

Eesti koolinoorte 53. bioloogiaolümpiaadi lõppvoor

Molekulaarbioloogia



Eesnimi:

Perekonnanimi:

Kool:

Klass :

Töö kood (leiad töölaualt) :

Õppejõud: Andres Ainelõ, Hanna Moor, Ilja Gaidutšik

Tundmatu bakteritüve määramine

Mikrobioloogia laborisse tuli tööle noor ja entusiastlik tudeng, kellele anti esimese asjana ülesandeks laboris kasutatavate bakteritüvede külvamine värsketele söötmetassidele. Tudeng sai tööga hiilgavalt hakkama, kuid järgmisel päeval tase termostaadist võttes tabas teda ebameeldiv üllatus – ta ei olnud ühelegi tassile bakteritüve nimetust peale kirjutanud! Ausa inimesena tunnistas ta oma eksimuse kohe üles. Juhendaja ei teinud sellest suuremat numbrit ning leidis, et nüüd ongi tudengil hea võimalus harjutada bakterite määramist biokeemiliste ja molekulaarbioloogiliste testide abil. Täna sees praktikumis saad Sinagi aimu, kuidas see töö välja näeb, kui sooritad ühe segiläinud bakteritüve peal rea teste ning määrad, millise bakteriga on tegemist.

NB!

Enne töö alustamist loe kindlasti läbi automaatpipeti kasutamise õpetus! Järgi iga testi juures võimalikke ohutust puudutavaid märkusi, mis on **paksus kirjas** välja toodud! Kontrolli iga töö juures olevat vahendite nimekirja ning kui Sinu töölaual miski puudub, anna assistendile kohe märku!

Valikvastustega küsimuste puhul tõmba õigele variandile ring ümber! Arvutusülesannetes näita arvutuskäik ja lõppvastus!

Soovitame tungivalt alustada tööd 1. testist, kuna DNA proov peab kindlasti vähemalt 50 minutit enne praktikumi lõppu assistentide kätte jõudma!

Üldised vahendid

- 2-20 µl automaatpipett
- 10-100 või 20-200 µl automaatpipett
- 100-1000 µl automaatpipett
- Kollased pipetiotsikud
- Sinised pipetiotsikud
- Petri tass uuritava bakteriga

Automaatpipeti kasutamise õpetus

Automaatpipetiga saab täpselt pipeteerida enda valitud mahtu vedelikku. Igal automaatpipetil on peal mahuvahemik, milles seda reguleerida saab. Vahemik on antud mikrolitrites. Mahtu reguleeritakse pipeti ülaosas musta ratast keerates. Valitud maht on näha aknakeses. Erineva värviga on tähistatud kas mikrolitri komakoht (kõige alumine number) või milliliiter (kõige ülemine number). Näiteks: „100“ = 100 µl, kuid kui esimene number on erinevat värvi, siis „100“ = 1ml = 1000 µl. Samamoodi „100“ = 10,0 µl. **Ole hoolas ja ära kunagi keera pipetti selle mõõtevahemikust välja! Võid pipeti rikkuda!**

Pipetti kasutatakse alati koos vastava pipetiotsikuga: kuni 1 ml võimaldavale pipetile sinised, väiksematele kollased. Otsiku võtmiseks suru pipett lihtsalt otse karbis oleva otsiku külge. Pärast pipeteerimist vajuta pipetinupu juures olevale klahvile, et otsik prüginousse lasta. Ära otsikut käega puutu! **Laboriassistendid jälgivad selle punkti täitmist eriti rangelt! Ilma otsikuta reostad pipeti!**

Pipeteerimiseks kasuta nuppu pipeti otsas. Nupp liigub alla kahes järgus: esmalt kuni mõõdupunktini ja siis juba raskemalt edasi tühjendamispunktini. Valitud ruumala sisse võtmiseks vajuta nupp kõigepealt mõõdupunktini alla, pane otsik vedelikku ja lase nupp sujuvalt üles. Vedeliku välja laskmiseks teise tuubi vajuta nupp sujuvalt täiesti alla. Mõõdupunktist üle vajutamine tühjendab otsiku täielikult.

Test 1. DNA restriksioonanalüüs

On teada, et laboris suudeti kõigisse uuritavatesse bakteritüvedesse viia üks kahest plasmiidist, A või B. Plasmiidid A ja B on täpselt sama suured ja mõlemasse on lisaks kloonitud sama geenifragment, kasutades kas restriктаasi EcoRI (plasmiid A) või BamHI (plasmiid B). Kõigi tüvede peal kasutati plasmidi eraldamise komplekti ning määrati saadud DNA kontsentratsioon. See aga ei ütle, kumma plasmiidiga on tegemist. Täpseks tuvastamiseks tuleks tundmatut plasmidi lõigata ühega kloonimiseks kasutatud restriктаasidest ning vaadelda tekkinud lõikumustrit. Lihtsaim viis seda teha on geelelektroforees, kus DNA fragmendid lahutatakse elektriväljas agarosgeelis suuruse järgi ning neid vaadeldakse visuaalselt.

Vahendid:

- Bakterist eraldatud DNA lahus, 116 ng/μl (**DNA**, saad assistendilt)
- 10-kordne restriksioonipuhver (**10x**)
- Vesi (**H₂O**)
- Restriктаas BamHI (**BHI**, jäätopsis)
- Elektroforeesivärv (**EF**)
- Stopper
- Tühi reaktsioonituub

Töö käik:

DNA lõikamiseks tuleb segada kokku restriksioonisegu kogumahus 20 μl. Selleks pipeteeri reaktsioonituubi vesi, 0,65 μg DNA-d, 2 μl 10x puhvrit ja 2 μl restriктаasi. NB! Restriктаas lisa viimasena!

1.1. Arvuta, mitu mikrolitrit DNA lahust ja vett pead restriksioonisegusse segama! (2p)
Kutsu assistent oma vastust kontrollima, temalt saad allkirja ja DNA lahuse.

DNA lahuse kontsentratsioon on 116 ng/μl. Vaja on 0,65 μg = 650 ng DNA-d. See teeb $650 \text{ ng} / 116 \text{ ng}/\mu\text{l} \approx 5,6 \mu\text{l}$. Vett kulub seega $20 - 5,6 - 2 - 2 = 10,4 \mu\text{l}$

Restriksioonisegusse kulub 5,6 μl DNA lahust ja 10,4 μl vett.

Assistendi allkiri:.....

Reaktsiooni läbiviimiseks too oma segu kõigepealt 10 minutiks 37 °C termostaati ning tõsta seejärel 10 minutiks 80 °C termostaati, aega saad stopperiga jälgida. Järgnevalt lisa oma proovile 3 μl foreesivärvi ning too oma **töö koodiga** proov laboriassistendile **hiljemalt 60 minutit** enne praktikumi lõppu! Hilisemaid proove ei arvestata!

Assistendid lahutavad kõik proovid elektroforeesil ning toovad Teile proovide pildid hiljemalt 20 minutit enne praktikumi lõppu tagasi. Pildi põhjal otsusta, kumma plasmiidiga on tegemist. Ooteaegade jooksul vasta järgnevatele küsimustele!

1.2. Miks liiguvad pikemad DNA molekulid geelis aeglasemalt kui lühikesed? (1p)

a) pikkadel DNA molekulidel on suurem füüsiline takistus läbi geeli liikumisel

- b) pikkadel DNA molekulidel on suurem kogulaeng
- c) pikkadel DNA molekulidel on väiksem laeng pikkusühiku kohta
- d) pikad DNA molekulid ei liigu geelis aeglasemalt, neile mõjub elektriväljas suurem jõud

Suuruse järgi lahutamine põhinebki asjaolul, et DNA fragmentidel on kõigil võrdne laeng pikkusühiku kohta (-2 iga aluspaari kohta kaksikheeliksis). See tähendab, et elektriväljas lükkab iga aluspaari võrdne jõud. Need aluspaarid, mis on ühendatud pikemateks fragmentideks, jäävad geeli pooridesse kergemini kinni ning liiguvad aeglasemalt.

1.3. Millised väited on tõesed restriktsooniensüümide kohta? (1p)

a) restriktsooniensüümid lõikavad reeglina 4-8 nukleotiidi pikkuseid

äratundmisjärjestusi

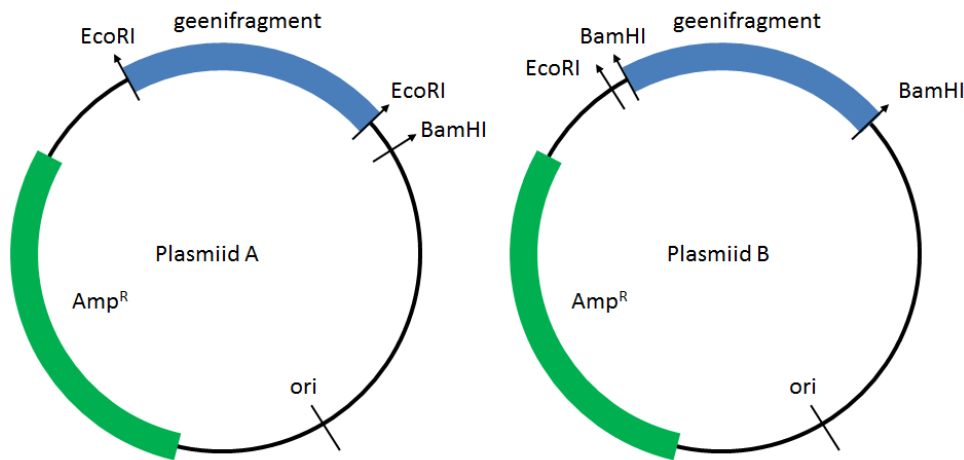
- b) restriktsooniensüümid kuuluvad endopeptidaaside hulka
- c) restriktsooniensüümid töötavad kõige efektiivsemalt +6 °C juures
- d) restriktsooniensüüme ei saa elusrakkudes esineda, kuna need hävitaksid genoomse DNA

e) restriktsooniensüümid ei lõika üheaheelalist DNA-d

Restriktsooniensüümid on küll „endo“, st. lõikavad ahela keskelt katki, kuid nad on endo**nukleasid**. Endopeptidaas on ensüüm, mis lõikab peptiidahela ehk valgu keskele. Võrdluseks oleksid „ekso“ ensüümid, mis lõikavad polümeeriahela otsast järjest lülisid ära.

Samuti on paljudes bakteriliikides raku sees restriktsooniensüümid, kuid sel juhul on olemas ka bakteri enda DNA-d kaitsev ensüüm – metülaas. See metüleerib (lisab lämmastikalusele metüülrühma –CH₃) rakus leiduvate restriktsooniensüümide äratundmisjärjestused ja ei lase neil reaktsiooni läbi viia. Kui rakku peaks aga sattuma näiteks bakteriviiruse DNA, millel kaitsvad metüülmärgised puuduvad, lõigatakse see katki.

1.4. Leia joonise põhjal, mitu fragmenti saadakse plasmiididest A ja B kummagi restriiktaasiga lõigates! (1p)



Plasmiidist A tekib EcoRI-ga lõigates 2 fragmenti, BamHI-ga lõigates 1 fragmenti. Plasmiidist B tekib EcoRI-ga lõigates 1 fragmenti, BamHI-ga lõigates 2 fragmenti.

Plasmiidikaardil on noolekestega tähistatud vastavate ensüümide lõikekohad. Plasmiidis A on kaks EcoRI lõikekohta, geenifragmenti kummalgi küljel. Seega lõikab EcoRI mõlemad kohad lahti ning tekib kaks lineaarset lõiku: sinine geenifragment ja kogu ülejäänud plasmiid. BamHI lõikekohti on plasmiidis A aga ainult üks. Seega lõikab BamHI lihtsalt DNA rõngasmolekuli ühest kohast lahti ning tekib üks lineaarne DNA lõik.

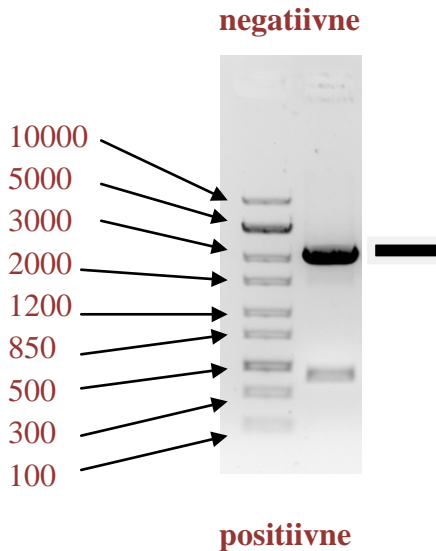
1.5. Milleks on plasmiidis vajalikud kaardil tähistatud Amp^R geen ja „ori“-piirkond? (2p)

Amp^R geeni produkt annab bakterile resistentsuse antibiootikumi ampitsilliin vastu. Seda kasutatakse plasmidi kandvate bakterite selektsiooniks: kui me tahame bakteritesse plasmidi sisse viia, siis osad rakud võtavad plasmidi vastu ja osad mitte. Kui kasvatada neid rakke nüüd söötmes, mis sisaldab ampitsilliini, siis suudavad seal kasvada ainult plasmidi kandvad rakud.

Ori-piirkond on *origin of replication*, ehk piirkond, kust algab DNA süntees ehk replikatsioon.

1.6. Kleebi saadud geelipilt allnäidatud kohta. Geelipildil on tähistatud positiivse ja negatiivse elektroodi asukohad ning võrdluseks on DNA marker, mis koosneb DNA lõikudest pikkustega 10000, 5000, 3000, 2000, 1200, 850, 500, 300 ja 100 aluspaari. Seda kasutades hindate oma plasmiidist tekkinud lõigu või lõikude ligikaudne pikkus. Otsustate, kumma plasmiidiga on tegemist! (8p)

Pilt:



DNA on negatiivselt laetud ning liigub seega positiivse elektroodi poole. Küsimus 1.2 viitab faktile, et suuremad fragmendid liiguvad geelis aeglasemalt. Seetõttu oleks markeri vöötide lugemist tulnud alustada ülemisest otsast. Markeriga võrreldes näeme, et ülemine fragment on ligikaudu 3000 aluspaari pikk ning alumine on veidi väiksem kui 500 aluspaari.

5 punkti võis saada ilusa geelipildi eest (hindas tillukeste mahtude pipeteerimise oskust); 2 punkti oli aluspaaride pikkuste hindamine ning 1 punkt selle põhjal järelduse tegemine.

Minu geelipildil on 2 fragmenti pikkus(t)ega umbes 3000 ja 450 aluspaari.

Järelikult on tegemist plasmiidiga A / B (tõmba õigele variandile ring ümber).

1.7. Joonista oma geelipildile ka kolmas rada ja märgi sinna, kus oleks liikunud teisest plasmiidist BamHI-ga lõigates tekkinud produkt(id)! (2p)

Teine plasmiid, ehk plasmiid A oleks BamHI-ga andnud ainult ühe fragmendi, mis oleks sama pikk (vt. DNA töö sissejuhatav tekst!) kui plasmiid B mõlemad lõikusfragmendid kokku. Seega oleks plasmiid A lõikusprodukt liikunud veidi aeglasemalt, kui B-st saadud suurem fragment. Täpne asukoht ei olnud siinkohal nii kriitiline.

Test 2. β -galaktosidaasi olemasolu määramine

β -galaktosidaas on ensüüm, mis katalüüsib bakterites laktoosi lagundamisraja esimest reaktsiooni, laktoosi lõhustamist glükoosiks ja galaktoosiks. Laboris saab β -galaktosidaasi olemasolu testida, kasutades sünteetilist substraati ONPG-d. Toimiv β -galaktosidaas lagundab värvitu ONPG galaktoosiks ja kollaseks ortonitrofenooliks. Selleks, et värvuse teket paremini hinnata, kasutatakse testis võrdluseks positiivset ja negatiivset kontrolli. Nendeks on bakteritüved, kes vastavalt toodavad ja ei tooda β -galaktosidaasi. Kokku pead Sa seega tegema kolm β -galaktosidaasi määramise reaktsiooni.

Vahendid:

Z puhver (**Z**)

Kloroform (**Kloro**)

ONPG, 4 mg/ml

Positiivse ja negatiivse kontrolli rakud mikrotuubides (**POS** ja **NEG**)

Külviaas

300 μ l LB sööde (**LB**)

Tühjad reaktsioonituubid (3 tk)

Töö käik:

Uuritava tüve rakud on kasvanud tahkel söötmel ja tuleb reaktsiooni läbiviimiseks esmalt külviaasagakokku koguda ja LB söötmes suspendeerida. Selleks tõmba söötme pinnalt külviaasaga kokku umbes tassi diameetri pikkune triip ja keeruta külviaasa 300 μ l-is LB söötmes, kuni rakud lahusesse satuvad. Pipeteeri segu üles-alla, kuni moodustub suspensioon ja rakukänkraid ei ole silmaga enam näha. Nii positiivse kui negatiivse kontrolli rakud on kasvatatud vedelsöötmes ja neid saab otse kasutada.

Reaktsioonisegu koosneb 600 μ l-st Z-puhvrast, 50 μ l-st kloroformist, 100 μ l-st rakkude suspensioonist või vedelkultuurist ja 0,8 mg-st ONPG-st. Valmis segu tuleb kinnises tuubis tugevalt 10-20 sekundi jooksul loksutada ja seejärel oodata reaktsioonisegude värvumist toatemperatuuril mõne minuti jooksul.

2.1. Arvuta, mitu µl ONPG lahust tuleb reaktsioonisegule lisada, kui lahuse kontsentratsioon on 4 mg/ml! (1p)

Reaktsiooniks on vaja 0,8 mg ONPG-d. Lahuse kontsentratsioon on 4 mg/ml. Seega on vaja $0,8 \text{ mg} / 4 \text{ mg/ml} = 0,2 \text{ ml}$ ehk 200 µl ONPG lahust.

Vastus: 0,2 ml ehk 200 µl

2.2. Hinda eri tüvede värvusreaktsioonide intensiivsuseid ja täida tabel! (4p)

Bakteritüvi	Värvusreaktsiooni tugevus
Negatiivne kontroll	-
Positiivne kontroll	+++
Uuritav tüvi	-

Reaktsiooni intensiivsuse hindamiseks kasuta järgmisi tähiseid: - / + / ++ / +++

Kui ette on antud positiivne ja negatiivne kontroll, siis neid tuleks käsitleda skaala piirjuhtudena ja uuritavat proovi nendega võrrelda.

2.3. Kas uuritav tüvi toodab β-galaktosidaasi? (2p)

Ei tooda.

Test 3. KOH kiirtest bakterite gramreaktiivsuse määramiseks

Vahendid:

Mikroskoobi alusklaas

3% KOH lahus

Tikk

Töö käik:

Tilguta pipetiga alusklaasile 50 µl KOH lahust (**NB! Ole ettevaatlik, KOH lahus on nõrgalt söövitava toimega!**). Võta tikuga tassilt veidi bakterirakke ning suspendeeri need KOH tilgas umbes 1 minuti jooksul. Tõsta tikuga suspensiooni tilgast 1-2 cm kõrgusele ning jälgi, kas tekivad viskoossed niidid. Niite tekitavad gramnegatiivsed bakterid, grampositiivsete puhul niite ei teki.

3.1. Kuidas erinevad omavahel gramnegatiivsed ja grampositiivsed bakterid? (1p)

a) laktoosi kasutamise võime poolest, grampositiivsed ei kasuta laktoosi

b) rakukesta ehituse poolest, gramnegatiivsetel on kaks rakumembraani

c) DNA paigutuse poolest, grampositiivsetel paikneb kromosoom pikliku raku otsmises alas

d) viburite pikkuse poolest, gramnegatiivsetel on oluliselt pikemad viburid

3.1. Kas uuritav bakter on grampositiivne või gramnegatiivne? (2p)

gramnegatiivne

Test 4. Tsütokroom *c* (*cyt c*) oksüdaasi olemasolu määramine

Tsütokroom *c* (*cyt c*) oksüdaas on bakteri membraanis asuv suur ensüümkompleks, mis on aeroobse elektrontransportahela viimaseks lüliks. See oksüdeerib korraga 4 tsütokroom *c* molekuli, redutseerib ühe hapnikumolekuli ja transpordib lisaks 4 prootonit läbi membraani rakust välja.

Cyt c oksüdaasi olemasolu bakteri membraanis saab testida, kasutades sünteetilist substraati dimetüül-*p*-fenüleendiamiini. Funktsionaalne *cyt c* oksüdaas oksüdeerib selle hapniku juuresolekul violetset värvi indofenoolsiniseks.

Vahendid:

Tühi reaktsioonituub

Oksüdaastesti reaktiiv (tõmbekapis)

Filterpaber

Tikk

Töö käik:

Rebi filterpaberist piklik tükk, mis mahuks üpris täpselt reaktsioonituubi ning pane paberitükk tuubi. Anna laboriassistendile märku, et soovid oksüdaastesti reaktiivi. Assistendi loal mine tõmbekapi alla ning pipeteeri oma filterpaberile 50 µl reaktiivi. **NB! Testireaktiivi aurud ei ole tervisele kasulikud! Laual hoia tuubi võimalikult vähe aega avatuna!** Sulge oma tuub ning mine oma töökohale tagasi. Võta tikuga tassilt veidi bakterirakke ning hõõru need reaktiiviga immutatud paberi vastu. Sulge tuub ja jälgi, kas bakterirakud põhjustavad indofenoolsinise teket.

4.1. Kas oksüdaas-positiivsed bakterid on võimelised õhuhapnikku hingama? (1p)

Jah

4.2. Kas uuritav bakter toodab tsütokroom *c* oksüdaasi? (2p)

Jah

Test 5. Katalaasi olemasolu määramine

Katalaas on ensüüm, mida aeroobsetes tingimustes elavad bakterid kasutavad reaktiivse ja seega rakkudele ohtliku vesinikperoksiidi neutraliseerimiseks. Katalaas on üks kiiremaid teadaolevaid ensüüme, mis võib katalüüsida ligikaudu 4×10^7 reaktsiooni sekundis.

Vahendid:

Mikrotuub 1 ml 3% vesinikperoksiidi lahusega (**PEROX**)

Tikk

Töö käik:

Võta tikuga tassilt veidi bakterirakke ning sega need vesinikperoksiidi lahusesse. Sulge tuub ning jälgi lahust. Katalaasi tootva bakteritüve korral on näha mullikeste eraldumist.

5.1. Kas uuritav bakter toodab katalaasi? (2p)

Jah

5.2. Kui kaua kuluks ühel katalaasimolekulil aega, et lagundada kogu tuubis olev vesinikperoksiid? Ühe reaktsiooni käigus lagundab katalaas 2 vesinikperoksiidi molekuli. Vesinikperoksiidi molaarmass on 34 g/mol, lahuse kontsentratsioon on massiprotsentides, tihedus on 1 g/cm³. (3p)

Sellele ülesandele võis läheneda mitut moodi. Üks lahenduskäik on järgnevalt esitatud. Üldiselt on vaja leida tuubis olevate vesinikperoksiidimolekulide kogus, sellest leida nende lagundamiseks kuluvate reaktsioonide arv ning jagada see katalaasi reaktsioonide arvuga sekundis.

Tuubis on 1 ml 3-massiprotsendist H₂O₂. Kuna tihedus on 1 g/cm³ ja 1 cm³ = 1 ml, on meil tuubis 1 g lahust. Sellest 3% moodustab H₂O₂ mass, mis on seega $1 \text{ g} \cdot 3/100 = 0,03 \text{ g}$.

H₂O₂ molekulide arvu leidmiseks leiame esmalt moolide arvu. See on $0,03 \text{ g} / 34 \text{ g/mol} = 0,00088 \text{ mol}$. Nüüd tuli teada Avogadro arvu $N_A = 6,02 \cdot 10^{23}$ osakest/mol. Seega on vesinikperoksiidi tuubis $0,00088 \text{ mol} \cdot 6,02 \cdot 10^{23} \text{ osakest/mol} = 5,3 \cdot 10^{20}$ molekuli H₂O₂.

Kuna ühe reaktsiooni käigus lagundab katalaas 2 vesinikperoksiidi, kulub terve tuubitäie lagundamiseks järelikult $5,3 \cdot 10^{20} / 2 = 2,7 \cdot 10^{20}$ reaktsiooni. Katalaasi kiirus on $4 \cdot 10^7$ reaktsiooni sekundis. Aega kulub seega $2,7 \cdot 10^{20} \text{ reaktsiooni} / 4 \cdot 10^7 \text{ reaktsiooni/sekund} = 6,6 \cdot 10^{12}$ sekundit.

Ka osaliselt lahendatud ülesande eest sai punkte. Lõpuni lahendatud, kuid väikeste arvutusvigadega ülesanne või Avogadro arvu mitteteadmised võtsid 0,5 punkti maha.

Vastus: $6,6 \cdot 10^{12}$ sekundit ehk ligikaudu 210500 aastat

5.3. Millise gaasiga on katalaasi toimet tekkivad mullikesed täidetud? (1p)

a) Veeauruga

b) Hapnikuga

c) Väävelvesinikuga

d) Vesinikperoksiidiga

Katalaasi katalüüsiv reaktsioon on $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2\uparrow$

Testide kokkuvõte (1p)

Test	Tulemus
Plasmiid	B
β -galaktosidaas	negatiivne
Gramreaktiivsus	gramnegatiivne
Oksüdaas	positiivne
Katalaas	positiivne

Tabeli juures hinnati oma tulemuste kokkuvõtmist, mitte nende õigsust.

Kasuta järgmistel lehekülgedel olevat määramisskeemi ja otsusta, missuguse bakteriga on tegemist! Järgi skeemi punkt-punktilt, kuni jõuad kindla bakteritüveni! (4p)

Siin hinnati määraja kasutamist oma tulemustest lähtuvalt. Õige tulemus on ära toodud.

Laboris kasutatavate bakteritüvede määraja

1. a) bakter on grampositiivne → punkt 2
b) bakter on gramnegatiivne → punkt 17
2. a) bakter on oksüdaas-positiivne → punkt 3
b) bakter on oksüdaas-negatiivne → punkt 10
3. a) bakter on katalaas-positiivne → punkt 4
b) bakter on katalaas-negatiivne → punkt 7
4. a) bakter on β -galaktosidaas-positiivne → punkt 5
b) bakter on β -galaktosidaas-negatiivne → punkt 6
5. a) rakus on plasmiid A → *Virgibacillus koreensis*
b) rakus on plasmiid B → *Bacillus subtilis*
6. a) rakus on plasmiid A → *Bacillus fortis*
b) rakus on plasmiid B → *Virgibacillus marismortui*
7. a) bakter on β -galaktosidaas-positiivne → punkt 8
b) bakter on β -galaktosidaas-negatiivne → punkt 9
8. a) rakus on plasmiid A → *Bacillus aeolius*
b) rakus on plasmiid B → *Bacillus thermantarcticus* prBA-lacZ
9. a) rakus on plasmiid A → *Bacillus caldovelox*
b) rakus on plasmiid B → *Bacillus azotoformans*
10. a) bakter on katalaas-positiivne → punkt 11
b) bakter on katalaas-negatiivne → punkt 14
11. a) bakter on β -galaktosidaas-positiivne → punkt 12
b) bakter on β -galaktosidaas-negatiivne → punkt 13
12. a) rakus on plasmiid A → *Bacillus mycoides*
b) rakus on plasmiid B → *Paenibacillus xylanilyticus*
13. a) rakus on plasmiid A → *Staphylococcus aureus*
b) rakus on plasmiid B → *Staphylococcus cohnii* subsp. *cohnii*
14. a) bakter on β -galaktosidaas-positiivne → punkt 15
b) bakter on β -galaktosidaas-negatiivne → punkt 16

15. a) rakus on plasmiid A → *Lactobacillus cypricasei*
 b) rakus on plasmiid B → *Streptococcus pyogenes*
16. a) rakus on plasmiid A → *Streptococcus australis*
 b) rakus on plasmiid B → *Lactobacillus iners*
17. **a) bakter on oksüdaas-positiivne** → **punkt 18**
 b) bakter on oksüdaas-negatiivne → punkt 25
18. **a) bakter on katalaas-positiivne** → **punkt 19**
 b) bakter on katalaas-negatiivne → punkt 22
19. a) bakter on β -galaktosidaas-positiivne → punkt 20
b) bakter on β -galaktosidaas-negatiivne **punkt 21**
20. a) rakus on plasmiid A → *Neisseria lactamica*
 b) rakus on plasmiid B → *Alteromonas infernus*
21. a) rakus on plasmiid A → *Pseudomonas aeruginosa*
b) rakus on plasmiid B → ***Pseudomonas putida***
22. a) bakter on β -galaktosidaas-positiivne → punkt 23
 b) bakter on β -galaktosidaas-negatiivne → punkt 24
23. a) rakus on plasmiid A → *Suttonella indologenes* prSI-lacZ
 b) rakus on plasmiid B → *Alcaligenes faecalis* pv 566
24. a) rakus on plasmiid A → *Kingella kingae*
 b) rakus on plasmiid B → *Alcaligenes faecalis*
25. a) bakter on katalaas-positiivne → punkt 26
 b) bakter on katalaas-negatiivne → punkt 29
26. a) bakter on β -galaktosidaas-positiivne → punkt 27
 b) bakter on β -galaktosidaas-negatiivne → punkt 28
27. a) rakus on plasmiid A → *Escherichia coli*
 b) rakus on plasmiid B → *Citrobacter freundii*
28. a) rakus on plasmiid A → *Edwardsiella tarda*
 b) rakus on plasmiid B → *Yersinia pestis*

29. a) bakter on β -galaktosidaas-positiivne → punkt 30
b) bakter on β -galaktosidaas-negatiivne → punkt 31
30. a) rakus on plasmiid A → *Dysgonomonas capnocytophagoides*
b) rakus on plasmiid B → *Anaerobiosprillum succiniciproducens*
31. a) rakus on plasmiid A → *Succinivibrio dextrinosolvens*
b) rakus on plasmiid B → *Streptobacillus moniliformis*

Lõppvastus:

Tundmatu bakteritüvi on *Pseudomonas putida*