

Uwaga

1. studenci przychodzą na zajęcia z własną odzieżą ochronną (kitle)
2. na zajęcia 1. przynoszą ze sobą próbki gleby (około 15g) zebrane w różnych lokalizacjach

Zebrane próbki muszą zawierać dokładną metryczkę zawierającą następujące dane:

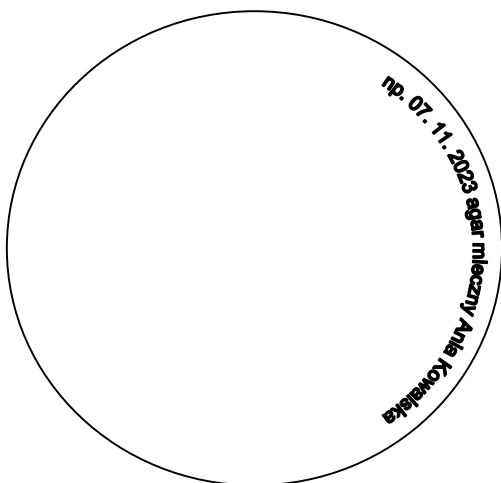
- imię i nazwisko osoby pobierającej próbkę	
- data pobrania	
- miejsce zebrania materiału (np.: okolice torowiska, okolice stacji benzynowej, park osiedlowy, okolice ruchliwej drogi, okolice marketu, kompostownik i In. najlepiej również z nazwą ulicy, jeśli takie dane są dostępne)	
- wilgotność próbki w chwili pobrania (niska, średnia, duża)	
- jeśli próbka zostanie pobrana dużo wcześniej przed zajęciami, należy ją przechowywać zamkniętą, jednak z zachowaniem przepływu powietrza (np. nakłóć worek w kilku miejscach)	

Uwaga!!!!

Należy bardzo dokładnie opisywać szalki i probówki. **Opis zawsze umieszczamy na spodniej stronie szalki (rys.1.)**

W opisie musi być zawarte:

- data wykonania podłoża
- rodzaj podłoża (np. agar mleczny, agar ze skrobią, podłoże LA, podłoże LA+Ni²⁺)
- osoba przygotowująca podłoże
- data posiewu
- rodzaj posiewu (np. bakterie proteolityczne z gleby, posiew redukcyjny bakterii odpornych na wysokie stężenia mocznika)
- osoba wykonująca posiew



miejsce opisu szalki

Rys.1. Przykład opisanie szalki

Pozyskiwanie szczepów mikroorganizmów o znaczeniu przemysłowym

Gleba to powierzchniowa warstwa litosfery ziemskiej, utworzona z wietrzejącej skały, przekształconej w specyficzny sposób przez organizmy żywe. Posiada ona wiele funkcji umożliwiających funkcjonowanie ekosystemów glebowych, umożliwia zakotwiczenie roślin, dostarcza im składników odżywczych, spełnia funkcje buforujące i filtrujące chroniąc ekosystemy przed wpływem niepożądanych substancji. Ze względu na swój skład chemiczny oraz właściwości fizyczne gleba jest siedliskiem olbrzymiej ilości drobnoustrojów i innych żywych organizmów. Drobnoustroje obecne w glebie rozmnażają się i przetwarzają materię organiczną, tworząc biomasę własnych komórek oraz nagromadzają substraty niezbędne do uzupełniania zasobów próchnicy a także rozkładają i mineralizują związki organiczne, przez co włączają w ponowny obieg pierwiastki nieodzowne w produkcji roślinnej, opartej na asymilacji CO₂ z atmosfery. Najważniejszymi pierwiastkami, za obieg których w naturze odpowiedzialne są mikroorganizmy glebowe, są węgiel i azot.

Blisko 50 % masy materii organicznej dostającej się do gleby w postaci resztek roślin i zwierząt stanowi węgiel. Mikroorganizmy znajdujące się w glebie odzyskują go na drodze rozkładu i mineralizacji związków organicznych, z których składa się świeża materia organiczna, w której skład wchodzi cukry proste (heksozy, pentozy), wielocukry takie jak skrobia, chityna czy celuloza, kwasy organiczne, związki aromatyczne czy związki hydrofobowe – np. tłuszcze i woski. W zależności od struktury chemicznej poszczególne składniki masy roślinnej są rozkładane i mineralizowane z różną prędkością. Najszybciej metabolizowane są przez mikroorganizmy glebowe substancje łatwo rozpuszczalne, takie jak cukry, aminokwasy, czy kwasy organiczne. Dużo trudniej ze względu na hydrofobowość mineralizowane są woski, tłuszcze, gumy i garbniki. Jednym z najbardziej odpornych na rozkład materiałem roślinnym są ligniny (liczna grupa związków aromatycznych). Część enzymów biorących udział w rozkładzie materii organicznej, wydzielana jest na zewnątrz komórek produkujących je mikroorganizmów. Przykładem takich enzymów produkowanych przez mikroorganizmy zewnątrzkomórkowo są np. **rozkładające skrobię amylazy**, czy **też hydrolizujące wiązania peptydowe obecne w białkach - proteazy**. W przypadku amylaz, głównymi ich producentami są szczepy grzybowe z rodziny *Aspergillus* oraz bakteryjne *Bacillus*, *Micrococcus*, czy *Pseudomonas*. Proteazy dzieli się na alkaliczne, obojętne i kwaśne, ze względu na optimum pH, w którym działają. Głównymi ich producentami są szczepy *Bacillus*, *Streptomyces*, a także *Aspergillus*.

Źródłem szczepów mikroorganizmów wykorzystywanych w przemyśle, po udoskonaleniu ich określonych cech produkcyjnych jest najczęściej środowisko naturalne (ryc. 1, A i B). Pozyskiwanie tych mikroorganizmów ze środowiska wymaga użycia szeregu metod przesiewowych w celu izolacji tylko tych, które wytwarzają interesujący nas produkt (produkty) lub charakteryzują się określonymi właściwościami (np. termostabilność, oporność na antybiotyki, oporność na wysokie stężenia metali ciężkich, przetwarzanie określonych substancji).

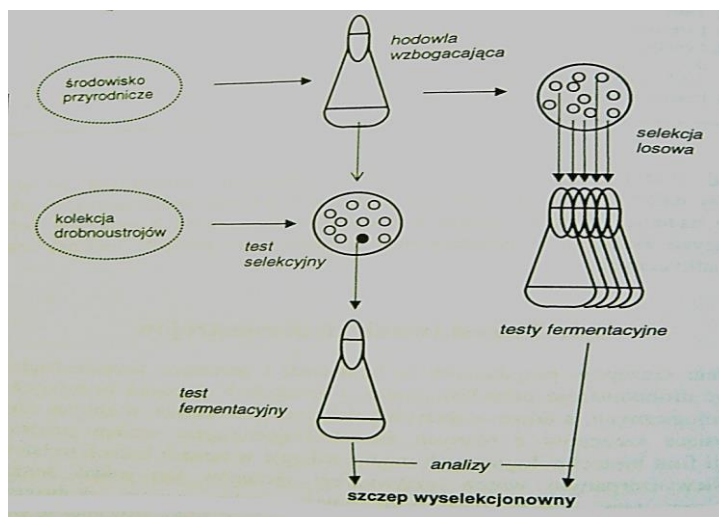


Ryc. 1. Źródła szczepów o znaczeniu przemysłowym.

Pozyskiwanie szczepów mikroorganizmów o znaczeniu przemysłowym

Proces pozyskiwania nowych szczepów mikroorganizmów obejmuje następujące po sobie etapy (ryc.2):

1. pobranie próby ze środowiska naturalnego,
2. hodowla wzbogacająca
3. test selekcyjny
4. testy fermentacyjne
5. identyfikacja gatunkowa wybranego mikroorganizmu.



Ryc. 2. Etapy pozyskiwania szczepów mikroorganizmów o znaczeniu przemysłowym.

Ad. 1. Pobranie próby ze środowiska

Jako źródło mikroorganizmów wybieramy takie środowisko naturalne (lub przekształcone przez człowieka), z którego spodziewamy się wyizolować, z zastosowaniem klasycznych technik mikrobiologicznych najwięcej drobnoustrojów o spodziewanych właściwościach. Środowisko to jest wskazywane na drodze racjonalnego wyboru, zależnego od założeń projektowych.



Zakres wyboru źródła mikroorganizmów jest często ograniczony tylko do tych środowisk, w których spodziewamy się znaleźć drobnoustroje przydatne w konkretnym procesie biotechnologicznym (np. ograniczone warunkami troficznymi lub temperaturowymi).

Założenie projektowe mogą zasadniczo się od siebie różnić, dlatego też często wymagane jest zbieranie potencjalnych próbek z różnych lokalizacji. Poniżej przedstawiono przykładowe założenia projektów.

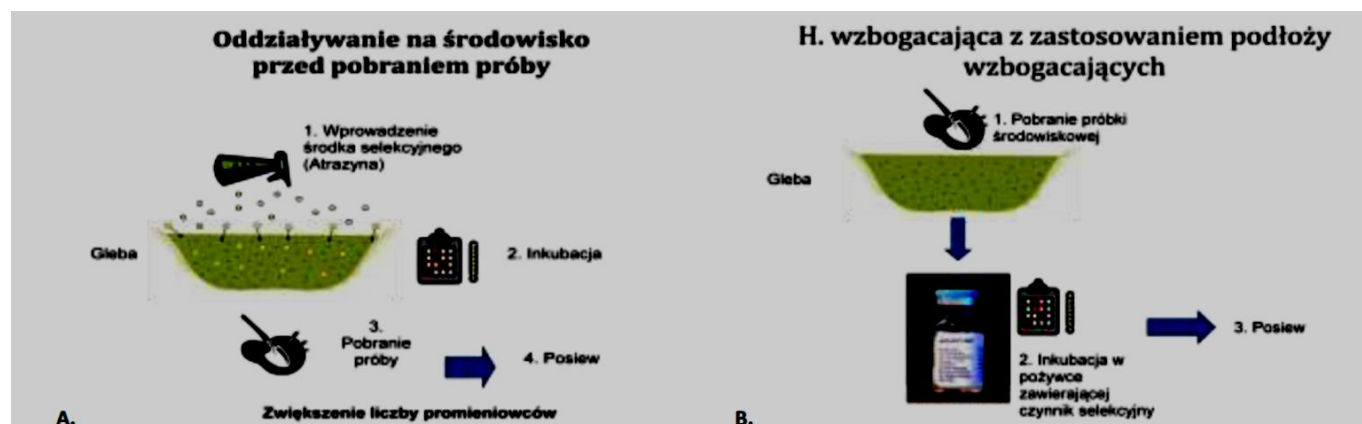
- izolacja mikroorganizmów glebowych o aktywności proteolitycznej
- selekcja mikroorganizmów glebowych odpornych na wysokie stężenia metali ciężkich
- selekcja mikroorganizmów glebowych opornych na wybrane antybiotyki
- bioremediacja gleby skażonej produktami ropopochodnymi

Miejsce pobrania próbek	Udział bakterii rozkładających paliwa w ogólnej liczbie drobnoustrojów glebowych [%]
Lotnisko	0,2 – 2,2
Stacja paliw	0,01 – 0,29
Torowisko kolejowe	0,03 – 1,09

Tab. 1. Zasadnicze znaczenie ma miejsce pobrania próby, gdyż zazwyczaj organizmy o znaczeniu przemysłowym stanowią niewielki odsetek populacji zasiedlającej daną niszę ekologiczną.

Ad. 2. Sposoby zwiększania liczebności poszukiwanych drobnoustrojów

Możliwe jest zwiększanie liczebności poszukiwanych drobnoustrojów o znaczeniu biotechnologicznym, poprzez np.: (1) oddziaływanie na środowisko przed pobraniem próby (ryc. 3. A), (2) wprowadzenie do środowiska wabików – pułapek, (3) wstępną obróbkę fizyczną lub mechaniczną próbki, (4) prowadzenie hodowli wzbogacających (ryc. 3. B).



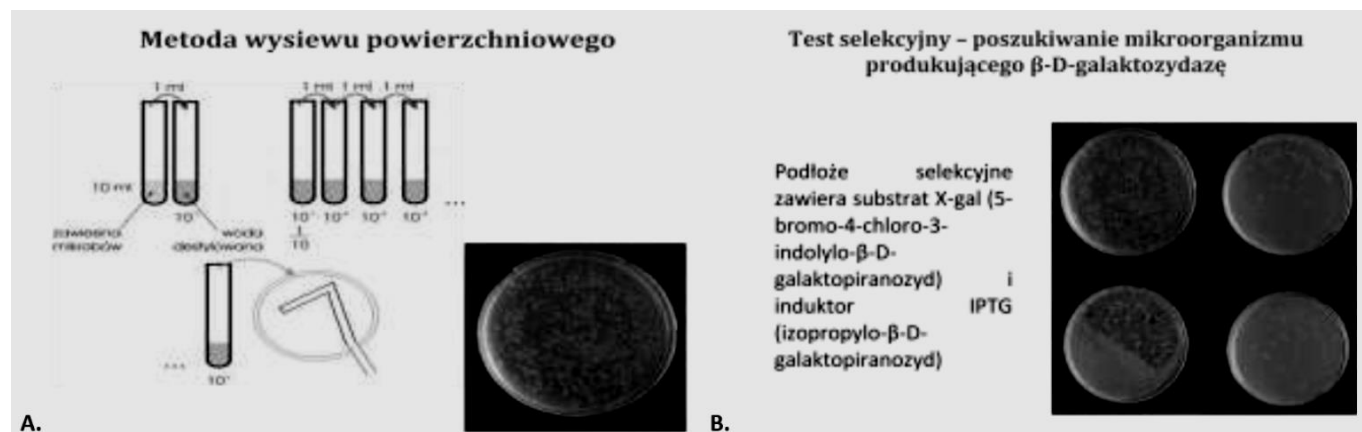
Ryc 3. Sposoby zwiększania liczebności drobnoustrojów w próbce.

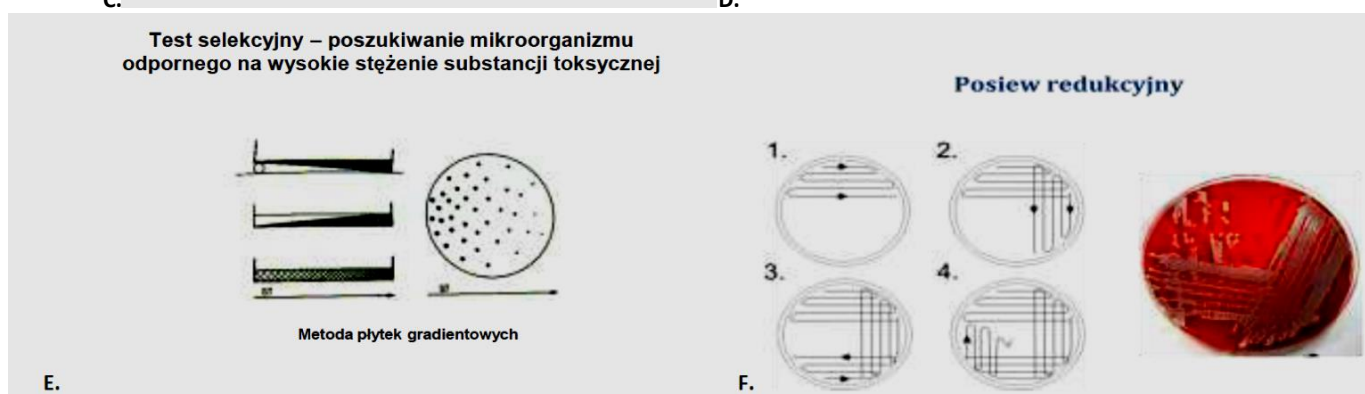
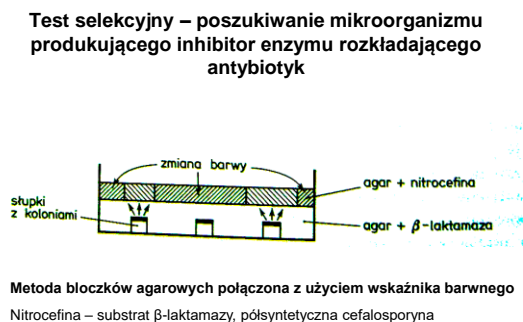
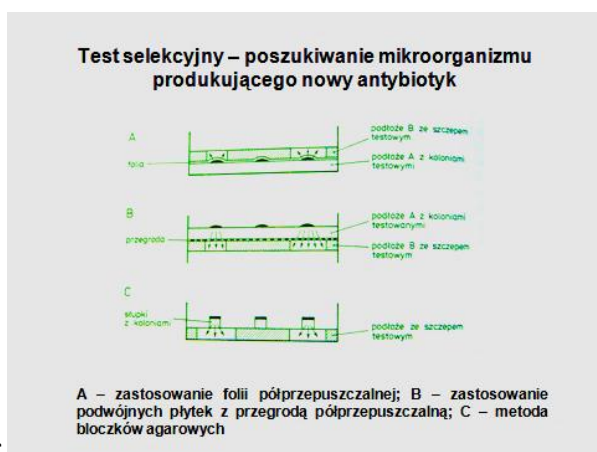
Hodowla wzbogacająca - metoda ta opiera się na wprowadzeniu do próbki pobranej ze środowiska związków chemicznych mogących pełnić rolę czynnika selekcyjnego, pozwalającego na zmiany liczebności mikroorganizmów tworzących populację drobnoustrojów zawartych w badanej próbce, podczas jej inkubacji w określonych warunkach fizykochemicznych, tj. temperatura, czas inkubacji.

Izolacja dominujących w środowisku drobnoustrojów żyjących w danym środowisku nie nastęca większych trudności. Istotne problemy napotyka się w przypadku mikroorganizmów o znacznie mniejszej liczebności w badanej niszy ekologicznej. Jedną z metod pozwalających na rozwiązanie tego problemu jest hodowla wzbogacająca. Metoda ta opiera się na wprowadzeniu do próbki pobranej ze środowiska naturalnego związków chemicznych pełniących rolę czynnika selekcyjnego, pozwalającego na zmianę liczebności/proporcji tworzących populację drobnoustrojów, podczas ich inkubacji w określonych warunkach fizykochemicznych (np. temperatura lub czas inkubacji). Będzie to skutkowało preferowanym wzrostem organizmów nas interesujących. Wprowadzanych czynników selekcyjnych w jednym czasie może być kilka, np. określone warunki troficzne i temperatura.

Ad. 3. Test selekcyjny

Test selekcyjny jest podstawową metodą identyfikacji mikroorganizmów wykorzystywanych w przemyśle. W konstrukcji tego rodzaju testów poszukuje się cechy biochemicznej bezpośrednio lub pośrednio powiązanej ze zdolnością mikroorganizmu do produkcji wybranego produktu lub wykazującego dane cechy. Możliwe jest dokonanie takiej selekcji np. poprzez zastosowanie odpowiedniego podłoża na szalkach Petriego. Pierwszą z metod stosowanych w selekcji mikroorganizmów jest technika wysiewu powierzchniowego, polegająca na doświadczalnym takim dobraniu stężenia zawiesiny mikroorganizmów (najczęściej kolejne rozcieńczenia dziesiętne – metoda Józefa Listnera), aby na podłożu stałym otrzymać pojedyncze kolonie (ryc. 4. A) lub selekcjonuje na odpowiednim podłożu (ryc. 4. B-E – metoda Roberta Kocha). Następnie wybrane kolonie mikroorganizmów poddaje się posiewowi redukcyjnemu (ryc. 4. F), pozwalającemu wyselekcjonować dane klonu bakteryjne konieczne do dalszej analizy. **Z kolonii, które przeszły testy selekcyjne z wynikiem pozytywnym, za pomocą posiewu redukcyjnego zostają wyprowadzone czyste kultury, które poddawane są następnie testom fermentacyjnym**





Ryc. 4. A – E. Wysiew i selekcja mikroorganizmów

Ad. 4. Testy fermentacyjne

Pozwalają na ocenę stopnia przydatności poszczególnych izolatów mikroorganizmów wyodrębnionych w testach selekcyjnych. Ich celem jest wybór mikroorganizmu przeprowadzającego określony proces biotechnologiczny z największą wydajnością przy jednoczesnej minimalizacji kosztów w przypadku produkcji na skalę przemysłową. Testy fermentacyjne najczęściej przeprowadzane są w niewielkich bioreaktorach o pojemności 5-20 dm³. W testach tych uwzględnia się optymalną metodę hodowli badanego mikroorganizmu (np. wybór typu bioreaktora, sposób hodowli, wymagania mikroorganizmu, zapotrzebowanie na tlen, różnice pH). Po pomyślnym przejściu testu mikroorganizmy poddaje się badaniom w celu ustalenia przynależności gatunkowej.

Ad. 5. Identyfikacja gatunkowa wybranego mikroorganizmu

Celem identyfikacji przynależności gatunkowej mikroorganizmu wybranego podczas testów fermentacyjnych jest ustalenie, czy nie mamy do czynienia z mikroorganizmem, który został już wcześniej wyselekcjonowany i jego właściwości jako producenta określonego produktu przemysłowego nie zostały już wcześniej opisane. Dodatkowo szczep taki mógł zostać wcześniej opatentowany i zastrzeżony do użycia w określonych aplikacjach przemysłowych. Identyfikację przeprowadza się za pomocą znanych metod biochemicznych, biofizycznych, immunologicznych i biologii molekularnej opartych na analizie wybranych sekwencji nukleotydowych genomowego DNA badanego mikroorganizmu. Po tym etapie można przystąpić do wykorzystania tego organizmu jako bazy do konstrukcji szczepu mikroorganizmu przemysłowego.

Piśmiennictwo:

1. Chmiel A.: Biotechnologia - podstawy mikrobiologiczne i biochemiczne, Wydawnictwo Naukowe PWN, 1998
2. Mikrobiologia techniczna (red. Libudzisz Z., Kowal K.). Łódź: Wydawnictwo Politechniki Łódzkiej 2000
3. Laboratorium z mikrobiologii ogólnej i środowiskowej. (red. Mrozowska J.). Gliwice: Wydawnictwo Politechniki Śląskiej 1999

Doświadczenie 1.

Cel ćwiczenia.

Celem ćwiczenia jest wykazanie zdolności mikroorganizmów obecnych w próbce gleby do przeprowadzania reakcji rozkładu różnego rodzaju substancji organicznych i włączania w ponowny cykl przemiany materii skumulowanego w nich węgla i azotu.

Izolacja mikroorganizmów glebowych o aktywności proteolitycznej, amylolitycznej i lipolitycznej

Materiały:

- probówki typu eppendorf 1,5ml
- kolby szklane płaskodenne
- ezy
- głaszczki mikrobiologiczne
- agar
- medium suplementowane (odżywcze)
- skrobia
- tłuszcz roślinny
- mleko odtłuszczone
- baktotrypton (pepton K)
- ekstrakt drożdżowy
- jałowa sól fizjologiczna (0,9% roztwór NaCl)
- gleba
- woda destylowana
- płyn Lugola
- 20% roztwór siarczanu miedzi (II)
- waga

Wykonanie doświadczenia:

I etap

Przygotowanie prostego podłoża agarowego

Sporządzić 500ml roztworu zawierającego 1% baktotrypton, 0,5% ekstraktu drożdżowego, 1% NaCl i 3,5% agar. Po wymieszaniu całość ogrzewać aż do rozpuszczenia. Po zagotowaniu kolbę z podłożem wyjałowić w autoklawie (120°C, 1,5atm., 20 min).

II etap

Wzbogacanie podłoży:

- a) **przygotowanie płytek agarowych z dodatkiem 2% skrobi (oznaczenie aktywności amylolitycznej):**
do ogrzanego i upłynnionego podłoża agarowego dodać **4g skrobi do 200 ml podłoża** (4 płytki na grupę ćwiczeniową);
- b) **przygotowanie płytek agarowych z dodatkiem odtłuszczonego mleka (oznaczenie aktywności proteolitycznej):**
do 150 ml upłynnionego i ostudzonego do 60°C podłoża agarowego i **dodać 50ml jałowego odtłuszczonego mleka**, wymieszać. Tak przygotowane podłoże wylać na płytki Petriego (4 płytki na grupę ćwiczeniową);
- c) **przygotowanie płytek agarowych z dodatkiem tłuszczu (oznaczenie aktywności lipolitycznej):**
do 200 ml upłynnionego podłoża agarowego dodać **6 g płynnego tłuszczu roślinnego**. Wylać na płytki Petriego (4 płytki na grupę ćwiczeniową).

III etap

Posiew mikroorganizmów glebowych na zubożone płytki agarowe – selekcja

Z naważki 10g gleby, wytrząsanej 10 minut w 90 ml jałowej soli fizjologicznej otrzymujemy rozcieńczenie 10^{-1} . Po sedymentacji makrocząstek, z otrzymanego rozcieńczenia wykonać kolejne rozcieńczenia (od 10^{-2} do 10^{-5}) w probówkach Eppendorfa z 1 ml soli fizjologicznej. Następnie nanieść na zubożone płytki agarowe po 100 μ l rozcieńczeń (10^{-3} – 10^{-5}). Posiewy inkubować w temperaturze pokojowej przez 5-7 dni.

Doświadczenie 2. (wykonanie na drugich zajęciach)

Uwaga!!!

Do inkubacji, w celu identyfikacji mikroorganizmów amylolitycznych i lipolitycznych, szalki z:

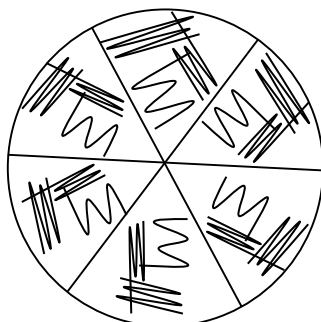
- Podłoże agarowe z dodatkiem skrobi – oznaczenie bakterii amylolitycznych – po okresie inkubacji zalać powierzchnię płytki płynem Lugola – **szukać kolonii wokół których wystąpi strefa przejaśnienia świadcząca o hydrolizie skrobi.**
- Podłoże agarowe z tłuszczem – oznaczenie mikroorganizmów lipolitycznych – **po okresie inkubacji zalać powierzchnię podłoża 20% roztworem siarczanu miedzi (II). Pojawienie się zielonego zabarwienia kolonii świadczy o zdolności do hydrolizy tłuszczu.**

Następnie dla wybranych szczepów wykonać 6 posiewów redukcyjnych na nowe płytki z dodatkiem skrobi (1 sztuka), mleka (1 sztuka) i tłuszczu roślinnego, według ryc. 5.

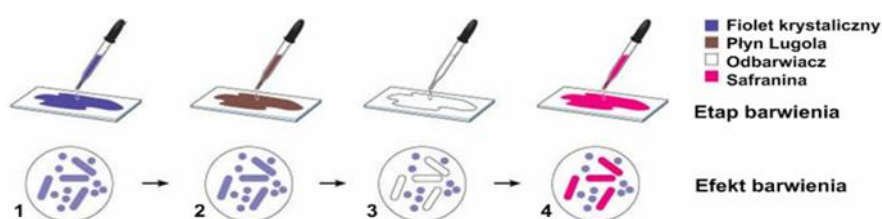
Pozyskiwanie szczepów mikroorganizmów o znaczeniu przemysłowym

Identyfikacja mikroorganizmów glebowych przed selekcją

Z rozcieńczenia 10^{-1} 1 ml roztworu i dodać do 1 ml medium suplementowanego. Inkubować w temperaturze pokojowej przez 1 godzinę. Następnie pobrać kroplę roztworu i sporządzić rozmazy na mikroskopowych szkiełkach podstawowych a następnie wykonać preparaty barwione metodą Grama i obserwować morfologię komórek. Uwaga, jeśli stężenie komórek bakteryjnych będzie zbyt wysokie, wykonać preparaty ponownie przy większych rozcieńczeniach bakterii (rozcieńczyć roztworem soli fizjologicznej).



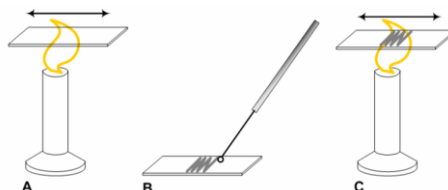
Ryc. 5. Posiew redukcyjny kilku kolonii na 1 szalce.



Ryc. 6. Barwienie metodą Grama

Wykonanie barwienia:

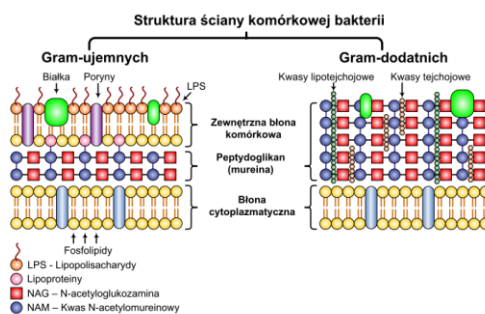
- na szkiełko podstawowe nanieść bakterie i po ewentualnym dodaniu płynu fizjologicznego wykonać rozmaz
- szkiełko z rozmazem pozostawić do całkowitego wyschnięcia, po czym preparat utrwalić przez trzykrotne przesunięcie nad płomieniem palnika (ryc. 7)



Ryc. 7. Przygotowanie wymazu bakteryjnego A – odfuszczenie, B – wymaz, C – utrwalenie

- utrwalony preparat zalewać roztworem fioletu krystalicznego odczekać 60 sekund do 3 minut
- tryskawką delikatnie zmyć barwnik
- zalać preparat jodyną lub płynem Lugola
- odczekać 30 sekund do 2 minut
- ostrożnie odbarwić całość w etanolu przez ok. 10-20 sekund
- splukać preparat wodą destylowaną
- dobarwić innym barwnikiem, np. safraniną czy fuksyną zasadową przez ok. 30 sekund
- dobrze splukać preparat wodą destylowaną, nakropić kroplę soli fizjologicznej, nakryć szkiełkiem nakrywkowym i oglądać pod mikroskopem świetlnym

Mechanizm barwienia



Ryc. 8. Struktura ściany komórkowej bakterii G- i G+

- Fiolet krystaliczny jest zasadowym, słabo rozpuszczalnym barwnikiem, który w roztworze tworzy kationy. Łatwo penetruje przez ścianę komórkową i błonę cytoplazmatyczną bakterii Gram-ujemnych i Gram-dodatnich wnikając do wnętrza komórki. Na tym etapie wszystkie komórki wybarwione są na fioletowo.

Pozyskiwanie szczepów mikroorganizmów o znaczeniu przemysłowym

- 2) Następnie na preparat nanosi się płyn Lugola, który stanowi roztwór jodu w jodku potasu. Jony jodu łatwo przenikają do wnętrza komórki, podobnie jak cząsteczki fioletu krystalicznego. Kationy barwnika reagują z jonami jodu tworząc wielkocząsteczkowe, nierozpuszczalne w wodzie kompleksy. Wszystkie komórki nadal zabarwione są na kolor fioletowy.
- 3) Trzeci etap polega na naniesieniu odbarwiacza (roztworu alkoholu lub mieszaniny acetonu z alkoholem). Odbarwiacz wnika w warstwy mureiny bakterii powodując dehydratację. W wyniku usunięcia wody następuje zagęszczenie sieci mureiny, a tym samym zmniejszenie pustych przestrzeni w wielowarstwowych ścianach komórkowych. Ponadto w wyniku działania odbarwiacza u bakterii Gram-ujemnych zniszczeniu ulega zewnętrzna błona lipopolisacharydowa ekspozując cienką warstwę mureiny. Kompleks barwnika z jodem zostaje uwięziony pod zwartą i grubą warstwą mureiny w komórkach bakterii Gram-dodatnich, natomiast z komórek bakterii Gram-ujemnych jest on łatwo wymywany odbarwiaczem. Na tym etapie następuje właściwe zróżnicowanie komórek. Komórki Gram-dodatnie z uwięzionym kompleksem barwnika nadal mają zabarwienie fioletowe, podczas gdy komórki Gram-ujemne stają się bezbarwne po wyptukaniu kompleksu.
- 4) Ostatnim etapem jest dodatek barwnika kontrastowego – fuksyny zasadowej. Barwnik ten, podobnie jak fiolet krystaliczny, wykazuje charakter zasadowy, słabo rozpuszcza się w wodzie, a w roztworze tworzy kationy, które łatwo penetrują przez warstwę mureiny i łączą się z ujemnie naładowanymi cząsteczkami takimi jak kwasy teichojoyowe, peptydy czy główki fosfolipidów. Ponieważ kolor safraniny jest mniej intensywny niż fioletu krystalicznego komórki Gram-dodatnie pozostają fioletowe. Bezbarwne komórki Gram-ujemne zabarwione safraniną przyjmują kolor różowy.

Efekt barwienia Grama

W efekcie wyżej przedstawionych działań i opisanego mechanizmu komórki efekty mogą być trojaki:

- bakterie barwią się na kolor ciemno-fioletowy, prawie czarny, określamy jako Gram-dodatnie lub (Gram +)
- bakterie barwią się w kolorze czerwonym, określamy jako Gram-ujemne lub (Gram -)
- bakterie nie barwią się w ogóle metodą Grama (np. prątki)

Efekt barwienia zależy od podłoża i wieku hodowli:

- starsze hodowle *Clostridium* mogą barwić się Gram-ujemnie
- kiełkujące endospory (i pierwsze pokolenie po wykiełkowaniu) *Bacillus subtilis* barwią się Gram-ujemnie

Doświadczenie 3.**a) Selekcja szczepów odpornych na wysokie stężenie metali ciężkich (niklu) z zastosowaniem płytek gradientowych**

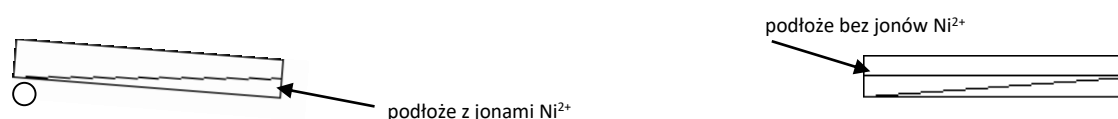
Materiały

- gleba
- płytki Petriego
- kolby szklane płaskodenne
- podłoże LA
- podłoże LA z dodatkiem jonów niklu (50ml)
- jałowa sól fizjologiczna
- woda destylowana

Wykonanie:

Przygotowanie płytek gradientowych

Przygotować 50 ml podłoża LA z dodatkiem jonów niklu (50µg NiCl₂ na ml). Oprzeć szalkę na bagietce i wylać podłoże z LA z jonami wg ryciny 11, aby uzyskać różne stężenie jonów w obrębie podłoża. **Zaznaczyć na spodzie szalki kierunek wzrostu stężenia niklu na spodzie szalki.** Po zastygnięciu płytkę zdjąć z bagietki i następnie wylać podłoże cienką warstwą podłoża LA bez dodatku jonów Ni²⁺. Na każdą grupę przygotować 3 szalki.



Ryc. 11. Wylewanie podłoża gradientowego na szalkę Petriego.

Posiew mikroorganizmów glebowych na przygotowane płytki gradientowe

Z nawózki 10g gleby, wytrząsanej 10 minut w 90 ml jałowej soli fizjologicznej otrzymujemy rozcieńczenie 10⁻¹. Po sedymentacji makrocząsteczek, z otrzymanego rozcieńczenia wykonać kolejne rozcieńczenia (od 10⁻² do 10⁻⁵) w probówkach Eppendorfa z 1 ml soli fizjologicznej. Następnie nanieść na płytki gradientowe (zarówno z niklem jak i mocznikiem) po 100µl rozcieńczeń 10⁻³– 10⁻⁵). Posiewy inkubować w temperaturze pokojowej przez 5-7 dni. Po inkubacji podzielić szalkę na 4 pola i procentowa określić zawartość kolonii.

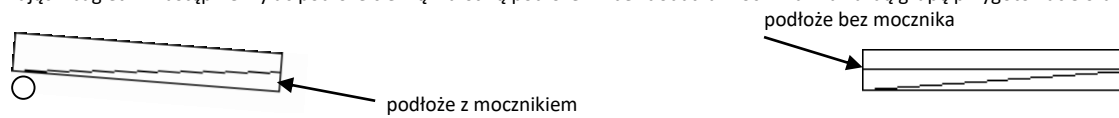
b) Selekcja szczepów odpornych na wysokie stężenie mocznika z zastosowaniem płytek gradientowych

Materiały

- gleba
- płytki Petriego
- kolby szklane płaskodenne
- podłoże LA
- podłoże LA z dodatkiem mocznika (50ml)
- jałowa sól fizjologiczna
- woda destylowana

Pozyskiwanie szczepów mikroorganizmów o znaczeniu przemysłowym**Wykonanie:****Przygotowanie płytek gradientowych**

Przygotować 50 ml podłoża LA z dodatkiem mocznika (1mg mocznika na ml). Oprzeć szalkę na bagietce i wylać podłoże z LA z jonami wg ryciny 12, aby uzyskać różne stężenie mocznika w obrębie podłoża. **Zaznaczyć strzałką na spodzie szalki kierunek wzrostu stężenia mocznika.** Po zastygnięciu płytkę zdjąć z bagietki i następnie wylać podłoże cienką warstwą podłoże LA bez dodatku mocznika. Na każdą grupę przygotować 3 szalki.



Ryc. 12. Wylewanie podłoża gradientowego

Posiew mikroorganizmów glebowych na przygotowane płytki gradientowe

Z nawózki 10g gleby, wytrząsanej 10 minut w 90 ml jałowej soli fizjologicznej otrzymujemy rozcieńczenie 10^{-1} . Po sedimentacji makrocząsteczek, z otrzymanego rozcieńczenia wykonać kolejne rozcieńczenia (od 10^{-2} do 10^{-5}) w probówkach Eppendorfa z 1 ml soli fizjologicznej. Następnie nanieść na płytki gradientowe (zarówno z niklem jak i mocznikiem) po 100 μ l rozcieńczeń 10^{-3} – 10^{-5}). Posiewy inkubować w temperaturze pokojowej przez 5-7 dni. Po inkubacji podzielić szalkę na 4 pola i procentowa określić zawartość kolonii.

Doskonalenie cech produkcyjnych mikroorganizmów o znaczeniu przemysłowym

Procesy biotechnologiczne z zastosowaniem mikroorganizmów wyizolowanych bezpośrednio ze środowiska naturalnego na ogół przebiegają z wydajnością niewystarczającą, aby ich użycie na skalę przemysłową było opłacalne ekonomicznie. Aby wykorzystać potencjał biotechnologiczny tych mikroorganizmów, przeprowadza się modyfikację ich genotypu prowadzącą do uzyskania szczepów produkcyjnych mogących znaleźć zastosowanie w przemyśle. Modyfikację genotypu szczepu macierzystego, wyizolowanego z próbki środowiskowej i scharakteryzowanego taksonomicznie, prowadzi się na drodze: mutagenезy indukowanej *in vivo* lub fuzji protoplastów komórek szczepów pochodzących od genetycznie różniących się przodków.

Mutagenезa - proces prowadzący do powstania mutantu

Mutant – mikroorganizm różniący się genotypem od komórek szczepu macierzystego

- zmiany genotypowe w komórkach mutantu muszą być trwałe
- dziedziczone przez komórki potomne
- ich obecność musi nadawać szczepowi mutantu właściwości fenotypowe różniące go od szczepu macierzystego

Mutacja – trwała zmiana w sekwencji DNA, która jest przekazywana komórkom potomnym

Zmiana premutacyjna – zmiana w sekwencji DNA, która może być usunięta w procesie replikacji

Mutagenезa spontaniczna (samorzutna) – proces powstawania mutacji zachodzący niezależnie od określonych czynników zewnętrznych

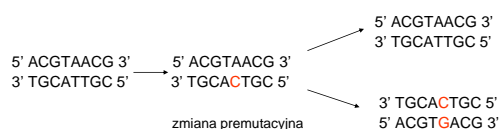
- błędy popełniane w czasie replikacji DNA
- błędy powstające w wyniku samorzutnych modyfikacji chemicznych zasad DNA

Częstość mutagenезy spontanicznej

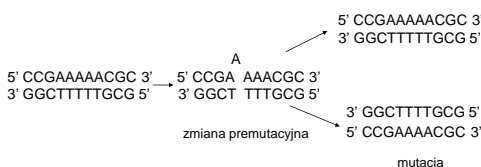
- bakteriofag T4 – 10^{-7}
- *Escherichia coli* – 10^{-9}
- *Drosophila melanogaster* – 10^{-10}

➤ **Substytucja** – zmiana jednej pary zasad na inną

- **transzycja** – zmiana jednej puryny na inną purynę lub zmiana jednej pirymidyny na inną pirymidynę
- **transwersja** – zmiana pirymidyny na purynę lub puryny na pirymidynę



➤ **Delecja** - usunięcie jednej lub większej liczby par zasad



Mutacje powstające na skutek modyfikacji zasad w DNA

➤ **Insercja** – wstawienie jednej lub większej liczby par zasad



➤ **Deaminacja cytozyny** – powoduje powstanie uracylu, nie zwiększa poziomu mutacji spontanicznych

➤ **Metylacja cytozyny** – powoduje powstanie 5-metylocytozyny, nie zwiększa poziomu mutacji spontanicznych

➤ **Deaminacja 5-metylocytozyny** – powoduje powstanie tyminy i po replikacji mutację GC → AT

Mutagenезa indukowana – proces powstawania mutacji na skutek działania zewnętrznych czynników fizycznych lub chemicznych

Typy mutacji indukowanych

- mutacje punktowe (substytucje)
- delecje
- insercje

Powstałe komórki mutantów różnią się genotypowo i fenotypowo od komórek szczepu macierzystego oraz wzajemnie od siebie

Czynniki chemiczne i fizyczne wykorzystywane w doskonaleniu mikroorganizmów na drodze mutagenезy

Czynnik mutageny	Sposób działania
Promieniowanie UV	powstanie dimerów pirymidynowych
Promieniowanie X	pęknięcia jedno- i dwuniciowego DNA
5-bromouracyl	analog tyminy, tworzy pary z adeniną i guaniną

Czynnik mutageny	Sposób działania
2-aminopuryna	analog adeniny, tworzy pary z tyminą i cytozyną
Hydroksyloamina	hydroksylacja cytozyny, pochodna tworzy pary z adeniną
N-metylo-N'-nitro-N-nitrozoguanidyna	synteza metyloguaniny podczas replikacji, powoduje tranzycje i inne typy mutacji
Metanosulfonian metylowy	alkilacja puryn i pirymidyn
Oranz akrydyny	interkalacja pomiędzy zasady w DNA, powoduje błędy replikacji i mutacje typu insercja lub delecja
Kwas azotowy (III)	deaminacja adeniny, hipoksantyna tworzy pary z cytozyną

Dawka mutagenu

- zbyt duża dawka czynnika mutagennego prowadzić może do śmierci wszystkich komórek szczepu macierzystego poddanych jego działaniu
- duże dawki czynnika mutagennego prowadzą do uszkodzenia DNA w wielu miejscach genomu
- mutacje pożądane mogą być maskowane przez mutacje niekorzystne
- **optymalna dawka mutagenu powoduje efekt letalny u max 90% komórek poddawanych mutagenzie**

Wielkość dawki czynnika mutagennego zależy od:

- właściwości szczepu poddawanego mutagenzie
- warunków hodowli
- wieku hodowli

Promieniowanie UV (254-265 nm)

Zalety

- wysoka częstotliwość powstawania mutacji w stosunku do efektu letalnego
- dostępność i łatwość użycia źródła promieniowania
- łatwość dozowania dawek
- moc lampy
- odległość od zawiesziny komórek
- czas działania
- **łatwość odtwarzania warunków mutagenyzy**
- **możliwość wywołania mutacji w rosnących komórkach wegetatywnych i sporach**

Piśmiennictwo:

1. Chmiel A.: Biotechnologia - podstawy mikrobiologiczne i biochemiczne, Wydawnictwo Naukowe PWN, 1998
2. Mikrobiologia techniczna (red. Libudzisz Z., Kowal K.). Łódź: Wydawnictwo Politechniki Łódzkiej 2000

Doświadczenie 4.

Doskonalenie właściwości proteolitycznych szczepów bakterii na drodze mutagenizacji z zastosowaniem promieniowania UV.

Materiały

- 20 ml hodowli nocnej szczepów bakteryjnych o aktywności proteolitycznej
- lampa UV
- agar
- pepton K
- ekstrakt drożdżowy
- mleko odtłuszczone 0,0 lub 0,5%
- jałowa sól fizjologiczna
- jałowe probówki Eppendorfa 1,5ml

a. Wykonanie

Przygotować 5 szalek Petriego .

b. Mutageniza indukowana promieniowaniem UV

Z 0,15 ml hodowli proteolitycznego szczepów bakteryjnych należy wykonać rozcieńczenia seryjne w probówkach Eppendorfa zawierających po 1,35 ml jałowej soli fizjologicznej tak, aby uzyskać rozcieńczenia komórek bakteryjnych w zakresie 10^{-1} – 10^{-3} .

Na każdą Szalkę z agarem mlecznym należy nanieść po 100µl rozcieńczenia 10^{-3} bakterii w soli fizjologicznej. Po posianiu odstawić bakterie na 20 minut a następnie otwarte płytki wystawiamy na działanie promieniowania UV. Płytki należy umieścić 5cm od lampy UV, będącej źródłem promieniowania. Czas ekspozycji poszczególnych płytek to: 5, 10, 15 i 30 minut. Jednej szalki nie naświetlamy.

Po naświetleniu wszystkich płytek należy je inkubować w temperaturze 28°C przez 5-7 dni w ciemności. Po inkubacji należy policzyć kolonie bakterii na poszczególnych płytkach i porównać je ze strefami przejaśnienia wokół kolonii bakteryjnych na płytce kontrolnej w celu określenia aktywności proteolitycznej poszczególnych kolonii bakteryjnych.

Imię i nazwisko:

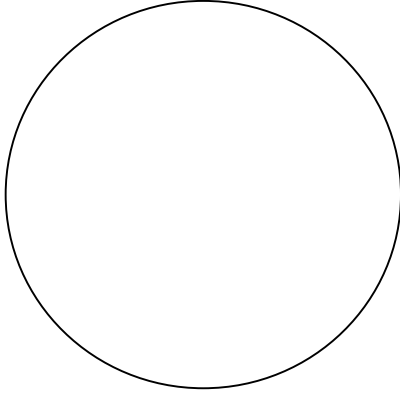
Doświadczenie 1.a

Na poniższych schematach umieść wynik doświadczenia:

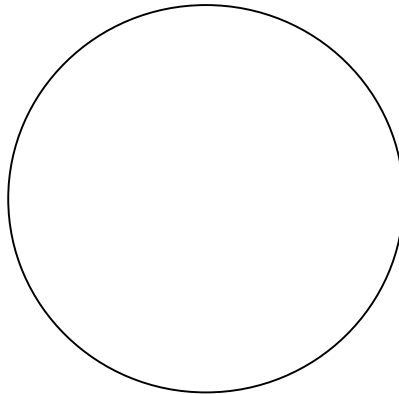
Płytki agarowe z dodatkiem skrobi

Na poniższych schematach narysuj położenie bakterii o aktywności amylolitycznej:

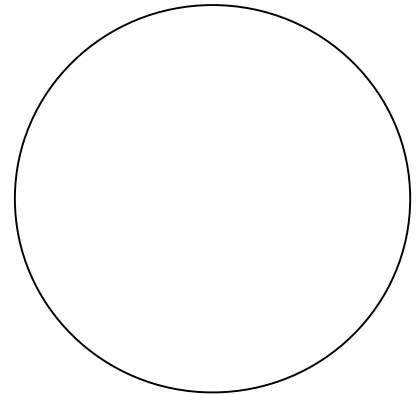
10^{-3}



10^{-4}



10^{-5}



Wnioski i interpretacja:

.....

.....

.....

.....

.....

.....

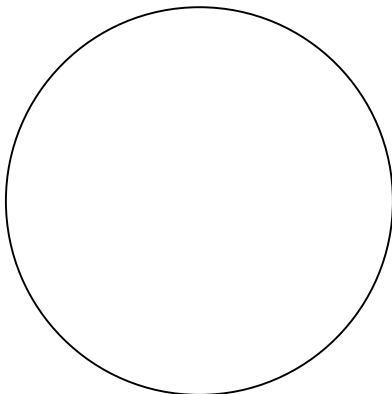
Doświadczenie 1.b

Na poniższych schematach umieść wynik doświadczenia:

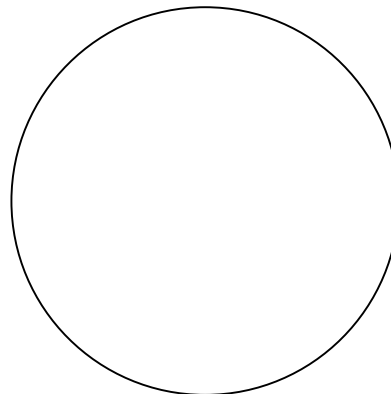
Płytki agarowe mleczne

Na poniższych schematach narysuj położenie bakterii o aktywności proteolitycznej:

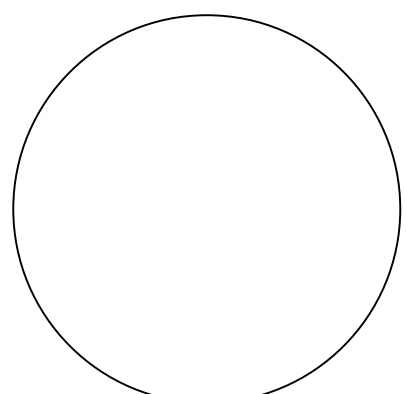
10^{-3}



10^{-4}



10^{-5}



Wnioski i interpretacja:

.....

.....

.....

.....

.....

.....

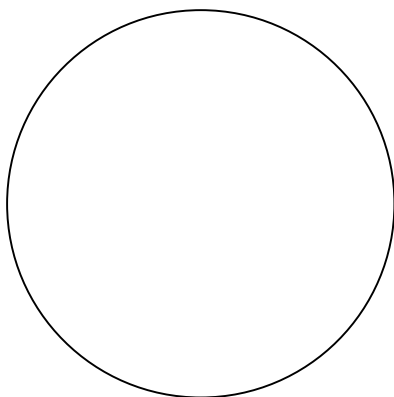
Doświadczenie 1.c

Na poniższych schematach umieść wynik doświadczenia:

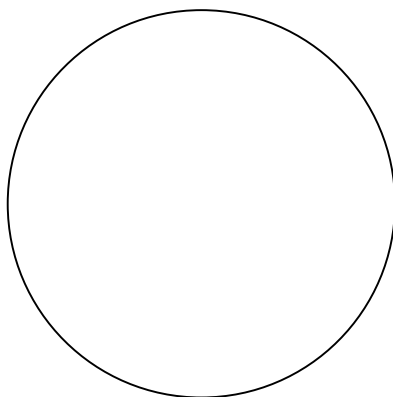
Płytki agarowe z dodatkiem tłuszczu

Na poniższych schematach narysuj położenie bakterii o aktywności lipolitycznej:

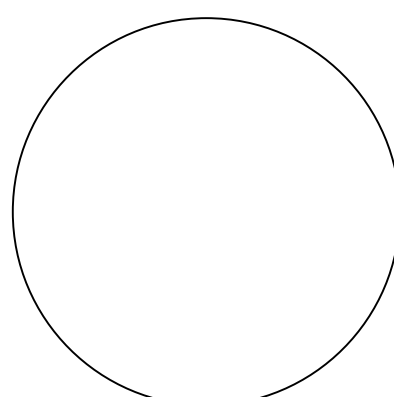
10^{-3}



10^{-4}



10^{-5}



Wnioski i interpretacja:

.....

.....

.....

.....

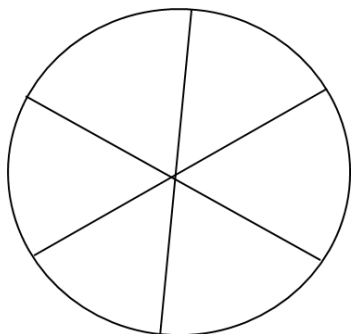
.....

.....

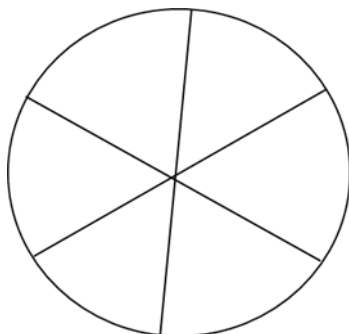
.....

Doświadczenie 2. (wykonanie na drugich zajęciach)

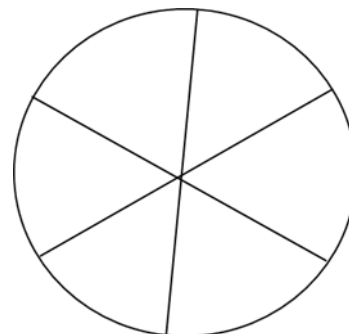
Posiewy redukcyjne kolonii



Płytki agarowa ze skrobią



Płytki agarowa mleczna



Płytki agarowa z dodatkiem tłuszczu

Wnioski i interpretacja:

.....

.....

.....

.....

.....

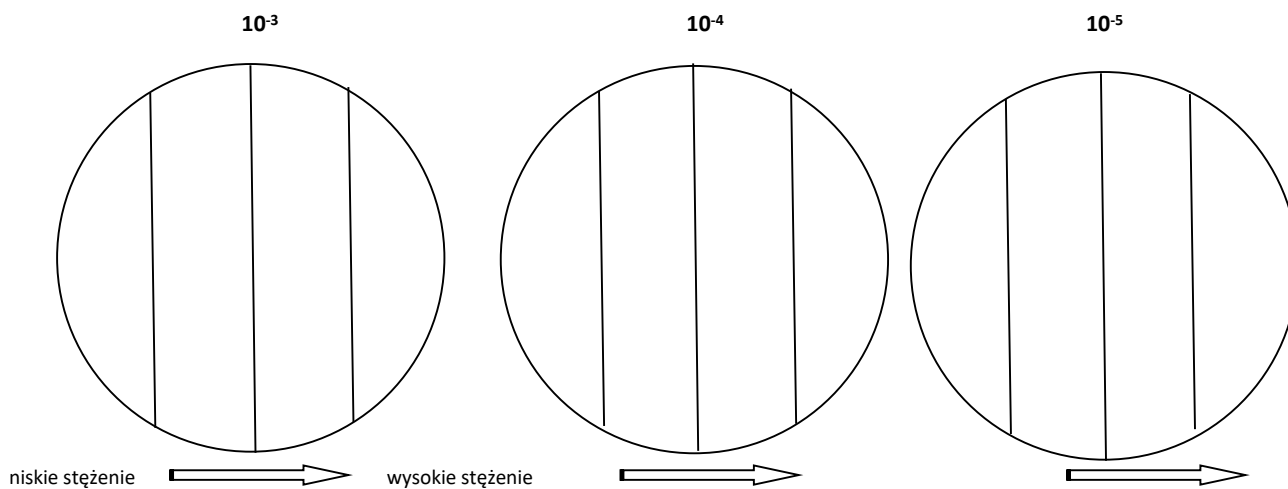
.....

.....

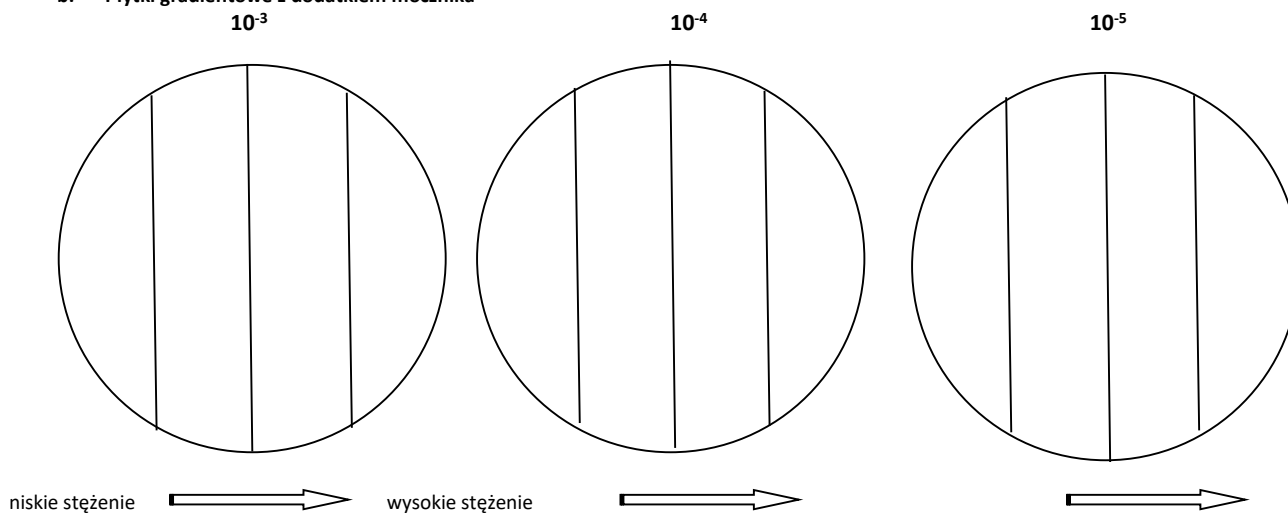
Doświadczenie 3.

Na poniższych schematach narysuj wynik doświadczenia:

a. Płytki gradientowe z dodatkiem jonów niklu



b. Płytki gradientowe z dodatkiem mocznika



Wnioski i interpretacja:

.....

.....

.....

.....

.....

.....

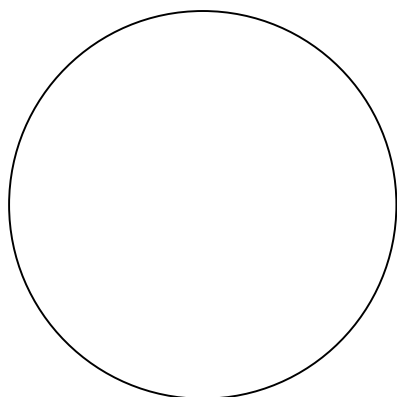
.....

.....

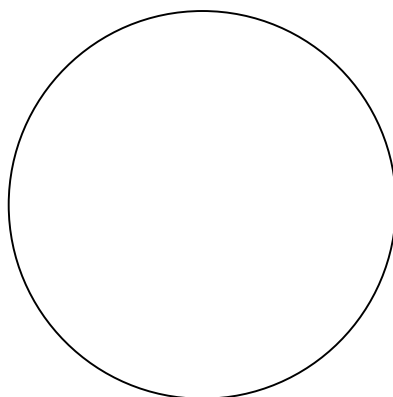
Doświadczenie 4.

Doskonalenie właściwości proteolitycznych wyizolowanych szczepów bakterii na drodze mutagenizacji z zastosowaniem promieniowania UV

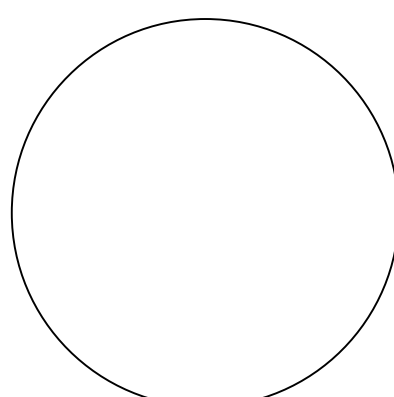
a. Płytki agarowe LA



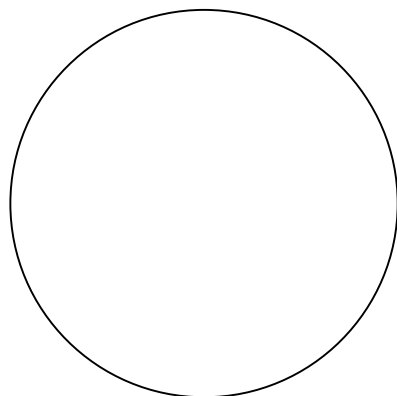
kontrola



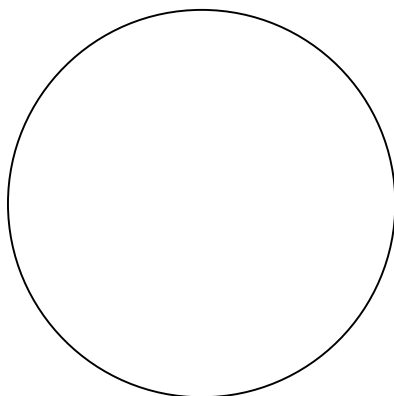
5 minut naświetlania



10 minut naświetlania



15 minut naświetlania



30 minut naświetlania

Wnioski i interpretacja:

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....