



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 mokymo(si) metodai ir naujausios technologijos gamtos mokslų bakalauro rengimui**

MIKROBIOLOGIJA

Laboratorinis darbas.

Denitrifikacija

Darbo tikslas – nustatyti ar tiriami mikroorganizmai vykdo nitrato redukciją

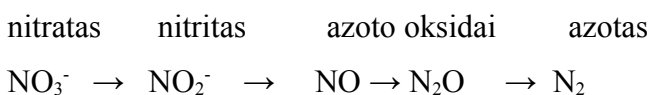
Darbo užduotys:

1. užauginti tiriamas kultūras nitrato turinčioje terpėje;
2. nustatyti nitrato buvimą terpėje po inkubavimo;
3. nustatyti nitrato buvimą terpėje po inkubavimo.

Nitrato redukcija

Mikroorganizmų kvėpavimo grandinėse galutinio elektronų akceptorius vaidmenį gali atlikti ne deguonis, kaip visose eukariotų ląstelėse, o kiti junginiai, pavyzdžiui SO_4^{2-} arba NO_3^- , Fe^{3+} , dimetilsulfoksidas (DMSO), kai kurie organiniai junginiai. Tai vadinama anaerobine respiracija.

Vienas iš dažniausių alternatyvių elektronų akceptorių kvėpavimo grandinėje yra nitratas (NO_3^-), jis redukuojamas iki nitrito (NO_2^-), paskui iki kitų junginių - dažniausiai dujų azoto (N_2) arba azoto oksidų. Nitrato redukcijos etapai:



Azotas ir azoto oksidai – dujos, kurios šio proceso metu patenka į atmosferą. Reakcijas vykdančios fermentai (nitrato, nitrito ir azoto oksidų reduktazės veikia anoksinėmis sąlygomis). Kai kurie mikroorganizmai, pavyzdžiui *E.coli*, vykdo tik pirmąjį proceso etapą.

Nitrato pavertimas azoto dujomis vadinamas **denitrifikacija**. Tai pagrindinis biologinis procesas, kurio metu gamtoje susidaro N_2 . Denitrifikacija ūkiniu požiūriu yra nepalanki augalininkystei, nes dėl šio proceso dirvožemis netenka augalams prieinamo azoto (nitrato pavidalu). Nutekamojo vandens valymo įrengimuose, esant biologiniam užterštumui denitrifikacija palanki, nes pašalina iš sistemos azotą (jis patenka į atmosferą N_2 pavidalu).

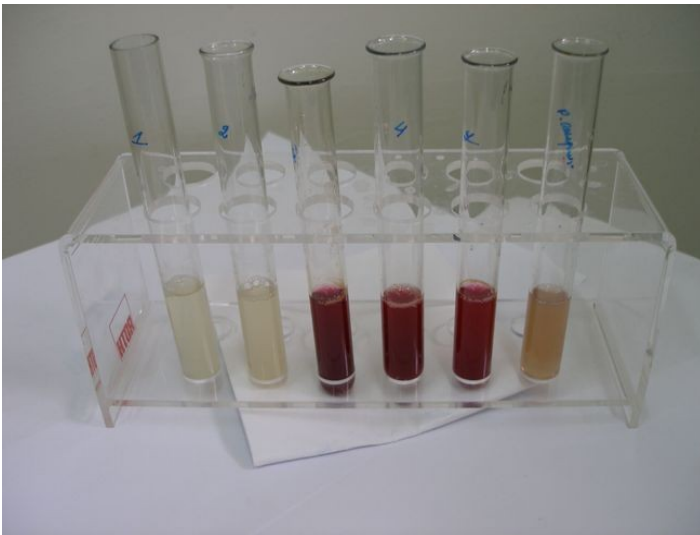
Nitrato redukcijos nustatymas

Sugebėjimą redukuoti nitratai galima nustatyti auginant mikroorganizmus ant terpės su nitratu. Užaugus bakterijų kultūrai, į terpę pridedama reagentų – sulfanilinės rūgšties ir N, N dimetil – alfa – naftilamino. Jei terpėje yra nitrito, susidariusio mikroorganizmams redukuojant nitratai, terpė nusidažo raudona spalva.

Jei terpės spalva nepakinta, tai gali reikšti arba tai, kad nitratas neredukuotas arba, kad jis redukuotas iki azoto dujų. Tam patikrinti į terpę įdedama cinko miltelių. Jei terpėje dar yra nitrato, esant cinko jis redukuojamas iki nitrito, o kadangi terpėje yra aukščiau paminėtų reagentų, atsiranda raudona spalva. Taigi šiuo atveju raudona spalva rodo neigiamą reakciją – šiuo atveju nitrato redukciją sukėlė cinkas, o ne bakterijų veikla.

Jei įdėjus cinko spalva nepakinta, reiškia, terpėje jau nebuvo likę nitrato, taigi jis redukuotas iki dujų.

Dujų (azoto, azoto oksidų) išskyrimą galima nustatyti ir taip: įdėti į mėgintuvėlį su nitratine terpe apverstą mažą mėgintuvėlį. Jei mikroorganizmų augimo metu išsiskirs dujos, jos kaupsis apverstame mėgintuvėlyje.



1pav. Mėgintuvėliai su bakterijų kultūra, auginta nitratinėje terpėje. Įdėjus reagentų, raudona spalva mėgintuvėliuose rodo, kad yra nitrito. Kairėje pusėje esančiuose dviejuose mėgintuvėliuose nitrito nėra.



2pav. Į pirmuosius du mėgintuvėlius įberta cinko miltelių (matosi nuosėdos dugne). Raudona spalva neatsirado (nitritas nesusidarė), vadinasi prieš įberiant cinko, terpėje nebuvo nitrato.

Darbo priemonės:

Inkubatorius - mikroorganizmų kultivavimui

Laminarinis boksas steriliam sėjimui

Spiritinė lempelė

Mikrobiologinė kilpelė arba adata

Mėgintuvėliai su nitratine terpe

Tiriamos bakterijų kultūros
sulfanilinės rūgšties tirpalas
N, N dimetil – alfa – naftilamino tirpalas
Cinko milteliai

Darbo eiga:

1. Užsėkite bakterijas į mėgintuvėlius;
2. Inkubuojujame 12 val (arba ilgiau, priklausomai nuo kultivuojamų bakterijų augimo greičio);
3. Į kiekvieną mėgintuvėlį įlašinkite po 5 lašus sulfanilinės rūgšties tirpalo ir dimetilnaftilamino tirpalo;
4. Stebėkite terpės spalvos pokytį;
5. Jei per 5 min. spalva nepakito, į mėgintuvėlius įberkite cinko miltelių;
6. Stebėkite terpės spalvos pokytį (po 1 – 15min.), pasižymėkite rezultatus, nufotografuokite mėgintuvėlius;
7. Užrašykite išvadas atsakydami į klausimus: ar jūsų tiriami mikroorganizmai gali redukuoti nitrata? Jei taip, koks galutinis šios redukcijos junginys?

Dėmesio. Netyčia užsilašinus reagentų ant rankų nedelsiant jas nuplaukite.

Literatūra:

Robert A. Pollack ir kt. Laboratory Exercises in Microbiology, 2005.
Ian L. Pepper, Charles P. Gerba. Environmental Microbiology, 2004.
Michael T. Madigan ir kt. Brock Biology of Microorganisms, 2008.