

1. dalis Kvėpavimo būdo nustatymas

Darbo priemonės:

Inkubatorius mikroorganizmų kultivavimui

Laminarinis boksas steriliai sėjimui

Spiritinė lempelė

Mikrobiologinė kilpelė arba adata

Verdančio vandens vonia

Mėgintuvėliai su agarizuota LB terpe

Tiriamos bakterijų kultūros

Darbo eiga:

1. Užvirinkite terpę mėgintuvėliuose;
2. atvėsinkit mėgintuvėlius iki $40^0 - 45^0$ C;
3. užsėkite bakterijas į mėgintuvėlius dūriu – taip kad kilpelė pasiektų mėgintuvėlio dugną;
4. inkubuojame 12-48 val.
5. nustatykite kaip mikroorganizmai pasiskirstė terpės tūryje, schematiškai nupieškite arba nufotografuokite mėgintuvėlius.

Obligatiniai aerobai auga tik mėgintuvėlio paviršiuje, fakultatyviniai aerobai auga ne tik viršuje bet ir likusiame mėgintuvėlio tūryje. Anaerobai auga mėgintuvėlio dugne. Fakultatyviniai anerobai

paprastai būna pasiskirstę visame terpės tūryje. Mikroaerofilai auga nedidelėje zonoje netoli nuo terpės paviršiaus (žr. 1 pav.), kur prasiskverbusio iš oro deguonies kiekis yra tinkamas jų augimui.

Dažniausios klaidos:

Nepakankamas mėgintuvėlių atvėsinimas prieš sėjant. Jei terpė per karšta sėjami mikroorganizmai gali žūti.

Per didelis užsėjamų mikroorganizmų kiekis. Sėjimui panaudota biomasė nusėda į mėgintuvėlio dugną ir gali būti klaidingai įvertinta kaip anaerobų augimas dugne. Užsėjus biomasės neturėtų matytis.

Azoto fiksavimas

Azotas būtinas mikroorganizmų augimui. Daugelis mikroorganizmų gali naudoti azotą, įeinantį į organinius junginius, nitrato ar amonio druskas, tačiau nemaža dalis gali fiksuoti ir atmosferoje esantį azotą. Tai gram neigiamos šaknų gumbelinės bakterijos (*Rhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*) kurios sudaro simbiozę su ankštiniais augalais, aktinomicetai *Frankia*, sudarantys simbiozę su alksniais, laisvai dirvoje gyvenančios bakterijos, kaip *Azotobacter*, *Clostridium*, *Bacillus*. Azotą fiksuoja daugelis cianobakterijų. Azoto fiksacija būdinga vien tik prokariotams.

Deguonis reikalingas energijos gavimui, bet jis taip pat ir inaktyvuoja fermentą nitrogenazę, kuri fiksuoja azotą. Dėl to azoto fiksacija dažniausiai vyksta mikroaerofilinėmis sąlygomis. Gumbelinių bakterijų gumbeliuose O₂ kiekis reguliuojamas leghemoglobinu, kuris riša O₂. Surišto (komplekse su leghemoglobinu) ir nesurišto deguonies santykis yra 10000/1.

Frankia apsaugo savo nitrogenazę ląstelių galuose esančiuose specialiuose sustorėjimuose su storomis sienelėmis.

Cianobakterijoje *Anabaena* nitrogenazę atskirta specialiose ląstelėse – heterocistose, kuriose nevyksta fotosintezė, ir kurios turi storesnes sieneles, saugančias nuo aplinkoje esančio deguonies.

Azotobacter nitrogenazę apsaugoma nuo deguonies sudarant jos kompleksą su specialiu baltymu.

Kituose mikroorganizmuose nitrogenazę gali būti apsaugota nuo deguonies arba greit šalinant deguonį respiracijos metu arba O₂ sulaikančiais gleivių sluoksniais.

Azoto fiksatoriai aptinkami kultivuojant mikroorganizmus terpėje be azoto šaltinio. Joje gali augti tik mikroorganizmai sugebantys pasisavinti atmosferos azotą.

2. dalis. Azoto fiksavimo nustatymas

Darbo priemonės:

Mėgintuvėliai su beazotine pusiau standžia Rennie terpe
Tiriamos bakterijų kultūros

Darbo eiga:

1. užsėkite bakterijas į mėgintuvėlius dūriu
2. inkubuojame kelias paras
3. nustatykite ar išaugo mikroorganizmai ir kaip jie pasiskirstė terpės tūryje, schematiškai nupieškite arba nufotografuokite mėgintuvėlius.

1pav. Mikroaerofilinis filoferos mikroorganizmų, fiksuojančių atmosferos azotą, augimas

