

Eesti koolinoorte 52. bioloogiaolümpiaad

lõppvooru mikrobioloogia praktikum



Eesnimi:

Perekonnanimi:

Kool:

Klass:

Õpetaja:

Juhendaja: Triinu Visnapuu, TÜ MRI geneetika teadur

1. Pärmide arvukuse määramine plaadimeetodil

Sissejuhatus:

Pärmid on enamasti üherakulised eukarüootsed organismid, mis paljunevad pungumisega. Erinevad pärmide liigid on olulised nii looduses kui ka inimeste elus. Pagaripärmi (*Saccharomyces cerevisiae*) kasutatakse laialdaselt toiduainetööstuses pagaritoodete, veini ja õlle tootmiseks. Kuna pagaripärmi on suhteliselt lihtne kasvatada ja uurida, siis on see üheks eukarüootseks mudelorganismiks, mida kasutatakse erinevates geneetilistes ja rakubioloogilistes uuringutes. Mõned pärmiliigid (näiteks *Candida albicans*) võivad olla tõvestavad ja tekitada infektsioone. Kuna pärmide arvukusest võivad sõltuda nii toote ohutus kui omadused, siis on oluline teada pärmirakkude arvukust.

Toitaineterikkale söötmele on külvatud *Saccharomyces cerevisiae* rakke sisaldavat lahust. Seejärel kasvatati pärmirakke 2 päeva, et söötme pinnale moodustuksid pärmikolooniad.

Materjalid:

Saccharomyces cerevisiae kolooniad YPD söötmeplaadil, marker

Praktiline töö:

- Loe kokku söötmele olevad *Saccharomyces cerevisiae* kolooniad. Markeeri loetud kolooniad tassi põhjal, et ei toimuks ühe koloonia mitmekordset arvestamist.

Söötmeplaadil nr. oli kolooniat.

- Arvuta välja, mitu kolooniat moodustavat rakku (*CFU – colony forming unit*) on 1 ml alglahuses, kui söötmetassi pinnale külvati 100 µl lahjendatud kultuuri. Lahjendus on märgitud tassi põhjale.

Vastus: Algekultuuris oli CFU/ml.

- Millised tegurid mõjutavad pärmirakkude arukust?
- Ensüüm zümolüaas (*zymolyase*) hüdrolüüsib β -1,3 glükaane. Kuidas võiks selle ensüümiga töötlemine mõjutada pärmirakke ja miks?

2. Bakteriliikide eristamine gramreaktiivsuse ja fenotüübiliste tunnuste abil

Sissejuhatus:

Puhaskultuuriks nimetatakse ainult ühe mikroobitüve rakke sisaldavat kultuuri. Selleks, et mikroobi identifitseerida ja teistest bakteritest eristada, tuleb kindlaks teha mitmeid morfoloogilisi, geno- ja fenotüübilisi tunnuseid. Bakterite hulgas on võimalik eristada kahte suurt rühma: gramnegatiivseid ja -positiivseid baktereid. Selline erinevus tuleneb bakterite polüsahhariidse rakukesta põhilise komponendi, peptidoglükaani, erinevast paksusest. Lisaks uuritakse bakterite määramisel erinevate süsinikuallikate kasutamist ja ensüümide olemasolu.

Söötmetassile on külvatud bakteritüvi, mis võib olla grampositiivne *Bacillus pumilus*, gramnegatiivne *Enterobacter aerogenes* või gramnegatiivne *Pseudomonas grimontii*. Selleks, et erinevaid bakteriliike eristada, tuleb määrata gramreaktiivsust nii kiirmeetodil kui ka mikroskoopiliselt ning teha kindlaks bakteri võime erinevaid aineid (kaseiin, tsitraat, DNA) lagundada.

Materjalid:

toiteagari tassile külvatud bakteritüvi,
destilleeritud vesi,
alusklaas,
pinsetid,
gaasipõleti,
tikud,
plastikust külviaasad,
Huckeri kristallviolett,
joodi sisaldav Lugoli lahus,
etanol (96°),
safraniin,
pesunõu,
filterpaberid,
valgusmikroskoop,
immersiooniõli,
objektiivipuhastuspaber,
eetri-etanooli segu,
KOH lahus (3%),
piima sisaldav tardsööde, kuhu on külvatud bakteritüvi,
DNA-d sisaldav tardsööde, kuhu on külvatud bakteritüvi,
tsitraati sisaldava tardsöötmeiga katseklaas, kuhu on külvatud bakteritüvi,
1 M HCl lahus,
katseklaaside alus,
automaatpipeti otsikud,
automaatpipett,
must paber

Praktiline töö:

A. Gramreaktiivsuse määramine Grami värvimisega

- **Valmista bakteritüvest mikroskoobipreparaat, värvi see vastavalt Grami värvimise meetodikale ning vaatele seda valgusmikroskoobiga õliimmersioonisüsteemis.**
 - 1) Võta puhas alusklaas.
 - 2) Aseta alusklaasile veepudelist tilk destilleeritud vett. Võta puhta plastikust külviaasaga söötmetassilt veidi materjali ja suspendeeri veetilgas. **Ära võta palju rakumassi!** Piisab sellest, kui vedelikutilk on peale rakkude võtmist kergelt hägune.
 - 3) Hajuta veetilk alusklaasil laiali, et preparaat paremini kuivaks. Jäta see lauale kuivama.
 - 4) Fikseeri kuivanud preparaat termiliselt. Selleks süüta gaasipõleti ja tõmba rakkudega alusklaas seda pinsettide vahel hoides mõned korrad läbi leegi nii, et katsudes on klaas kuum. **Ära kuumuta märga preparaati ega lase materjali kõrbema!**
 - 5) Värvü fikseeritud preparaati 1 min **Huckeri kristallvioletiga**. Selleks kata preparaat kõigepealt kristallvioletiga. 1 minuti pärast pese alusklaasi pinsettide vahel hoides ettevaatlikult destilleeritud veega üleliigne värv pesunõusse. Pesuetapi võid lõpetada kui preparaadilt enam värvilist vett ei eraldu.
 - 6) Kata preparaat 1 minutiks Lugoli lahusega.
 - 7) Pese preparaat uuesti destilleeritud veega.
 - 8) Kata preparaat etanooliga ja pese destilleeritud veega. **Etanool ei tohi preparaadile jääda kauemaks kui 30 sekundiks!**
 - 9) Kuivata veetilgad ettevaatlikult filterpaberiribaga ja värvi preparaat **safraniiniga**. Safraniinil lasta toimida kuni 30 sekundit.
 - 10) Kuivata preparaadi servad filterpaberiga, lase preparaadil kuivada ja mikroskoobi see õliimmersioonisüsteemis. Selleks asetä preparaadile tilk immersiooniõli, keera vaatluseks alla õlis kasutatav objektiiv (100x suurendus) ja fokuseeri preparaat kasutades mikroskoobi makro- ja mikrokruvisid. Preparaati esemelaual saad liigutada kasutades vastavat hooba. Objektiiv peab olema õlililga sees.
 - 11) **Valmis preparaati näita juhendajale!**
 - 12) Peale kasutamist puhasta objektiiv spetsiaalse puhastuspaberiga, mida niisuta eetri-etanooli seguga.
- On teada, et gramnegatiivseid bakterirakke katab õhem peptidoglükokaankiht ning moodustunud kristallvioleti ja joodi kompleksi on rakkudest võimalik etanooliga välja pesta. Grampositiivsed rakud värvuvad esimese värvimise etapiga ning seda värvust ei kaota nad ka neid etanooliga töödeldes. **Leia, millist tüüpi rakkudega on sinu tüve puhul tegemist.**

Tüve nr. rakud värvusid (mis värvi?). Seega on tegemist gram..... tüvega.

B. Kiirmeetod gramreaktiivsuse määramiseks

- Tee samale tüvele gramreaktiivsuse kiirtest ning võrdle seda preparaadi analüüsil saadud tulemusega.
 - 1) Pane alusklaasile paar tilka 3% KOH lahust.
 - 2) Võta plastikust külviaasaga toiteagari tassilt baterirakke ning sega neid vedelikutilgas ~1 minut.
 - 3) Tõsta külviaasaga suspensiooni 1-2 cm kõrgusele ja jälgi **rakkude lüüsumisel moodustuvate limajate niitide** teket.
 - 4) Limajad niidid moodustuvad siis, kui rakud lüüsuvad, sest kaitsev peptidoglükaankiht ei ole piisavalt paks.
- Tüve nr. rakud lüüsuvad/ei lüüsunud (tõmba vale variant maha). Seega on tegemist gram..... tüvega.
- Milliste ainete/molekulide toimetel bakterite peptidoglükaanist rakukest laguneb?

C. Bakteritüve fenotüübiliste tunnuste kindlakstegemine

- Bakteritüve võimet lagundada kaseiini, tsitraati ja DNA-d saad kindlaks teha kasutades vastavat substraati sisaldavat söödet. Uuri, kas tüvi kasutab neid aineid.
 - a) **Kaseiini** lagundamise testimine
Uuri piima sisaldaval tassil bakteri külvihoone ümbrust. **Läbipaistvate tsoonide teke** näitab, et mikroob on piimavalgu ära lagundanud. Parema kontrastsuse jaoks võid kasutada taustana musta paberit.
 - b) **DNA** lagundamise testimine
Võta DNA-d sisaldava söötmega tass, kuhu on külvatud bakteritüvi ja pipeteeri sellele 3 ml 1 M HCl lahust. DNA moodustab happega reageerides valkja sademe. Uuri tumeda paberi taustal, kas külvihoone ümbrusesse on tekkinud **läbipaistev tsoon**, mis näitab, et DNA on ära lagundatud.
 - c) **Tsitraadi** kasutamise testimine
Võta tsitraati sisaldava kaldagariga katseklaas. Uuri, milline värvusreaktsioon on toimunud. Algselt on sööde roheline ning **värvimuutus siniseks** näitab aluselist keskkonda ning see omakorda tsitraadi kasutamist. Võrdle katseklaasi

kontrollsöötmega, kuhu rakke külvatud ei ole.

- **Saadud tulemused kannab tabelisse!**

Tüve nr.	Gramreaktiivsus	Kaseiini lagundamine	DNA lagundamine	Tsitraadi kasutamine

- **Määra tehtud testide alusel, millise bakteriliigiga on tegemist.** On teada, et kartulist isoleeritud *Bacillus pumilus* lagundab kõiki substraate, looduslikust veest pärinev *Pseudomonas grimontii* ei lagunda DNA-d ning soolestiku asukas *Enterobacter aerogenes* kasutab ainult tsitraati.

Vastus: Tüvi nr. on

- **Miks toodavad mikroobid rakuväliseid ensüüme? Nimeta rakuväliseid ensüüme.**

SÖÖTMED JA LAHUSED:

Eetri-etanooli lahus

70% eetrit ja 30% etanooli

Huckeri kristallviolett (ammooniumoksalaat-kristallviolett)

2 g kristallvioletti 20 ml 95% etanoolis ning 0.8 g ammooniumoksalaati 80 ml destilleeritud vees. Lahused kokku segatud ja filtreeritud.

Lugoli lahus

2 g KJ, 1 g J kristalle 300 ml destilleeritud vees

Safraniin

0.25 g safraniini 10 ml 96° etanoolis, lisatud 90 ml destilleeritud vett

Toiteagar

1000 ml destilleeritud vee kohta 3 g lihaekstrakti, 5 g peptooni. Tardsöötme saamiseks lisatud 20 g agarit. Autoklaavitud 15 min 121°C. Valatud kuumalt välja 20 ml kaupa steriilsetesse tassidesse.

YPD sööde (pärmisööde)

1000 ml destilleeritud vee kohta 10 g pärmiekstrakti, 20 g peptooni, 20 g glükoosi. Tardsöötme saamiseks lisatud 20 g agarit. Autoklaavitud 15 min 121°C. Valatud kuumalt välja 20 ml kaupa steriilsetesse tassidesse.