



Mikroorganizmy i cząsteczki

Zeszyt 1

Autorzy tego zeszytu

Eckhard R. Lucius (koordynator)

Catherine Adley, Jan Frings, Cecily Leonard, Dean Madden, Markus Müller, Uta Nellen, Patricia Nevers, John Schollar, Marleen van Strydonc, Paul Wymer

Europejska Inicjatywa Nauczania Biotechnologii (EIBE) postawiła sobie zadanie wspomaganie nowych metod nauczania w szkole i w kształceniu nauczycieli dla pogłębienia zrozumienia biotechniki jak również wniesienia wkładu w naukowo uzasadnioną, publiczną debatę w tej dziedzinie.

BELGIA

Vic Damen / Marleen Van Strydonck, R&D Groep VEO, Afdeling Didactiek en Kritiek, Universiteit Antwerpen, Universiteitsplein 1, B-2610 WILRIJK.

DANIA

Dorte Hammelev, Biotechnology Education Group, Foreningen af Danske Biologer, Sonderengen 20, DK-2860 SOBORG.

Lisbet Marcussen, Biotechnology Education Group, Foreningen af Danske Biologer, Lindevej 21, DK-5800 NYBORG.

NIEMCY

Horst Bayrhuber / Eckhard R. Lucius / Reglana Rojek / Ute Harms / Angela Kroß, Institut für die Pädagogik der Naturwissenschaften an der Universität Kiel, Olshausenstraße 62, D-24098 KIEL.

Ognian Serafimov, UNESCO-INCS, c/O Jörg-Zürn-Gewerbeschule, Rauensteinstraße 17, D-88662 ÜBERLINGEN. Eberhard Todt, Fachbereich Psychologie, Universität Gießen, Otto-Behaghel-Straße 10, D-35399 GIEßEN.

FRANCJA

Gerard Coutouly LEGTP Jean Rostand, 18 Boulevard de la Victoire, F-67089 STRASBOURG Cedex.

Laurence Simonneaux / Jean-Baptiste Puel, Ecole Nationale de Formation Agronomique, Toulouse-Auzeville, Boite Postale 87,

F-31326 CASTANET TOLOSAN Cedex.

IRLANDIA

Catherine Adley / Cecily Leonard, University of Limerick, LIMERICK.

WŁOCHY

Antonio Bargellesi-Severi / Alessandra Corda Mannino / Stefania Uccelli, Centro di Biotecnologie Avanzate, Largo Rosanna Benzi 10, I-16132 GENOVA.

LUKSEMBURG

John Watson, Ecole Européenne de Luxembourg, Département de Biologie, 23 Boulevard Konrad Adenauer, L-1115 LUXEMBOURG.

HOLANDIA

David Bennett, Cambridge Biomedical Consultants, Schuytstraat 12, NL-2517 XE DEN HAAG.

Fred Brinkman, Hogeschool Holland, Academy for Communication, Postbus 261, NL-1110 AG DIEMEN.

Liesbeth van de Grint / Jan Frings, Hogeschool van Utrecht, Educatie Centrum voor Biotechnologie, FEO, Afdeling Exacte Vakken, Biologie, Postbus 14007, NL-3508 SB UTRECHT

AUSTRIA

Rainhart Berner, Höhere Bundeslehr- und Versuchsanstalt für Chemische Industrie Wien, Abt. für Biochemie, Biotechnologie und Gentechnik, Rosensteingasse 79, A-2170 WIEN.

HISZPANIA

Maria Sáez Brezmes / Angela Gómez-Nino, Rosa Villamanán, Facultad de Educación, Universidad de Valladolid, Geologo Hernández Pacheco 1, ES-47014 VALLADOLID.

SZWECJA

Margareta Johansson, Föreningen Gensyn, PO Box 37, S-26881 SVALÖV

Elisabeth Strömberg, Östrabo Gymnasiet, S-45181 UDDEVALLA.

ZJEDNOCZONE KRÓLESTWO

Wilbert Garvin, Northern Ireland Centre for School Biosciences, NIESU, School of Education, The Queen's University of Belfast, BELFAST, BT7 1NN.

John Grainger / John Schollar / Caroline Shearer, National Centre for Biotechnology Education, The University of Reading, PO Box 228, Whiteknights, READING, RG6 6AJ.

Jill Turner, Department of Science and Technology Studies, University College London, Gower Street, LONDON, WC1 6BT

Paul Wymer, Society for General Microbiology, Marlborough House, Basingstoke Road, READING RG7 1AE.

KOORDYNATOR Z RAMIENIA EIBE

Horst Bayrhuber, Institut für die Pädagogik der Naturwissenschaften an der Universität Kiel, Olshausenstraße 62, D-24098 KIEL, Germany Telefon: + 49 931 880 3166 (EIBE Secretary: Regina Rojek). Fax: + 49 931 880 3132.



Spis treści

Przepisy bezpieczeństwa, prawo autorskie i podziękowania	4
O niniejszym zeszycie	5
Wykonywanie modeli	
Model-wycinanka DNA	6
Modele mikroorganizmów	8
Ekstrakcja DNA	
Izolowanie DNA z bakterii	10
Izolowanie DNA z cebuli	12
Mikroorganizmy użyteczne	
Produkcja amylazy	14
Produkcja celulazy	16
Produkcja antybiotyków	18
Prezentacja osiągnięć w dziedzinie mikrobiologii	
Wytwarzanie ciasta chlebowego	22
Immobilizowanie komórek drożdżowych	22
Ogniwo mikrobiologiczne	25
Przenoszenie genów	
Koniugacja bakterii	27
Przenoszenie genów przez bakterie <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	32
Załącznik 1	
Receptura żywek do hodowli mikroorganizmów	34
Załącznik 2	
Podstawy techniki prac mikrobiologicznych	35
Załącznik 3	
Otwieranie ampułki	35

World Wide Web

Tylko niewiele dziedzin nauki rozwija się tak szybko jak biotechnologia. EIBE przy pomocy mediów elektronicznych rozpowszechnia zeszyty zawierające materiał dydaktyczny, aby móc stale informować o najnowszym stanie wiedzy w tej dziedzinie i propagować ją w sposób tani.

Niniejszy zeszyt, jak również wszystkie inne materiały dydaktyczne EIBE stoją do dyspozycji w całej Europie i na całym świecie, poprzez World Wide Web. Można je znaleźć pod:

<http://www.reading.ac.uk>:

8001/

Wszystkie zeszyty EIBE w World Wide Web są plikami w formacie Portable Document Format (PDF). Oznacza to, że zachowana zostaje wysoka jakość rysunków, kolorów, czcionki i rozmieszczenie materiałów, niezależnie od zastosowania systemu. (Macintosh, łącznie z Power PC, Windows, DOS lub Unix).



Pliki PDF są również mniejsze niż ich pliki źródłowe, tak że możecie je szybciej ładować. Abyście mogli obejrzeć sobie materiały dydaktyczne EIBE, potrzebujecie jednak odpowiedniej kopii programu do odczytu, Adobe Acrobat.

Program Adobe Acrobat można otrzymać bezpłatnie w wielu językach (holenderski, angielski, francuski, niemiecki, hiszpański, szwedzki i włoski). Ładować można z:

<http://www.adobe.com/>

Przy pomocy tego oprogramowania możecie obejrzeć materiały dydaktyczne EIBE lub wydrukować je. Oprócz tego możecie przy jego pomocy łatwo wyszukać materiał.

UWAGA: *Adobe* i *Acrobat* są zarejestrowanymi znakami towarowymi firmy Adobe Systems Incorporated i są chronione prawem autorskim. *Macintosh* jest zarejestrowany jako znak towarowy firmy Apple Computer Incorporated.

Przepisy bezpieczeństwa

We wszystkich zeszytach EIBE staraliśmy się zidentyfikować wszystkie możliwe zagrożenia i zaproponować odpowiednie środki ostrożności. Tak dalece jak to możliwe proponowane doświadczenia są zgodne z ogólnie obowiązującymi w Unii Europejskiej zaleceniami zapewnienia bezpieczeństwa. W przypadku szczególnych zagrożeń zalecenia te zostały uwzględnione. Załącznik 2 do niniejszego zeszytu zawiera dodatkowe wytyczne zachowania bezpieczeństwa.

Użytkownik powinien być świadomy tego, że mogą zdarzyć się błędy i opuszczenia. Nadto różni pracodawcy i instytucje kształcące mają różne normy postępowania. Dlatego przed przeprowadzeniem doświadczenia użytkownik powinien zawsze zapoznać się z własnymi zaleceniami bezpieczeństwa. Oznacza to, że MUSI być zachowana każda zasada wymagana przez pracodawcę lub instytucję kształcącą, niezależnie od propozycji zawartych w zeszycie EIBE.

Gdyby zalecenia ostrożności nie podawały inaczej, zakłada się, że:

- doświadczenia przeprowadzone są w odpowiednio wyposażonej i odpowiednio nadzorowanej pracowni przyrodniczej
- wszystkie urządzenia i sprzęt do pracy są starannie konserwowane i przeglądane; zwykle prace laboratoryjne (jak podgrzewanie cieczy) wykonywane są z zachowaniem ostrożności;
- zwraca się uwagę na dokładne wykonanie pracy, gdy używane są chemikalia lub żywe organizmy;
- w przypadku spodziewanego zagrożenia dla oczu muszą być noszone okulary ochronne;
- uczniowie i/lub studenci zapoznani są z bezpiecznym posługiwaniem się podczas doświadczeń chemikaliami i mikroorganizmami.

Podziękowania

EIBE szczególnie jest wdzięczny za pomoc przy opracowywaniu niniejszego materiału następującym osobom: Liesbeth van de Grint (Hogeschool van Utrecht, Holandia) i John Schollar (National Centre for Biotechnology Education, The University of Reading, Wlk. Brytania) zorganizowali i zrealizowali międzynarodowe warsztaty, podczas których przetestowano materiał niniejszego zeszytu. Następujący nauczyciele wzięli w tym udział i dostarczyli bardzo pomocnych komentarzy do wstępnie opracowanych materiałów: E. Vergants, L. Daniels, L. Neels (Belgia); Dorte Hammelev (Dania), Lucienne Diemer, Gerard Coutouly (Francja), Thomas Jess, dr U. Schnack, dr E. Lipkow (Niemcy); A. de Graaf, Guus Smid, J. Gradener (Holandia); Rebecca Weston, Jane Gent, Derek Mackie, Sarah Whitethread, Maggie Parson (Wlk. Brytania).

© Powielanie

Zeszyty EIBE podlegają prawu o powielaniu i kopiowaniu, jednak są one dostępne bezpłatnie dla instytucji kształcących, do celów niekomercyjnych. Gdybyście chcieli niniejszy materiał częściowo lub całkowicie użyć do celów handlowych lub dalej rozpowszechnić w dobrowolnej postaci to skontaktujcie się z:

panią Reginą Rojek
Wydział nauczania przedmiotów
biologicznych w uniwersytecie w Kilonii
Olshausenstr. 62
D-240 98 KIEL Niemcy
Telefon: +49(0) 431 880 3166
Fax: + 49(0) 431 880 3132
E-Mail: rojek@ipn.uni-kiel.de

Zespół podstawowy

- **Catherine Adley**
The University of Limerick, Irland
- **Jan Frings**
Hogeschool van Gelderland, Nederlande
- **Cecily Leonard**
The University of Limerick, Irland
- **Eckhard R. Lucius (koordynator) IPN w**
Uniwersytecie w Kilonii, Niemcy
- **Marleen van Strydonck**
The University of Antwerp, Belgien
- **Paul E.O. Wymer**
The Wellcome Trust for Medical Science
London, Wlk. Brytania

Układ graficzny, ilustracje, czcionka, teksty uzupełniające i druk: Dean Madden, Caroline Shearer, NCBE, The University of Reading, Wlk. Brytania.

Prawa autorskie do ilustracji © Dean Madden 1997.
Tłumaczenie: Ursula Goertz

O niniejszym zeszycie

Niniejszy zeszyt zawiera zbiór praktycznych prac, które osobno lub jedna po drugiej mogłyby stanowić część jednostki nauczania. Zostały one opracowane przez nauczycieli i wykładowców różnych krajów europejskich i zostały zebrane pod patronatem EIBE (European Initiative for Biotechnology Education), z pomocą Komisji Europejskiej DG XII.

Wszystkie ćwiczenia zostały intensywnie przetestowane z udziałem nauczycieli z różnych części Europy, podczas praktycznych warsztatów szkoleniowych.

Ćwiczenia niniejszego zeszytu zawierają:

1. Modele cząsteczki DNA i różnych mikroorganizmów. Powinny one pokazać istotne cechy tych form życia i dać uczniom możliwość poznania względnej wielkości mikroorganizmów.
2. proste, bezpieczne i tanie metody ekstrakcji DNA, aby zapoznać uczniów z wymaganymi do tego podstawowymi technikami pracy i umożliwić im zapoznanie się z materiałem genetycznym.
3. mnogość doświadczeń dla unaocznienia
 - a) obecność mikroorganizmów w otoczeniu i obecności różnych szczepów użytecznych
 - b) niektórych produktów wytwarzanych z udziałem mikroorganizmów (enzymy i antybiotyki).Dwa doświadczenia są doświadczeniami jakościowymi, jedno pozwala na ilościowe wyznaczenie produkcji enzymu.
4. różne doświadczenia z uwidocznieniem działania wzrostu mikroorganizmów, zaczynając od prostej pracy z ciastem chlebowym, poprzez fermentację i na koniec z bezpośrednim pomiarem działalności metabolicznej w drożdżach. Każde z tych doświadczeń daje możliwość dalszych, rozszerzonych badań. Celem motywowania uczniów metodom prac o znaczeniu biotechnicznym dawano pierwszeństwo przed zasadami teoretycznymi.
5. dwie demonstracje pokazujące naturalne metody przenoszenia genów, po to, by dokonać praktycznego wprowadzenia w podstawy modyfikacji genetycznej.

Ponieważ dwa z praktycznych doświadczeń zawierają produkcję i sposób działania antybiotyków, jak również pokazują przenoszenie odporności na działanie antybiotyków, dołączono do tych instrukcji dodatkowe informacje. Autorzy próbowali utworzyć kombinację łatwych i trudniejszych ćwiczeń i mają nadzieję, że nauczyciele biologii znajdą w tym coś interesującego i dającego się zastosować. Dwa załączniki zawierają kilka podstawowych informacji o zastosowaniu technik prac mikrobiologicznych w pracowniach szkolnych.

W najbliższym czasie do dyspozycji postawimy uzupełniające instrukcje: powiązania obiegów, przepisy bezpieczeństwa, źródła zaopatrzenia w materiały i inne ważne informacje dla różnych części Unii Europejskiej.

Mile widziane będą uwagi do niniejszych materiałów, zwłaszcza uwagi nauczycieli, których zdania jesteśmy ciekawi. Komentarze i pytania lub pilną korespondencję dotyczącą zaleceń bezpieczeństwa powinno się kierować do:

Dr Eckharda R. Luciusa
Wydział Nauczania Przedmiotów Biologicznych
Uniwersytetu w Kilonii
Olshausenstr. 62
D-24098 Kiel, Niemcy
Tel.: +49 431 880 3137
fax: +49 431 880 1521
E-Mail:lucius@ipn.uni-kiel.de.

National Centre for Biotechnology Education
The University of Reading
The United Kingdom

Tel. + 44 1734 783743
fax: + 44 1734 750140
E-Mail:D.R.Madden@reading.ac.uk.

Model-wycinanka DNA

Cel

- Pokazanie istotnych cech budowy DNA (kwasu dezoksyrybonukleinowego).

Pracochłonność

Sporządzenie modelu trwa ok. 30 minut. Jeżeli wycinanki (części przeciwległe) mają być kolorowane, to trzeba poświęcić więcej czasu.

Materiały i sprzęt

Potrzeby na każdego ucznia lub każdą grupę uczniów

- nożyczki
- mocny klej do papieru, taśmy klejące lub mały zszywacz
- nici (aby zawiesić elementy modelu lub zawiesić gotowy model)

Uwaga: aby otrzymać stabilny model można przykleić jeden do drugiego dwa szkielety cukrowo-fosforanowe.

Instrukcja konstruowania modelu

1. Wycina się szkielety cukrowo-fosforanowe A i B
2. Wycina się „szczeble” z par zasad
3. Przyczepy szczebli zagina się jak pokazano
4. Przyczepy z jednego końca każdego szczebelka przykleja się do numerowanych odcinków szkieletu A. Szczeble mogą być przymocowane w dowolnej kolejności.
5. Zawieszki mocuje się do drugiego końca szczebelka, do odpowiednich numerów szkieletu B.
6. Do modelu podwójnej helisy nitką mocuje się etykiety. Rysunek poniżej może być używany po to, by opisać model.

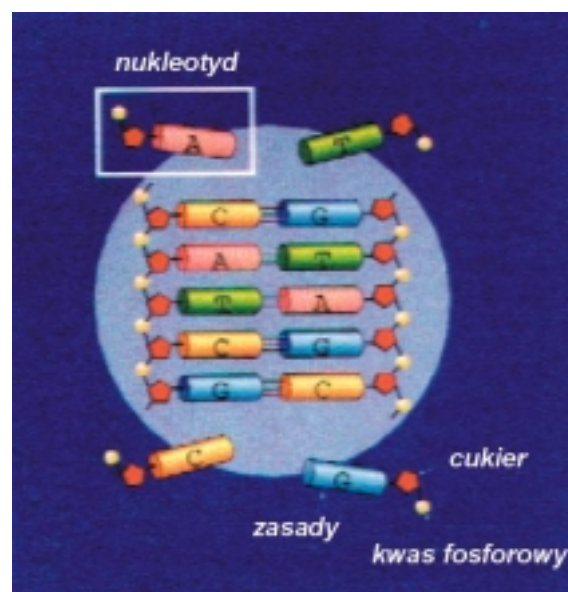
Podziękowania

Niniejszy model przejęty został z rządowej organizacji naukowej CSIRO w Australii, która opracowała go dla swego klubu „Double Helix” Science Club. EIBE dziękuje organizacji CSIRO za pomysł i zgodę na wykorzystanie modelu.

Pierwsza pozycja	Druga pozycja				Trzecia pozycja
	T	C	A	G	
T	PHE PHE LEU LEU	SER SER SER SER	TYR TYR STOP STOP	CYS CYS STOP TRP	T C A G
C	LEU LEU LEU LEU	PRO PRO PRO PRO	HIS HIS GLN GLN	ARG ARG ARG ARG	T C A G
A	ILE ILE ILE MET	THR THR THR THR	ASN ASN LYS LYS	SER SER ARG ARG	T C A G
G	VAL VAL VAL VAL	ALA ALA ALA ALA	ASP ASP GLU GLU	GLY GLY GLY GLY	T C A G

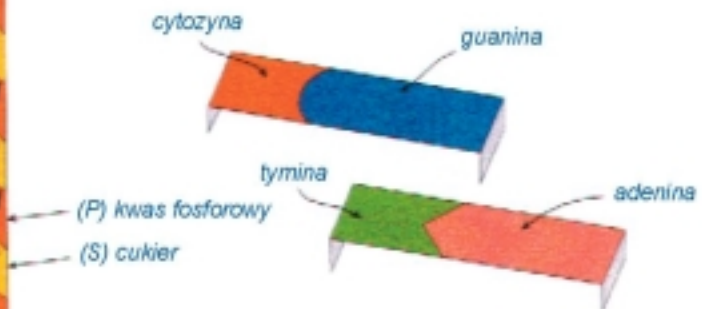
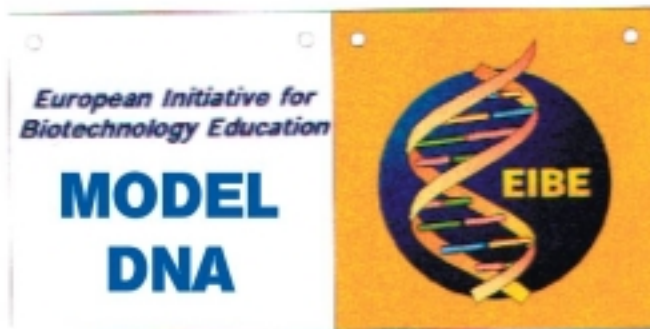
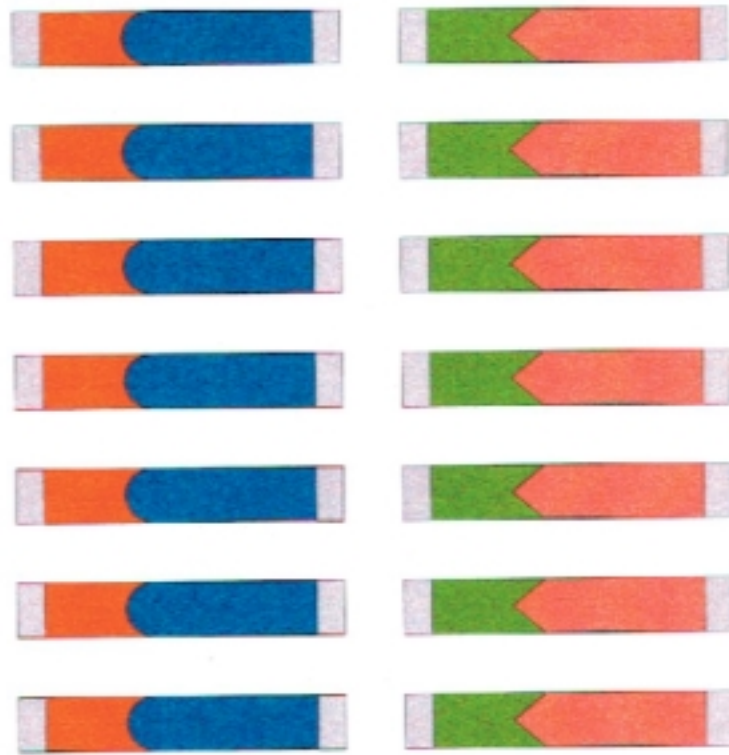
Kod genetyczny

Każda sekwencja trzech zasad na podwójnej helisie DNA koduje jeden z dwudziestu aminokwasów, tutaj w środku przedstawionych skrótem trzyliterowym.



Budowa DNA

Łańcuchy składające się z cząsteczek cukru i kwasu fosforowego tworzą obydwie „rusztowania” DNA. Między nimi są cztery zasady: tymina (T), cytozyna (C), adenina (A) i guanina (G), które połączone są wiązaniami wodorowymi.



Modele mikroorganizmów

Często trudno jest uczniom ocenić wielkości mikroorganizmów. Ponadto z trudem przychodzi im uchwycenie trójwymiarowej struktury mikroorganizmu po obserwacji przez mikroskop, dający strukturę dwuwymiarową.

Wykonanie modeli ułatwi uczniom dostęp do istotnych cech i względnej wielkości mikroorganizmów.

Takie polecenie pracy jest szczególnie owocne wtedy, gdy uczniom pozostawi się wolną rękę w opracowywaniu ich własnych modeli i gdy nie muszą oni postępować dokładnie według wstępnych danych. Z tego wynika, że takie polecenie pracy realizowane jest najlepiej w domu, (gdzie dysponuje się większym asortymentem materiałów i ma się więcej czasu.)

Uwaga: Temu uczącemu się, który uważa, że budowanie modeli leży poniżej jego godności należałoby zwrócić uwagę na długą historię budowy modeli w biologii molekularnej, aczkolwiek obecnie modele przestrzenne w dużym stopniu zastąpione zostały obrazowaniem komputerowym.

Cel

- pokazanie najważniejszych cech bakteriofagów lambda i wielu bakterii
- pomoc w ocenianiu względnej wielkości wirusów i bakterii

Zapotrzebowanie czasu

Wykonanie modelu bakteriofaga trwa ok. 30 minut. Jeżeli model ma być pokolorowany, to trzeba zaplanować więcej czasu. W zależności od staranności budowa modelu bakterii może trwać godzinę lub dłużej.

Uwaga: Celowe byłoby zlecić to zadanie jako pracę domową.

Sprzęt i materiały

Zapotrzebowanie na każdego ucznia lub grupę roboczą.

- Książki z rysunkami obrazującymi budowę wirusów i bakterii
- różne materiały do budowy modeli np. karton, wybrany materiał opakowaniowy, piłki pingpongowe, perelki i in.
- nożyczki
- klej, taśmy klejące lub mały zszywacz
- mazaki

Instrukcja pracy

Wirus

Z przedstawionego wykroju buduje się model bakteriofaga lambda.

Bakteria

Ze zgromadzonych przez uczniów materiałów projektuje się model bakterii (pałeczki i koki)

Dla każdego modelu

1. Pokazane główne cechy np. błony komórkowe i materiał genetyczny powinny być zidentyfikowane.
2. Wielkość przedstawionego organizmu powinna być określona.
3. Powinno się objaśniać proste możliwości określenia wielkości modelu młodszym uczniom, np. gdyby bakteria miała „tę” wielkość to porównywalnie ty byłabyś tak wysoka jak dom.

Objaśnienia i wskazówki

Możnaby również zachęcić uczniów do zbudowania modeli komórek zwierzęcych i roślinnych. Modele te mogłyby bardziej objaśnić różnice między prokaryotami a eukaryotami i wyraźnie podkreślić coraz częściej przytaczaną hipotezę endosymbiontów (która objaśnia ewolucyjne pochodzenie eukaryotów).

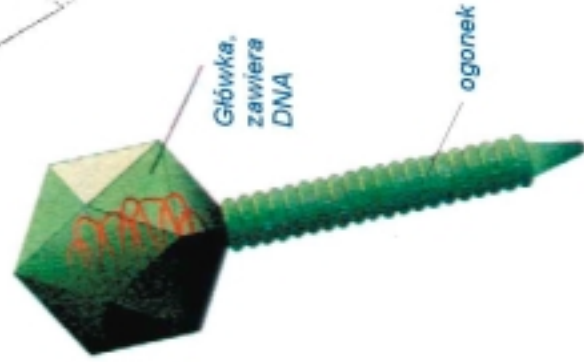
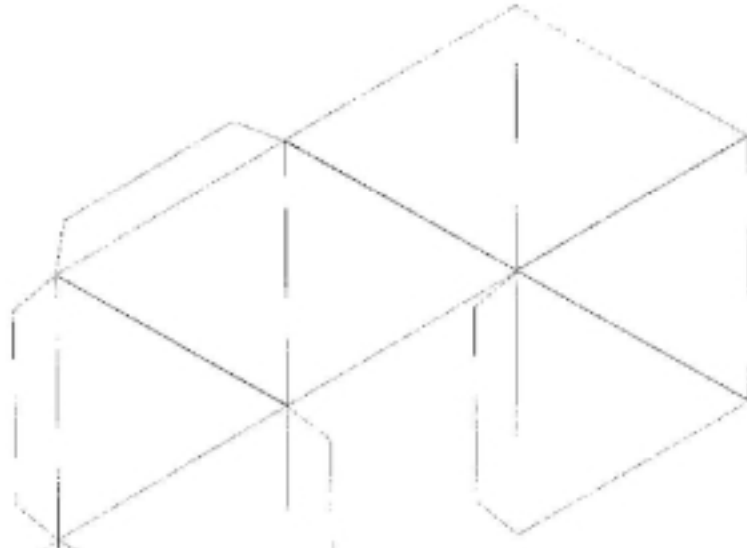
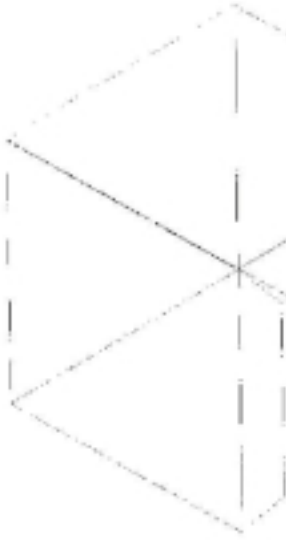
Informacja dodatkowa

Instrukcje budowy modeli opisane są również w następującej publikacji
Nicholl, L. und Nicholl D. (1987) Modelling the eukaryotic chromosome: a stepped approach. *Journal of Biological Education* 21 (2) 99-104.

Siatka do budowy główki bakteriofaga λ

Siatkę kopiuje się na karton lub papier powlekany (folia OHP)

Tnie się po liniach zewnętrznych, ryłcem zarysowuje się wszystkie linie i składa się wzdłuż tych linii. Przyczepczy przykleja się mocnym klejem



Główka,
zawiera
DNA

ogonek

Pasmo DNA może być przedstawione przy pomocy grubej nici lub drutu

Słomka do napojów może być użyta jako ogonek (ruchome dające się wyciągnąć słomki czynią model bardziej realistycznym)

Izolowanie DNA z bakterii

W tym doświadczeniu używa się lizosomu (enzymu) do rozłożenia ścian komórek bakteryjnych, a detergentu do rozzerwania wewnętrznych błon komórkowych, które następnie uwalniają kwasy nukleinowe (DNA i RNA).

Cel

- izolowanie DNA z bakterii *Escherichia coli* K-12

Przygotowanie

Kultury bakterii w pierw muszą być co najmniej 4 dni wcześniej umieszczone w pożywce bulionowej (tylko w pełni gęste hodowle wytwarzają znaczące ilości kwasów nukleinowych)

Zapotrzebowanie czasu

To doświadczenie trwa 50 minut (łącznie z 30 minutami, podczas których bakterie są inkubowane z enzymem).

Sprzęt i materiały

Zapotrzebowanie na każdego ucznia lub każdą grupę roboczą

- gęsta hodowla *Escherichia coli* K-12 (por. „przygotowanie” powyżej)
- lizosom w postaci proszku (mała szczypta na łopatkę wystarczy)
- 6 ml etanolu (schłodzonego). Wystarczy etanol skażony lub spirytus denaturowany
- 0,5 ml środka do mycia naczyń np. *Pril* (Henkel)
- drucik z uszkiem - eza
- 3 ml wody destylowanej
- 2 próbówki
- pipeta lub strzykawka jednorazowa 1 ml do dozowania wody i roztworu lizosomu
- łąźnia wodna nastawiona na 60°C
- inkubator nastawiony na 37°C

Przebieg doświadczenia

1. Co najmniej 4 dni przed rozpoczęciem doświadczenia nastawia się do rozmnażania kulturę *Escherichia coli* K-12
2. Małą ilość lizosomu dodaje się do 5 ml zawiesiny bakterii i starannie miesza się.
3. Mieszaninę inkubuje się w temp. 37°C przez 30 minut.
4. Do zawiesiny bakterii dodaje się 0,5 ml środka do mycia naczyń.
5. Próbówkę z mieszaniną inkubuje się w zlewce z wodą o temperaturze 60°C, przez 2 minuty.
6. Mieszaninę schładza się przez kilka minut w zimnej wodzie.

7. Na powierzchnię mieszaniny starannie i powoli wlewa się warstewkę zimnego etanolu.
8. Kwasy nukleinowe (DNA i RNA) zostają wytrącone w górnej warstwie etanolowej.

Objaśnienia i wskazówki

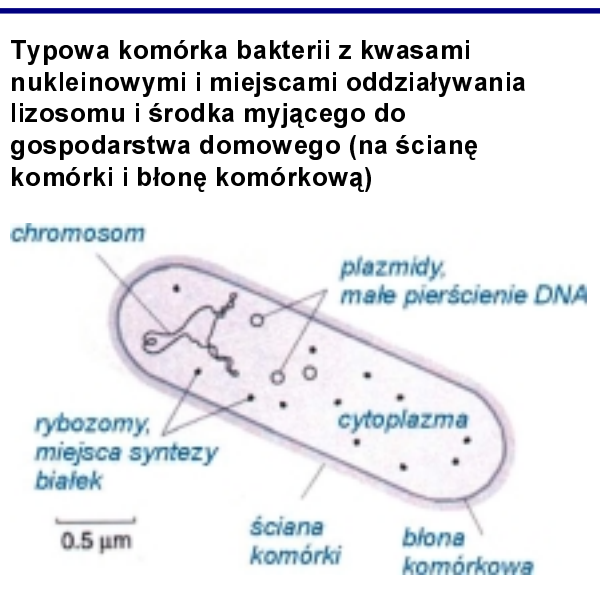
1. DNA można zabarwić fuksyną lub roztworem błękitu metylenowego.

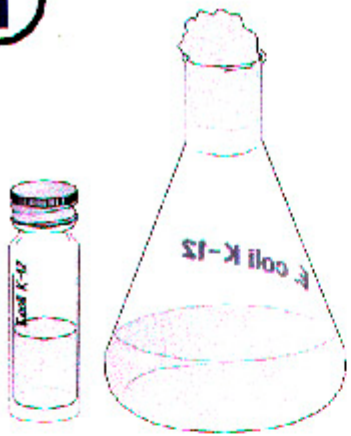
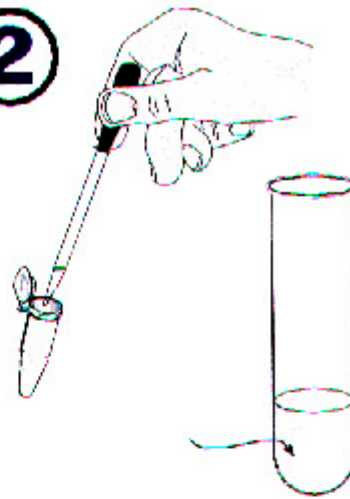
Środki bezpieczeństwa

Przy posługiwaniu się kulturami powinno się zachowywać ogólnie obowiązujące środki bezpieczeństwa dla prac mikrobiologicznych. Ostrożnie przy używaniu gorącej wody (operacja nr 5).

Podziękowania

Niniejsze doświadczenie bazuje na opracowanej przez Hertela i in. i Süßmutha i in. próbie izolowania DNA z *Bacillus subtilis*. Dziękujemy profesorowi Josephowi Lengelerowi, Osnabrück, za propozycję zastosowania w doświadczeniu środka do mycia naczyń.

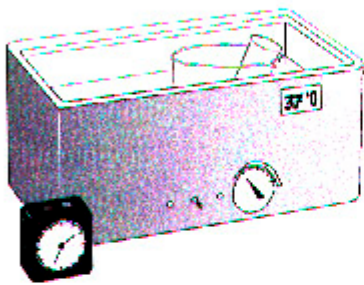
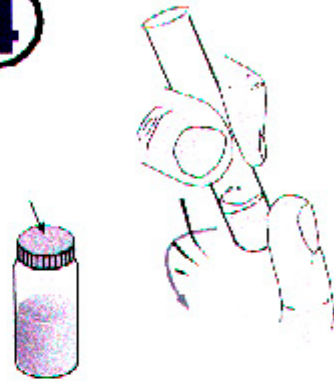


1**2**

1. Przygotuj hodowlę *E. coli* K-12 w pożywce bulionowej. Inkubuj ją 3-7 dni w temp. 37°C.

2. Dodaj niewielką ilość lizosomu do 5 ml zawiesiny bakteryjnej i wymieszaj starannie.

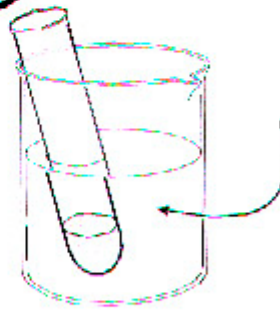
3. Inkubuj mieszaninę przez 30 min przy 37°C.

3**4**

4. Dodaj 0,5 ml środka do mycia naczyń do zawiesiny bakteryjnej.

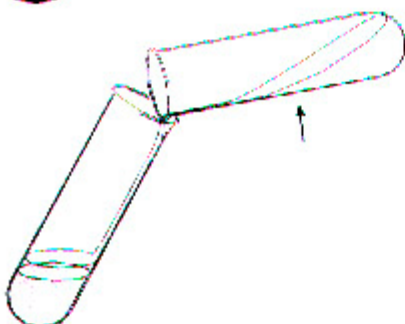
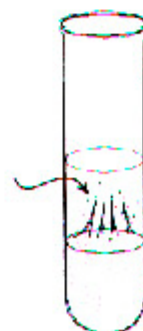
5. Inkubuj mieszaninę przez 2 min przy 60°C w zlewce z wodą.

6. Schładzaj mieszaninę przez kilka minut w zimnej wodzie.

5**6**

7. Na powierzchnię zawiesiny wprowadź powoli i bardzo ostrożnie zimny, wychłodzony w lodzie etanol.

8. Kwasy nukleinowe (cienkie, białe pasemka) precypitują w górnej, etanolowej warstwie.

7**8**

Izolowanie DNA z cebuli

Jest to metoda izolowania DNA i RNA z tkanki roślinnej. Tkanka jest wprawdzie rozrywana mechanicznie. Detergent używany w gospodarstwie domowym niszczy zarówno błony komórkowe jak również błonę jądra komórkowego. Resztki komórek odfiltrowuje się; kwasy nukleinowe i rozpuszczalne białka pozostają w roztworze. Enzym trawi białka a następnie kwasy nukleinowe wytrąca się w zimnym etanolu.

Cel

- izolowanie kwasów nukleinowych z tkanek cebuli.

Uwaga: Kwasy nukleinowe w ten sposób spreparowane nie są czyste. Właściwym zamiarem opisanej metody jest zademonstrowanie podstawowych zasad ekstrakcji DNA z tkanki.

Przygotowanie

Etanol musi być zimny, z lodu. Trzeba go pozostawić co najmniej na 24 godziny przed rozpoczęciem doświadczenia w butelce z tworzywa sztucznego odstawionej do zamrażarki.

Zapotrzebowanie czasu

Doświadczenie trwa 35 minut (łącznie z czasem inkubacji 15 minut).

Sprzęt i materiały

Zapotrzebowanie dla każdego ucznia lub każdej grupy roboczej:

- mikser (artykuł gospodarstwa domowego)
- ostry nóż do obierania ziemniaków, deska do krajania
- lejek plastikowy duży
- łaźnia wodna nastawiona na 60°C
- pojemnik z lodem
- 2 zlewki, 250 ml
- filtr do kawy (nie bibuła filtracyjna laboratoryjna)
- średniej wielkości cebula
- środek do mycia naczyń, 10 ml (nie koncentrat)
- sól kuchenna, 3 g
- woda destylowana, 100 ml
- strzykawka jednorazowa 10 ml do odmierzania płynów
- próbówka
- bagietka
- enzymy proteolityczne np. neutraza (Novo Nordisk) 2-3 krople
- etanol zimny z zamrażalnika, ok. 6 ml (etanol skażony względnie spirytus denaturowany nadają się)

Przebieg doświadczenia

1. Do środka do mycia naczyń dodać soli kuchennej. Zrób 100 ml roztworu w wodzie.
2. Cebule rozdrabnia się w małe kostki, ale nie mniejsze niż 10 mm x 10 mm.
3. Rozdrobnioną cebulę dodaje się do roztworu detergentu z solą.
4. Zlewkę wstawia się na 15 minut do łaźni wodnej (60°C).
5. Zlewkę wstawia się do bardzo zimnej wody w celu schłodzenia i stale miesza się zawartość przez 5 minut.
6. Mieszaninę wlewa się do miksera i *miksuje się nie dłużej niż 5 sekund.*
7. Mieszaninę filtruje się do drugiej zlewki. Musi być zagwarantowane to, że piana na powierzchni cieczy nie zmiesza się z filtratem.
8. 2-3 krople proteazy dodaje się do 6 ml ekstraktu z tkanki cebuli w próbówce i starannie miesza się.
9. Zimny etanol ostrożnie wlewa się po ścianie próbówki, aby utworzył warstwę nad ekstraktem tkanki cebuli. Próbkę pozostawia się na kilka minut nie poruszając jej.
10. Kwasy nukleinowe wytrącają się tworząc nitki przechodzące do warstwy etanolowej.

Objaśnienia i wskazówki

1. DNA można zabarwić stosując fuksynę lub roztwór błękitu metylenowego.
2. DNA może być również uzyskany z tkanki zwierzęcej (np. z ikry dorsza, wątroby, trzustki cielęcej lub jagnięcej). Stosuje się przy tym delikatniejsze metody rozdrabniania tkanki jak ucieranie w moździerzu tłuczkiem (z piaskiem morskim), aby nie porozrywać łańcuchów DNA.

Środki ostrożności

Doświadczenie nie niesie ze sobą żadnych szczególnych zagrożeń, ale cięcie cebuli i używanie miksera powinno być przeprowadzane z zachowaniem ostrożności.

Podziękowania

Niniejsze doświadczenie zostało przejęte z *A Sourcebook of Biotechnology Activities* autorów Alison Rasmussen i Roberta Mathesona (1990), National Association of Biology Teachers/North Carolina Biotechnology Center. ISBN: 0 94121209. Całą publikację można otrzymać poprzez: NABT, 1120 Roger Bacon Drive # 19, Reston, Virginia 22090, USA.



10 ml środka do mycia naczyń
3 g soli kuchennej
100 ml wody
1 średniej wielkości cebula

Sól dodaj do środka do mycia naczyń. Uzupełnij wodą do 100 ml. Dobrze wymieszaj, aby sól rozpuściła się.



Rozdrobnioną cebulę dodaj do posolonego roztworu środka do mycia naczyń

Roztwór środka do mycia naczyń rozpuszcza błony komórkowe i wydobywa DNA z jądra komórkowego każdej komórki



Wstaw probówkę na 15 min do gorącej wody o temp. 60°C

Ciepło przyspiesza proces, denaturuje dezoksyrybonukleazy, które mogłyby zniszczyć DNA,



Ochłódź mieszaninę przez kilka minut przez wstawienie zlewki do naczynia z wodą i lodem

...ale zbyt długie oddziaływanie gorąca niszczy również DNA. Dlatego potrzebna jest kąpiel lodowa



Miksować nie dłużej niż 5 sekund

Mikser pomaga przy otwieraniu komórek cebuli. Zbyt długie miksowanie uszkadza DNA



Przefiltruj całą mieszaninę

Oddziela to materiał zawierający ścianki komórek od DNA i białek, które teraz są w roztworze



Dodaj 2-3 krople enzymu proteazy do 6 ml ekstraktu z cebuli

Proteaza niszczy białka w roztworze. Mała jej ilość wystarcza.



Wlewaj tę samą ilość zimnego etanolu, ostrożnie na powierzchnię ekstraktu cebuli

Etanol musi być zimny. Powinien stać w zamrażarce. *Możliwe jest zastosowanie spirytusu denaturowanego*

IZOLOWANIE DNA Z CEBULI

Włókna DNA w górnej warstwie alkoholowej

DNA nie rozpuszcza się w alkoholu. Dlatego wytrąca się z roztworu w górnej warstwie.



Produkcja amylazy przez mikroorganizmy glebowe

Skrobia zbudowana jest z wielu cząsteczek cukru glukozy, które tworzą albo liniowy polimer zwany amylozą albo polimer rozgałęziony zwany amylopektyną.

Rozkładanie tych polimerów udaje się przez wydzielane poza komórkę amylazy, które syntetyzowane są przez wiele organizmów, w tym: bakterie i grzyby. Zbadano liczne mikroorganizmy po to, aby znaleźć te, które nadają się do komercyjnej produkcji enzymów. W niniejszym doświadczeniu zbadano mikroorganizmy żyjące w glebie, pod względem wydzielania enzymów poza komórkę.

Miejsca działania enzymów na amylopektynę. Cząsteczki glukozy w amylozie i amylopektynie połączone są wiązaniami α - 1,4, odgałęzienia podłączone są do tych łańcuchów wiązaniami α - 1,6. Najważniejszymi, osiągalnymi w handlu amylazami są:

α -amylaza - hydrolizuje połączenia α - 1,4 wyłącznie w łańcuchach, tak że powstają krótsze łańcuchy (dekstryny) w sposób oplacalny uzyskiwana z bakterii (np. *Bacillus spp.*)

β -amylaza - hydrolizuje te połączenia α - 1,4 w polimerach glukozy, które odłączają z końców łańcuchów cząsteczki maltozy. Nie może ona pokonać połączeń α - 1,6. Do celów handlowych uzyskiwana z jęczmienia i słodu.

Amyloglukozydaza - rozrywa połączenia α - 1,4, odszczepia przy tym cząsteczki glukozy z końców łańcuchów i hydrolizuje również połączenia α - 1,6, jednakże tylko powoli. Do celów handlowych uzyskiwana z grzybów *Aspergillus spp.* i *Rhizopus oryzae*.

Pululanaza - hydrolizuje połączenia α - 1,6. Do celów handlowych uzyskiwana z bakterii *Bacillus acidopullulyticus* i *Klebsiella*.

Cel

- pokazanie naturalnie występujących mikroorganizmów produkujących amylazy.

Wymagane wiadomości wstępne

Uczniowie powinni mieć podstawową znajomość prac mikrobiologicznych, łącznie z techniką sterylnej pracy. Pożądana jest znajomość reakcji jodoskrobiowej.

Przygotowanie

Roztwór jodu i jodku potasu (JKJ) według Lugola powinien być przygotowany najpóźniej w przeddzień, gdy nie dysponuje się roztworem gotowym do użycia. Kryształki jodu potrzebują trochę czasu do rozpuszczenia.

Pożywka agarowo-skrobiowa i buteleczki z wodą sterylną powinny być przygotowane przed godziną lekcją. W idealnym przypadku próbki gleby przed użyciem powinny być wysuszone na powietrzu.

Sterylnie pałeczki z watą. Sztyfty pałeczek handlowych wykonane z tworzywa sztucznego przy sterylizacji w autoklawie topią się. Niektóre handlowe pałeczki z watą mogłyby być ponadto poddawane obróbce antybakteryjnej. Do niniejszego doświadczenia samemu sporządza się niewielką ilość pręcików z watą, nawijając włókna bawełniane na ostrze wykałaczki. Sterylizuje się je w autoklawie przez 15 minut przy 121°C, w butelce McCartneya lub luzem owinięte w folię aluminiową.

Zapotrzebowanie czasu

Przygotowanie i inkubowanie płytek Petriego: 45 min
Badanie wyników 2-3 dni później: 15 minut.

Sprzęt i materiały

Zapotrzebowanie dla każdego ucznia lub każdej grupy roboczej (zakłada się zwykłe wyposażenie pracowni)

- sterylne płytki Petriego z pożywką agarowo-skrobiową sterylną 15-20 ml, wykonaną z handlowego agaru z dodatkiem 0,2-procentowej skrobi rozpuszczalnej
- 1 g suchej gleby, pobranej z głębokości 10 cm pod powierzchnią
- roztwór jodu i jodku potasu wykonany przez rozpuszczenie 1 g jodu i 2 g jodku potasu w 300 ml wody destylowanej
- 15 ml sterylnej wody destylowanej w butelce McCartneya
- sterylne pałeczki z watą w wykonaniu własnym (por. „przygotowanie” powyżej)
- mazak filcowy wodoodporny (do opisywania płytek Petriego).

Przebieg doświadczenia


1. 1 g wysuszonej gleby dodaje się do 15 ml sterylnej wody destylowanej i dobrze wytrząsa się celem wymieszania.
2. Zaszczepianie płytki z pożywką skrobiowo-agarową; sterylna pałeczka z watą służy do rozprowadzania zawiesiny gleby na powierzchni agaru.
3. Płytkę Petriego opisuje się umieszczając inicjały, datę i materiał użyty do zaszczepienia.
4. Odwróconą, zaszczepioną płytkę pozostawia się na 2-3 dni przy 30°C w celu inkubacji.
5. Na płytkę po inkubacji nalewa się ostrożnie roztwór jodu, aż pokryta zostanie cała powierzchnia na wysokość ok. 1 mm. Miejsca, gdzie jeszcze istnieje skrobia są zabarwione na kolor niebiesko-czarny (cząsteczki jodu wnikają

w obszar wewnętrzny łańcuchów molekularnych glukozy). Obszar jasnobrązowy (kolor roztworu jodu i jodku potasu) powstaje wzdłuż krawędzi kolonii, gdzie mikroorganizmy rozłożyły skrobię.

Środki ostrożności

WAŻNE: W Niemczech nie jest dozwolone przeprowadzanie tego doświadczenia w taki sposób, ponieważ płytki zaszczepione nieokreślonymi organizmami są otwierane. Dlatego powinno się używać kolonii *Bacillus subtilis* DSM 402 zamiast organizmów z gleby. Podczas tego doświadczenia i przy usuwaniu odpadów powinno się stosować ogólnie obowiązujące środki ostrożności. Nie jest wskazane sporządzanie z zaszczepionych płytek izolatów własnych. Jod jest trujący i trzeba się nim posługiwać z ostrożnością.

1



Przygotuj płytkę Petriego ze sterylną pożywką skrobiowo-agarową

2




sucha ziemia

Sporządź zawiesinę 1 g ziemi w 15 ml sterylnej wody (w niemieckich szkołach stosuj płynną kulturę *Bacillus subtilis*)


woda sterylna

3



Zaszczep pożywkę agarową zawiesiną ziemi za pomocą sterylnych wacików na patyku

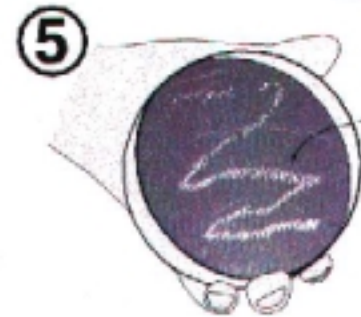
4



Inkubuj płytkę przez 2-3 dni przy 30°C

Odwrócone płytki pozostaw do rozmnażania bakterii

5



jasne obszary bez skrobii

Pokryj płytkę roztworem jodu aby pokazać gdzie skrobia została rozłożona.

PRODUKOWANIE AMYLAZY PRZEZ MIKROORGANIZMY GLEBY

Wytwarzanie celulozy

Istnieje duże zainteresowanie wykorzystaniem odpadów celulozy powstałych przy produkcji papieru, jako zasobów pokarmowych dla procesów fermentacyjnych; przy tym tanie materiały wyjściowe przekształcane są w bardzo cenne produkty. Większość celulaz wytwarzanych do celów handlowych produkuje się przez fermentację płynnych odpadów celulozowych przez grzyby *Trichoderma reesei*.

Bakteria *Cellulomonas* rośnie jednak szybciej na płytkach Petriego i jej produkcja pozakomórkowych celulaz jest łatwo mierzalna.

Cel

- oznaczenie ilościowe celulozy wytwarzanej przez *Cellulomonas*.

Przygotowanie

Do używania w klasie powinno się przygotować kultury *Cellulomonas uda* (DSM 20107) w pożywce bulionowej (np. w butelkach McCartneya). Powinno to nastąpić dwa lub trzy dni przed przeprowadzeniem doświadczenia. Kultury inkubuje się przy 25-30°C.

Pożywka CMC zawiera:

0,5 g karboksymetylocelulozy (rozpuszczalna postać celulozy); 0,1 g NaNO₃; 0,1 g K₂HPO₃; 0,1 g KCl; 0,05 g MgSO₄; 0,05 g wyciągu z drożdży i 0,1 g glukozy w 100 ml wody.

Pożywka powinna być zagęszczona 1,7-procentowym agarem.

Zapotrzebowanie czasu

Przygotowanie i inkubacja bakterii na płytkach

Petriego: 45 min

Badanie wyników 2-3 dni później: 15 minut

Sprzęt i materiały

Zapotrzebowanie na każdego ucznia lub każdą grupę roboczą (zakłada się dostęp do normalnie wyposażonej pracowni).

- Kultura bakteryjna *Cellulomonas uda* (DSM 20107)
- sterylne płytki Petriego z 15 ml sterylnej pożywki CMC (por. „przygotowanie” wyżej)
- sterylna woda (w butelce McCartney'a)
- sterylna strzykawka jednorazowa 1 ml (bez igły) lub strzykawka dawkująca i 2 sterylne, zamknięte pipety

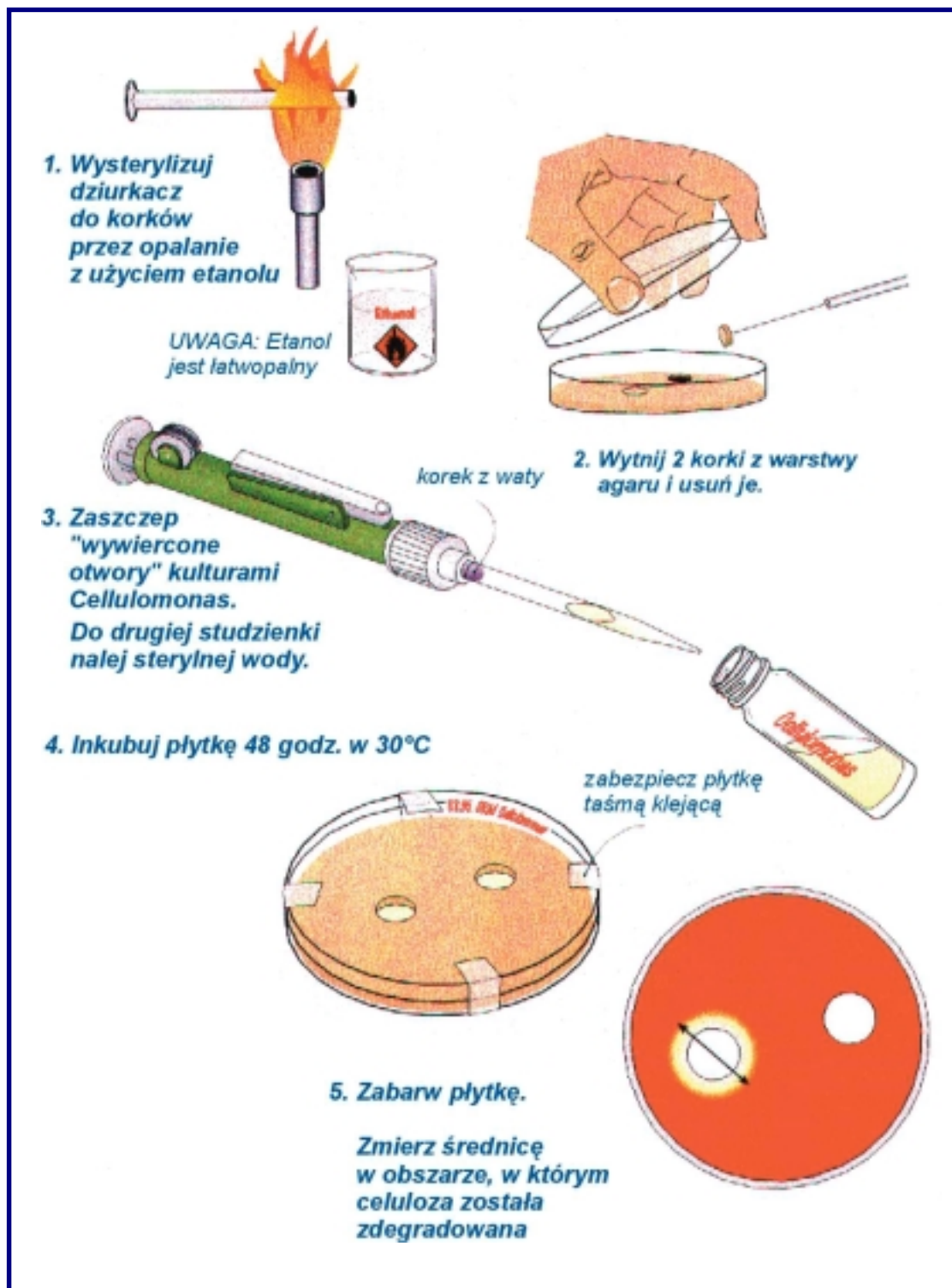
- zlewka z 5-procentowym roztworem pochłorynu np. Domestos (Lever)
- roztwór czerwieni Kongo (z 1 mg na ml wody)
- roztwór chlorku sodu 1 molowy
- etanol (do opalania dziurkacza do korków)
- dziurkacz do korków, średnicy 5 mm
- inkubator nastawiony na 25-30°C
- mazak filcowy do opisywania płytek Petriego

Przebieg doświadczenia

1. Dziurkacz do korków (średnica 5 mm) zanurza się w alkoholu i opala się.
UWAGA: podczas tej operacji dziurkacz musi być trzymany poziomo aby płomień nie przedostawał się przez środek dziurkacza do góry i nie oparzył rąk.
2. Pokrywę płytki z pożywką CMC lekko unosi się z jednej strony i następnie dziurkaczem robi się otwór w agarze. Korek z agaru usuwa się z dziurkacza, w razie gdy to konieczne zagiętą igłą.
3. Powtarza się zabieg 1 i 2, aby otrzymać dwa otwory w agarze.
4. W dolnej stronie płytki Petriego dokładnie opisuje się każde wycięcie. Odpowiednim skrótem byłyby: C (*Cellulomonas*) W (sterylna woda, kontrola).
5. W odpowiedni otwór wprowadza się albo 0,2 ml kultury bakteryjnej lub sterylną wodę. Trzeba przy tym używać sterylnej strzykawki jednorazowej lub pipety. Użyty sprzęt należy włożyć do zlewki ze środkiem dezynfekującym.
6. Płytki przy 25-30°C inkubuje się przez okres do jednego tygodnia. *Cellulomonas* produkuje przy 30°C po 48 godzinach jasne otoczki o średnicy do 16 mm.

Po inkubowaniu....

7. Płytki na 15 minut pokrywa się roztworem czerwieni Kongo i odbarwia się przez dodanie roztworu soli na 10-15 minut. Obszary nie zabarwione pokazują, gdzie pożywka CMC została rozłożona do β -(1,4) - glukanu, który zawiera siedem lub mniej reszt glukozy. Średnicę jasnych otoczki można zmierzyć, aby otrzymać ilościowe porównanie aktywności enzymu rozkładającego celulozę.



Objaśnienia i wskazówki

1. Zawiesiny z ziemią można pipetować do wycięć w agarze, aby pokazać jej florę mikrobiologiczną przy wytwarzaniu celulozy.
2. Taki sam sposób postępowania można zastosować po to, aby zbadać aktywność handlowych preparatów celulozy.
3. Proces degradacji celulozy można śledzić przez wiele dni przez sporządzenie drugiego zestawu płytek.

Środki ostrożności

Podczas doświadczenia muszą być przestrzegane podstawowe środki ostrożności przy pracach mikrobiologicznych (usuwanie płytek na końcu doświadczenia), łącznie z przestrzeganiem aseptyki prac.

WAŻNE: przy stosowaniu próbek gleby jako surowca do produkcji celulozy (objaśnienia i wskazówki do zabiegu 1) w Niemczech zabronione jest ponowne otwieranie płytek.

Produkcja antybiotyku

Wiele mikroorganizmów produkuje antybiotyki - substancje, które hamują wzrost ich bakteryjnych konkurentów lub zabijają ich. Od czasu wynalezienia penicyliny w latach czterdziestych (produkowanej przez grzyby *Penicillium*) substancje te są wysoce skuteczne w zwalczaniu chorób. Obecnie najważniejsze antybiotyki wytwarzane są przez bakterię *Streptomyces*. Dalsze informacje o sposobie działania antybiotyków i zjawiska oporności bakteryjnej znajdziecie w materiale stanowiącym załącznik.

Cel

- wyprodukowanie antybiotyku streptomycyny przez *Streptomyces griseus* i pokazanie jego działania na wzrost wielu mikroorganizmów.

Wiadomości wstępne

Pochodzenie i działanie antybiotyków, powstawanie i rozprzestrzenianie się oporności na antybiotyki (por. tekst towarzyszący).

Na dole: Kultura trzydniowa *Streptomyces griseus* (z lewej) Organizmami testowymi są (z góry na dół): *Candida utilis*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus mycoides*, *Escherichia coli*.



Przygotowanie

Potrzebne są żywe kultury *Streptomyces griseus*. Muszą one być hodowane 2-3 dni na płytkach z 15-20 ml agaru standardowego. Kultura, którą ma się zaszczyć te płytki, musi być przygotowana. W tym celu eż pobiera się *Streptomyces* z kultury na agarze skośnym i ponownie tworzy się zawiesinę w 1 ml sterylnej pożywki bulionowej, następnie przenosi się do próbówki z 5 ml sterylnej pożywki bulionowej. Kulturę tę inkubuje się przez 24 godziny w 30°C.

Płytkę Petriego szczepi się jednodobową kulturą *Streptomyces griseus* przez naniesienie na płytce pojedynczej pionowej kreski tak dalece po lewej stronie jak to możliwe, aby prawa część odżywki pozostała sterylna.

Płytki inkubuje się przy 30°C przez 3-4 dni. Dodatkowo zakłada się jednodobowe kultury organizmów testowych (*Bacillus mycoides*, *Candida utilis*, *Escherichia coli* K-12, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas fluorescens*).

Zapotrzebowanie czasu

Przygotowanie pożywek i hodowli bakterii: 60 minut
+ pierwsze inkubowanie kultury *Streptomyces*: 24 godziny, następnie dalsze 72-96 godzin
Zaszczepienie płytek: 20 minut
Inkubowanie: 24-72 godziny.

Sprzęt i materiały:

Zapotrzebowanie dla każdego ucznia lub każdej grupy roboczej (zakłada się, że istnieje dostęp do normalnie wyposażonej pracowni).

- inkubator nastawiony na 30°C
- eża
- sterylne płytki Petriego z 15-20 ml agaru standardowego, na których naniesiono bakterie *Streptomyces griseus* (DSM 40236) rozmnożone przez 48-72 godziny (por. "Przygotowanie" wyżej)
- organizmy testowe * na kulturach skośnych
 - *Candida utilis* (drożdże), DSM 02361
 - *Micrococcus luteus* (bakteria), DSM 20030
 - *Pseudomonas fluorescens* (bakteria), DSM 50090
 - *Bacillus mycoides* (bakteria), DSM 2048
 - *Escherichia coli* K-12 (bakteria), DSM 498

* Trzeba przestrzegać miejscowych przepisów odnoszących się do stosowania tych organizmów w szkole. (w Niemczech zastosowanie jest dozwolone).

Przebieg doświadczenia

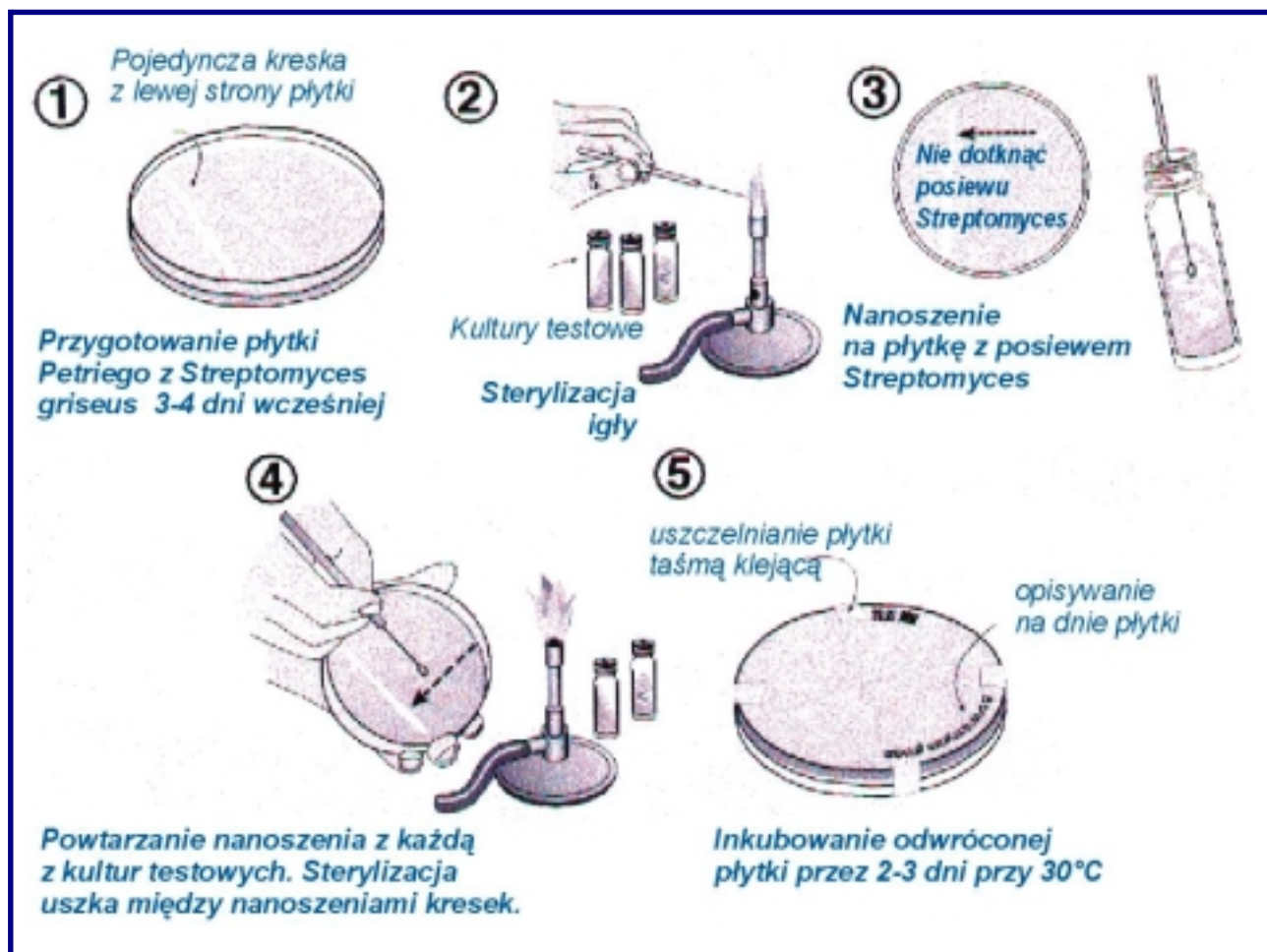
1. Każdą przygotowaną pożywkę z kulturą *Streptomyces* zaszczepia się organizmami testowymi:
 - a) Drucik z uszkiem do zaszczepiania przeciąga się przez płomień palnika Bunsena i chwilę ochładza się.
 - b) Sterylnym drucikiem z uszkiem pobiera się kultury organizmów testowych i nanosi się w postaci poziomej kreski na jasną część pożywki (na prawo od *Streptomyces*). Nanoszenie kultur testowych zawsze musi zaczynać się w prawym rogu w kierunku do kultury *Streptomyces* i sięgać do niej blisko.
WAŻNE! Nie wolno dotknąć uszkiem kultur *Streptomyces*.
 - c) Drucik z uszkiem ponownie opala się w płomieniu. Powtarza się operacje a-c dla każdej kultury testowej.
- 2) Pytki inkubuje się 2 dni przy 30°C.
- 3) Badanie płytek

Środki ostrożności

Tę pracę trzeba wykonywać w pracowni. Podczas pracy i przy usuwaniu odpadów kultur stosować należy podstawowe środki ostrożności. Ilość antybiotyku wytworzona podczas doświadczenia nie stanowi zagrożenia.

Uwagi

Bakteria *Streptomyces griseus* wytwarza antybiotyk streptomycynę, który dyfunduje do pożywki posiewowej kultury. Streptomycyna i stosowane antybiotyki zakłócają syntezę białek przez ich przyłączanie się do składnika 30S rybozomów bakteryjnych. Niektóre organizmy (*Bacillus mycoides*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*) reagują wykazując wrażliwość na działanie streptomycyny, inne (*Pseudomonas fluorescens*) są odporne. Drożdże (*Candida utilis*) nie są zwalczane przez streptomycynę, gdyż są eukariontami o innej budowie rybozomów. Załączony tekst dostarczy dalszych informacji opisujących szczegółowo produkcję antybiotyków i ich sposób działania.



Wytwarzanie ciasta chlebowego

Opowieści o chlebie z zakwasu, które sięgając aż do starożytnego Egiptu (4000 pne) pokazują, że wytwarzanie chleba w ogóle jest jednym z najstarszych przykładów biotechnologii. Tradycyjnie w Wielkiej Brytanii chleb wytwarzano z mąki pszennej, wody, soli i w miarę możliwości z tłuszczu - zależnie od receptury.

Te składniki tworzą ciasto, w którym drożdże są związane.

Amylasy w wilgotnej mące przekształcają skrobię w glukozę, która stanowi pożywienie dla zimmobilizowanych komórek drożdży. Dodatkowo drożdże potrzebują źródła azotu. Peptony i aminokwasy stawiane są do dyspozycji przez częściową hydrolizę białek mąki (gluten). Oddychanie beztlenowe drożdży prowadzi do wytworzenia dwutlenku węgla i alkoholu.

Gluten przyczynia się do elastyczności i plastyczności ciasta chlebowego i zapewnia zamykanie pęcherzyków dwutlenku węgla, który powiększa pęcherzyki powietrza w chlebie, aby ciasto mogło „rosnąć”.

Cel

- proponowany sposób postępowania daje możliwości zbadania efektów działania różnych wariantów receptury, które modyfikują albo białka mąki albo działanie enzymów.

Zapotrzebowanie czasu

W zależności od warunków (ciepło itp.) doświadczenie może być zakończone po 50 minutach.

Sprzęt i materiały

Na każdy chleb:

- drożdże suszone, 1 g
- mąka pszenna (typ 405), 75 g
- woda, 50 ml
- inne dodatki wg życzenia np. kwas askorbinowy, α -amylaza, bromian potasowy (por. *Objaśnienia i wskazówki* poniżej)
- małe zlewki do mieszania ciasta

- mocne bagietki szklane do mieszania
- 2 cylindry miarowe, 100 ml
- stoper

Przebieg doświadczenia

1. Drożdże suszone aktywuje się w wodzie, dodaje się mąkę i dobrze miesza się.
2. Ciasto formuje się w postaci kielbaski i wkłada do cylindra miarowego.
3. Mierzy się wysokość sięgania ciasta co 10 minut, przez okres 1 godziny.

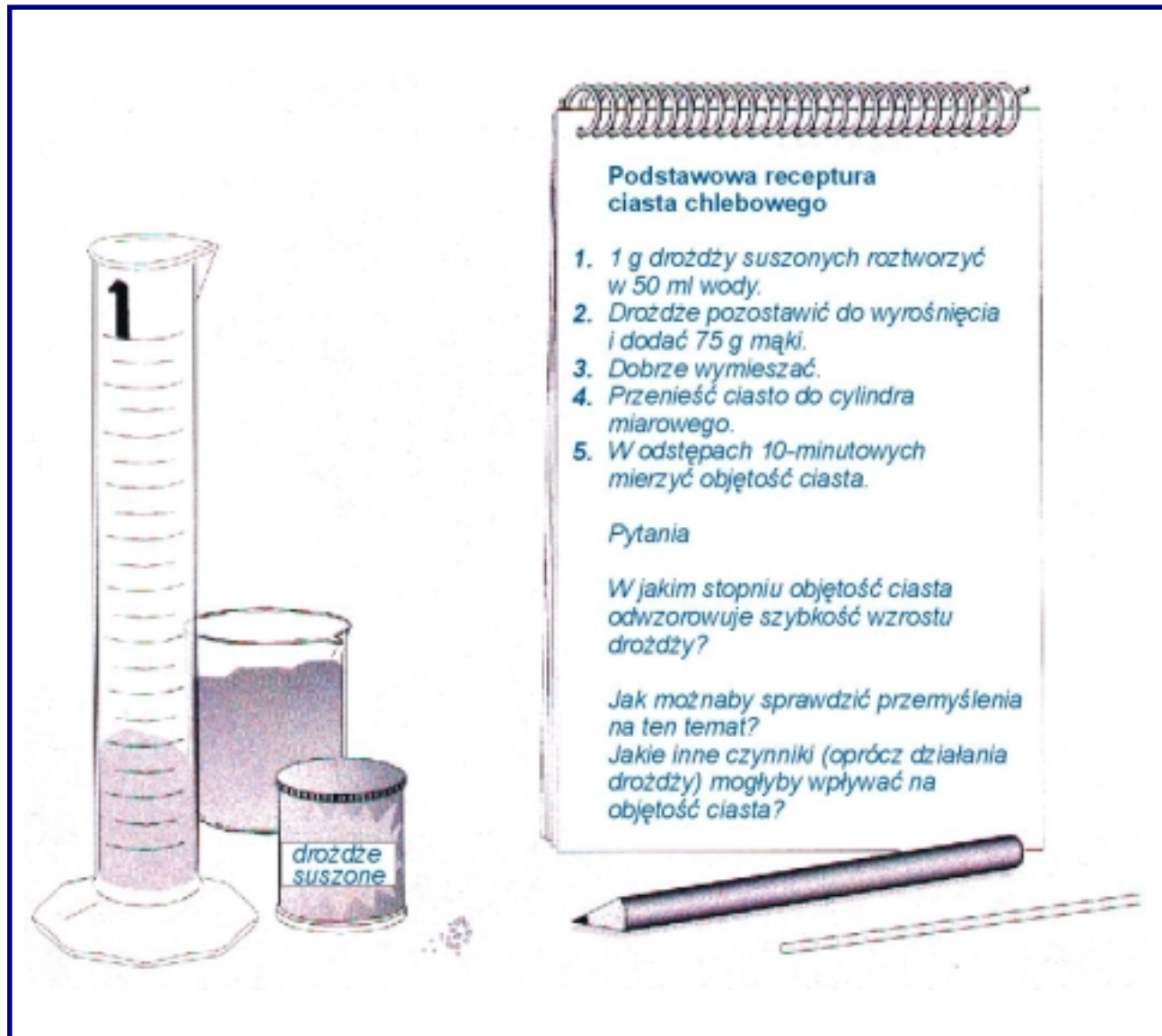
Objaśnienia i wskazówki

1. Jaki efekt dają różne postaci drożdży suszonych na stopień „wyrośnięcia” (np. zwykle drożdże suszone w porównaniu z nowszymi drożdżami rozczynowymi)?
2. Jakie różnice przy „rośnięciu” ciasta wynikają z różnych gatunków mąki (np. mąka żytnia, pszenna i razowa)? Gatunki mąki pszennej zawierają dużo glutenu, ale mało α -amylazy. Mąka razowa wykazuje dużą zawartość α -amylazy.
3. Jaki efekt daje polepszacz mąki - kwas askorbinowy (witamina C) na stopień „wyrośnięcia”? Kwas askorbinowy reaguje z enzymami w cieście i ogranicza tworzenie się mostków siarkowodorowych między białkami glutenu (do receptury ciasta można włączyć 1 g).
4. Jaki efekt daje dodanie α -amylazy na stopień „wyrośnięcia”? Jak możecie objaśnić zaobserwowane różnice?
5. Polepszacz mąki bromian potasu umożliwia tworzenie się mostków siarczkowych między sąsiadującymi białkami glutenu, tak że powstaje elastyczne, lepiej „rosnące” ciasto. Jednakże zbyt silne rośnięcie osłabiałoby ciasto. Można porównać ciasta, które zostały wytworzone z wzgl. bez tego dodatku.
6. Sól hamuje działanie proteaz i zapobiega w ten sposób zamianie glutenu w lepką masę, która nie może zamknąć w sobie i zgromadzić dwutlenek węgla. Nadmiar soli wytwarza silne wiązania jonowe z bocznymi łańcuchami cząsteczek białka, czyniąc je mniej rozciągliwymi, co prowadzi do twardego ciasta. Zbyt duża ilość soli hamuje ponadto „rośnięcie” drożdży. Możliweby oznaczyć optymalną dla ciasta ilość soli.

Literatura

On food and cooking. The science and lore of the kitchen von Harold McGee (1991) Harper Collins Publishers. ISBN: 0 004 12657 2

Pritchard, P.E. (1992) *Studies on the bread-improving mechanism of fungal alpha-amylase*
Journal of Biological Education **26**, (1) 12-18



Podstawowa receptura ciasta chlebowego

1. 1 g drożdży suszonych rozpuścić w 50 ml wody.
2. Drożdże pozostawić do wyrośnięcia i dodać 75 g mąki.
3. Dobrze wymieszać.
4. Przenieść ciasto do cylindra miarowego.
5. W odstępach 10-minutowych mierzyć objętość ciasta.

Pytania

W jakim stopniu objętość ciasta odzworowuje szybkość wzrostu drożdży?

Jak możnaby sprawdzić przemyślenia na ten temat?

Jakie inne czynniki (oprócz działania drożdży) mogłyby wpływać na objętość ciasta?

Zimmobilizowane komórki drożdży

Zwykle drożdże piekarnicze, *Saccharomyces cerevisiae*, nie są w stanie sfermentować cukru laktozę. Enzym β -galaktozydaza rozszczepia laktozę do glukozy i galaktozy. Drożdże, które są zimmobilizowane z tym enzymem, mogą się rozwijać w pożywce, która zawiera laktozę. Z obydwu cukrów, które powstają w wyniku działania enzymu najpierw wykorzystywana jest glukoza. Gdy zasób tego cukru zostanie zużyty drożdże zmieniają swój metabolizm i stosują inny produkt rozszczepienia laktozy - galaktozę. Działalność drożdży szybko daje się zbadać przez pomiar ilości dwutlenku węgla tworzącego się przy fermentacji.

Cel

- wprowadzenie w ilościowe badanie fermentacji.

Przygotowanie

Alginian sodu jest trudno rozpuszczalny w wodzie. Rozpuszcza się go w gorącej wodzie, przy ciągłym mieszaniu. Dlatego alginian sodu trzeba przygotować z wyprzedzeniem. Alginian sodu przed dłuższym przechowywaniem powinien być autoklawowany.

Ważne: do wszystkich roztworów powinno się stosować wodę destylowaną lub pozbawioną jonów, gdyż jony wapnia w wodzie wodociągowej powodują wytrącanie alginatu z roztworu.

Zapotrzebowanie czasu

Zimmobilizowane komórki drożdży można spreparować w ciągu 10-15 minut. Fermentacja może trwać do tygodnia.

Sprzęt i urządzenia

Zapotrzebowanie dla każdego ucznia lub każdej grupy roboczej

- 4 - procentowy roztwór alginianu sodu, 10-15 ml
- 1,5 - procentowy roztwór chlorku wapnia. 100 ml
- strzykawka jednorazowa 10 ml, bez igły
- sitko do herbaty
- 2 zlewki, 200 ml
- 2 kolby Erlenmeyera, 250 ml
- 2 korki z dwoma przewierconymi otworami
- 2 duże zlewki np. 500 ml
- 2 cylindry miarowe, 100 ml



Zimmobilizowane komórki drożdży w matrycy z alginianu wapnia

- roztwór do sterylizacji chemicznej np. *Domestos* lub *Sagrotan*
- 13 - procentowy roztwór chlorku sodu, ok. 1 l (wystarczy zwykły roztwór soli kuchennej)
- 100 ml pożywki z 2 g glukozy, 1 g wyciągu z drożdży i 1 g peptonu
- 100 ml pożywki z 2 g laktozy, 1 g wyciągu z drożdży i 1 g peptonu
- enzym β -galaktozydaza np. *Lactozym* (NOVO Nordisk), 2 ml
- drożdże piekarnicze lub drożdże suszone.

Przebieg doświadczenia

Zimmobilizowane enzymy i komórki drożdży preparuje się w sposób następujący:

1. Drożdże suszone miesza się w 25 ml wody destylowanej, w małej zlewce i pozostawia do napęcznienia w temperaturze pokojowej przez 10 minut.
2. W drugiej zlewce miesza się alginian sodu z β -galaktozydazą i mieszając wprowadza się do 10 ml roztworu drożdży.
3. Mieszaninę enzymu - drożdży - alginianu nabiera się do strzykawki jednorazowej i kroplami dodaje się do roztworu chlorku wapnia w drugiej dużej zlewce.

4. Kulki immobilizowanych enzymów i drożdży pozostają do stwardnienia, na 10 minut w roztworze chlorku wapnia.
5. Kulki oddziela się od roztworu filtrując przez sitko do herbaty i starannie przepłukuje wodą wodociągową.

Kulki mogą być przechowywane w chłodziarce, w sterylnej wodzie do 3 dni przed użyciem.

Przygotowanie naczynia fermentacyjnego:

1. Kolby sterylizuje się *Sagrotanem* lub *Domestosem* i następnie płucze się wodą.
2. Sterylną pożywkę wlewa się do kolb, pożywkę glukozową do jednej (jako kontrola), a laktozową do drugiej.
3. Tę samą ilość kulek dodaje się do każdej kolby.
4. Kolby zamyka się korkiem z dwoma przewierconymi otworami.
5. Kolby trzyma się w temperaturze 21-25°C.

Czas, który tworzy się nad 13-procentowym roztworem chlorku sodu chwyta się do cylindra miarowego (dwutlenek węgla nie jest rozpuszczalny w tym roztworze) i mierzy się jego ilość w regularnych odstępach czasu.

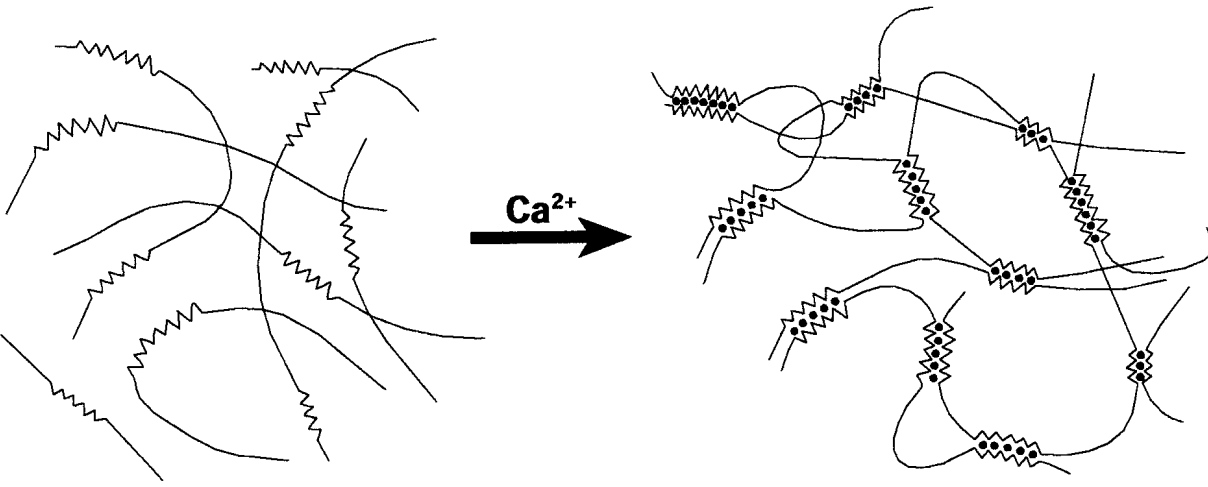
6. Sporządza się wykres przedstawiający ilość gazu w zależności od czasu.

Objaśnienia i wskazówki

1. Można zastosować różne rodzaje drożdży np. drożdże piekarnicze lub „drożdże winne”.
2. Można zmieniać stężenie β -glukozydazy, czas inkubacji lub inne zmienne.

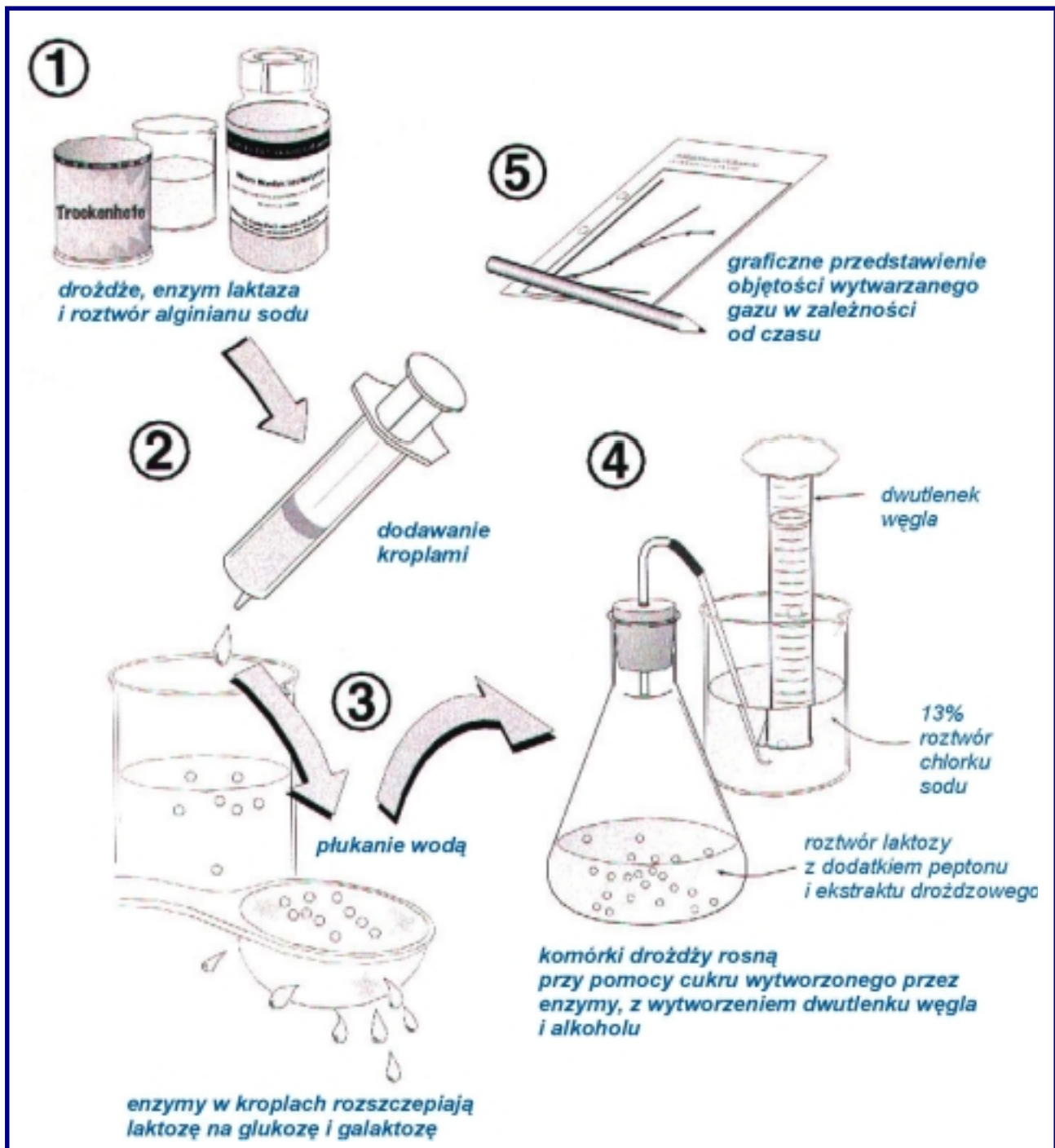
Środki ostrożności

Wydzielanie się gazu w naczyniach szklanych może być niebezpieczne. Powinno się zapewnić to, że naczynia fermentacyjne będą odpowiednio otwarte. Substancji chemicznych do sterylizacji powinno się używać ostrożnie i powinno się przestrzegać wszystkich instrukcji stosowania podanych przez producentów.



Najczęstszą techniką immobilizowania komórek jest ich uwięzienie w alginianie wapnia. Sposób ten szczególnie nadaje się do żywych komórek, z powodu łagodnych warunków postępowania. Ta wielostronna metoda stosowana jest do immobilizowania żywych lub martwych komórek w bioreaktorach, do zatapiania roślinnych zarodków i zalążków („sztuczne nasiona”) do mikrorozmnażania, do immobilizowania komórek hybrydowych do produkcji przeciwciał monoklonalnych i do otoczkowania enzymów i środków leczniczych (patrz wykaz na następnej stronie).

Komórki lub enzymy podlegające zatopieniu mieszane są w pierw z roztworem alginianu sodu. Tę mieszaninę wkrapla się następnie do roztworu z kationami wielowartościowymi (zwykle Ca^{2+}). Kropelki przy wpadaniu do roztworu tworzą automatycznie kuleczki, które wiążą komórki w trójwymiarowej siatce z alginianu, połączonej na krzyż jonami (patrz rysunek wyżej). Dalsze informacje w Smidrod, O. i Skjak-Brak G. (1990) Alginate as an immobilization matrix for cells. Trends in Biotechnology 8 (3)71-78.



Przykłady zastosowania komórek zimmobilizowanych w alginianie (według Smidsroda i Skjak-Braeka, 1990)

Komórki	Produkty/miejsce zastosowania	Komórki	Produkty/miejsce zastosowania
Bakterie		Algi	
<i>Erwinia rhapontice</i>	izomaltuloza	<i>Botryococcus braunii</i>	węglowodory
<i>Pseudomonas denitrificans</i>	oczyszczanie wody pitnej	Komórki roślinne	
<i>Zymomonans mobilis</i>	etanol	<i>Chatharanthus roseus</i>	alkaloidy do terapii nowotworowej
Cyjanobakterie		Różne rośliny	sztuczne nasiona
<i>Anabena sp.</i>	amoniak	roślinne zarodki	posługiwanie się komórkami, mikroskopia
Grzyby		Komórki ssaków	
<i>Kluyveromyces bulgaricus</i>	hydroliza laktozy	hybrydy	przeciwciała monoklonarne
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	etanol	wyspy Langerhansa	insulina/implantacja
<i>Saccharomyces bajanus</i>	produkcja szampanów	fibroblasty lub komórki limfy	interferony (α lub β)

Ogniwo mikrobiologiczne

Mikroorganizmy prądotwórcze przez długie lata były biologicznym kuriozum. Obecnie badacze widzą ich zastosowanie w zegarach i kamerach, jako źródła energii dla trzeciego świata i w bioreaktorach do przekształcania odpadów przemysłowych na elektryczność.

Opisane tutaj mikrobiologiczne ogniwo wytwarza prąd elektryczny w niewielkiej ilości, przez oddawanie elektronów z łańcucha oddechowego drożdży. Może ono służyć do badania oddychania w nowy i stymulujący sposób. Dalsze informacje znajdziecie w *BIO/technology Education*, B and 1, nUmer 4, strona 163-168.

Cel

- motywujące wprowadzenie do badań oddychania
- możliwe badania niektórych czynników wpływających na oddychanie mikroorganizmów
- znaczenie zastosowania odpadów organicznych do wytwarzania elektryczności.

Przygotowanie

Przygotować roztwory z reagentami. Przed użyciem membrany wymiennicza kationowego trzeba ją moczyć 24 godziny w wodzie destylowanej. Drożdże suszone należy zaktywować wtedy, gdy zmontowane zostanie ogniwo.

•

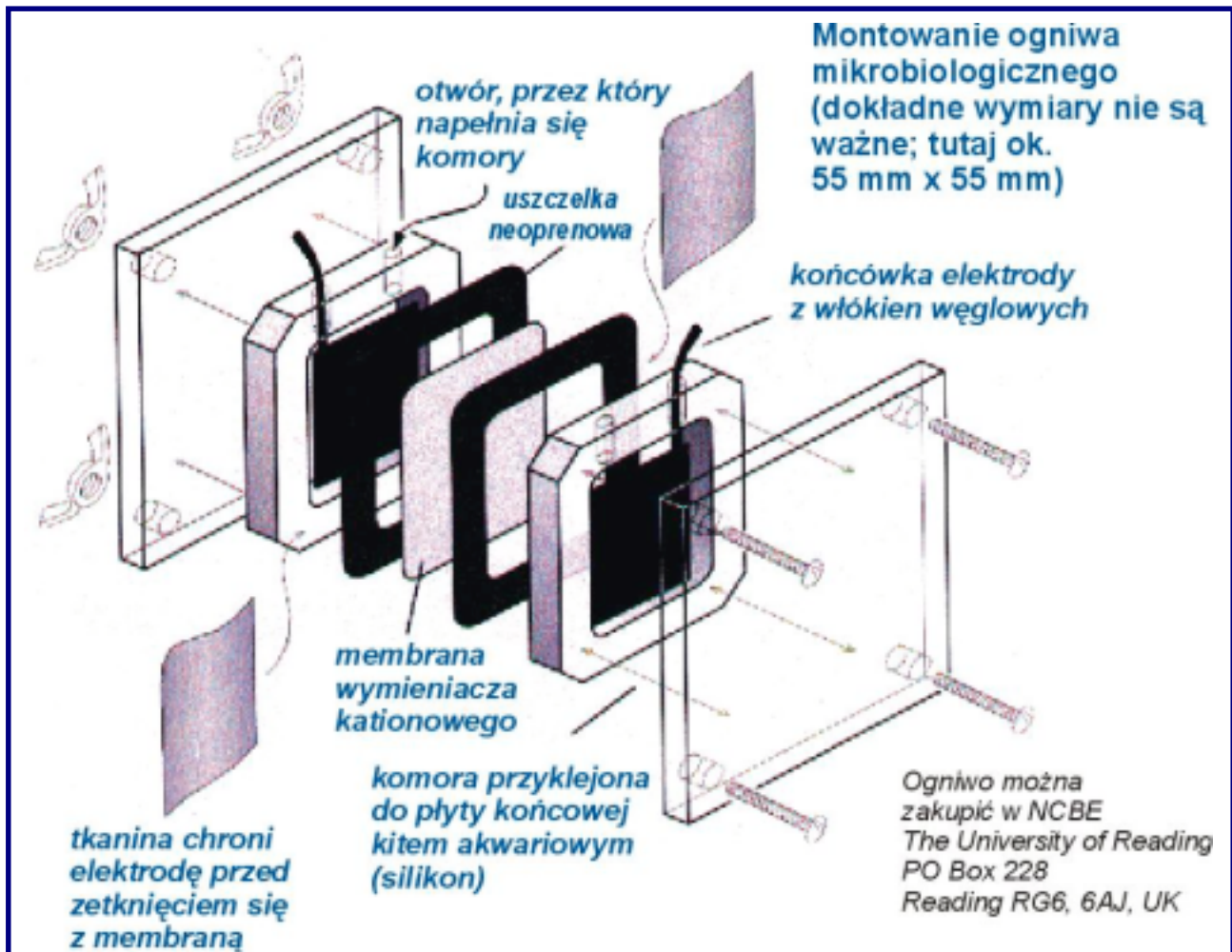
Zapotrzebowanie czasu

Budowa ogniwa (aż do wytwarzania prądu) trwa ok. 30 minut.

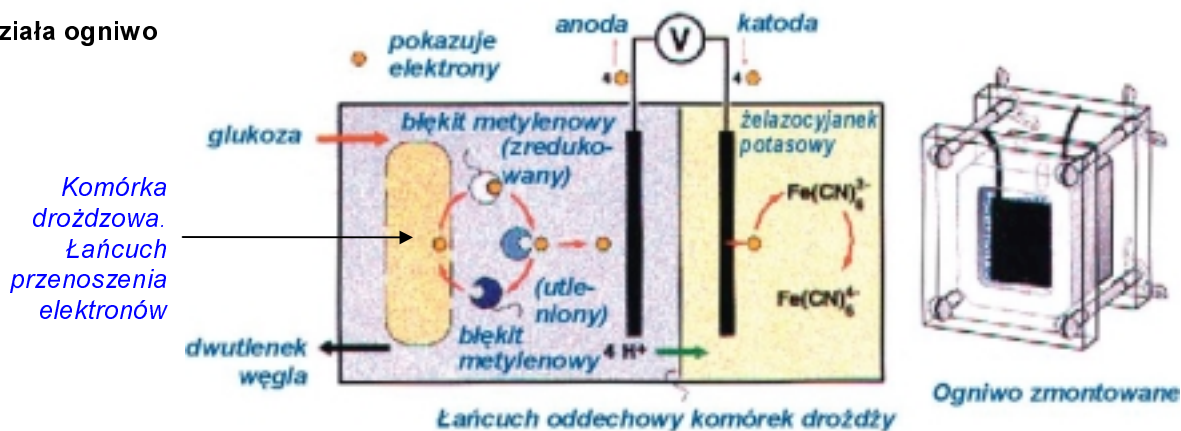
Sprzęt i materiały

Zapotrzebowanie dla każdego ucznia lub każdej grupy roboczej

- ogniwo Perspex (ICI), wycięte z materiału grubości 4 mm
- uszczelki neoprenowe, 2 szt.
- membrana wymiennicza kationowego, przycięta z dopasowaniem do przestrzeni między komorami. Membrana może być użyta wielokrotnie, ale topi się podczas autoklawowania.
- elektrody z włókna węglowego, przycięte z dopasowaniem do komory
- ściereczka (z tkaniny), przycięta na wymiar wewnętrzny ogniwa, 2 szt.
- strzykawka jednorazowa 10 ml, 2 szt., do rozprowadzania cieczy
- denko lub pokrywa płytki Petriego jako podstawka ogniwa
- elektryczne końcówki podłączeniowe z zaciskami krokodylkowymi, 2 szt.



Jak działa ogniwo



- woltomierz 0-5V lub miernik napięcia i/lub silnik niskoprądowy
- nożyczki

Wszystkie poniższe roztwory powinny być sporządzone nie w wodzie, lecz w 0,1 M buforze fosforanowym

- drożdże suszone, zagęszczone 0,1 M buforem fosforanowym (nie dodawać roztworu glukozy bez uprzedniego aktywowania drożdży w roztworze buforowym)
- 10 milimolowy roztwór błękitu metylenowego, 5 ml 1 M roztworu glukozy
- 0,02 M roztwór żelazocyjanu potasowego, 10 ml

Sporządzenie 0,1 M buforu fosforanowego, pH 7,0
Rozpuścić 4,08 g Na_2HPO_4 i 3,22 g NaH_2PO_4 w 500 ml wody destylowanej.

Przebieg doświadczenia

1. Dwie elektrody z włókien węglowych przycina się odpowiednio do rysunku.
2. Dwie ściereczki z tkaniny przycina się dopasowując do ogniwa.
3. Ogniwo montuje się odpowiednio jak na rysunku.
4. Ogniwo stawia się w denku lub pokrywie płytki Petriego, aby przejąć ewentualnie wydobywającą się kroplami ciecz.
5. Drożdże, roztwór glukozy i roztwór błękitu metylenowego miesza się ze sobą i podaje się pipetą (strzykawką jednorazową) do komory ogniwa energetycznego.
6. Do drugiej komory odpipetowuje się roztwór żelazocyjanu potasowego.
7. Poprzez zaciski krokodylkowe podłącza się woltomierz lub miernik napięcia, do końcówek elektrod. Ogniwa tego typu zwykle wytwarzają

napięcie między 0,4 a 0,6 V. Przepływ prądu powinien być mierzalny natychmiast. Jeżeli przyrząd pomiarowy pokazuje 0, to trzeba sprawdzić podłączenia i zagwarantować, że elektrody z włókien węglowych nie stykają się z membraną wymienniczą kationowego.

Objaśnienia i wskazówki

1. Można połączyć ze sobą większą ilość ogniw, aby wytworzyć wyższe napięcie. Powiększenie ogniwa (lub powierzchni elektrod) zwiększa ilość prądu (ale nie napięcie).
2. Mogą być stosowane różne rodzaje drożdży jak drożdże piekarnicze lub winne. Uwaga: ze względów bezpieczeństwa nie zaleca się stosowania innych mikroorganizmów.
3. Można zbadać wpływ ciepła na sposób działania ogniwa (zwraca się uwagę na odpowiednie „środki kontroli”, które przy tego rodzaju porównaniu są niezbędne.

Środki ostrożności



Żelazocyjanek potasowy jest trujący. Przy jego używaniu powinno się nosić okulary ochronne.

W razie kontaktu z oczami trzeba przepłukać oczy i zasięgnąć porady lekarskiej.

Jeżeli nastąpiło połknięcie żelazocyjanu potasowego to trzeba wypić dużą ilość wody i zwrócić się do lekarza. Przestrzegać należy lokalnych przepisów dotyczących usuwania zużytych roztworów.

Podziękowania

Ogniwo mikrobiologiczne opracowane zostało przez dr Petera Bennetto w King's College, Londyn. Adres dla zamówień patrz rysunek str. 25.

PRZENOSZENIE GENÓW

Naturalne przenoszenie genów przez koniugację bakterii

Istnieje wiele naturalnych metod przenoszenia genów między bakteriami. Przenoszenie genów prawdopodobnie wyewoluowało w naturze po to, aby umożliwić organizmom dostosowanie się do szybko zmieniających się warunków środowiskowych. Z reguły geny o największej mobilności zlokalizowane są na plazmidach. Plazmidy są kolistym DNA, który replikuje się niezależnie od chromosomów bakterii. Zawierają one małą liczbę genów, które między innymi przenoszą zdolność rozkładania szkodliwych substancji z otoczenia, jak np. metale ciężkie lub antybiotyki.

Znane są trzy różne rodzaje naturalnego przenoszenia genów:

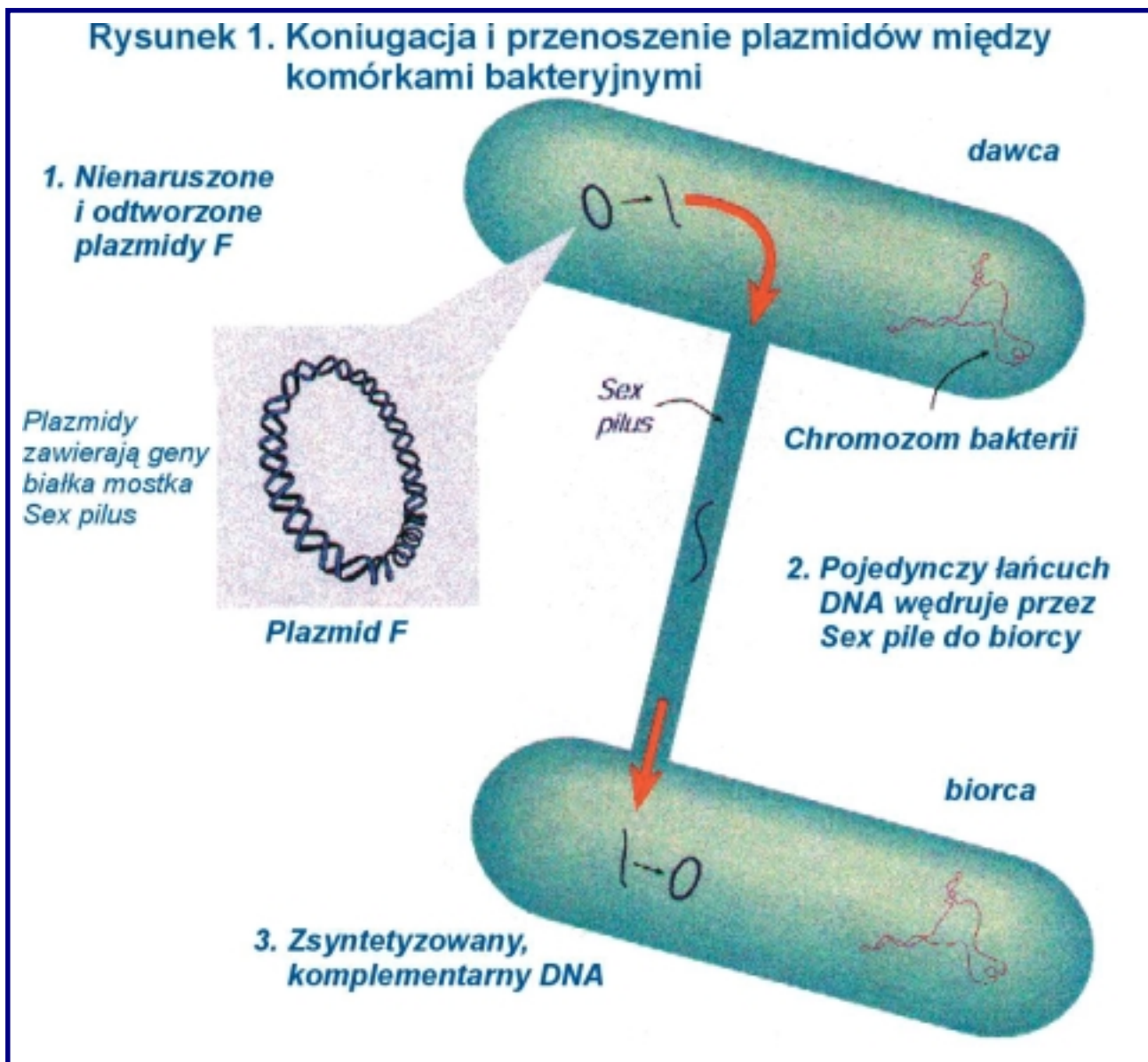
Transformacja jest przyjmowaniem wolnego DNA z otoczenia komórki.

Transdukcja jest wędrówką DNA z jednej komórki do drugiej przy współudziale bakteriofagów.

Koniugacja jest przenoszeniem wyspecjalizowanych „plazmidów F” przez wąski mostek łączący (sex pilus), który łączy dwie komórki bakterii (patrz rys. 1).

Wszystkie te mechanizmy (zwłaszcza transformacja) używane są przez inżynierię genetyczną do wprowadzania wybranych genów do bakterii. Poniższe doświadczenie bada koniugację między dwoma występującymi naturalnie szczepami bakteryjnymi.

Uwaga: Doświadczenie tu przeprowadzane opiera się na naturalnie występujących bakteriach, plazmidach i procesach i dlatego nie jest „inżynierią genetyczną”.



Plazmidy F

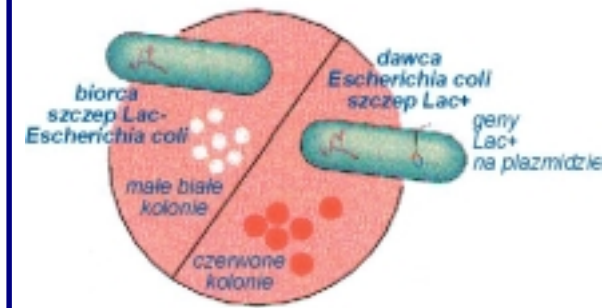
Tak zwane „plazmidy F” (F oznacza płodny, urodzajny) zawierają geny, które umożliwiają przeniesienie kopii plazmidu między komórką dawcy i biorecy (inaczej mówiąc: koniugacja bakterii).

Plazmidy F mogą również zawierać inne geny. W opisanym tu doświadczeniu dawca zawiera np. plazmid o nazwie *F Lac*. Nazywa on się tak dlatego, ponieważ nadaje swemu gospodarzowi zdolność przekształcania laktozy. (Dlatego bakteria należy do szczepu *Lac+*). W przeciwieństwie do tego szczep biorecy (bez plazmidu) nie jest w stanie przekształcić laktozę (szczep *Lac-*).

Na pożywce z agarem MacConkeya te różne szczepy mogą być rozróżnione po fenotypie: szczep dawcy tworzy czerwone kolonie, szczep biorecy białe (patrz rys. 2).

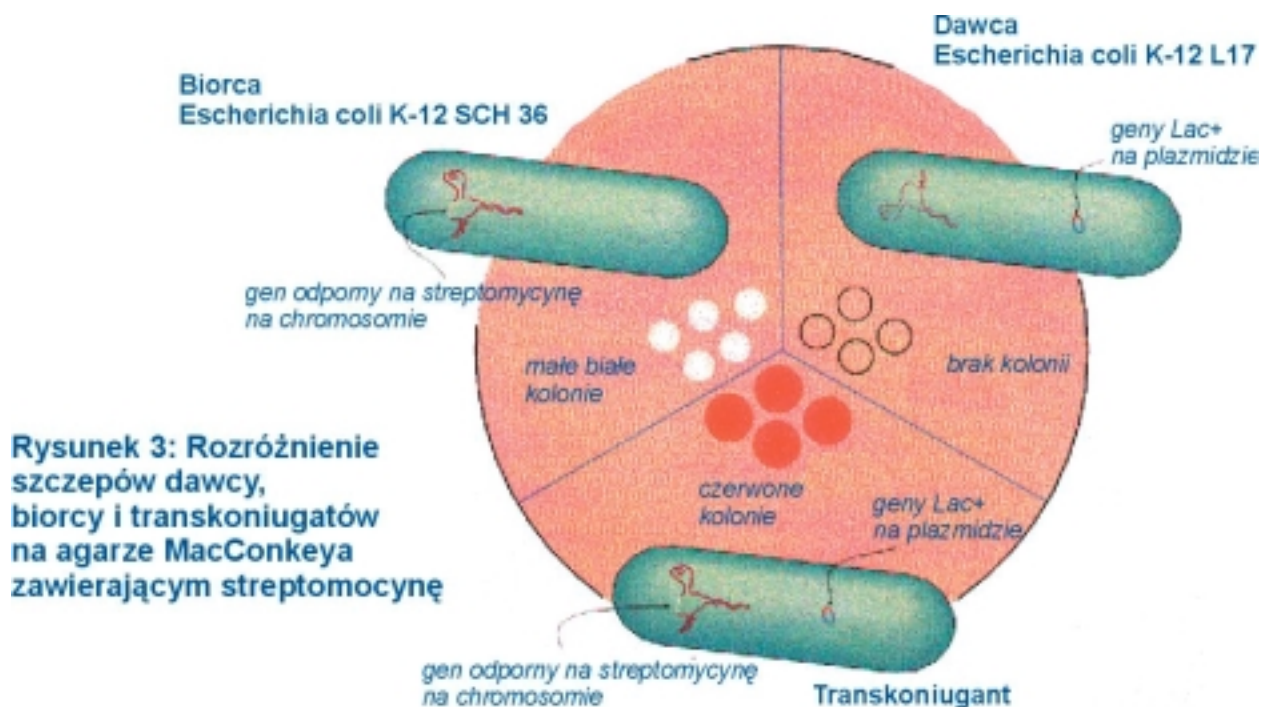
Przy zmieszaniu dawcy i biorecy plazmidy *F-Lac* przenoszone są od dawcy do biorecy. W ten sposób bioreca uzyskuje zdolność do przekształcania laktozy. Genetyczny „trik” daje dawcy możliwość

Rysunek 2. Fenotyp szczepów dawcy i biorecy na agarze MacConkeya



rozpoznania biorecy i szczepów z genami przeniesionymi drogą koniugacji. Wybiera się szczep biorecy z genem na chromosomie, który wykazuje swoją niewrażliwość na antybiotyk streptomycynę. Szczep dawcy nie posiada tego genu, i jego wzrost jest hamowany przez streptomycynę. Dlatego szczep biorecy i transkoniuganty mogą być rozpoznawane po ich zdolności do wzrastania na pożywce zawierającej streptomycynę.

Rysunek 3: Rozróżnienie szczepów dawcy, biorecy i transkoniugantów na agarze MacConkeya zawierającym streptomycynę



Rysunek 3: Rozróżnienie szczepów dawcy, biorecy i transkoniugantów na agarze MacConkeya zawierającym streptomycynę

Cel

- motywujące wprowadzenie w genetykę bakterii
- dyskusja pytań, które wynikają z przenoszenia genów (np. rozprzestrzenianie się odporności na działanie antybiotyków), ocena ryzyka związanego z przenoszeniem genów.

Przygotowanie

Następujące materiały powinny być przygotowane i wysterylizowane:

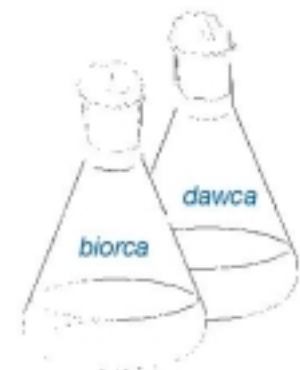
- 3 małe (np. 100 ml) kolby Erlenmayera z 10 ml sterylnej pożywki bulionowej w każdej kolbie
- sterylny agar MacConkeya z dodatkiem siarczanu streptomycyny (200 mg na ml). Po ochłodzeniu agaru do 50°C (próba grzbietu dłoni) powinien on zostać wlały do sterylnych płytek Petriego (ok. 15-20 ml na płytkę)
- używanymi kulturami są:
Szczep dawcy: *Escherichia coli* K-12 CSH 36 (DSM numer 6253)
Szczep biorcy: *Escherichia coli* K-12 L 17 (DSM numer 6254)

Te występujące w przyrodzie szczepy sprowadza się z DSMZ (Niemieckie Zbiory Mikroorganizmów i Hodowli Komórkowych GmbH w Braunschweig). Obydwa szczepy dostarczane są w ampulkach, zliofilizowane.

Ampułki muszą być otwierane we właściwy sposób aby zapewnić to, że ich zawartości nie zostaną zanieczyszczone i użytkownik nie zostanie narażony na niepotrzebne ryzyko (por. załączona instrukcja). Szczep dawcy z trudnością daje się utrzymać na hodowli ukośnej; dlatego powinno się stosować świeżo sporządzoną kulturę.

Kultury dobowe dawcy powinny być przygotowywane w sposób następujący:

1. Zawartość kolby ze sterylną pożywką bulionową zaszczebia się szczepem dawcy (kolba opisana „dawca”), zawartość drugiej kolby (opisanej „biorca”) szczepem biorcy.
2. Obydwie kolby inkubuje się przez noc przy 37°C, najlepiej w łaźni wodnej z wytrząsaniem.



„Parowanie” obydwu kultur

1. Sterylną pipetą dodaje się do trzeciej kolby z 10 ml sterylnego bulionu 0,8 ml szczepu dawcy.
2. Sterylną pipetą do tej samej kolby Erlenmayera dodaje się 0,2 ml szczepu biorcy.
3. Kolbę odpowiednio opisuje się i zawartość inkubuje się przy 30°C przez 16-24 godziny.
Uwaga: Kolba nie musi być konieczne wstrząsana, ale wolno ją również podczas inkubacji tylko bardzo delikatnie zamieszać - gwałtowne ruchy niszczą pilus, który łączy koniuganty.

Sterylnie pręciki z watą przygotowuje się owijając nieco waty wokół ostrza wykałaczki. Autoklawuje się je w butelce McCartneya lub lekko owinięte folią aluminiową, przy 121°C przez 15 minut.

Zapotrzebowanie czasu

Przygotowanie pożywek:	60 minut
Pierwsza inkubacja:	48 godzin
Zaszczepianie podłoża:	15 minut
Inkubacja:	24 godziny
Ocenianie wyników:	20 minut

Sprzęt i materiały

Zapotrzebowanie dla każdego ucznia lub każdej grupy roboczej (zakłada się dostęp do pracowni normalnie wyposażonej).

- dostęp do inkubatora nastawionego na 30°C
- sterylne płytki Petriego z 15-20 ml agaru MacConkeya i dodaną streptomycyną
- następujące kultury, które uprzednio utworzyły się w bulionie:
 - szczep dawcy
 - szczep biorcy
 - mieszanina „parujących się” szczepów dawcy i biorcy
- 3 sterylne, sporządzone przez siebie pałeczki z watą
- małe zlewki z roztworem dezynfekującym np. 3% *Domestos* (Lever) do odkładania zużytych pałeczek
- wodoodporny mazak filcowy (do opisywania płytek Petriego)
-

Przebieg doświadczenia

1. Płytkę z agarem MacConkeya i streptomycyną na stronie spodniej dzieli się mazakiem na trzy takie same wycinki.
2. W środku każdego wycinka kreśli się okrąg (średnica ok. 10 mm) i opisuje się S (dawca), E (biorca) i M (mieszanina).
3. Każdy zakreślony obszar zaszczepia się odpowiednim szczepem bakterii. Koniecznie należy używać nowej pałeczki z watą dla każdego szczepu. Pałeczki odkłada się jako odpad do roztworu środka dezynfekującego.
4. Pozostawia się płytki na kilka minut, aż na podłożu nie będzie już widać cieczy. Odwrócone płytki inkubuje się przy 30°C jeden do dwóch dni.

Objaśnienia i wskazówki

Realizowalne są różne ilościowe odmiany niniejszego doświadczenia, np.:

1. Przez rozcieńczenie kultur dawcy i biorcy sterylnym roztworem Ringera lub 0,001 M roztworem $MgSO_4$ można oznaczyć optymalny stosunek dawcy i biorcy.
2. Można wyznaczyć optymalny „czas parowania” dla koniugantów.

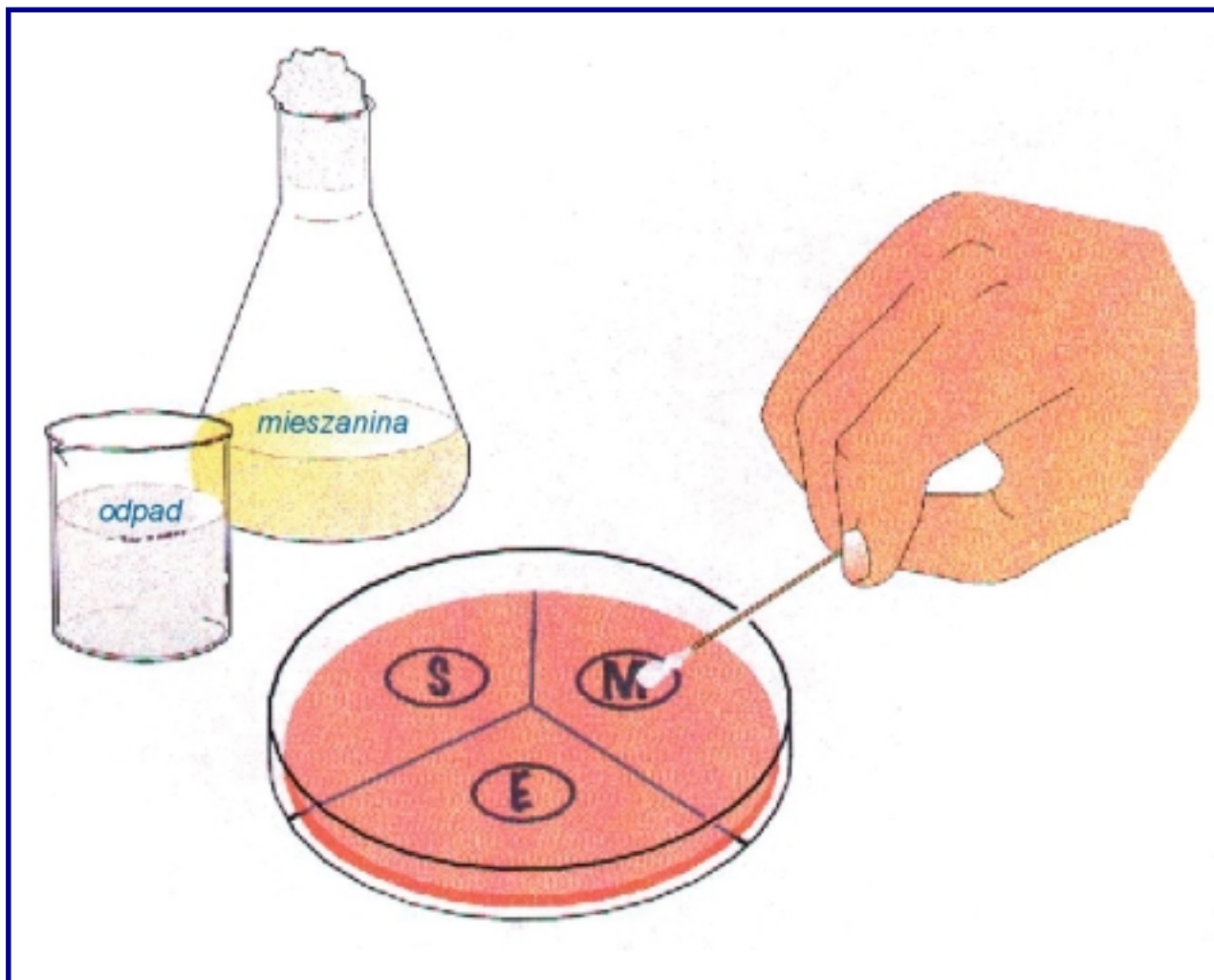
Środki ostrożności

Doświadczenie musi być przeprowadzane w pracowni. Powinny być zachowane podstawowe środki bezpieczeństwa (łącznie z techniką prac sterylnych) dla obydwu przebiegów doświadczenia i dla usuwania odpadów kultur.

Podziękowania

Niniejsze doświadczenie jest uproszczoną wersją doświadczenia prof. Patricii Nevers z Uniwersytetu w Hamburgu.

Protokół prof. Nevers bazuje na doświadczeniu E. Härle'a i R. Hausmanna z Uniwersytetu we Freiburgu.



Naturalne przenoszenie genów przez *Agrobacterium tumefaciens*

Guzy roślinne są poważnym zmartwieniem w rolnictwie, ogrodnictwie i gospodarce leśnej. Często rozwijają się po niewielkich okaleczeniach powstałych wskutek uprawy roli, wskutek szkód wyrządzanych przez mróz lub przy przesadzaniu.

Na przełomie wieku zaobserwowano, że określone guzy zawsze powstawały w połączeniu z infekcją bakteryjną. Zawarte w guzach bakterie nazwane zostały *Agrobacterium tumefaciens* (z łaciny: agar = rola, tumor = nabrzmienie, facere = czynić). Dopiero w końcu lat siedemdziesiątych nareszcie rzucono światło na kompleksowe wzajemne stosunki między roślinami a *Agrobacterium*.

Bakterie infekujące wprowadzają kawałek swojej informacji genetycznej (plazmid) do zespołu chromosomów komórki roślinnej i zmuszają zarażoną komórkę do tego, aby realizowała program korzystny dla bakterii. Każda zaatakowana komórka roślinna dzieli się stosownie do tego programu.

Rozwija się guz, który służy jako przestrzeń życiowa i dostarcza niezwykłych aminokwasów, które potrzebne są niepożądanym gościom bakteryjnym.

Metody przenoszenia genów przez *Agrobacterium* zaadaptowane zostały przez hodowców roślin i stosowane są do zamierzonego przenoszenia genów zamiast pracochłonnego krzyżowania. Z tego powodu zmodyfikowane postacie *Agrobacterium* stały się ważnym narzędziem w technologii genetycznej.

Agrobacterium ma postać pałeczek i ma prawie tę samą wielkość co *E. coli* (długość 1-3 μm). *Agrobacterium* żyje tlenowo w górnych warstwach ziemi. Jest ona saprofitem, aczkolwiek może wykorzystywać nieorganiczny azot.

Agrobacterium atakuje tylko rośliny dwuliścienne i może wnikać i zarażać rośliny tylko wtedy, gdy są uszkodzone. Dzieje się tak dlatego, że bakteria nie ma zdolności przenikania przez nienaruszoną

ścianę komórki roślinnej. Sok uszkodzonej komórki „zwabia” bakterie z najbliższego otoczenia i aktywuje przenoszenie genów.

Bakterie mnożą się wokół rany i przenikają obszar międzykomórkowy przywierając do ściany komórki roślinnej.

Plazmid bakterii *Agrobacterium* jest przenoszony i na koniec włączany do chromosomu rośliny skąd steruje produkcją związków będących dla niej źródłem węgla i azotu.

Cel

- infekcja *Bryophyllum - Calanchoe* sp. (który może szybko rosnąć i rozmnażać się) przez występującą naturalnie postać *Agrobacterium* w różnych warunkach. W ciągu 4 tygodni można zaobserwować wzrost guza. Badać można następujące warianty doświadczenia:

A. Sposób infekowania

- dokonuje się zadrapania i natychmiast zakaża bakterią *Agrobacterium*
- dokonuje się zadrapania i następnego dnia zakaża się bakterią *Agrobacterium*
- dokonuje się zadrapania i zakaża bakterią *Agrobacterium* i przykrywa wilgotną ściereczką papierową
- dokonuje się zadrapania i NIE zakaża się bakteriami
- *Agrobacterium* nanoszona jest na nienaruszone części rośliny.

B. Miejsca infekowania:

- łodyga
- powierzchnia liścia
- koniec pędu

Przygotowanie

1. Rozmnożenie rośliny - gospodarza (uczniowie mogą to ewentualnie wykonać w domu).
2. Przygotowanie pożywki i kultury *Agrobacterium*. Nowe kultury muszą być przygotowane co najmniej 2 tygodnie przed użyciem.

Zapotrzebowanie czasu

Wyhodowanie roślin-gospodarzy / w razie gdy to konieczne: 4 miesiące

Przygotowanie kultury *Agrobacterium*: 2 tygodnie

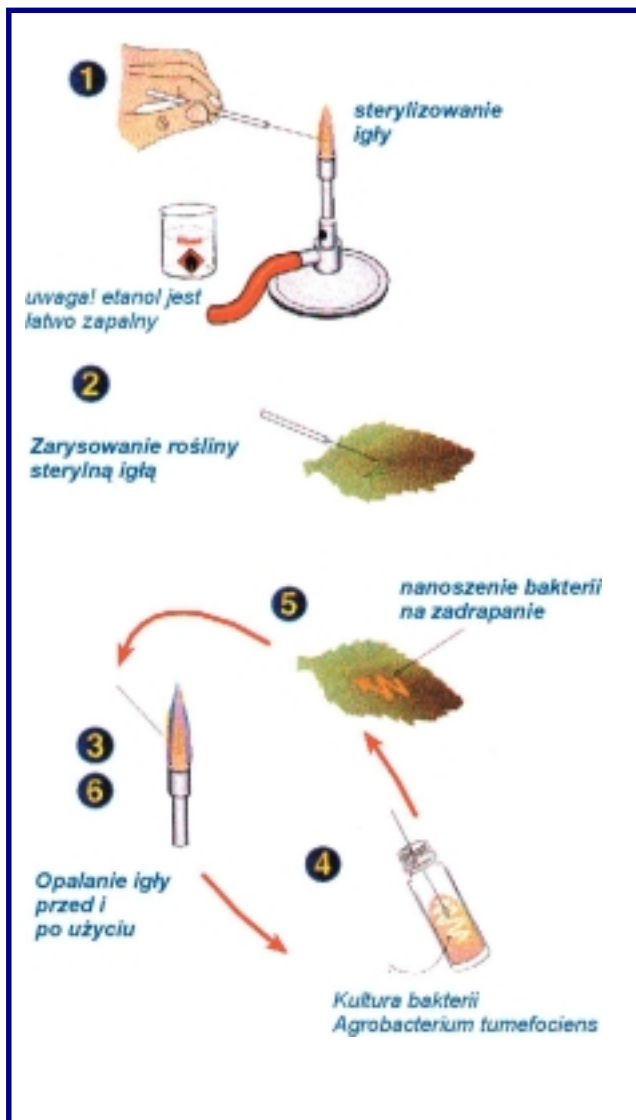
Zakażenie przy użyciu *Agrobacterium*: 20 minut

Obserwacja wzrostu guza: 3-4 tygodnie

Sprzęt i materiały

Zapotrzebowanie dla każdego ucznia lub każdą grupę roboczą (zakłada się dostęp do normalnie wyposażonej pracowni)

- woda sterylna (w butelce McCartneya)
- igła do szczepień
- eza
- mikroskop binokularny
- nożyczki
- etykiety samoprzylepne i mazak filcowy wodoodporny
- papierowe chusteczki do nosa
- taśma klejąca
- etanol do opalania instrumentów
- kultura *Agrobacterium tumefaciens* na pożywce agarowej
- rośliny *Kalanchoe (Bryophyllum)* w wieku ok. 3-4 miesiące



Przebieg doświadczenia

Rośliny doświadczalne traktuje się w różny sposób (por. wprowadzenie i późniejszą instrukcję).

1. Każdą roślinę opisuje się podając datę i rodzaj potraktowania. W razie konieczności zakażone części oznacza się np. przywieszonymi etykietami.
2. Rośliny doświadczalne ustawia się w dobrze oświetlonym miejscu i nawilża się (nie podlewać nadmiernie).
3. Podczas następnych 4-6 tygodni obserwuje się wzrost guza i sporządza się rysunki. Kawałek tkanki guza bada się z użyciem binokularnego mikroskopu i porównuje ze zwykłą tkanką liścia.

Infekowanie rośliny z użyciem *Agrobacterium*:

Metoda 1 (natychmiastowe infekowanie ran)

1. Igłę do szczepień zanurza się w alkoholu i opala się w płomieniu palnika. Powierzchnię rośliny zarysowuje się raz lub wiele razy.
2. Rany zakaża się bezpośrednio z kultury *Agrobacterium*. W tym celu eżę opala się i ochładza przez krótki czas. Z białawej kultury bakteryjnej pobiera się drucikiem niewielką jej ilość i rozmazuje się na ranie. Uszko drucika ponownie opala się.

Metoda 2 (infekowanie rośliny po 24 godzinach po jej skałeczeniu)

1. Skałeczenie rośliny (patrz metoda 1)
2. Następnego dnia zakaża się ranę bakteriami *Agrobacterium*

Metoda 3 (zakażanie ran i na koniec przykrywanie wilgotną ściereczką z papieru)

1. Skałeczenie i zakażanie rośliny (patrz metoda 1)
2. Z papierowej ściereczki wycina się kawałki i nawilża sterylną wodą wodociągową. Kawałki te kładzie się na skałeczenia i mocuje taśmą klejącą. Kawałki papieru powinny być zwilżane.

Metoda 4 (bez infekowania ran)

1. Roślinę kaleczy się na powierzchni (patrz metoda 1). Drugiego skałeczenia dokonuje się w podobnym miejscu i przykrywa zwilżonym papierem. Skałeczeń nie zakaża się z użyciem *Agrobacterium*.

Metoda 5 (infekowanie bez skałeczenia)

1. Nie kaleczy się rośliny
2. Przy pomocy drucika z uszkiem sterylną kulturę *Agrobacterium* wymazuje się w jednym lub wielu miejscach nieuszkodzonej powierzchni.

Środki ostrożności

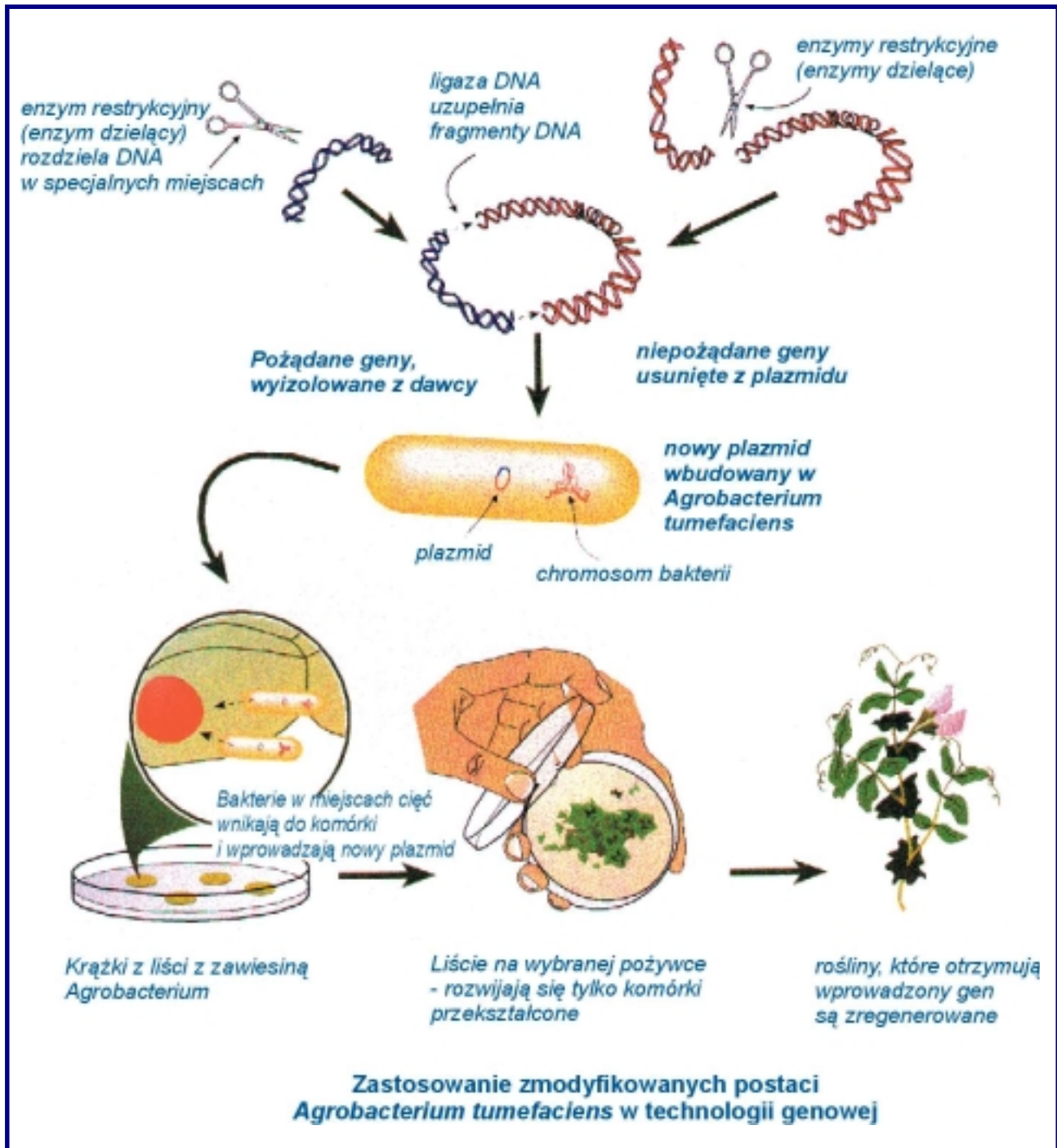
Doświadczenia muszą być przeprowadzane w pracowni. Przy obchodzeniu się z mikroorganizmami trzeba stosować się do podstawowych przepisów bezpieczeństwa mikrobiologicznego łącznie z zastosowaniem aseptycznych technik.

WAŻNE: *A. tumefaciens* jest poważnym szkodnikiem roślin. Jej stosowanie w niektórych

krajach i regionach jest ściśle nadzorowane. Przy przeprowadzaniu tych doświadczeń musi być zagwarantowane to, że będą one zgodne z obowiązującymi przepisami bezpieczeństwa.

Podziękowanie

Ten ciąg doświadczeń opracowała Uta Nellen z Centrum Nauczania Biologii i Wychowania Ekologicznego w Hamburgu. EIBE dziękuje za udzielenie zgody na ich wykorzystanie.



Pożywki mikrobiologiczne

European Initiative for Biotechnology Education

Pożywki agarowe i buliony powinny się wytwarzać z preparatów występujących w handlu, przy czym należy przestrzegać instrukcji producenta. Przed użyciem powinny one być autoklawowane w 121°C przez 15 minut. Przygotowane pożywki z zasady mogą być składowane kilka miesięcy w temp. ok. 4°C.

Pożywka agarowa ze skrobią

pożywka agarowa	20,7 g
skrobia rozpuszczalna	2,0 g

Wodą destylowaną uzupełnić do 1 l i autoklawować w 121°C przez 15 minut.

Agar MacConkeya ze streptomycyną

agar MacConkeya	50,0 g
woda destylowana	990 ml

Po autoklawowaniu przez 15 min. w temp. 121°C schłodzić do 50°C, następnie dodać:

roztwór siarczanu streptomycyny 200 mg/10 ml.

Te płytki muszą być sporządzane na świeżo. Nie mogą one być przechowywane dłużej niż kilka dni w chłodziarce przy temp. ok. 4°C.

Techniki prac mikrobiologicznych

European Initiative for Biotechnology Education

Aerozole

Aerozole są małymi kropelkami z przyczepionymi mikroorganizmami, które w sposób niezamierzony dostają się do powietrza, mają trwałość pół godziny lub dłużej i mogą być wdychane. Są one przede wszystkim potencjalną przyczyną infekcji w pracowniach. Aerozole z rozlanych kultur mogą powodować infekcje skóry i oczu. Połknięcie mikroorganizmów jest możliwe wtedy, gdy kultury są pipetowane ustami.

Zasadnicze prace laboratoryjne

Następujące środki ostrożności muszą być stosowane:

Nie powinno się wykonywać żadnych czynności z rąk do ust (np. gryzienie ołówka, lizanie etykiet, pipetowanie ustami). Jedzenie, picie i palenie w pracowni jest niedozwolone. Zaleca się, aby wszyscy uczniowie nosili fartuchy robocze. Wszystkie skaleczenia powinny być zabezpieczone przed rozpoczęciem praktycznych prac, przez nałożenie wodoodpornego plastra lekarskiego.

Przed i po praktycznej pracy miejsce pracy powinno być przetarte środkiem dezynfekującym. Odpowiednie środki dezynfekujące można nabyć w handlu z pomocami naukowymi. Nauczyciele i uczniowie po wykonaniu pracy powinni umyć ręce.

Rozsypanie, rozlanie, pęknięcia

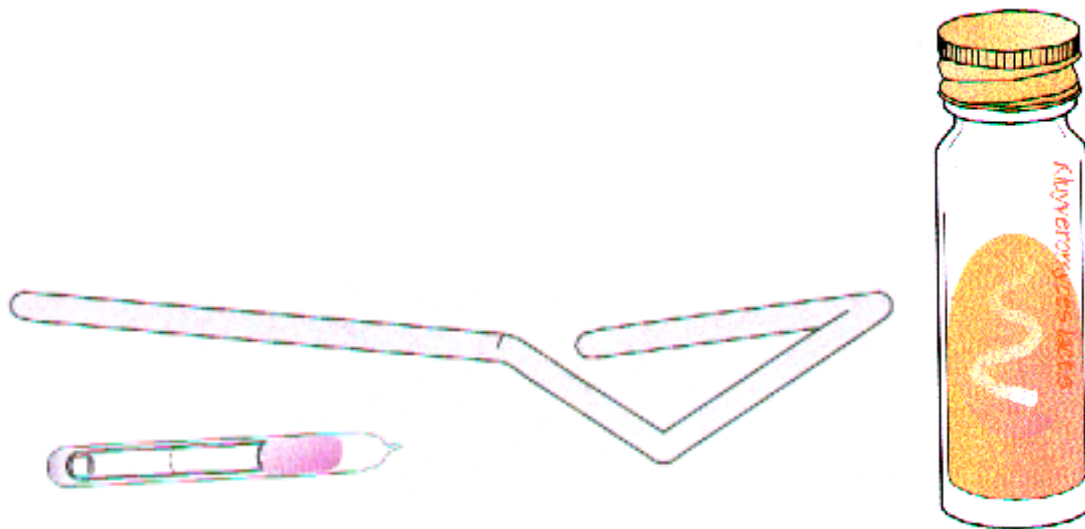
W razie *nieszczęśliwych wypadków przy pracy z kulturami* (wstrząsania itp.) powinno się postępować w sposób następujący: powinno się nosić jednorazowe rękawice. Stłuczone pojemniki i/lub rozsypana albo rozlana kultura powinny być przykryte ściereczką nasyoną środkiem dezynfekującym. Po nie mniej niż 10 minutach trzeba je sprzątnąć stosując ściereczki papierowe i szufelkę do śmieci. Usuwany jako odpad materiał musi być wyrzucony do śmietniczki na materiał zakażony lub do odpowiedniego worka na śmieci. Obydwa: worek i śmietniczka muszą być autoklawowane przed wyrzuceniem na wysypisko. Szufelka również musi być autoklawowana lub włożona na 24 godziny do środka dezynfekującego.

Skażenie przez nieuwagę skóry i ubrania

Każdy, kto się opryskał powinien szybko umyć się. Mocno skażone ubranie przed praniem powinno być zdezynfekowane środkiem dezynfekującym. Ściereczki do czyszczenia, które zostały skażone, powinny być autoklawowane.

Pochodzenie mikroorganizmów

Wszystkie mikroorganizmy trzeba uważać za potencjalnie szkodliwe. Organizmy stosowane w doświadczeniach objętych niniejszym zeszytem przy starannym ich przygotowaniu nie stanowią zagrożenia. Powinny one tylko być sprowadzane od uznanych dystrybutorów (np. z DSMZ, patrz załącznik 3)



Techniki pracy sterylnej

Celem technik pracy sterylnej jest:

- a) uzyskanie i zachowanie czystych kultur mikroorganizmów
- b) bezpieczna praca z mikroorganizmami.

Czysta kultura składa się z jednego szczepu jednego rodzaju mikroorganizmu, podczas gdy kultura mieszana zawiera dwa lub więcej szczepów.

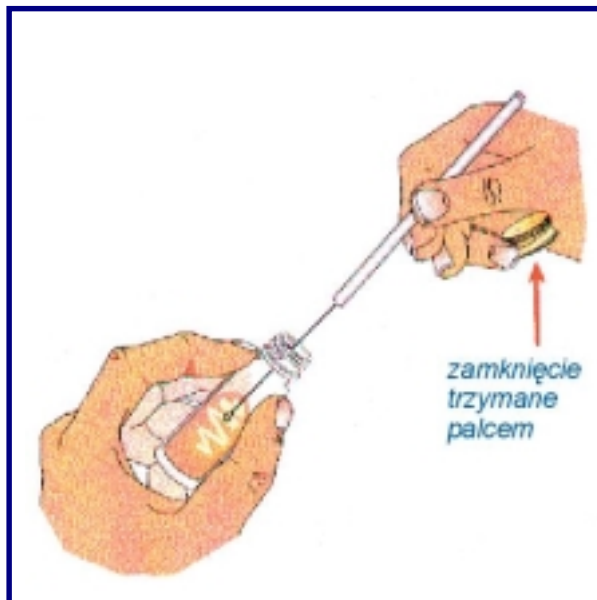
Zanieczyszczenie mikroorganizmami jest stałym wszechobecnym niebezpieczeństwem, ponieważ mikroorganizmy występują wszędzie; na skórze, w powietrzu i na obiektach martwych. Aby czyste kultury utrzymać w czystości trzeba używać sterylnych pożywek i sterylnego sprzętu, a zanieczyszczenia (kontaminanty) będą wykluczone. Są to podstawowe zasady sterylnej techniki pracy. W sposób nierealistyczny należy przyjąć, że młodszy uczeń wykona bez zarzutu prace wymagające sterility. Mimo to niektóre doświadczenia z niniejszego zeszytu zakładają, że uczniowie będą mogli przenosić kultury w sposób sterylny. W tych przypadkach powinno się postępować w sposób następujący: pożywki przed użyciem powinny być autoklawowane. Muszą być używane sterylne naczynia (kolby, płytki Petriego). Pokrywy muszą spoczywać na pojemnikach, aby przeciwdziałać skażeniu.

Prace powinny być wykonywane w pobliżu palnika Bunsena. Nad płomieniem wznoszą się prądy powietrzne i usuwają mikroorganizmy, które mogłyby skażać pożywkę lub czyste kultury.

Przy przenoszeniu kultur zamknięcia i pokrywy powinny być otwierane nie na dłużej niż to konieczne. Jeżeli otwiera się korek lub zamknięcie butelki, to aż do powtórnego zamknięcia powinno się go trzymać w ręce. Chroni to przed skażeniem miejsca pracy oraz kultury.

Po usunięciu zamknięcia szyjkę butelki z kulturą należy wyżarzyć przez 1-2 sekundy. Istniejące tam mikroorganizmy zostaną przez to uśmiercone i wytworzą się prądy konwekcyjne, które zapobiegają skażeniu przez przypadkowe kultury istniejące w powietrzu.

Poprzez ćwiczenia możliwe jest trzymanie butelki w jednej ręce, a jej zamknięcia metalowego w drugiej, dociskając małym palcem zamknięcie do powierzchni dłoni. (Przy tym sposobie postępowania ważne jest, aby zamknięcie butelki zostało lekko poluzowane zanim zostanie wprowadzony drucik z uszkiem). W razie konieczności dwóch uczniów może ze sobą współpracować, aby przeprowadzić ten zabieg.

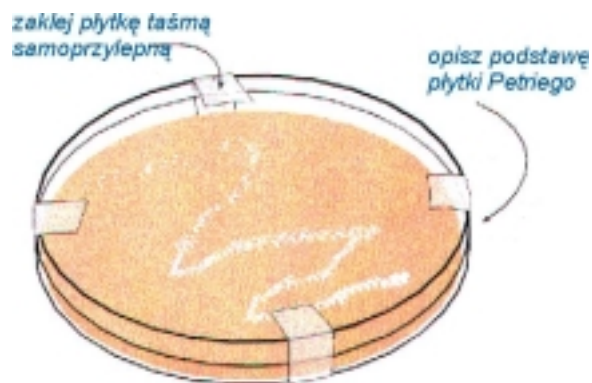


Druciki z uszkami powinny być podgrzane, aż cały element metalowy rozgrzeje się do czerwoności. Musi to nastąpić przed i po przeniesieniu kultur. Uszka powinny się powoli wprowadzić do płomienia palnika Bunsena, aby uniknąć odprysków, a przez to tworzenia się aerozolu. W razie nieużytkowania palnik Bunsena powinien utrzymywać żółty płomień, tak że nie można go przeoczyć. Niebieski płomień o wysokości ok. 5 cm powinien być stosowany do sterylizacji uszek i do wyżarzania szyjek butelek. Należy unikać skażenia miejsca pracy. Sprzęt do pracy powinien być natychmiast po użyciu sterylizowany, a używane pipety niezwłocznie powinny być wkładane do naczynia z roztworem środka dezynfekującego.

Inkubowanie kultur

Przed inkubowaniem płytki Petriego opisuje się na stronie spodniej. Nazwiska, data i nazwa kultury lub jej pochodzenie pomogą zidentyfikować pożywkę i jej zawartość.

Po dokonaniu tego (inkubowanie nieznanymi kulturami) płytki Petriego zamyka się jak pokazano niżej:



Uszczelnienie zabezpiecza to, że pożywki przez nieuwagę nie zostaną otwarte lub niepowołana osoba nie dostanie się do nich. Uwaga: *plytek nie uszczelnia się całkowicie, gdyż w przeciwnym razie mogłyby powstać beztlenowe warunki wzrostu.*

Bakterie

Kultury bakteryjne w płytkach Petriego zwykle powinny być inkubowane w pozycji odwróconej, tak że występująca woda kondensacyjna nie dostanie się z pokrywy do kultury (gdyby przed zaszczepieniem wystąpiła silna kondensacja w płytkach Petriego, to wprawdzie trzeba je osuszyć).

Po inkubacji przez 2-3 dni w 25-30°C widoczne będą kolonie bakterii.

Grzyby

Płytek Petriego z grzybami nie odwraca się. Kultury grzybów powinny być inkubowane przez ok. 7 dni. Temperatura pokojowa ok. 21°C umożliwia ich wzrost, ale inkubator pozwala na dokładniejszą kontrolę.

Usuwanie odpadów i sterylizacja

Ważne jest, aby urządzenia zastosowane w doświadczeniu starannie oczyścić, by uniknąć skażenia miejsc pracy i ludzi. Wszystkie pojemniki, które służą do przechowywania i wzrostu kultur muszą być autoklawowane przed ponownym użyciem, następnie przemyte środkiem dezynfekującym i wypłukane. W pracowni powinny istnieć dwa worki do autoklawowania: jeden do szklanego sprzętu ponownego zastosowania, drugi do odpadów. Na każdym miejscu pracy powinien stać jeden większy i jeden mniejszy pojemnik na odpadki dla pipet i szkiełek przedmiotowych. Do wyrzucania potłuczonych naczyń szklanych do dyspozycji powinien być kubek metalowy. Pipety plastikowe przeznaczone do wyrzucenia i szkiełka przedmiotowe oraz wszystkie ciecze z kultur powinno się wkładać do małego naczynia z roztworem środka dezynfekującego.

Pipety z tworzyw autoklawuje się i wyrzuca do śmieci, szkiełka przedmiotowe wkłada się na 24 godziny do roztworu dezynfekującego i przed ponownym użyciem myje się i płucze. Pipety szklane trzeba wkładać do większego naczynia. Tłoczki pipet powinny być wyciągnięte dopiero wtedy, gdy ostrze

pipety znajduje się w środku dezynfekującym, gdyż w przeciwnym razie mogą tworzyć się aerozole.

Zabrudzone pipety przed ponownym użyciem trzeba autoklawować, wyciągnąć i wypłukać.

Skażone chusteczki papierowe, części odzieży i płytki Petriego wkłada się do worka na odpady i trzeba je autoklawować.

Wszystkie skażone urządzenia i naczynia szklane (włącznie z użytymi płytkami Petriego) powinny być autoklawowane w worku do sprzętu szklanego, przeznaczonego do autoklawowania.

Nie skażony sprzęt szklany można normalnie wyciągnąć. Potłuczony sprzęt szklany trzeba wyrzucić do pojemnika na odpady, specjalnie do tego przeznaczonego. Gdyby sprzęt szklany został skażony, to przed jego wyrzuceniem do śmieci musi być autoklawowany. Nieskażony, potłuczony sprzęt szklany można wyrzucać bez szczególnych środków ostrożności.

Autoklawowanie

Sterylizacja oznacza całkowite zabicie mikroorganizmów i ich przetrwalników.

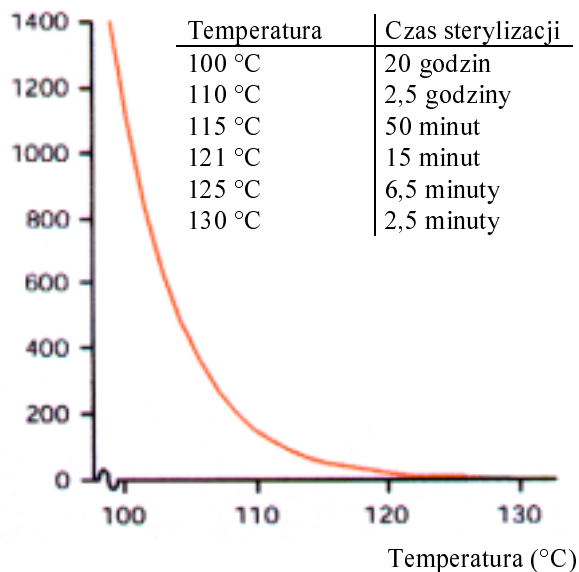
Wszystkie materiały przed rozpoczęciem prac praktycznych powinny być wysterylizowane, aby uniknąć skażenia. Kultury i skażony materiał również przed wyrzuceniem powinny być sterylizowane. Autoklawowanie jest preferowaną metodą sterylizacji pożywek kultur, wodnych roztworów i stosowanych kultur. W tej technologii używa się pary pod ciśnieniem, przy 121°C (np. w szybkowarze). Mikroorganizmy łatwiej zabijane są przez gorąco wilgotne niż suche, gdyż para niszczy ich białka. Autoklawowanie można prowadzić w domowym garnku ciśnieniowym lub w autoklawie zbudowanym do tego celu. Garnki ciśnieniowe mogą być stosowane w pracowniach szkolnych, ale ich niewielka pojemność może być wadą przy stosowaniu materiałów przeznaczonych dla całej klasy.

Zasady autoklawowania

Dwa czynniki mogą wpływać niekorzystnie na efektywność. Po pierwsze powietrze musi być usunięte z autoklawu. Zapewnia się przez to, że para o wysokiej temperaturze osiągnie powierzchnię sterylizowanych: obecność powietrza obniża temperaturę przy tym samym ciśnieniu pary. Sprzęt podlegający sterylizacji nie powinien być umieszczony zbyt ściśle, aby powietrze mogło uciec. W przypadku butelek i naczyń o zamknięciach gwintowych trzeba pokrywki nieco poluzować, aby powietrze uchodziło, a wewnątrz naczynia nie narosło niebezpieczne ciśnienie.

Po drugie trzeba poświęcić dostatecznie dużo czasu aby gorąco (przez kondukcję) mogło wnikać do pożywek na płytkach Petriego lub innych naczyniach. Różne czasy potrzebne do sterylizacji dla pożywek i sprzętu przy różnych temperaturach można odczytać z rysunku poniżej.

Czas sterylizacji (minuty)



Już mała odchyłka temperatury może oznaczać bardzo dużą zmianę czasu sterylizacji. Ważne jest również aby wszystkie sprzęt osiągnął temperatury w podanym okresie np. bulion dokładnie w środku naczynia fermentacyjnego. Zatem trzy czynniki przyczyniają się do czasu trwania autoklawowania:

- **faza podgrzewania:** czas, którego potrzeba, aby centralne obszary zawartości autoklawu osiągnęły wymaganą temperaturę
- **faza sterylizacji:** minimalny czas, w którym przy wstępnie określonej temperaturze zabite zostały wszystkie żywe organizmy
- **faza bezpieczeństwa:** czas bezpieczeństwa, przeważnie połowa czasu sterylizacji.

Garnki ciśnieniowe pracują przy temperaturze 121°C. Z tego wynika dla całkowitego czasu sterylizacji: faza podgrzewania (np. 5 minut) + faza sterylizacji (np. 15 minut) + faza bezpieczeństwa (5 minut) = 25 minut

Naczynie	pojemność	czas
próbówka	20 ml	12-14 minut
kolba	50 ml	12-14 minut
kolba	200 ml	12-15 minut
naczynie fermentacyjne	1 litr	20-25 minut

Karmelizacja

Specjalne autoklawy pracują niekiedy przy wyższych temperaturach niż 121°C. Podczas gdy z jednej strony związana z tym oszczędność czasu działa obniżająco na koszty, to trzeba pomyśleć o tym, że wyższe temperatury oddziałują szkodliwie na określone pożywki. Roztwór glukozy np. karmelizuje przy wysokich temperaturach tworząc związki, które mogą działać toksycznie na mikroorganizmy. W przypadku glukozy można uniknąć tej reakcji przez nastawienie pH pożywki na wartość 4. Po sterylizacji wartość pH można z powrotem podwyższyć jeśli trzeba.

Reakcja Maillarda

Reakcja brunatnienia (reakcja Maillarda) może wystąpić w pożywce przez interakcję związków azotu i węglowodanów w wyższych temperaturach. Powstające tu związki są również toksyczne dla niektórych mikroorganizmów, tak że w określonych warunkach będzie konieczne osobne autoklawowanie węglowodanów i pozostałości pożywki (przykład: przy preparowaniu agaru z mlekiem).

Użytkowanie i bezpieczne postępowanie się autoklawem

Przy używaniu naczyń ciśnieniowych lub autoklawów konieczne należy stosować się do instrukcji obsługi producenta. Zwłaszcza należy zwracać uwagę na to, aby w autoklawach była dostateczna ilość wody, by podczas autoklawowania nie było gotowania na sucho. Naczynie ciśnieniowe wymaga 250 ml wody - większe autoklawy wymagają większej ilości. Użycie wody destylowanej lub demineralizowanej zapobiega tworzeniu się kamienia kotłowego. Przed sprzątnięciem autoklaw powinien być starannie wysuszony. Jeżeli nie zrobi się tego, mogą tworzyć się osady na dnie autoklawu, które poważnie uszkadzają urządzenie i pod ciśnieniem mogą wywołać wyoblenie na zewnątrz.

Przy użytkowaniu autoklawu para powinna móc uchodzić swobodnie przez mniej więcej minutę, aby usunąć powietrze z wnętrza, zanim zamknie się zawór wylotowy.

Po zakończeniu autoklawowania trzeba dać wystarczająco dużo czasu na schłodzenie zawartości i ponowne uzyskanie normalnego ciśnienia atmosferycznego. Naczynia lub zawory nie powinny być otwierane pod ciśnieniem, gdyż w przeciwnym razie możliwe są oparzenia. Przedwczesne otwarcie pokrywy i wynikający z tego spadek ciśnienia powoduje gotowanie się cieczy we wnętrzu autoklawu. Pożywki lub bulion mogą się spienić i wylać z naczynia.

Sterylizacja chemiczna

Wiele różnych chemikaliów może być użytych do sterylizacji. Naczęściej w pracach laboratoryjnych stosowanym środkiem są roztwory zawierające fenol i podchloryny. Roztwory zawierające fenol działają przeciwko bakteriom i grzybom, ale nie przeciw przetrwalnikom i niektórym wirusom. Do pewnego określonego stopnia są one inaktywowane przez kontakt z drewnym, gumą lub tworzywem sztucznym. Używanie w pracowniach ogranicza ich stosowanie do dezynfekcji pojemników na odpady i do dezynfekcji powierzchni.

Roztwory zawierające podchloryny (np. płyny bielące) nie za bardzo nadają się do sterylizacji płytek Petriego itp., ponieważ mogą się inaktywować przez białka i materiały z tworzyw sztucznych. Mimo to 5-procentowy roztwór *Domestosu* lub *Sagrotanu* nadaje się do użycia w pojemnikach na odpady.

Otwieranie ampułki

European Initiative for Biotechnology Education

Zamawianie kultur u:
DSMZ - Deutsche Sammlung von
Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
Dr Barbara Lehnberg

Otwieranie ampułki



UWAGA! Trzeba nosić okulary ochronne, gdyż przy otwieraniu ampułki mogą powstać odpryski szkła.

1. Końcówkę ampułki ogrzewa się w płomieniu palnika Bunsena.
2. Pipetą nakrapla się dwie lub trzy krople zimnej wody na ogrzaną końcówkę. Szkło musi teraz pęknąć.
3. Część ampułki, która odskoczyła mocno lecz ostrożnie ostukuje się pincetą a odpryski szkła zbiera się do płytki Petriego. Pozostałą część ampułki można wyrzucać do odpadów.
4. Pincetą usuwa się ostrożnie korek z waty szklanej, który trzyma wewnętrzną rurkę w ampulce.

5. Wewnętrzną rurkę ostrożnie przenosi się do sterylnej płytki Petriego i z powrotem zamyka się płytkę.

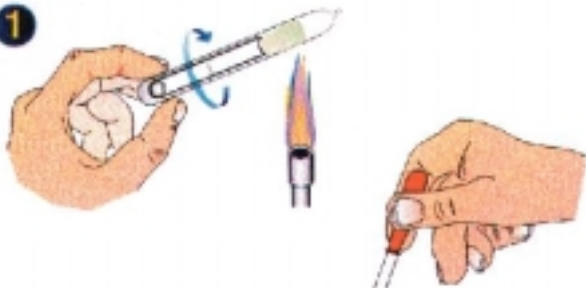
Przygotowanie kultury liofilizowanej

1. Korek z waty usuwa się pincetą i opala się płomieniem otwór wewnętrznej rurki.
2. Do zawartości wewnętrznej rurki dodaje się ok. 1 ml sterylnego bulionu.
3. Otwór wewnętrznej rurki ponownie opala się i zakłada się korek z waty. Rurkę odstawia się na 20 minut w celu przygotowania kultury.
4. Opalonym drucikiem z uszkiem dobrze miesza się zawartość rurki wewnętrznej i przenosi do sterylnej próbówki z ok. 5 ml bulionu.
5. Kulturę inkubuje się przy 30°C przez noc.

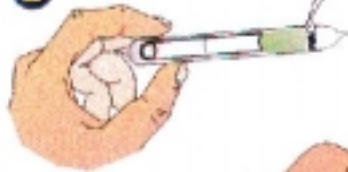
Następnego dnia...

6. Kroplę przygotowanego roztworu nanosi się opaloną eżą na powierzchnię pożywki agarowej. Służy to sprawdzeniu możliwego zakażenia płytki. Powinien wyrosnąć tylko jeden rodzaj kolonii mikroorganizmów na płytce.

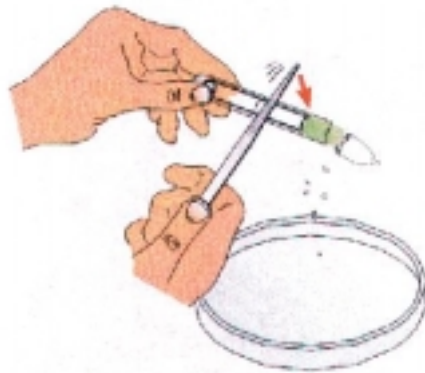
1



2



3



Otwieranie
ampulki

4



5

