



Mikroorganismid ja molekulid

MOODUL

1

Biotehnoloogiaalase Hariduse Euroopa Initsiatiivgrupp

Mooduli koostajad

Eckhard R. Lucius (koordinaator)

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



Biotehnoloogiaalase Hariduse Euroopa Initsiatiivgrupp (EIBE) taotleb biotehnoloogiaalase hariduse edendamist Euroopa Liidu liikmesriikide üldhariduskoolides ja kolledžites. Sellega suurendatakse inimeste biotehnoloogiaalaseid oskusi, süvendatakse arusaamist ning juhitakse neid sisulistele mõttevahetustele.

EIBE kontaktisikud



AUSTRIA

| Rainhart Berner, Höhere Bundeslehr- und Versuchsanstalt für Chemische Industrie Wien, Abt. für Biochemie, Biotechnologie und Gentechnik, Rosensteingasse 79, A-1170 WIEN.



BELGIA

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



BULGAARIA

| Raytcho Dimkov, Faculty of Biology, University of Sofia "St. Kliment Ohridski", Dr. Tzankov blvd. No.8, 1421 SOFIA.



TŠEHHI

| Hana Nováková, Pedagprogrm, Faculty of Education UK, Pedagogical Centre, Prague, Konevova 241, CZ-13000 PRAGUE 3.



TAANI

| Dorte Hammelev, Frederiksberg HF kursus, Sønderjyllands alle 2, DK-2000 FREDERIKSBERG.

| Lisbet Marcussen, Nyborg Gymnasium og HF kursus, Skolebakken 13, DK-5800 NYBORG.



IIRI

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



EESTI

| Tago Sarapuu, Science Didactics Dept., Institute of Molecular and Cell Biology, University of Tartu, Vanemuise 46, 51014 TARTU.



PRANTSUSMAA

| Gérard Coutouly, LEGTP Jean Rostand, 18 Boulevard de la Victoire, F-67084 STRASBOURG Cedex.

| Laurence Simonneaux / Jean-Baptiste Puel, Ecole Nationale de Formation Agronomique, Toulouse-Auzeville, Boîte Postale 87, F-31326 CASTANET TOLOSAN Cedex.



SAKSAMAA

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

| Michael Schallies, Pädagogische Hochschule Heidleberg, Im Neuenheimer Feld 561, D-69120 HEIDELBERG.

| Ognian Serafimov, UNESCO-INCS, c/o Jörg-Zörn-Gewerbeschule, Rauensteinstraße 17, D-88662 ÜBERLINGEN.

| Eberhard Todt, Fachbereich Psychologie, Universität Gießen, Otto-Behagel-Straße 10, D-35394 GIEßEN.



KREEKA

| Vasilis Koulaidis / Vasiliko Zogza-Dimitriadi, Dept. of Education, Unit of Science, University of Patras, Rion, GR-26500 PATRAS



ITAALIA

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



LUKSEMBURG

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



HOLLAND

| David Bennett / Ana-Maria Bravo-Angel, Cambridge Biomedical Consultants, Schuytstraat 12, NL-2517 XE DEN HAAG.

| Fred Brinkman, Hogeschool Holland, Dept. of International Relations, PO Box 261, NL-1112 XB 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.



POOLA

| Anna Sternicka, Department of Biology, University of Gdansk, Bazynskiego 1, GDANSK.



HISPAANIA

| María Sáez Brezmes / Angela Gómez-Niño / Rosa M. Villamañán, Facultad de Educación, Universidad de Valladolid, Geologo Hernández Pacheco 1, ES-47014 VALLADOLID.



ROOTSI

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

| Elisabeth Strömberg, Östrabo Gymnasiet, Kaempegatan 36, S-45117 UDDEVALLA.



ŠVEITS

| Kirsten Schlueter, Institut fuer Verhaltenswissenschaft, Eidgenössische Technische Hochschule IfV/ETH, ETH Zentrum TUR, Turnerstr. 1, CH-8092 ZUERICH



SUURBRITANNIA

| Wilbert Garvin / Jill Turner, Northern Ireland Centre for School Biosciences, NIESU, School of Education, The Queen's University of Belfast, BELFAST, BT7 1HL.

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

| Jenny Lewis, Centre for Studies in Science and Mathematics Education, University of Leeds, LEEDS, LS2 9JT.

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

EIBE koordinaator

Horst Bayrhuber, Institut für die Pädagogik der Naturwissenschaften an der Universität Kiel, Olshausenstraße 62, D-24098 KIEL, Germany.
Telefon: + 49 431 880 3129/8803151 (EIBE sekretär: Ute Harms). Faks: + 49 431 880 3132.



Mikroorganismid ja molekulid

MOODUL
1

Biotehnoloogiaalase Hariduse Euroopa Initsiatiivgrupp

SISUKORD

Sisukord

I Ohutusnõuded, autoriõigused, mooduli koostajad ja tänu 4

I Käesolevast moodulist Sissejuhatus 5

I Mudelite valmistamine DNA mudeli valmistamine 6 Mikroorganismide mudelid 8

I DNA eraldamine Bakteriaalse DNA eraldamine 10 DNA eraldamine sibulast 12

I Tootlikud mikroorganismid Amülaasi tootmine mulla bakterite poolt 14 Tsellulaasi tootmine 16 Antibiootikumi tootmine 18

I Mikroorganismide elutegevuse jälgimine Leivataigna valmistamine 20 Seotud pärmirakud 22 Mikrobioloogiline kütteelement 25

I Geeniülekanne Geeniülekanne bakterite konjugatsioonil 27 Looduslik geeniülekanne *Agrobacterium tumefaciens*'i abil 31

I Lisa 1 Mikrobioloogilised söötmed 34

I Lisa 2 Mikrobioloogiaalased töövõtted 35

I Lisa 3 Lüofiliseeritud kultuuriga ampulli avamine 40

Veebileheküljed

Vähesed teadusharud arenevad sama kiiresti, kui biotehnoloogia. Biotehnoloogiaalase Hariduse Euroopa Initsiatiivgrupi (EIBE) õppematerjale levitatakse elektrooniliselt. See võimaldab neid parandada, kaasajastada ja seejärel minimaalsete kulutustega levitada.

Käesolev ja ka järgnevad EIBE moodulid on kätte saadavad kogu Euroopas ning mujal maailmas interneti aadressil:

<http://www.rdg.ac.uk/EIBE>

Kõik EIBE moodulid on veebis postskript-failidena (PDF). See tagab illustatsioonide hea kvaliteedi ja ühesuguse kujunduse sõltumata arvutitüübist (*Macintosh*, kaasaarvatud *Power PC*, *Windows*, DOS või *Unix*).

PDF failid on väiksemad, kui need, milles nad esialgselt koostati - see aga võimaldab neid kiiremini internetist kätte saada. EIBE moodulitega tutvumiseks vajate programmi *Adobe Acrobat® Reader*, mis on tasuta levitatav mitmetes keeltes (hollandi, inglise, prantsuse, saksa ja itaalia keeles). Programmi saate kas EIBE või *Adobe*'i koduleheküljelt:

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

Nimetatud tarkvaraga saate EIBE mooduleid nii vaadata kui välja trükkida. Seejuures on dokumentide otsimine ja nendes orienteerumine suhteliselt lihtne.

Märkus: *Adobe* ja *Acrobat* on firma *Adobe Systems Incorporated* registreeritud kaubamärgid. *Macintosh* on firma *Apple Computer Incorporated* registreeritud kaubamärk.



Ohutusnõuded

EIBE moodulites on püütud välja tuua kõik teadaolevad ohud ja soovitatud vastavaid ettevaatusabinõusid.

Võimaluse korral on praktilistes töodes kasutatud kõige tavalisemaid meetodeid, mille puhul kehtivad üldised ohutusnõuded. Kõrgendatud ohtlikkusega katsete puhul on sellele alati tähelepanu juhitud. Käesoleva õppematerjali lisas 2 jagatakse ohutusalaseid täiendavaid juhiseid.

Vaatamata sellele peavad kasutajad olema valmis selleks, et esitatud ohutusnõuetes võivad esineda üksikud eksitused ja puudujäägid. Lisaks sellele on ka ohutusnõuded erinevates riikides mõnevõrra erinevad. Seetõttu peavad kõik praktiliste tööde korraldajad alati iseseisvalt hindama riske ja järgima kohalikke ohutusnõudeid ja kehtivaid seadusi, sõltumata EIBE materjalides esitatud soovitustest.

Juhul, kui ei ole eraldi märgitud, eeldatakse, et:

- praktilisi töid viiakse läbi vastavalt sisustatud laborites;
- töövahendeid kasutatakse vastavalt nende kasutuseeskirjadele;
- tavaliste praktiliste tööde läbiviimisel, näiteks kuumutamisel, järgitakse ettevaatusabinõusid;
- järgitakse nõudeid kemikaalide ja elusorganismide kasutamisel;
- kui on vähegi vajalik, kantakse kaitseprille;
- õpilased on omandanud üldised ohutusnõuded, näiteks kemikaalide ning mikroorganismidega töötamisel.

© Autoriõigused

EIBE õppematerjalid on autorikaitse all. Moodulite koostajatele laienevad kõik autoriõigused ("Designs, Patents and Copyright Act", UK 1988, lõige 77).

Õppe-eesmärkidel kasutamine. Õpiotstarbel on lubatud EIBE materjale kasutada ja paljundada kas elektrooniliselt või trükitud kujul. Seejuures peab materjalide levitamine olema tasuta või katma üksnes paljunduskulud. Kõigil juhtudel tuleb ära

märkida mooduli koostajad ja tunnistada nende autoriõigusi.

Teised kasutusvõimalused. Materjale võib levitada isikult isikule mittekommertslikel eesmärkidel. Keelatud on moodulite elektrooniline levitamine listide, huvigruppide, postiaadresside, tellimuste, veebi või teiste analoogsete masslevivahenditega, mis kahjustavad autorite huve.

Kommertslikel eesmärkidel ilma autorite eelneva nõusolekuta on moodulite kasutamine rangelt keelatud. Materjalide osaliseks või terviklikuks kasutamiseks ja nende mistahes kujul paljundamiseks palume kontakteeruda:

Ute Harms
 Institut für die Pädagogik der
 Naturwissenschaften an der Universität Kiel
 Olshausenstr. 62
 D-24098 KIEL
 Germany
 Telefon: + 49 431 880 3151
 Faks: + 49 431 880 3132
 E-mail: harms@ipn.uni-kiel.de

Mooduli koostajad

- **Catherine Adley**
The University of Limerick, Eire.
- **Jan Frings**
Hogeschool van Gelderland, The Netherlands.
- **Cecily Leonard**
The University of Limerick, Eire.
- **Eckhard R. Lucius (koordinaator)** IPN an der Universität Kiel, Germany.
- **Marleen van Strydonck**
The University of Antwerp, Belgium.
- **Paul E.O. Wymer**
The Wellcome Trust for Medical Science
London, The United Kingdom.

Kujundus, illustratsioonid, trükikiri, täiendavad tekstid ja toimetamine: Dean Madden, Caroline Shearer, NCBE, The University of Reading, The United Kingdom.

Illustratsioonide ja tüpograafia autoriõigused
© Dean Madden, 1997

Eestikeelne tõlge © Tago Sarapuu, 1999

Tänu

EIBE on eriti tänulik alljärgnevatele isikutele, kes aitasid kaasa käesolevate materjalide valmimisele. Liesbeth van de Grint (Hogeschool van Utrecht, Holland) ja John Schollar (National Centre for Biotechnology Education, The University of Reading, Suurbritannia) korraldasid rahvusvahelise seminari, kus katsetati selle mooduli materjale. Järgnevad õpetajad võtsid seminarist osa ja tegid esialgsesse materjali palju kasulikke märkusi: E. Vergauts, L. Daniels, L. Neels (Belgia), Dorte Hammelev (Taani), Lucienne Diemer, Gérald Coutouly (Prantsusmaa), Thomas Jeß, Dr. U. Schnack, Dr. E. Lipkow (Saksamaa), A. de Graaf, Guus Smid, J. Gradener (Holland), Rebecca Weston, Jane Gent, Derek Mackle, Sarah Whitethread, Maggie Parson (Suurbritannia).

Käesolevast moodulist



Käesolev moodul sisaldab valiku tööjuhendeid, mida võib õpetamisel kasutada kas üksikult või komplektina. Mitmete Euroopa riikide tegev-õpetajad ja haridusspetsialistid on andnud oma panuse nende materjalide koostamisse, mis on teoks saanud Euroopa Komisjoni DGXII toetusel EIBE (*Biotehnoloogiaalase Hariduse Euroopa Initsiatiivgrupp*) egiidi all.

Kõiki tööjuhendeid on Euroopa mitmete koolide õpetajate poolt ulatuslikult katsetatud.

Tööjuhendid hõlmavad järgmisi teemasid:

1. DNA molekuli ja erinevate mikroorganismide lihtsad mudelid. Need näitavad nimetatud biosüsteemide põhilisi omadusi ning võimaldavad õpilastel tajuda mikroorganismide suurust.
2. DNA eraldamise lihtsad, ohutud ja odavad meetodid. Sellega omandavad õpilased geneetilise materjaliga töötamise põhimõtted.
3. Rida katseid, mis näitavad:
 - a) mikroorganismide olemasolu keskkonnas ja kasulikke tüvesid;
 - b) mõningaid mikrobioloogilisiprodukte (ensüümid ja antibiootikumid).
 Kaks katset on kvalitatiivsed, üks uurib kvantitatiivselt ensüümide moodustumist.
4. Mitmed katsed mikroorganismide elutegevuse tagajärgedest - lihtsast leivataignast ja käärimisprotsessi uurimisest kuni pärmseente ainevahetuse aktiivsuse mõõtmiseni. Kõiki katseid on võimalik edasi arendada laiaulatuslikeks uurimistöodeks. Õpilaste motiveerimiseks on suurem rõhk asetatud biotehnoloogia rakenduslikule tasandile, mitte üksnes teoreetilisele küljele.
5. Kaks loodusliku geeniülekanne esitust, milles tutvustatakse geenitehnoloogia põhimõtteid.

Et kaks praktilist tööd sisaldavad antibiootikumide tootmist, toimet ja resistentsuse ülekannet, siis on vastavate teemade kohta esitatud ka lisainformatsioon.

Autorid on püüdnud pakkuda nii lihtsamaid kui keerukamaid ülesandeid lootes, et iga bioloogia-õpetaja leiab nende hulgast just endale sobiva. Kolm lisa sisaldavad põhilist informatsiooni koolilaborites rakendatavatest mikrobioloogia-alastest töövõtetest.

Lähitulevikus on võimalik saada täiendavaid lisamaterjale, mis käsitlevad mooduli seost Euroopa Liidu liikmesriikide erinevate õppekavadega, ohutusnõudeid ja töövahendite kättesaadavust.

Kõik kommentaarid, mis puudutavad käesolevat moodulit, on väga teretulnud. Eriti oodatakse aga õpetajate tähelepanekuid. Kõik märkused ja küsimused palume saata aadressil:

Dr. Eckhard R. Lucius
 Institut für die Pädagogik der
 Naturwissenschaften an der Universität
 Kiel
 Olshausenstr. 62
 D-24098 KIEL
 Germany
 Telefon: + 49 431 880 3137
 Faks: + 49 431 880 3132
 E-mail: lucius@ipn.uni-kiel.de

DNA mudeli valmistamine



Eesmärk

- Näidata DNA (desoksüribonukleiinhappe) ehituse peamisi omadusi.

Töö planeerimine

Mudeli valmistamiseks kulub umbes 30 minutit. Varuge rohkem aega, kui väljalõiked tuleb ka värvida.

Töövahendid ja materjalid

Igale õpilasele või töörühmale

- käärid;
- tugev paberiliim, kleeplint või väike klammerdaja (*kahepoolne kleeplint on sobiv, kuigi mõne aja möödudes võib see labti tulla*);
- niit (valmis mudeli ülesriputamiseks ja sildi kinnitamiseks).

Märkus: selleks, et mudel oleks tugevam, võib kahe desoksüriboosidest ja fosfaatrühmadest "selgroo" tagaküljed omavahel kokku kleepida.

Töökäik

- Lõigake välja desoksüriboosidest ja fosfaatrühmadest moodustunud "selgrood" A ja B.
- Lõigake välja paardunud lämmastikaluste ribad.
- Murdke ribad ottest tagasi, nagu näidatud kõrvaloleval joonisel.
- Liimige iga riba üks tagasimurtud ots "selgroo" A nummerdatud kastikesse. Ribade järjekord ei ole oluline.
- Liimige ribad teised otsad "selgroo" B vastavalt nummerdatud kastikesse.
- Kinnitage niidiga valminud DNA biheeliksi külge silt. Soovi korral võib mudelile kinnitada ka joonisel toodud sildi.

Tänu

Käesoleva mudeli koostamisel on aluseks võetud mudel, mille tegi Austraalia riikliku uurimisorganisatsiooni CSIRO teadusklubi "Double Helix". EIBE on tänulik CSIRO-le algupärase idee ja loa eest nende mudelit kasutada.

Esimene positsioon

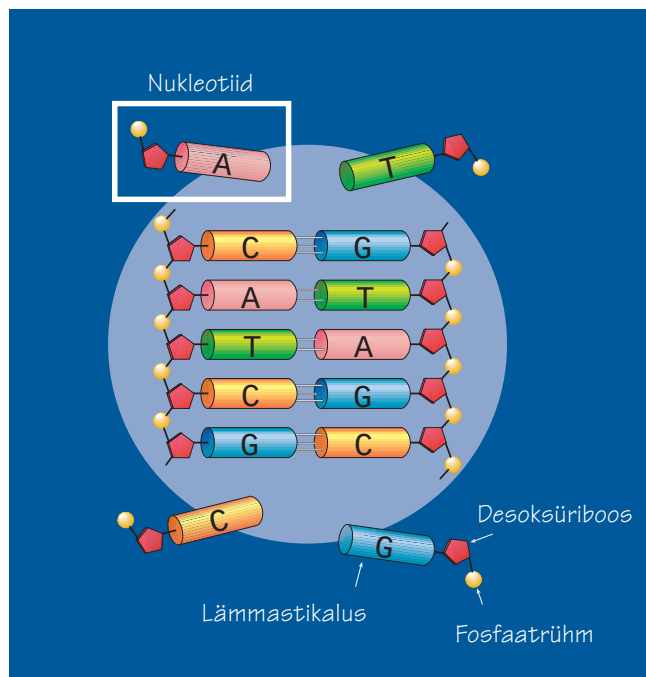
Teine positsioon

Kolmas positsioon

	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

Geneetiline kood

DNA molekuli kolm järjestikust nukleotiidi määravad ära ühe kahekümnest aminohapest, mis on esitatud tabeli keskosas kolmetäheliste lühenditena.



DNA struktuur

Desoksüribooside ja fosfaatrühmade omavahelisel ühinemisel on moodustunud DNA molekuli kaks "selgroogu". Nende vahel on neli erinevat lämmastikalust: tümiin (T); tsütosiin (C); adeniin (A) ja guaniin (G), mis on omavahel paarikaupa ühendatud vesiniksidemetega.

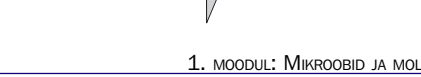
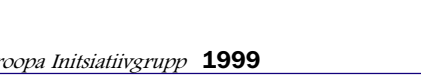
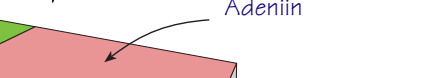


Selgroog A



Selgroog B

Paardunud lämmastikaluste ribad



**Biotehnoloogiaalase
Hariduse
Euroopa Initsiatiivgrupp**

DNA MUDEL



Tsütosiin

Guaniin

Tümiin

Adeniin

(P) Fosfaatrühm

(S) Desoksüriboos

Mikroorganismide mudelid



Mikroorganismide mõõtmete hindamisel esineb õpilastel tihti raskusi. Ka on mikrooskoobi kahemõõtmelise vaate alusel keeruline mõista nende organismide ruumilist ehitust.

Mudelite tegemine annab ettekujutuse nii mikroorganismide ehitusest kui suurusest.

Tulemused on paremad, kui õpilased peavad tegema oma mudelid, mitte järgima detailset valmistamise juhendit. Seetõttu on see ülesanne sobilik kodutööks (rohkem aega ja materjale).

Märkus: Neile, kes arvavad, et mudelite valmistamine on liiga lihtne tegevus, võiks öelda, et molekulaarbioloogias on mudelitel pikk ja väljapaistev ajalugu - kuigi tänapäeval tehakse neid peamiselt arvutitega.

Eesmärgid

- Näidata lambdafaagi ehituse olulisi jooni ja bakterite mitmekesisust.
- Aidata õpilastel mõista viiruste ja bakterite suhtelist suurust.

Töö planeerimine

Bakteriofaagi mudeli tegemiseks kulub aega umbes 30 minutit, kuid kui tuleb ka värvida, võtab töö rohkem aega. Sõltuvalt tegijast kulub aega kas tund või pisut rohkem.

Märkus: See töö sobib hästi kodutööks.

Töövahendid ja materjalid

Igale õpilasele või tööühmale

- õpikud, milles on kirjeldatud viiruste ja bakterite ehitust;
- materjalid mudeli valmistamiseks, nt. lüümikukile, paksem paber, pakkematerjalide jäägid, lauatenise pallid, helmed jne;
- käärid;
- liim, kleeplint või väike klammerdaja;
- värvid.

Töökäik

Viirused

Kasutage lambdafaagi mudeli tegemiseks näidist. Kopeerige päise kontuurid lüümikukilele ja lõigake see välja. Voltige päise mudel kokku ja kleepige kiiresti kuivava liimiga. DNA biheeliksi kujutamiseks kasutage paksu niiti või traati. Sabandi tegemiseks kasutage joogikõrt (realistlikuma mudeli saamiseks kasutage painduvat soonilist kõrt, mida saab pikemaks venitada).

Bakterid

Bakterite (kepikete ja kokkide) mudelite tegemiseks kasutage olemasolevaid materjale.

Iga mudeli juures:

1. määratlege põhilised struktuurid, mis on eksponeeritud, nt. rakumembraan, geneetiline materjal;
2. määrake organismi suurus, mida mudel kujutab;
3. mõelge, kuidas teistele lihtsalt seletada suhtelisi suursi, näiteks: kui bakterid oleksid selle mudeli suurusel, siis võrreldes nendega peaksime meie olema majasuursed.

Täiendavalt

Õpilastel võib lasta teha ka taime- või loomaraku mudeleid, mida saaks kasutada prokariootide ja eukariootide vaheliste erinevuste ja endosümbioosi (eukariootide arvatava evolutsioonilise pärinemise) teooria selgitamisel.

Lisakirjandus

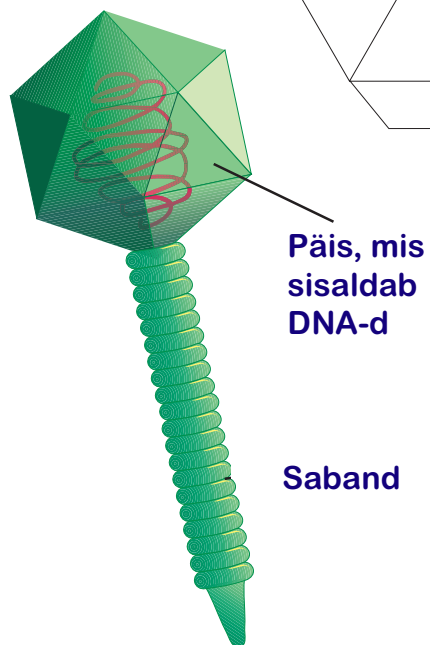
Mudelite valmistamist käsitletakse ka järgmises ajakirjas:

Nicholl, L. and Nicholl, D. (1987) Modelling the eukaryotic chromosome: a stepped approach. *Journal of Biological Education* 21 (2) 99 - 104.

Näidis lambdafaagi mudeli valmistamiseks

Kopeerige lambdafaagi päise kontuurid lüümikukilele.

Lõigake see piirjooni mööda välja, voltige kokku ja liimige servadest kiiresti kuivava liimiga.



DNA ahelate kujutamiseks kasutage jämedat niiti või traati.

Sabandi tegemiseks kasutage joogikõrt (realistlikuma mudeli saamiseks kasutage painduvat soonilist kõrt, mida saab pikemaks venitada).

Bakteriaalse DNA eraldamine



Käesolevas töös kasutatakse bakterite rakukestade lõhkumiseks lüsoosüümi (ensüümi) ja rakumembraanide purustamiseks ning nukleiinhapete (DNA ja RNA) vabastamiseks kodus tarvitavat pesuvahendit.

Eesmärk

- Eraldada *Escherichia coli* bakteritüvest K-12 nukleinhapped.

Ettevalmistused

Vähemalt 4 päeva varem tuleb bakterikultuurid söötmele kasvama panna (vaid küllaldaselt kasvanud kultuurid annavad piisava koguse nukleinhapet).

Töö planeerimine

Kogu katse jaoks tuleb arvestada umbes 50 minutit. See sisaldab ka 30 minutit ooteaega, mille jooksul baktereid töödeldakse ensüümiga.

Töövahendid ja materjalid

Igale õpilasele või tööühmale

- *Escherichia coli* K-12 täiskasvanud kultuur;
- lüsoosüümi pulber - vajatakse väikseimat kogust, mida on võimalik spaatli otsaga võtta;
- 6 ml külma etanooli (tööstuslik metüülalkohol on ka sobiv);
- 0,5 ml kodus kasutatavat vedelat pesuvahendit, nt. *Pril* (Henkel), *Woolite* (Reckitt & Colman);
- külviaas;
- 3 ml destilleeritud vett;
- 2 katseklaasi;
- pipett või 1 ml plastmassist süstal lüsoosüümi lahuse lisamiseks;
- veevann 60 °C;
- termostaat või veenõu 37 °C veega.

Töökäik

1. Vähemalt neli päeva varem pange *Escherichia coli* K-12 bakterikultuur kasvama.
2. Lisage 5 ml bakterisegule väike kogus lüsoosüümi ja segage hästi.
3. Hoidke segu 30 min. temperatuuril 37 °C.
4. Lisage bakterisegule 0,5 ml kodus kasutatavat pesuvahendit.
5. Hoidke segu 2 min. veevannis temperatuuril 60 °C.
6. Jahutage segu mõne minuti jooksul külmas vees.
7. Valage külm etanool väga aeglaselt ja ettevaatlikult segu pinnale.
8. Nukleinhapped (DNA ja RNA) sadestuvad ülemisse (etanooli) kihti.

Täiendavalt

DNA-d võib värvida, nt. metüleensinise või atsetoortseiini lahusega.

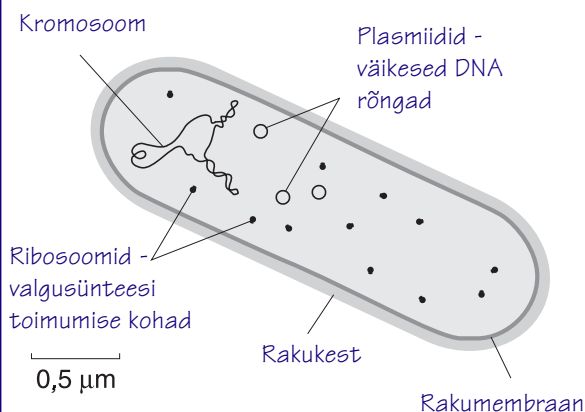
Ohutusnõuded

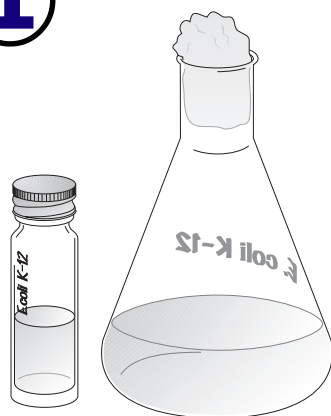
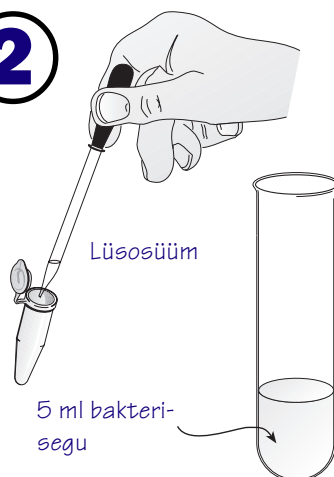
Bakterikultuuridega töötamisel tuleb järgida ohutusnõudeid. Kuuma vee kasutamisel (punkt 5) tuleb olla ettevaatlik.

Tänu

Käesolev töö põhineb katsel, mis viidi läbi Hertel *et al.* ja Sübmuth *et al.* (1987) poolt, kes eraldasid DNA *Bacillus subtilis* est. Täname prof. Joseph Lengelerit (Osnabrückist), kes soovitas selles katses kasutada pesuvahendit.

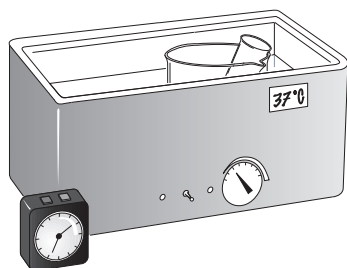
Joonisel on kujutatud bakterirakk, DNA ja rakustruktuurid (rakukest ja rakumembraan), millesse toimivad lüsoosüüm ja pesuvahend.



1**2**

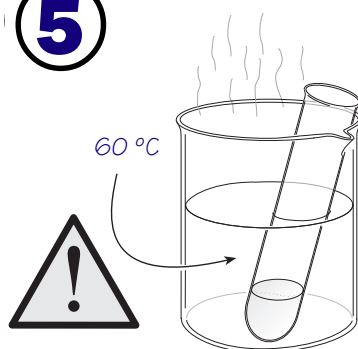
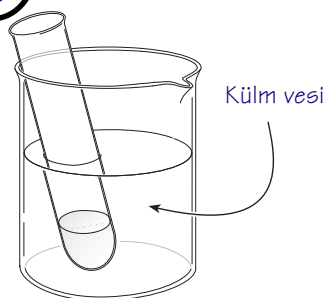
1. Vähemalt neli päeva varem pange söötmesse kasvama *Escherichia coli* K-12 kultuur.

2. Lisage 5 ml bakterisegule väike kogus lüsoosüümi ja segage hästi.

3**4**

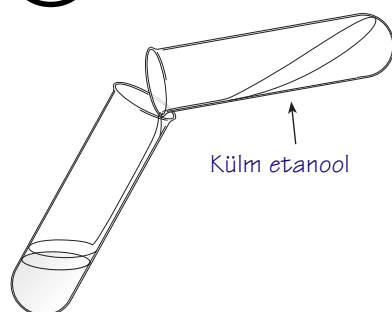
3. Hoidke segu 30 min. temperatuuril 37 °C.

4. Lisage bakterisegule 0,5 ml kodus kasutatavat vedelat pesuvahendit.

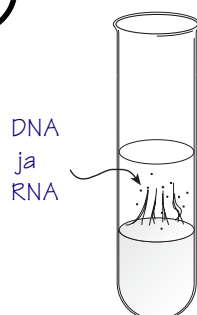
5**6**

5. Hoidke segu 2 min. 60 °C veevannis.

6. Jahutage segu mõni minut külmas vees.

7

7. Valage külm etanool väga aeglaselt ja ettevaatlikult segu pinnale.

8

8. Nukleiinhapped (valged niidikesed) sadestuvad ülemisse (etanooli) kihti.

DNA eraldamine sibulast



Selles katses eraldatakse DNA ja RNA taimerakkudest. Kõigepealt purustatakse kude mehhaaniliselt. Koduses majapidamises kasutatava nõudepesuvahendiga lõhutakse nii rakumembraan kui ka tuumamembraanid. Raku jäänused eraldatakse filtreerimisega. Lahusesse jäävad nukleiinhapped ja lahustunud valgud. Valkude lagundamiseks kasutatakse ensüümi, seejärel sadestatakse nukleiinhapped jääkülma etanooliga.

Eesmärk

- Eraldada nukleiinhapped sibula kudedest. Märkus: Katses esitatud meetodil eraldatud nukleiinhape ei ole väga puhas. Töö peamiseks eesmärgiks on kudedest DNA eraldamise põhivõtete tutvustamine.

Ettevalmistused

Etanool peab olema jääkülma. Selleks asetage etanool plastmassist pudeliga külmkappi vähemalt 24 tundi enne katset.

Töö planeerimine

Katse kestab umbes 35 minutit, sealhulgas veevannis hoidmine 15 minutit.

Töövahendid ja materjalid

Igale õpilasele või töörühmale

- köögikombain või mikser;
- terav juurviljanuga ja lõikelaud;
- suur plastmassist lehter;
- veevann 60 °C;
- kann jääga;
- kaks 250 ml nõud;
- kohvifilter (mitte kasutada laboratoorset filterpaberit);
- keskmise suurusega sibul;
- 10 ml nõudepesuvahendit (mitte kasutada kontsentreeritud vahendit);
- 3 g keedusoola;
- 100 ml destilleeritud vett;
- 10ml plastpipett vedelike mõõtmiseks;
- katseklaas;
- klaasist segamispulk;
- 2-3 tilka proteaasi, nt. *Neutrase* (Novo Nordisk);
- umbes 6 ml jääkülma etanooli (tööstuslik metüülalkohol on ka sobiv).

Töökäik

1. Lisage keedusool nõudepesuvahendile. Kallake juurde niipalju destilleeritud vett, et kokku oleks lahust 100 ml.
2. Peenestage sibul, kuid mitte väiksemateks kui 10 X 10 mm tükkideks.
3. Valage peenestatud sibula tükkidele soola ja pesuvahendi segu.
4. Asetage nõu 60 °C veevanni täpselt 15 minutiks.
5. Jahutage segu 5 minutit jääveevannis, segage pidevalt.
6. Kallake segu mikserisse ja käivitage see mitte kauemaks kui 5 sekundiks.
7. Filtreerige segu teise nõusse. Jälgige, et vaht ei ummistaks filtrit.
8. Lisage 2-3 tilka proteaasi katseklaasi, milles on umbes 6 ml saadud segu. Loksutage seda veidi aega.
9. Valage jääkülma etanool ettevaatlikult mööda katseklaasi seina nii, et see moodustaks pealmise kihi sibula ekstrakti peal. Jätke katseklaas mõneks ajaks seisma.
10. Nukleiinhapped sadestuvad ülemisse (etanooli) kihti.

Täiendavalt

1. DNA-d võib värvida, nt. metüleensinise või atsetoortseiini lahusega.
2. DNA-d saab eraldada ka mõnest loomsest koest (nt. tursamarjast, maksast, vasika harknäärmest). Mikseri asemel lõhutakse kude uhmrus uhmrinuiaga (koos kvartsi-liivaga). Nii jäävad DNA ahelad terveks.

Ohutusnõuded

Erilisi ohtusid selle katsega ei kaasne, kuid sibula peenestamisel ja mikseri kasutamisel tuleb olla ettevaatlik.

Tänu

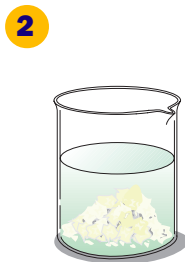
See meetod on adapteeritud Alison Rasmusseni ja Robert Mathesoni raamatust "A Source-book of Biotechnology Activities" (1990), National Association of Biology Teachers / North Carolina Biotechnology Center. ISBN: 0941212092.

Raamatu saate tellida aadressil: NABT, 11250 Roger Bacon Drive # 19, Reston, Virginia 22090, USA.



1
10 ml nõudepesuvahendit
3 g keedusoola
100 ml vett
1 keskmise suurusega sibul

Lisage sool pesuvahendile ning seejärel lisage niipalju vett, et segu ruumala oleks 100 ml. Segage hoolikalt, et sool lahustuks.



2
Lisage peenestatud sibul soola ja pesuvahendi segule.

Nõudepesuvahend lõhub rakumembraani ja tuumamembraanid vabastades DNA.



3
Kuumutage segu 60 °C veevannis 15 minutit.

Kõrge temperatuur kiirendab protsessi ...

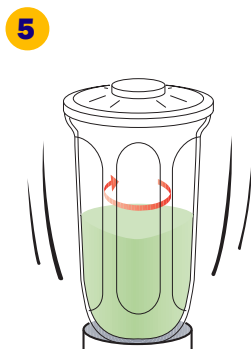
... ja denatureerib DNAasid, mis lõhustavad DNA-d.



4
Jahutage segu jäänõus mõne minuti jooksul.

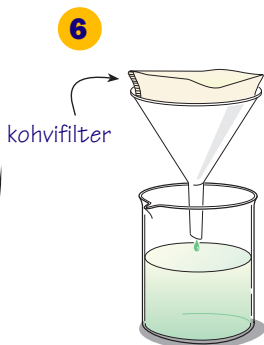
... aga selle toime võib laguneda ka DNA ahel ...

seega on jahutamine jäävannis vajalik.



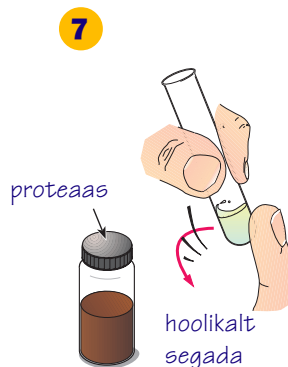
5
Käivitage mikser mitte kauemaks kui 5 sek.

Mikser aitab lõhkuda sibula rakud, kuid liiga tugev segamine tükeldab ka DNA.



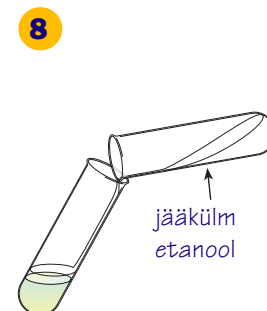
6
Filtreerige segu.

Filtreerimisega saame DNA ja valkude lahuse.



7
Lisage 2-3 tilka proteaasi umbes 10 ml sibula ekstraktile ja segage hoolikalt.

Proteaas lagundab lahuses olevad valgud.



8
Lisage seguga võrdne kogus jääkülma etanooli, valades see ettevaatlikult sibula ekstrakti pinnale.

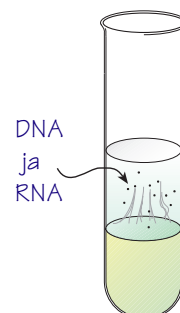
Etanool peab olema JÄÄKÜLM - hoitud eelnevalt 24 tundi külmkapis.

DNA eraldamine sibulast

9

DNA sadestub ülemisse (etanooli) kihti.

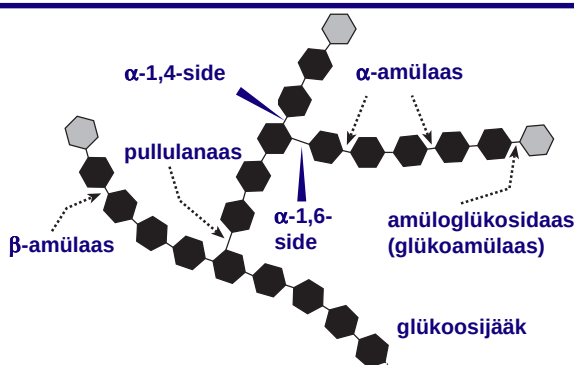
DNA ei lahustu etanoolis, seetõttu muutub selle sade ülemises kihis nähtavaks.



Amülaasi tootmine mulla bakterite poolt

★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★

Tärgliseahel koosneb glükoosijääkidest, mis on ühendatud nii, et moodustub kas lineaarne (amüloos) või hargnenud polümeer (amülopektiin). Neid polümeere lagundavad ensüümid amülaasid, mida toodavad mitmed organismid, kaasaarvatud bakterid ja seened. On avastatud, et paljud mikroorganismid on sobilikud nende ensüümide tootmiseks. Käesolevas katses vaadeldakse amülaaside saamist mulla bakterite abil.



Ensüümi mõju amülopektiinile

Glükoosijäägid amüloosis ja amülopektiinis on omavahel ühendatud α -1,4-sidemetega. Amülopektiinis on harud peahela külge ühendatud α -1,6-sidemetega.

Tööstuslikult toodetakse järgmisi amülaase:

α -amülaas hüdrolüüsib α -1,4-sidemeid glükoosi polümeeris (ainult ahela sees), moodustades lühemad ahelad - dekstriinid. Tööstuslikult toodetakse bakteritest, nt. *Bacillus* spp.

β -amülaas hüdrolüüsib α -1,4-sidemeid glükoosi ahelas, võttes korraga ühe maltoosijäägi ahela otsast. Ensüüm ei suuda lõhkuda α -1,6-sidemeid. Tööstuslikult toodetakse odrast ja linnast.

Amüloglükosidaas hüdrolüüsib α -1,4-sidemeid, võttes glükoosijääke ahela otsast. See ensüüm hüdrolüüsib ka α -1,6-sidemeid, kuigi aeglaselt. Tööstuslikult toodetakse seentest *Aspergillus* spp. ja *Rhizopus oryzae*.

Pullulanaas hüdrolüüsib α -1,6-sidemeid. Tööstuslikult toodetakse bakteritest *Bacillus acidopullulyticus* ja *Klebsiella pneumoniae*.

Eesmärk

- Jälgida looduslikke mulla baktereid, kes toodavad amülaasi.

Vajalikud eelteadmised

Õpilased peavad valdama mikrobioloogiaalaseid üldisi töövõtteid, kaasaarvatud neid, mis tagavad steriilsuse. Kasuks tulevad ka teadmised tärglise ja joodi reaktsioonist.

Ettevalmistused

Joodilahus peab olema valmistatud vähemalt päev varem, sest joodikristallide täielik lahustumine võtab aega.

Tärgliseagar ja steriilse veega pudelid peavad olema valmis vahetult enne katse algust. Mulla-proovid tuleks enne kasutamist õhu käes kuivatada.

Steriilsed vatitampoonid. Poest ostetud vatitampoonide plastmassist vars ei kannata autoklaavimist ja mõnda tüüpi vatitupse võib olla antiseptiliselt töödeldud. Seetõttu tehke ise vatitampoonid ja autoklaavige need kas McCartney pudelis või alumiiniumfooliumis 15 minutit temperatuuril 121 °C.

Töö planeerimine

Petri tasside ettevalmistamine: 45 min.

Tulemuste vaatlemine 2-3 päeva hiljem: 15 min.

Töövahendid ja materjalid

Igale õpilasele või töörühmale

(Eeldatakse tavalise laboritehnika olemasolu)

- steriilne Petri tass 15-20 ml steriilse agar-söötmega; valmistatud tööstuslikust söötmeagarist 0,2% lahustuva tärglise lisamisega;
- 1 g kuiva mulda, mis on võetud 10 cm sügavuselt;
- joodilahus, mis on saadud 1g joodikristallide ja 2 g kaaliumjodiidi lahustamisel 300 ml destilleeritud vees;
- 15 ml steriilset destilleeritud vett McCartney pudelis;
- steriilsed omatehtud vatitampoonid;
- viltpliiats Petri tasside märgistamiseks.

Töökäik

1. Pange 1 g kuiva mulda 15 ml destilleeritud vette ja segage hoolikalt mulla peenestamiseks.
2. Kasutades steriilset vatitampooni katke tärkliseagari pind mulla seguga.
3. Kirjutage Petri tassile oma initsiaalid, kuupäev ja külvatud materjali päritolu.
4. Hoidke külvatud tassi ümberpööratuna 2-3 päeva 30 °C juures.
5. Kallake joodilahust ettevaatlikult inkubeeritud tassile kattes selle umbes 1 mm kihiga. Kohad, kus on ikka veel tärklis, värvuvad sinkjas-mustaks (joodi molekulid sisenevad glükoosijääkidest koosneva tärklise helikaalse ahela keskosse). Helepruunid alad (joodilahuse värv) märgivad koloonia ääri,

juhul kui mikroorganismid on lagundanud tärklise.

Ohutusnõuded

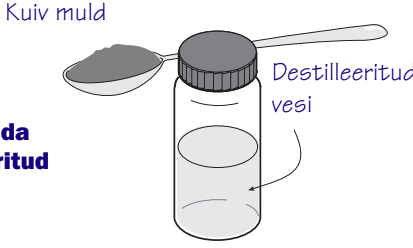
NB! Mõnes riigis on keelatud avada tase, milles on kasvatatud tundmatuid mikroorganisme. Vajadusel võib kasutada mulla asemel *Bacillus subtilis*e kultuuri. Katset läbi viies ja kultuuride hävitamisel tuleb järgida mikrobioloogiaalaseid üldisi ohutusreegleid. Külvatud tassidelt ei soovitata tundmatuid mikroorganisme edasi külvata. Jood on toksiline ja seetõttu tuleb olla ettevaatlik.

1



Valmistage ette Petri tass tärkliseagariga.

2



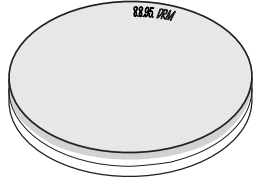
Segage 1 g mulda 15 ml destilleeritud vees.

3



Külvake steriilse vatitampooniga mulla segu söötmele.

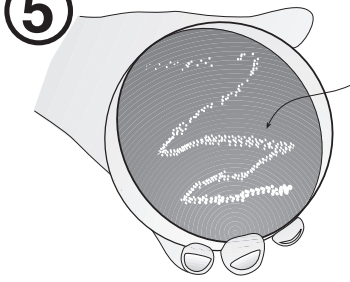
4



Hoidke tassi 2-3 päeva 30 °C juures.

Hoidke tassi ümberpööratuna

5



Hele ala märgib tärklise puudumist

Kasutage joodilahust, et näha, kus on tärklis lagunenud.

Tsellulaasi tootmine



Tselluloosirikaste jäätmete kasutamisel fermentatsiooni protsessi lähteainena on suur tähtsus. Sellega muudetakse kasutatud lähteained mitmeteks väärtuslikeks produktideks. Enamik tsellulaasidest (ensüümid) saadakse tööstuslikult seene *Trichoderma reesei* fermentatsioonil. Käesolevas töös kasutatakse bakterit *Cellulomonas*. See kasvab Petri tassil kiiremini ja moodustuvat tsellulaasi on kergem mõõta.

Eesmärk

- Korraldada katse bakteri *Cellulomonas*'e tsellulaasi koguse hindamiseks.

Ettevalmistused

Ette valmistada *Cellulomonas*'e kultuurid toitelahuses (nt. McCartney pudelis) klassis kasutamiseks. Seda tuleks teha 2-3 päeva enne planeeritud katset. Kultuure peaks hoidma 25-30 °C juures.

Karboksümetüülselluloosi sööde koosneb 0,5 g karboksümetüülselluloosist (tselluloosi lahustuv vorm); 0,1 g NaNO₃; 0,1 g K₂HPO₄; 0,1 g KCl; 0,05 g MgSO₄; 0,05 g pärmi ekstraktist ja 0,1 g glükoosist 100 ml vees. Sööde muudetakse tahkeks agari lisamisega 1,7%-ni.

Töö planeerimine

Petri tasside ettevalmistamine ja bakterikultuuri külvamine 45 min.

Tulemuste vaatlemine 2-3 päeva hiljem 15 min.

Töövahendid ja materjalid

Igale õpilasele või tööühmale
(Eeldatakse tavalise laboritehnika olemasolu)

- *Cellulomonas* sp. kaldkultuur;
- steriilne Petri tass, mis sisaldab 15 ml karboksümetüülselluloosi (vt. "Ettevalmistused");
- steriilne vesi (McCartney pudelis);
- 2 steriilset 1 ml pipetti või filtriga pipetti ja 2 steriilset otsikut;
- jäätmenõu, mis sisaldab 5% *Chlorate I* lahust, nt. *Domestos* (Lever);
- Kongo punase vesilahus (1 mg/ml);
- 1M naatriumkloriidi lahus;
- etanool (korgipuuri steriliseerimiseks);

- 5 mm läbimõõduga korgipuur;
- termostaat 25-30 °C;
- viltpliiats Petri tasside märgistamiseks.

Töökäik

1. Kastke 5 mm läbimõõduga korgipuur korraks alkoholi ja viige seejärel mõneks sekundiks leegi kohale. *NB! Hoidke korgipuuri horisontaalselt, et leegid ei leviks mööda vart ülespoole ega põletaks kätt.*
2. Kergitage tassi kaant ühest servast pisut ja lõigake agarist auk välja.
3. Kahe augu saamiseks korrake 1. ja 2. punktis esitatut.
4. Märgistage mõlemad augud, nt. tähtedega C (*Cellulomonas*) ja V (steriilne vesi, kontrollauk).
5. Viige ühte auku bakterikultuuri ja teise steriilset vett, kasutades mõlemal juhul steriilset pipetti. Kasutatud pipetid pange desinfitseerivasse lahusesse.
6. Hoidke tasse kuni nädal aega temperatuuril 25-30 °C. Kui tasse on 30 °C juures hoitud 48 tundi tekivad bakteri *Cellulomonas*'e elutegevuse tagajärjel kuni 16 mm läbimõõduga värvusetud alad.

Pärast inkubeerimist ...

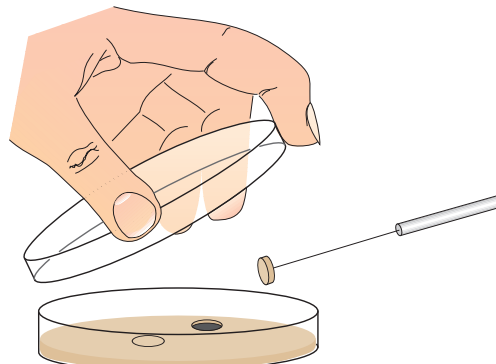
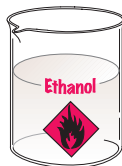
7. Värvige söötme pind tassil Kongo punase lahusega 15 min., seejärel värvitustage see soolalahusega 10-15 min. Värvuseta piirkondades on karboksümetüülselluloos lagundatud β-1,4-glükaanideks. Viimase koostises on kuni seitse glükoosijääki. Värvuseta alade diameetrite mõõtmisega saab võrrelda tselluloosi lagundamise aktiivsusi.

Täiendavalt

1. Tassil olevatesse aukudesse võib pipeteerida mulla segu, et jälgida tsellulaasi moodustumist mulla bakterite poolt.
2. Sama võtet võib katsetada tööstusliku tsellulaasi valmistamiseks.
3. Tselluloosi lagundamist võib jälgida mitmel päeval kasutades selleks rohkem tasse.

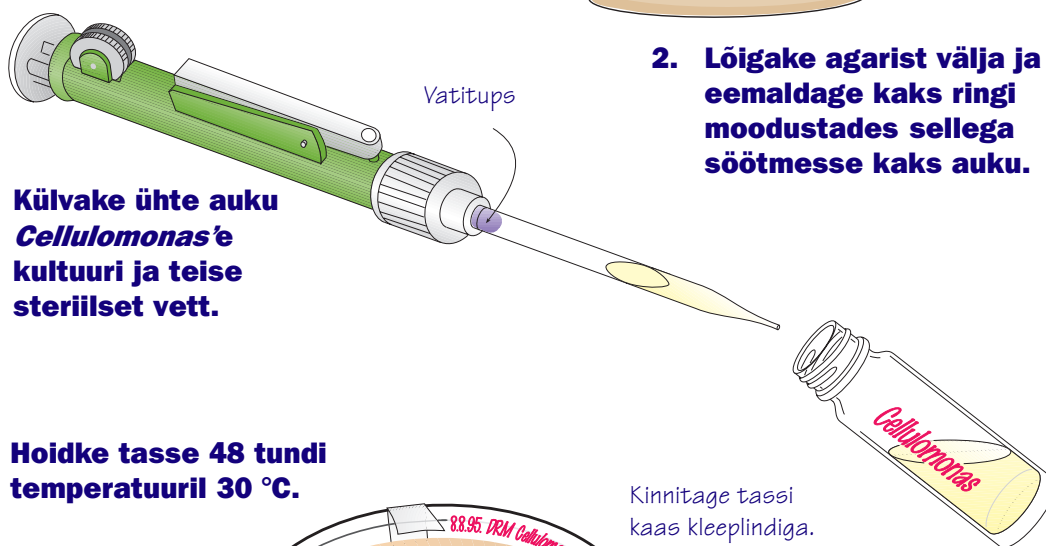
- 1. Steriliseerige korgipuur kuumutades seda koos etanooliga tuleleegis.**

NB! Etanool on kergesti süttiv!



- 2. Lõigake agarist välja ja eemaldage kaks ringi moodustades sellega söötmesse kaks auku.**

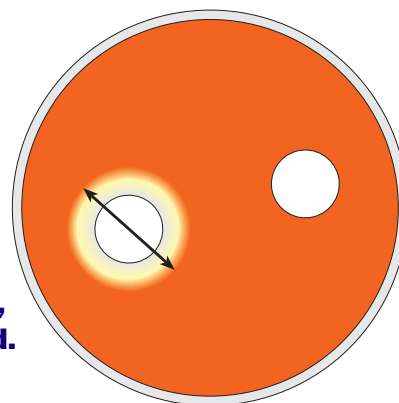
- 3. Külvake ühte auku *Cellulomonas*'e kultuuri ja teise steriilset vett.**



- 4. Hoidke tassi 48 tundi temperatuuril 30 °C.**

- 5. Värvige tass.**

Mõõtku selle ala diameeter, kus tselluloos on lagunenu.



Ohutusnõuded

Katse tegemisel tuleb järgida mikrobioloogiaalaseid üldisi ohutusreegleid ja steriilsuse nõudeid.

NB! Kui kasutatakse mullaproove (vt. "Täiendavalt", 1.), võivad kohalikud seadused keelata külvatud tasside hilisema avamise.

Antibiootikumi tootmine



Paljud mikroorganismid toodavad antibiootikume - aineid, mis pärsvivad bakterite kasvu. Alates penitsilliini avastamisest 1940-ndatel aastatel (seenest *Penicillium*) on need ained väga efektiivselt aidanud võidelda haiguste vastu. Tänapäeval toodetakse kõige tähtsamad antibiootikumid bakterist *Streptomyces*.

Eesmärk

- Vaadelda antibiootikumi streptomütsiini tekkimist *Streptomyces griseus*'est ja selle mõju mitmetele mikroorganismidele.

Vajalikud eelteadmised

Antibiootikumide päritolu ja mõju; resistentsuse tekkimine ja levik (vt. järgnevaid märkusi).

Ettevalmistused

Vajatakse aktiivseid *Streptomyces griseus*'e kultuure. Neid tuleb 2-3 päeva kasvatada 15-20 ml agarsöötme tassil. Eelnevalt peab olema ette valmistatud kultuur, mis neile tassidele külvatatakse. Selleks viige kalkkultuurilt külviaasatais *Streptomyces*'t 1 ml steriilsesse söötmesse.

Pildil: kolmepäevane *Streptomyces griseus*'e kultuur (vasakul). Kontrollorganismid on (ülevallt): *Candida utilis*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus mycoides* ja *Escherichia coli*.



Seejärel pipeteerige see katseklaasi, milles on 5 ml steriilset söödet. Hoidke külvil 24 tundi temperatuuril 30 °C.

Külvake Petri tassidele ööpäeva seisnud *Streptomyces griseus*'e kultuur tõmmates üheainsa vertikaalse joone vasakule servale, nii et parem pool jääb steriilseks.

Hoidke tasse 3-4 päeva temperatuuril 30 °C.

Lisaks sellele valmistage ette kontrollorganismide külvilid (nt. *Bacillus mycoides*, *Candida utilis*, *Escherichia coli* K-12, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas fluorescens*).

Töö planeerimine

Petri tasside ja külvatava materjali ettevalmistamine: 60 min. +

esialgse *Streptomyces*'e kultuuri kasvatamine:

24 tundi ning seejärel veel 72-96 tundi.

Tassidele külvamine: 20 min.

Kasvatamine: 24-72 tundi.

Töövahendid ja materjalid

Igale õpilasele või tööühmale

(Eeldatakse tavalise laboritehnika olemasolu).

- termostaat 30 °C;
- külviaas;
- steriilne Petri tass, millel on 15-20 ml agarsöödet. Sellele on tõmmatud triip bakteriga *Streptomyces griseus* ning lastud kasvada 48-72 tundi (vt. "Ettevalmistused");
- kontrollorganismidena valik järgmistest bakteritest kalkkultuuridena:
 - *Candida utilis* (pärm), DSM 02361
 - *Micrococcus luteus* (bakter), DSM 20030
 - *Pseudomonas fluorescens* (bakter), DSM 50090
 - *Bacillus mycoides* (bakter), DSM 2048
 - *Escherichia coli* K-12 (bakter), DSM 498.

NB! Järgige kohalikke seadusi mikroorganismide kasutamise kohta koolis. Sellele võib olla mõnes riigis piiranguid.

Töökäik

1. Igale ettevalmistatud tassile *Streptomyces*'e kultuuriga külvake kontrollorganismid järgnevalt:
 - a) Steriliseerige külviaas tõmmates seda läbi Bunseni põleti leegi ja laske aasal pisut jahtuda.
 - b) Kastke aas kontrollorganismi kultuuri ning tõmmake sellega üks horisontaalne triip tassi paremale poolele *Streptomyces*'e vertikaalse joone kõrvale. Jälgige, et võrreldes *Streptomyces*'e külviga oleksid jooned tõmmatud täisnurga all ning algaksid selle lähedalt.
 - NB! Külviaas ei tohi *Streptomyces*'e kultuuri puudutada!**
 - c) Steriliseerige külviaas tuleleegis ja korrake punkte a-c kõigi kontrollorganismidega.
2. Hoidke tasse 2 päeva temperatuuril 30 °C.
 3. Vaadeldge tasse.

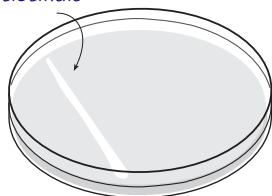
Ohutusnõuded

Katse tuleb läbi viia laboris järgides mikrobioloogiaalaseid üldisi ohutusreegleid. Katse käigus saadud antibiootikumi kogus ei ole ohtlik.

Märkus

Streptomyces griseus toodab antibiootikumi streptomütsiini, mis difundeerub ümbritsevasse söötmesse. Streptomütsiin ja teised sama rea antibiootikumid pärssivad valgusünteesi, inaktiveerides bakteri ribosoomide väiksema (30S) alamüksuse. Mõned organismid on sellele antibiootikumile tundlikud (*Bacillus mycoides*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*), teised mitte (*Pseudomonas fluorescens*). Streptomütsiin ei mõjuta pärmseeni (*Candida utilis*), kuna nad on eukarüoodid, kelle ribosoomid on teistsugused.

① Üks tõmme vasakule

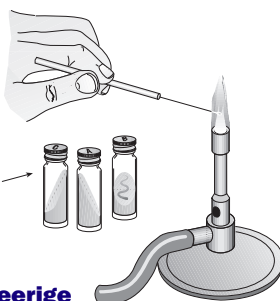


Valmistage ette Petri tass *Streptomyces griseus*'e külviga 3-4 päeva enne katse tegemist.

②

Kontroll-kultuurid

Steriliseerige traadist külviaas.



③

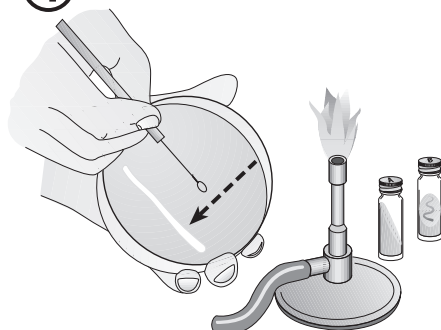
Ärge puudutage *Streptomyces*'t

Tõmmake kontroll-organismiga joon kuni *Streptomyces*'e jooneni.



④

Korrake seda teiste kontrollorganismidega ja ärge unustage iga kord külviaasa steriliseerimast.

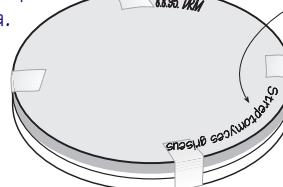


⑤

Kinnitage tassi kaas kleeplindiga.

Kirjutage tassi põhjale

Hoidke tassi ümberpööratuna 2-3 päeva temperatuuril 30 °C.



Leivataigna valmistamine



Biotehnoloogia rakendamise üheks vanimaks näiteks on leivategemine, mida tõendavad leiud Vana-Egiptusest (4000 eKr). Suurbritannias tehakse leiba traditsiooniliselt nisujahust, veest ja soolast, vahel lisatakse ka rasvainet. Taigna massisse “püütakse lõksu” pärmseened. Amülaasid hakkavad niisutatud jahus muutma tärklisi glükoosiks, millest toituvad seotud pärmi-rakud.

Lisaks vajab pärm lämmastikuallikat. Jahu valgu (gluteeni) osalisel hüdrolyüsil tekivad peptiidid ja aminohapped. Pärmil elutegevuse tulemusena anaeroobses keskkonnas tekivad süsinikdioksiid ja alkohol.

Tänu gluteenile on taigen elastne ning süsinikdioksiid ei pääse välja, vaid suurendab õhumulle taignas, mistõttu see kerkib.

Eesmärk

- Katsete abil uuritakse retsepti erinevate komponentide mõju jahu valkudele ja ensüümidele.

Töö planeerimine

Sõltuvalt tingimustest (temperatuurist jm.) kulub aega umbes 50 minutit.

Töövahendid ja materjalid

1 leiva kohta

- 1 g kuivatatud pärmi;
- 75 g kõrgema sordi jahu;
- 50 ml vett;
- lisaained vastavalt soovile, nt. askorbiinhape, α -amülaas, kaaliumbromaat (vt “Täiendavalt”);
- nõu taigna segamiseks;
- jämedad klaaspulgad segamiseks;
- kaks 100 ml mõõtsilindrit;
- kell.

Töökäik

1. Lahustage kuivatatud pärm vees. Lisage jahu ja segage hästi.
2. Veeretage taignast vorstikujuline rull ja asetage see ühte mõõtsilindrisse.
3. Märkige üles taigna kõrgus silindris iga kümne minuti järel. Tehke vaatlusi tunni aja jooksul.

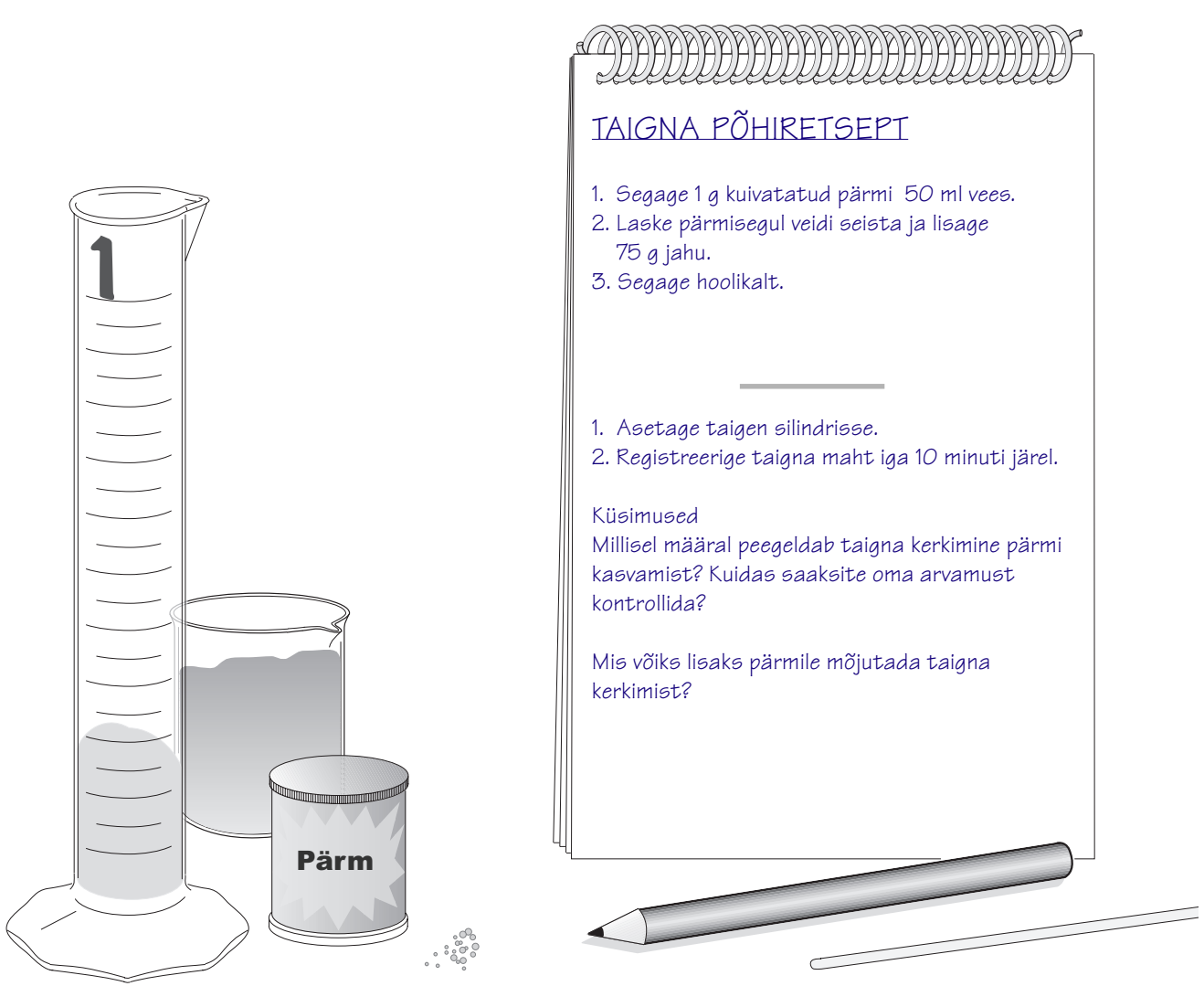
Täiendavalt

1. Kuidas mõjutavad taigna kerkimist erinevad pärmseened (nt. tavaline kuivatatud pärm võrreldes värske pärmiga)?
2. Kuidas mõjutavad taigna kerkimist erinevad jahusordid (nt. kõrgema sordi jahu, milles on võrreldes esimese ja teise sordi jahuga palju gluteeni, kuid väga vähe α -amülaasi)?
3. Missugune on taignaparandaja askorbiinhappe (vitamiin C) mõju taigna kerkimisele? Askorbiinhape reageerib ensüümidega taignas piirates S-S-sidemete moodustumist gluteeni aminohappejääkide vahel. (Lisage retseptile 1 g askorbiinhapet.)
4. Kuidas mõjutab taigna kerkimist α -amülaasi lisamine? Kuidas neid erinevusi seletada?
5. Taignaparandaja kaaliumbromaat soodustab S-S-sidemete tekkimist gluteenis kõrvuti olevate aminohappejääkide vahel, mille tulemusel saadakse elastsem ning paremini kerkinud taigen. Muidugi nõrgendab liigne paisumine taignat. Võrrelge taignaid, mis on valmistatud selle lisandiga ja ilma.
6. Sool pidurdab proteaaside tegevust ja ei lase gluteenil muutuda kleepuvaks massiks, mis ei suuda siduda süsinikdioksiidi. Liigne sool moodustab tugevaid ioonilisi sidemeid valgumolekulide kõrvalahelatega, vähendades nende elastsust. Tulemusena saame kõva leiva. Ülemäärane sool takistab ka pärmseente kasvu. Proovige leida taigna optimaalne soolasisaldus.

Lisakirjandus

On food and cooking. The science and lore of the kitchen by Harold McGee (1991) Harper Collins Publishers. ISBN: 0 00412657 2.

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



TAIGNA PÕHIRETSEPT

1. Segage 1 g kuivatatud pärm 50 ml vees.
2. Laske pärmisegul veidi seista ja lisage 75 g jahu.
3. Segage hoolikalt.

1. Asetage taigen silindrisse.
2. Registreerige taigna maht iga 10 minuti järel.

Küsimused

Millisel määral peegeldab taigna kerkimine pärm kasvamist? Kuidas saaksite oma arvamust kontrollida?

Mis võiks lisaks pärmile mõjutada taigna kerkimist?

Seotud pärmirakud



Harilik nn. pagaripärm *Saccharomyces cerevisiae* ei ole võimeline kasutama laktoosi. Ensüüm β -galaktosidaas lagundab laktoosi glükoosiks ja galaktoosiks. Kui pärmseened on seotud koos selle ensüümiga, siis on nad võimelised kasutama laktoosi sisaldavas keskkonnas. Pärmseened kasutavad moodustunud kahest suhkrust (glükoosist ja galaktoosist) esmalt glükoosi. Kui glükoosivarud on ammendatud, kohandub pärmi ainevahetus laktoosi teise lagunemisprodukti - galaktoosi - kasutamiseks. Pärmi elutegevus on kergesti jälgitav. Selleks mõõdetakse eralduva gaasi (süsinikdioksiidi) mahtu, mis tekib käärimisprotsessis.

Eesmärk

- Urida kvantitatiivselt käärimisprotsessi.

Ettevalmistused

Naatriumalginaat on vees vähelahustuv. Seda tuleb lahustada segades kuumas vees. Seetõttu tuleb naatriumalginaadi lahus eelnevalt valmistada. Kui on vaja naatriumalginaadi lahust säilitada, siis on soovitatav see kõigepealt autoklaavida. NB! Kõigi labuste tegemiseks kasutada destilleeritud või deioniseeritud vett, sest kraanivees olevad kaltsiumioonid põhjustavad alginaadi sadestumist.

Töö planeerimine

Seotud pärmirakkude valmistamiseks kulub 10-15 minutit ja käärimisprotsessiks kuni nädal.

Töövahendid ja materjalid

Igale õpilasele või tööühmale

- 10-15 ml 4% naatriumalginaadi lahust;
- 100 ml 1,5% kaltsiumkloriidi lahust;
- 10 ml pipett;
- teesõel;
- kaks 200 ml nõud;
- kaks 250 ml koonilist kolbi;
- kaks väljalaskeavaga korki;
- kaks suurt (nt. 500 ml) nõud;
- 100 ml mõõtsilinder;
- steriliseerimislahus, nt. naatriummetabisulfiidi lahus või valmistoodet, nt. *Milton* (naatriumhüpokloriidi lahus, Procter & Gamble);

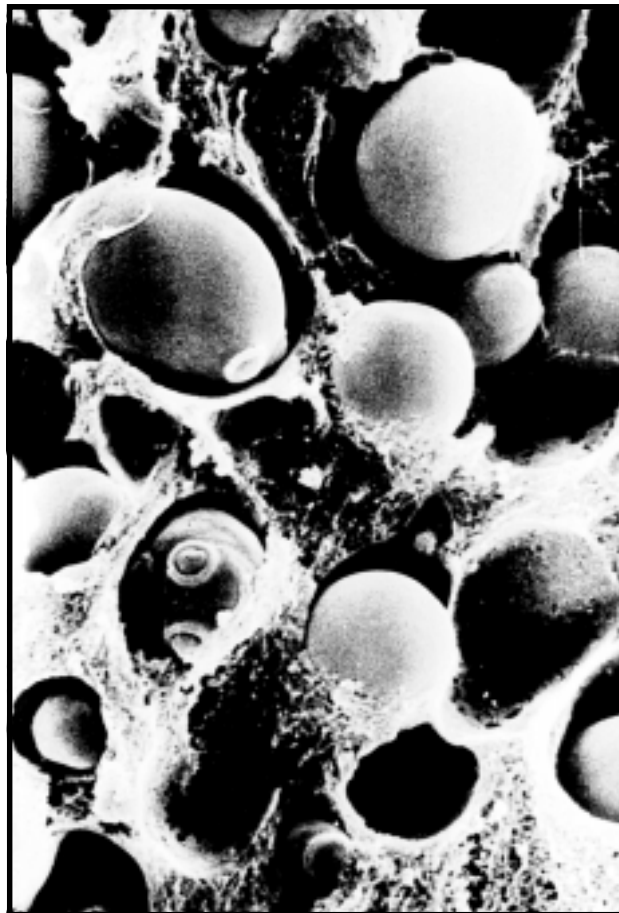


Foto: Dr. Duncan Casson

Kaltsiumalginaadis seotud pärmirakud.

- ca 1 liiter 13% naatriumkloriidi lahust (sobib tavaline keedusool);
- 100 ml söödet, mis sisaldab 2 g glükoosi, 1 g pärmi ekstrakti ja 1 g peptooni;
- 100 ml söödet, mis sisaldab 2 g laktoosi, 1 g pärmiekstrakti ja 1 g peptooni;
- 2 ml β -galaktosidaasi, nt. *Lactozym* (Novo Nordisk);
- värske või kuivatatud pagaripärm.

Töökäik

Valmistage seotud ensüümi ja pärmi graanulid järgnevalt:

1. Segage väikeses nõus kuivatatud pärm 25 ml destilleeritud veega. Katke nõu ja jätke 10 minutiks toatemperatuuril seisma.
2. Teises väikeses nõus segage naatriumalginaadi lahus ja β -galaktosidaas. Lisage sellele 10 ml pärmisegu.
3. Võtke natuke pärmi, ensüümi ja alginaadi segu pipetti ja lisage seda tilkhaaval teises suures nõus olevale kaltsiumkloriidi lahusesse.
4. Laske kaltsiumkloriidi lahusel, millesse on seotud ensüüm koos pärmirakkudega, 10 minuti jooksul kõvastuda.

5. Eraldage teesõelaga graanulid lahusest ja loputage neid kraanivee all.

Külmkapis võib graanuleid säilitada steriilses vees kuni kolm päeva.

Käärimisprotsessi läbiviimine:

1. Steriliseerige kolvid metabisulfaadi lahusega või mõne teise sarnase kemikaaliga. Pärast steriliseerimist loputage kolbe veega.
2. Valage kolbidesse steriilset söödet: ühte kolbi glükoosi sisaldavat söödet (kontroll-kolb) ja teise laktoosi sisaldavat söödet.
3. Pange võrdne kogus seotud pärmi graanuleid mõlemasse kolbi.
4. Asetage kolbidele korgid.
5. Hoidke kolbe temperatuuril 21-25 °C. Juhtige tekkiv gaas läbi 13% naatriumklorii-

di lahuse (süsinikdioksiid ei lahustu selles lahuses). Kogunenud gaasi maht registreerige sobiva ajavahemiku järel.

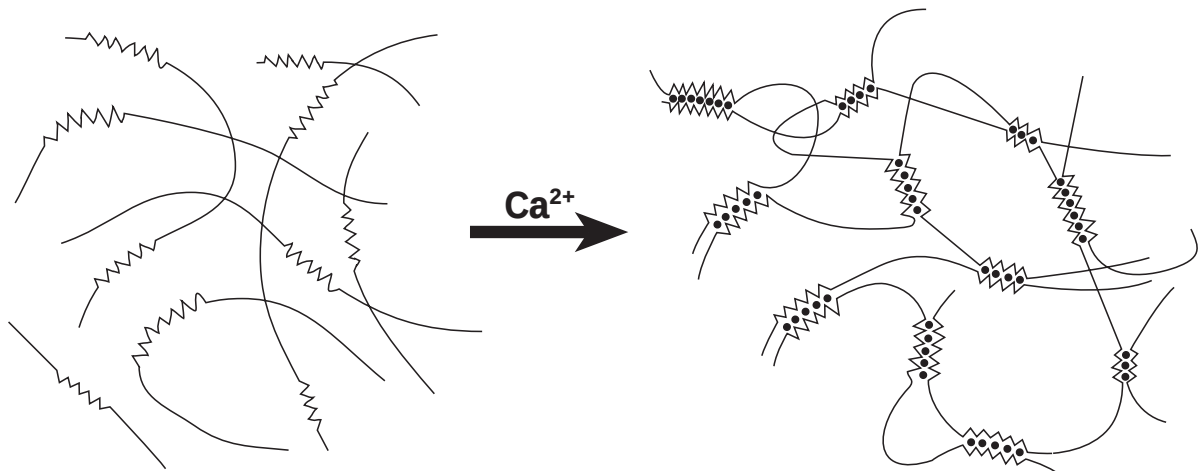
6. Tehke graafik, mille üks telg tähistab eraldunud gaasi hulka ja teine aega.

Täiendavalt

1. Võib kasutada erineva päritoluga pärmi, nt. veinipärmi või pagaripärmi.
2. Muutke β -galaktosidaasi kontsentratsiooni, temperatuuri ja teisi muutujaid.

Ohutusnõuded

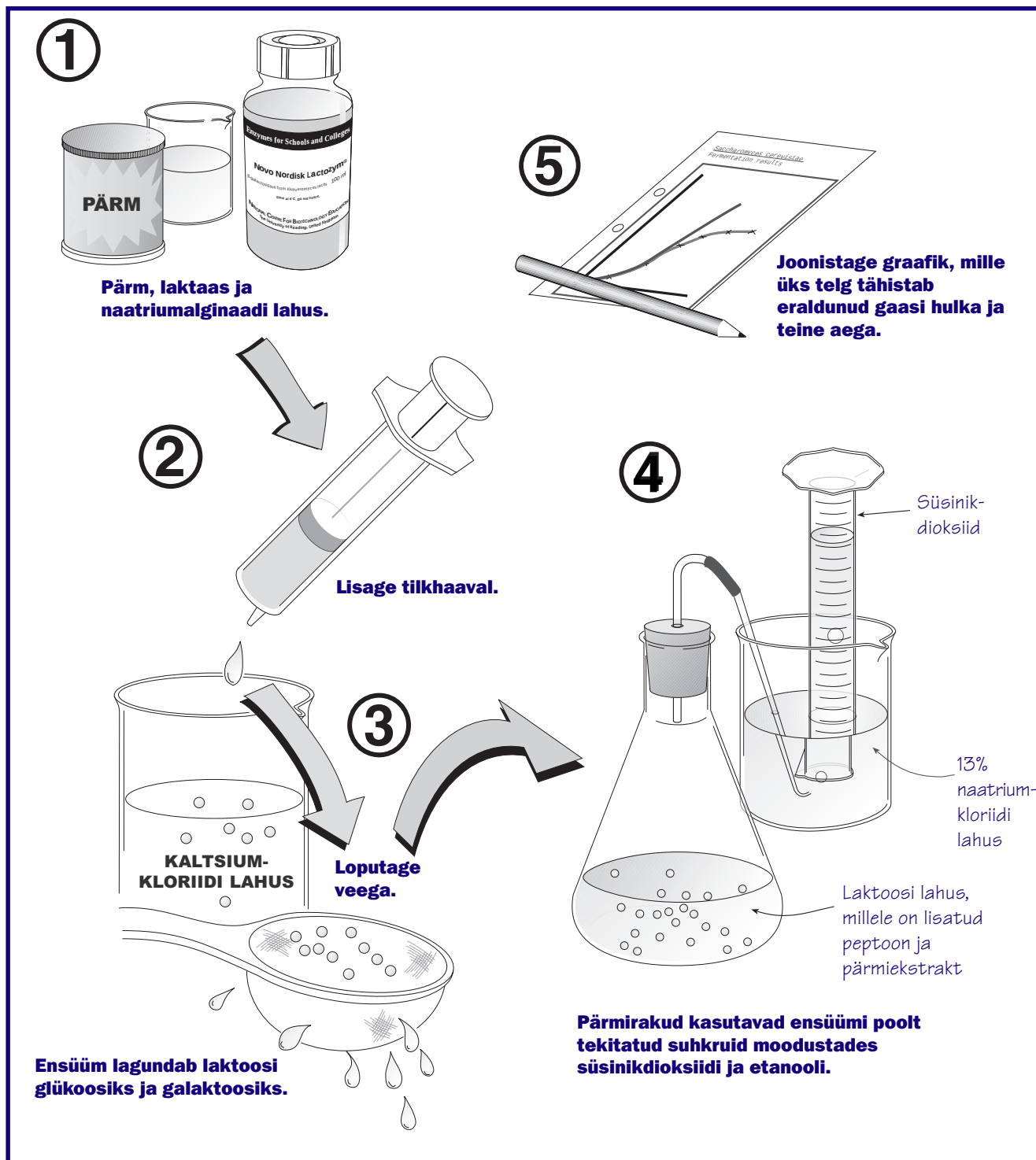
Gaas võib klaasnõudes olla ohtlik. Kontrollige, et käärimisprodukt (CO₂) oleks piisavalt vaba väljapääs. Keemilisel steriliseerimisel tuleb olla hoolikas ja järgida kemikaalide kasutusjuhised.



Rakkude sidumiseks kasutatakse kõige laialdasemalt kaltsiumalginaati. Meetod sobib ka elavate rakkude puhul, kuna see toimub “pehmetes” tingimustes. Meetodi kasutusala hõlmavad elusate või surnud rakkude sidumist bioreaktorites ning taime protoplastide ja taimeloodete sidumist koekultuuris paljundamiseks (ehk mikropaljundamiseks). Samuti kasutatakse seda hübriidoomi rakkude sidumiseks monokloonsete antikehade tootmisel ja ensüümide või ravimite kohale- kinnitamiseks (vt. tabel järgmisel lehel).

Seotavad rakud või ensüümid segatakse kõigepealt naatriumalginaadi lahusega. Moodustunud segu tilgutatakse lahusesse, mis sisaldab mitmevalentseid katioone (tavaliselt Ca²⁺). Niipea, kui tilgad langevad lahusesse, moodustavad nad koheselt ruumilise struktuuri, mis seob rakud alginaadi kolmemõõtmelisse võresse.

Lisakirjandus: Smidsrød, O. & Skjåk-Bræk, G. (1990) “Alginate as an Immobilization Matrix for Cells.” *Trends in Biotechnology* 8 (3) 71-78.



Näited alginaadiga seotud rakkude kasutusalaadest (Smidsrød & Skjak-Bræk, 1990)

Rakud

Toode/eesmärk

Bakterid

<i>Erwinia rhapontici</i>	Isomaltuloos
<i>Pseudomonas denitrificans</i>	Joogivee puhastamine
<i>Zymomonas mobilis</i>	Etanool

Tsüanobakterid

<i>Anabena</i> sp.	Ammoniaak
--------------------	-----------

Seened

<i>Kluyveromyces fragilis</i>	Laktoosi hüdrolyüs
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Etanool
<i>Saccharomyces bayanus</i>	Šampanja tootmine

Vetikad

<i>Botryococcus braunii</i>	Süivesinikud
-----------------------------	--------------

Rakud

Toode/eesmärk

Taimerakud

<i>Chatharanthus roseus</i>	Alkaloidid vähktõve raviks
Mitmed taimed	Kunstseemned
Taime protoplastid	Rakutehnoloogia, mikroskoopia

Imetajate rakud

Hübridoomid	Monokloonsed antikehad
Langerhansi saarekesed	Insuliin/implantatsioon
Fibroblastid või lümfoomirakud	Interferoonid (α või β)

Mikrobioloogiline kütteelement



Aastakümneid peeti elektrit tootvaid mikroorganisme bioloogilisteks kurioosumideks. Tänapäeval ennustavad teadlased nende organismide kasutuselevõttu kellades ja kaamerates, Kolmanda Maailma energiaallikates ja tööstusjäätmel elektriks muutvates bioreaktorites. Käesolevas töös kirjeldatud kütteelement annab nõrka elektrivoolu. Vool tekib pärmseente rakkude hingamisprotsessi elektrontransportahtlas olevate elektronide energia arvelt. Küttelementi saab kasutada hingamisreaktsioonide uurimiseks uudsel viisil. Lisainformatsiooni leiate ajakirjast: “*BIO/technology Education*”, köide 1, number 4, lk. 163-168.

Eesmärgid

- Tutvustada hingamisreaktsioonide uurimisvõimalusi.
- Uurida mikroorganismide hingamist mõjutavaid faktoreid.
- Näidata, kuidas orgaanilisi jääkaineid saab kasutada elektritootmiseks.

Ettevalmistused

Lahused tuleb eelnevalt valmistada. Leotage katioonvahetusmembraani enne kasutamist destilleeritud vees 24 tundi. Kuivatatud pärmseeni võib taaselistada siis, kui kütteelement on juba kokku pandud.

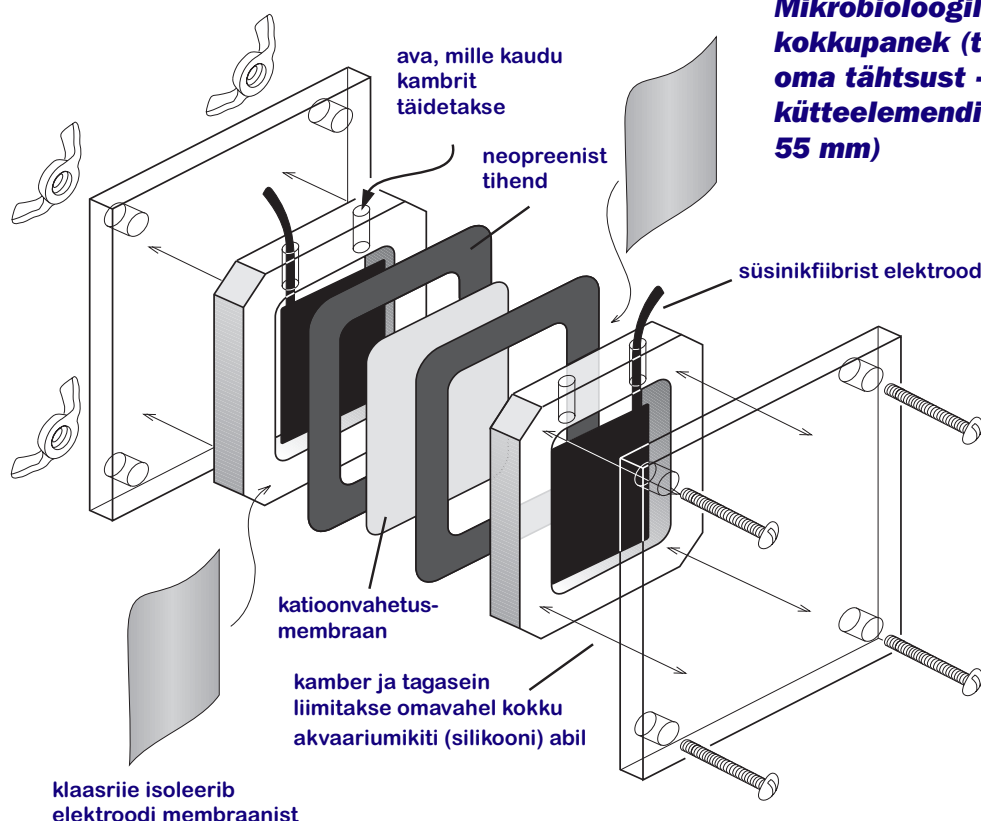
Töö planeerimine

Küttelemendi kokkupanemiseks kulub umbes 30 minutit.

Töövahendid ja materjalid

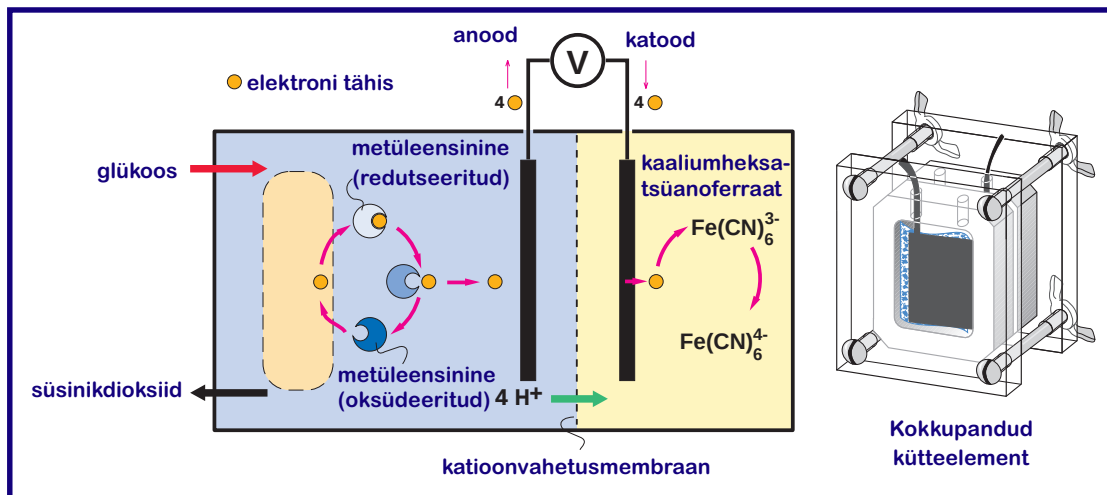
Igale õpilasele või tööühmale

- Perspex (ICI) kütteelement, lõigatud 4 mm paksusest lehest;
- kaks neopreenist tihendit;
- sobiva suurusega katioonvahetusmembraan (*membraani võib korduvalt kasutada, kuid see sulab autoklaavimisel*);
- kaks sobiva suurusega süsinikfiibrist elektroodi;
- kaks sobiva suurusega õhukese klaasriide tükki;
- kaks 10 ml plastmassist pipetti;



Mikrobioloogilise küttelemendi kokkupanek (täpsed mõõtmed ei oma tähtsust - joonisel oleva küttelemendi suurus on ca 55 X 55 mm)

Küttelemendi saate osta:
NCBE
The University of
Reading
POBox 228
Reading RG6 6AJ, UK



- Petri tassi kaas, millele asetada kütteleement;
- kaks elektrijuhet koos kinnitusklaasbritega;
- 0-5 V voltmeeter või multimeeter ja/või madalpingemootor;
- käärid;

Kõigi alljärgnevatel lahustel valmistamisel tuleb vee asemel kasutada 0,1 M fosfaatpuhvri lahust pH 7,0.

- kuivatatud pärm, millele on lisatud 0,1 M fosfaatpuhvri lahust. Tulemusena saadakse pudrutaoline mass (mitte lisada glükoosilahust enne, kui pärm on puhverlahuses elustatud);
- 5 ml 10 mM metüleensinise lahust;
- 5 ml 1 M glükoosilahust;
- 10 ml 0,02 M kaaliumheksatsüanoferraadi (III) lahust (nimetatakse ka punaseks veresoolaks).

0,1 M fosfaatpuhvri lahuse (pH 7,0)

tegemiseks lahustage 4,08 g Na_2HPO_4 ja 3,29 g NaH_2PO_4 500 ml destilleeritud vees.

Töökäik

1. Lõigake süsinikfiibrist kaks elektroodi.
2. Lõigake klaasriidest kaks tükki nii, et need sobiksid kütteleemendi sisse.
3. Pange kütteleement kokku, nagu on näidatud joonisel.
4. Asetage kokkupandud kütteleement Petri tassi kaanele, et lekkida võiv vedelik maha ei läheks.
5. Segage kokku “pärim puder”, glükoosilahus ja metüleensinise lahust. Kandke segu pipetiga kütteleemendi ühte kambrisse.
6. Teisele poole pipeteerige kaaliumheksatsüanoferraadi (III) lahust.

7. Ühendage voltmeeter või multimeeter klambritega elektroodide külge. Sellist tüüpi kütteleemendid annavad 0,4-0,6 V pinget. Märkus: Vool peaks tekkima kohe. Kui näit on 0, kontrollige ühendusi ja seda, et süsinikfiibrist elektroodid ei puutuks kokku katioonvahetusmembraaniga.

Täiendavalt

1. Suurema pinget saamiseks võib ühendada kokku mitu kütteleementi. Kütteleemendi suuruse (või elektroodide pindala) suurendamine annab tugevama voolu, pinget ei muutu.
2. Võib kasutada erinevaid söötmeid ja/või pärmisorte, nt. veinipärmi või pagaripärmi. Märkus: Turvalisuse mõttes ei soovitata selles kütteleemendis kasutada teisi mikroorganisme.
3. Uurida võib ka temperatuuri mõju kütteleemendile. (Ärge unustage kontrollkatseid, mis on vajalikud sellist laadi võrdluste tegemiseks).

Ohutusnõuded



Kaaliumheksatsüanoferraat (III) on mürgine ja selle kasutamisel on kaitseprillide kandmine kohustuslik. Lahuse silma sattumisel loputage neid rohke veega ja pöörduge arsti poole. Lahuse allaneelamise korral anda kannatanule palju juua ja viia arsti juurde. Kasutatud lahuste hävitamisel järgida kohalikke seadusi.

Tänu

Mikrobioloogilise kütteleemendi loojaks on Dr. Peter Bennetto Londoni King's Kollidžist.

Geeniülekanne bakterite konjugatsioonil

★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★

Looduses kanduvad geenid bakterite vahel üle mitmel viisil. Ilmselt on need mehhanismid tekkinud kiiresti muutuvate keskkonnatingimuste tõttu. Reeglina asuvad kõige liikuvamad geenid plasmiidides. Plasmiidid on väikesed ringikujulised DNA molekulid, mis replitseeruvad iseseisvalt. Nad sisaldavad väikest arvu geene, mis võimaldavad bakteril lagundada ohtlikke aineid keskkonnast, nt. raskmetalliühendeid ja antibiootikume.

Looduses esineb kolm tüüpi geeniülekanne:

Trasformatsioon - vaba DNA ülevõtmine rakku ümbritsevast keskkonnast;

Transduktsioon - DNA liikumine ühest rakust teise bakteriofaagi abil;

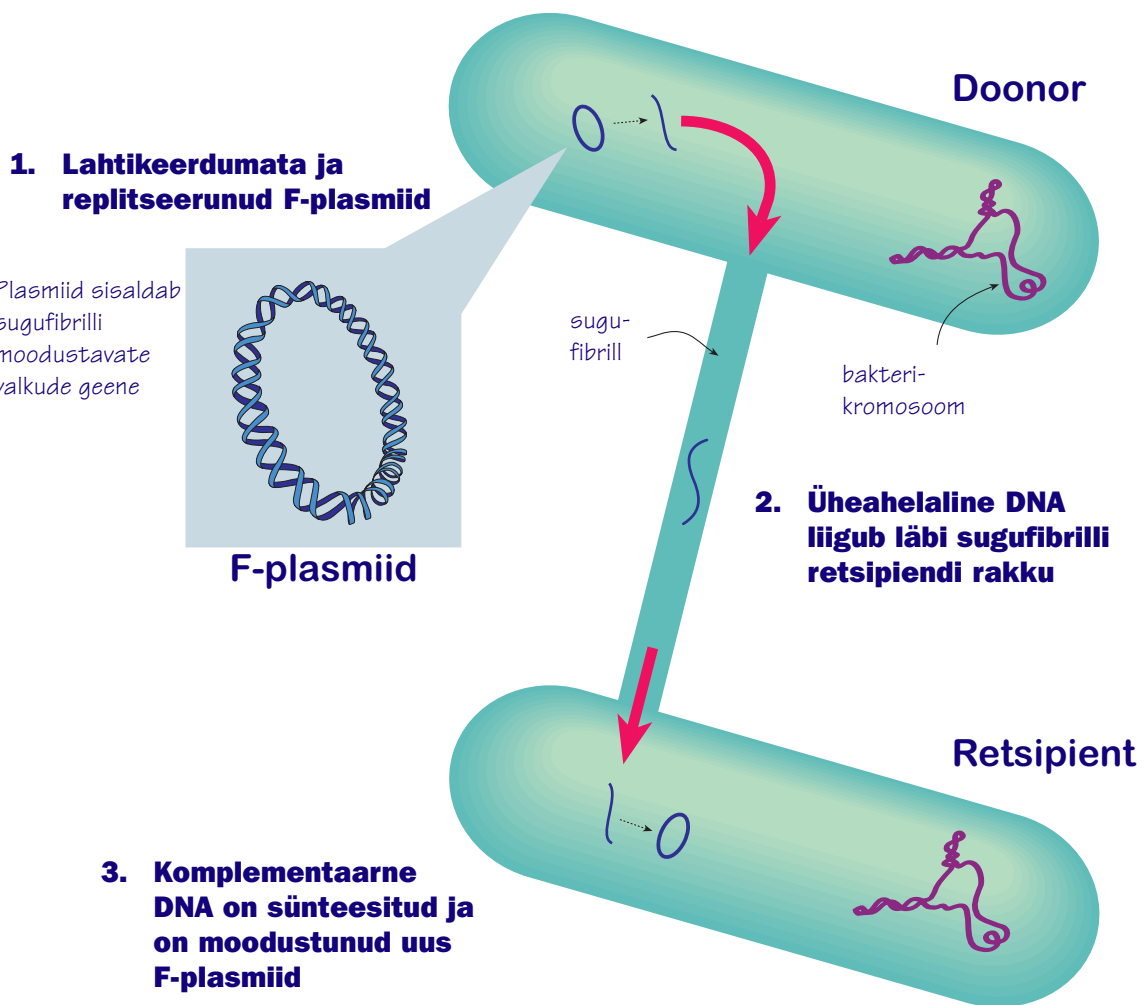
Konjugatsioon - spetsiaalsete F-plasmiidide ülekanne läbi kitsa kanalikese (sugufibrilli), mis ühendab kahte bakterirakku (joonis 1).

Geenitehnoloogid kasutavad kõiki neid meetodeid (eriti transformatsiooni) selleks, et sisestada bakteritesse teatud geene.

Järgnevas katses uuritakse konjugatsiooni kahe bakteritüve vahel.

NB! Käesolevas töös jälgitakse looduslikult toimuvaid protsesse, baktereid ja plasmide. Seetõttu ei ole siinkohal tegu geenitehnoloogia ega insenerigeneetikaga.

Joonis 1: Konjugatsioon ja F-plasmiidide ülekanne bakterirakkude vahel.



F-plasmiidid

Niinimetatud F-plasmiidid (F tähendab fertiilsust, viljakust) sisaldavad geene, mis võimaldavad plasmiidide ülekannet doonorrakust retsipientrakku (bakterite konjugatsioonil).

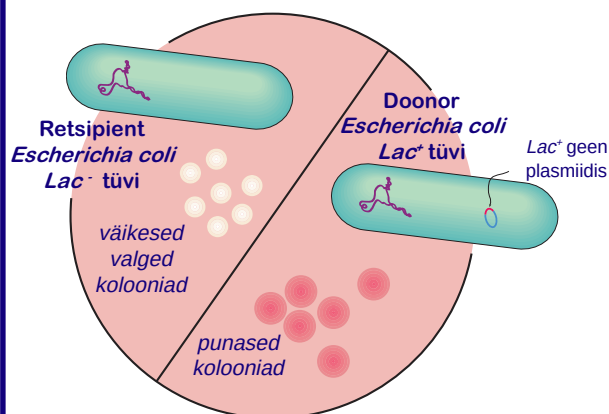
F-plasmiidid võivad kanda ka teisi geene. Näiteks käesolevas uurimuses sisaldavad doonorrakud plasmiidi, mida nimetatakse *F Lac*. See geen võimaldab lagundada laktoosi (bakterit nimetatakse seetõttu *Lac*⁺ tüveks). Retseptient, millel see plasmiid puudub, ei suuda laktoosi lagundada (nimetatakse *Lac*⁻ tüveks).

MacConkey agariga tassidel saab neid kahte tüve eristada värvuse järgi: doonor moodustab punase koloonia, retseptient aga valge (joonis 2).

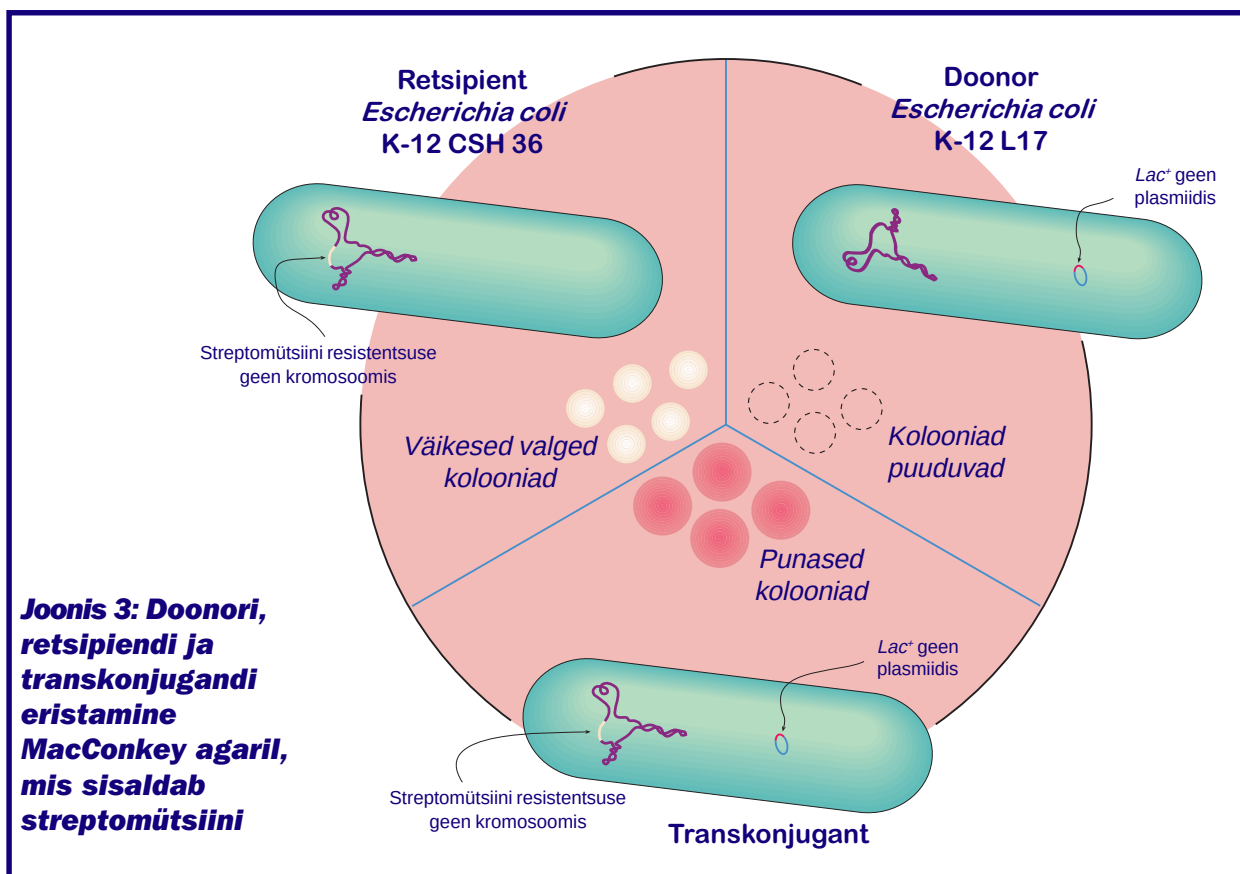
Doonori ja retseptiendi rakkude kokkusegamisel kanduvad *F Lac* plasmiidid üle doonorilt retseptiendile. Sellisel viisil omandab retseptient võime laktoosi lagundada ning teda nimetatakse transkonjugandiks.

Geneetiline "trikk" võimaldab eristada doonorit, retseptienti ja transkonjuganti.

Joonis 2:
Doonor ja retseptient MacConkey agaril



Retseptiendil on kromosomaalne geen, mille tõttu antibiootikum streptomütsiin talle ei mõju. Doonortüvel sellist geeni ei ole ja streptomütsiin peatab ta kasvu. Retseptiendi ja transkonjugandi määramiseks kasutatakse nende võimet kasvada streptomütsiini sisaldavas keskkonnas (joonis 3).



Joonis 3: Doonori, retseptiendi ja transkonjugandi eristamine MacConkey agaril, mis sisaldab streptomütsiini

Eesmärgid

- Tutvuda bakterigeneetikaga.
- Võimaldada õpilastel arutleda geenitransformatsiooni teemadel, nt. resistentsuse levik antibiootikumide suhtes ja riski analüüs geenitehnoloogias.

Ettevalmistused

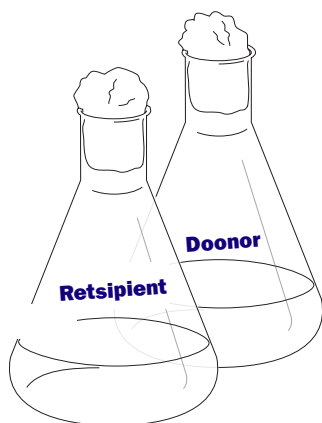
Valmistada ja steriliseerida järgmised vahendid:

- 3 väikest koonilist kolbi (100 ml) 10 ml toitelahusega;
- steriilne MacConkey agar, millele on lisatud streptomütsiinsulfaati (200 mg/ml). 50 °C jahutatud agar valatakse Petri tassidele (igale tassile 15-20 ml).
- Kasutatakse järgnevaid kultuure:
doonortüvi: *Escherichia coli* K-12 CSH36 (DSM number 6253)
retsipienttüvi: *Escherichia coli* K-12 L17 (DSM number 6254)

Neid looduses esinevaid tüvesid saab näiteks Saksamaa rakukultuuride ja mikroorganismide kogust (DSM). Mõlemat kultuuri väljastatakse külmutatult-kuivatatult (lüofiliseeritult) klaas-ampullides. Ampulle peab avama õigesti, et nende sisu ei saastuks ega ohustaks avajat (Lisa 3). Doonorkultuuri on raske kaldagaril säilitada, seega on vaja värskest elustatud kultuuri.

Valmistage ette **doonorkultuur** ja **retsipientkultuur**:

1. Külvake ühte kolbi doonortüve (kleepige kolvile silt “Doonor”) ja teise retsipienttüve (sildiga “Retsipient”).
2. Hoidke mõlemat kolbi ööpäev temperatuuril 37 °C. Kui võimalik, kasutage loksutiga veevanni.



Nende kahe kultuuri “paaritamine” toimub järgnevalt:

1. Lisage steriilse pipetiga 0,8 ml doonorkultuuri kolmandasse kolbi, mis sisaldab 10 ml steriilset toitelahust.
2. Samasse kolbi lisage teise steriilse pipetiga 0,2 ml retsipientkultuuri.
3. Kleepige kolbidele sildid ja hoidke kolbe 16-24 tundi temperatuuril 30 °C.
NB! Kolbe võib loksutada vaid VÄGA AEGLASALT, sest sugufibrillid võivad ägeda loksutamise ajal katkeda.

Steriilsed vatikorgid valmistatakse vatitüki mähkimisel ümber puutiku. Autoklaavige kõrge kas McCartney pudelis või alumiiniumfooliumis 15 minutit temperatuuril 121 °C.

Töö planeerimine

Söötmete valmistamine:	60 minutit
Eelnev inkubeerimine:	48 tundi
Külvamine:	15 minutit
Kasvatamine:	24 tundi
Tulemuste registreerimine:	20 minutit

Töövahendid ja materjalid

*Igale õpilasele või tööruhmale
(Eeldatakse tavalise laboritehnika olemasolu)*

- termostaat 30 °C;
- steriilne Petri tass, millel on 15-20 ml streptomütsiiniga MacConkey agarit;
- järgnevad eelkasvatatud kultuurid:
 - doonorkultuur
 - retsipientkultuur
 - doonori ja retsipienti kultuuride segu;
- 3 steriilset omatehtud vatitampooni;
- väike nõu desinfitseeriva vahendiga, nt. 3% Domestos'e (Lever) lahusega, kuhu visata kasutatud vatitampoonid;
- viltpliiats klaasnõude tähistamiseks.

Töökäik

1. Võtke üks tass, milles on streptomütsiiniga MacConkey agar. Tõmmake viltpliiatsiga tassi alaküljele kolm joont, nii et moodustuks kolm võrdset sektorit.
2. Iga sektori keskele joonistage umbes 10 mm läbimõõduga ring. Märgistage üks neist tähega "D" (doonorkultuur), teine tähega "R" (retsipient) ja kolmas tähega "S" (eelneva kahe segu - transkonjugantide moodustumiseks).
3. Külvake vastavaid kultuure steriilsete vatitampoonidega märgitud sektoritesse. Võtke iga kord uus vatitampoon, kasutatud vatitampoon visake desinfitseerivasse lahusesse.
4. Laske vedelikul mõne minuti jooksul agarisse imbuda. Katke tassid ja hoidke neid ümberpööratuna temperatuuril 30 °C üks kuni kaks päeva.

Täiendavalt

Lähtudes sellest tööst on võimalik teha mitmeid kvantitatiivseid lisakatseid:

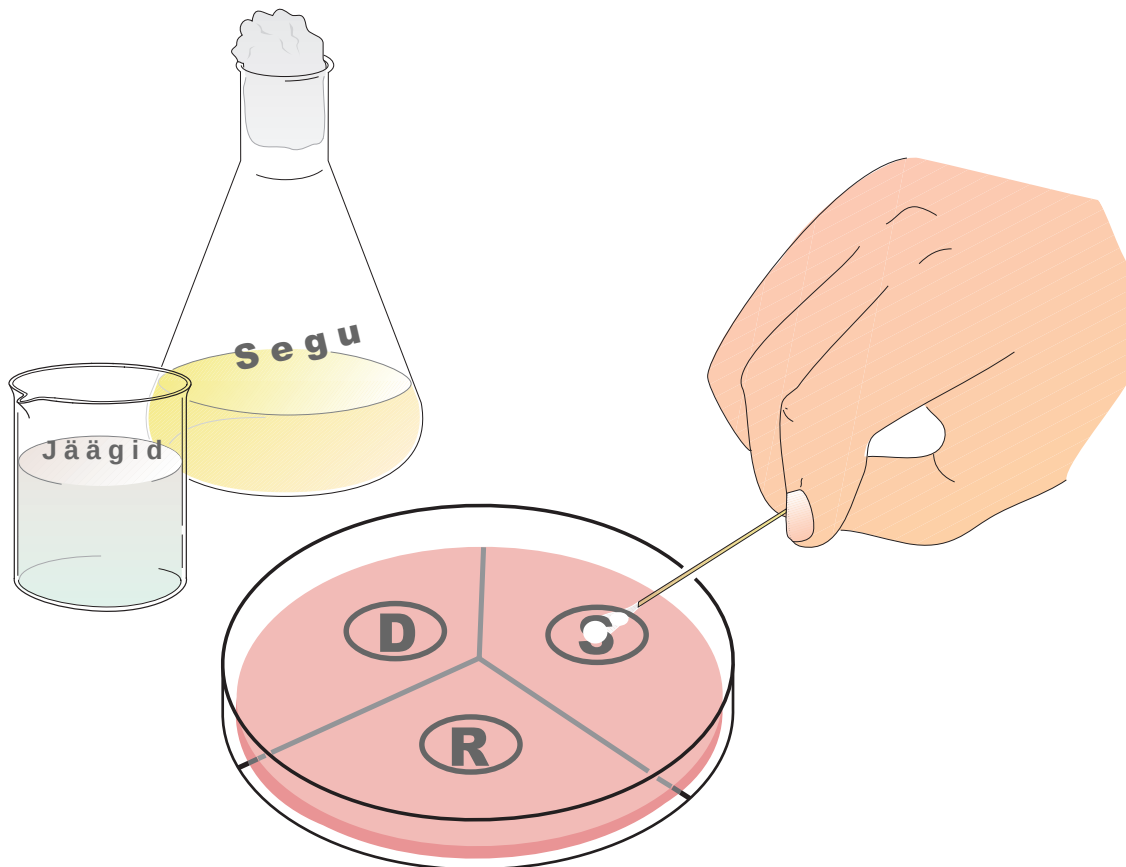
1. Määrata doonorkultuuri ja retsipientkultuuri optimaalne suhe lahjendades doonorkultuuri ja retsipientkultuuri steriilses Ringeri lahuses või 10^{-3} M MgSO_4 lahuses.
2. Määrata optimaalne konjugatsiooni aeg.

Ohutusnõuded

Katse tuleb läbi viia laboris järgides mikrobioloogiaalaseid üldisi ohutusreegleid ja steriilsuse nõudeid.

Tänu

See katse on lihtsustatud variant prof. Patricia Neversi poolt korraldatust (Hamburgi Ülikool), mis omakorda põhines E. Härle ja R. Hausmanni töö (Freiburgi Ülikool).



Looduslik geeniülekanne *Agrobacterium tumefaciens*'i abil



Taimede kasvaja põhjustavad palju probleeme põllumajanduses, iluaianduses ja viinamarjakasvatuses. Tihti tekivad kasvaja pisitillukeste vigastuste tagajärjel, mis võivad tuleneda külmakahjustustest, mullaharimisest või pookimisest.

Sajandivahetusel märgati, et teatud kasvaja-te teke on seotud bakteriaalse nakkusega. Baktereid hakati nimetama *Agrobacterium tumefaciens* (ladina keeles: *agar* = maa; *tumor* = paisuma; *facere* = tegema). Alles 1970-ndatel aastatel avastati keerukad suhted taimede ja *Agrobacterium tumefaciens*'i vahel.

Kasvajaid tekitavad bakterid sisestavad väikese osa oma geneetilisest infost (ühe plasmidi) taimerakku, kus see lülitub peremeesraku kromosoomistikku. Tulemusena hakkavad nakatunud rakud järgima bakterite poolt pealesunnitud programmi. Taimerakud jagunevad ja neist areneb kasvaja, millest saab bakterite elukoht. Kasvajakud toodavad bakterite elutegevuseks vajalikke ühendeid.

Taimearetajad kasutavad *Agrobacterium*'i osavõtul toimuvat geenitransformatsiooni soovitatavate geenide ülekandmiseks taimedele aeganõudvaid ristamiskatseid teostamata. Selle tulemusel on *Agrobacterium*'i modifitseeritud vormidest saanud oluline geenitehnoloogia vahend.

Agrobacterium on pulgakujuline ja sama pikk kui *E. coli* (umbes 1-3 µm). *Agrobacterium tumefaciens* säilitab patogeensusel elades mulla ülemises õhuküllases kihis. *Agrobacterium* ründab ainult kaheidulehelisi. Ta suudab rakku siseneda ja seda nakatada vaid vigastuste kaudu, sest bakterid ei suuda tungida läbi taimeraku kesta. Kahjustunud rakkude mahl "meelitab ligi" bakterid ja aktiveerib geenitransformatsiooni. Bakterid paljunevad haavapiirkon-

nas ja tungivad rakuvahe ruumi, kus nad kinnituvad rakukestadele. *Agrobacterium tumefaciens*'i plasmid kandub üle ja selle DNA lülitub taime kromosoomi. Bakteri geenilt toodab taim opeiline (nt. guanidoamiinhapet), mida *Agrobacterium* kasutab süsiniku- ja lämmastikuallikana.

Eesmärk

- Käesolevas katses nakatatakse kalanhoe või *Bryophyllum*'i taimi (mõlemad on kerge kasvatada ja paljundada) looduslikult esineva *Agrobacterium*'iga erinevates tingimustes ning nelja nädala jooksul jälgitakse kasvaja arengut. Katsetada võib järgmisi variante:

A. Nakatamise viis:

- tehke taime vastavasse piirkonda haav ja nakatage seda kohe *Agrobacterium*'iga;
- tehke haav, kuid kandke *Agrobacterium* peale järgmisel päeval;
- tehke haav ja nakatage kohe *Agrobacterium*'iga ning katke see niiske pabersalvrätiga;
- tehke haav, kuid ärge nakatage seda bakteritega;
- kandke *Agrobacterium* tervete taimede samasse piirkonda.

B. Nakatamise koht:

- vars,
- lehe pind,
- võrse tipp.

Ettevalmistused

1. Peremeestaimede paljundamine (õpilased saavad seda iseseisvalt teha, võimaluse korral isegi kodus);
2. Kasvukeskkonna ja *Agrobacterium tumefaciens*'i kultuuride ettevalmistamine. Värsked kultuurid tuleb vähemalt 2 nädalat enne kasutamist ette valmistada.

Töö planeerimine

Taimede kasvatamine (vajadusel): 4 kuud
Agrobacterium'i kultuuri ettevalmistamine:

2 nädalat

Taimede nakatamine *Agrobacterium*'iga: 20 min.

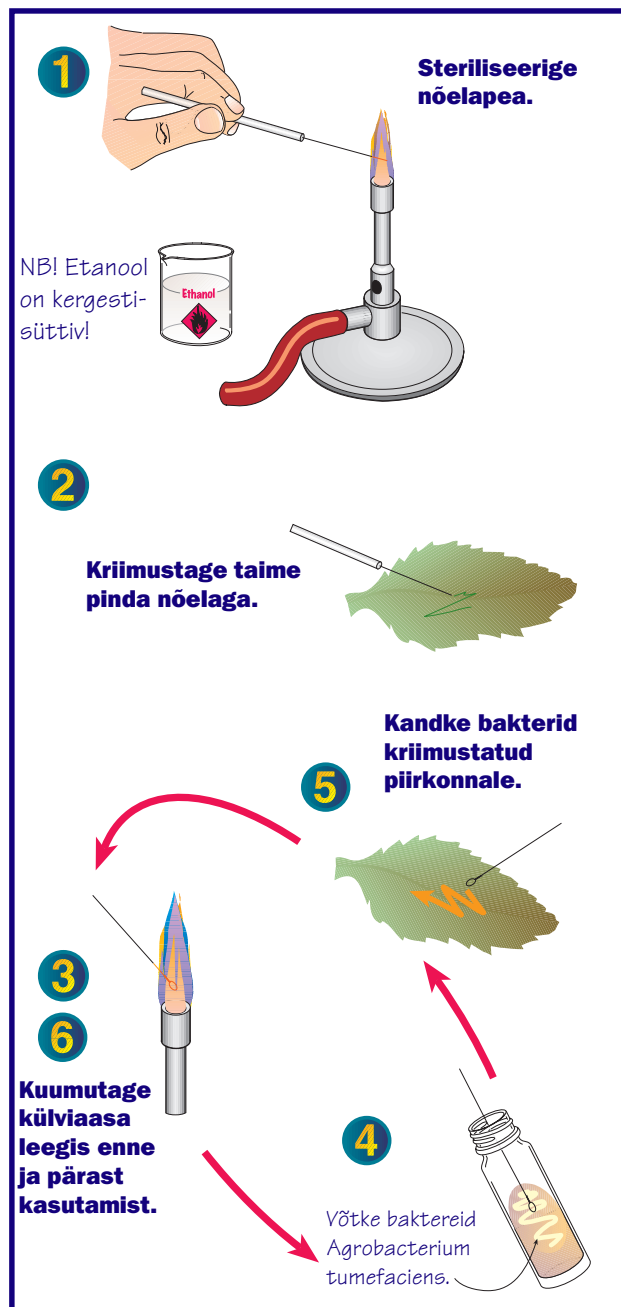
Kasvaja jälgimine: 3-4 nädalat

Töövahendid ja materjalid

Igale õpilasele või töörühmale

(Eeldatakse tavalise laboritehnika olemasolu)

- destilleeritud vesi (McCartney pudelis);
- külvinõel;
- külviaas;
- binokulaarne mikroskoop;
- käärid;
- külgeseotavad sildid ja viltpliiats;
- paberkäterätid;
- kleeplint;
- etanool instrumentide steriliseerimiseks leegis;
- bakteri *Agrobacterium tumefaciens* kultuur (agaril);
- 3-4 kuu vanused kalanhoe või *Bryophyllum*'i taimed.



Töökäik

Selles katses nakatatakse taimi mitmel viisil (vt. sissejuhatavad lõigud ja instruktsioonid).

1. Märgistage iga taim sildiga, millel on kuupäev ja informatsioon, mida taimega on tehtud. Kui vaja, eristage taime nakatatud osad külgeriputatavate siltidega.
2. Asetage taimed hästi valgustatud kohta ja hoidke neid niiskena (mitte üle kasta).
3. Jälgige ja registreerige kasvajate arengut järgmise 4-6 nädala jooksul. Uurige kasvajakoe tükikest binokulaarse mikroskoobi all ja võrrelge seda kahjustamata lehe koega.

Taimede nakatamine *Agrobacterium*'iga.

Meetod 1 (vigastatud taimepind nakatatakse kobe)

1. Kastke külvinõel alkoholi ja steriliseerige see leegis. Kriimustage taime pinda kas üks või mitu korda.
2. Nakatage vigastatud pind *Agrobacterium*'iga. Selleks kuumutage külviaasa ja laske sellel natuke aega jahtuda. Võtke aasaga veidi valget bakterikultuuri ja määrige vigastatud aladele. Kuumutage uuesti külviaasa.

Meetod 2 (taimed nakatatakse 24 tundi pärast kriimustuste tegemist)

1. Vigastage taimi (vt. meetod 1).
2. Katke haavad *Agrobacterium*'iga järgmisel päeval.

Meetod 3 (pärast nakatamist kaetakse vigastatud ala niiske pabersahvratikuga)

1. Tehke kriimustused ja nakatage taim nagu ülalpool kirjeldatud (meetod 1).
2. Lõigake paberkäterätist paberitükid ja niisutage neid steriilses vees. Asetage paber vigastatud alale ning kinnitage kleeplindiga. Hoidke paberkate niiskena 2 päeva jooksul.

Meetod 4 (vigastatud ala ei nakatata)

1. Tehke taimele kriimustused samasse kohta, kuhu esimese meetodi korral. Seejärel tehke kriimustused teise kohta ja katke need niiske paberiga. Ärge kandke vigastatud alale *Agrobacterium*'it.

Meetod 5 (nakatamine ilma vigastamata)

1. Ärge kriimustage taimi.
2. Kasutage külviaasa, et kanda *Agrobacterium*'it taime ühte või mitmesse piirkonda.

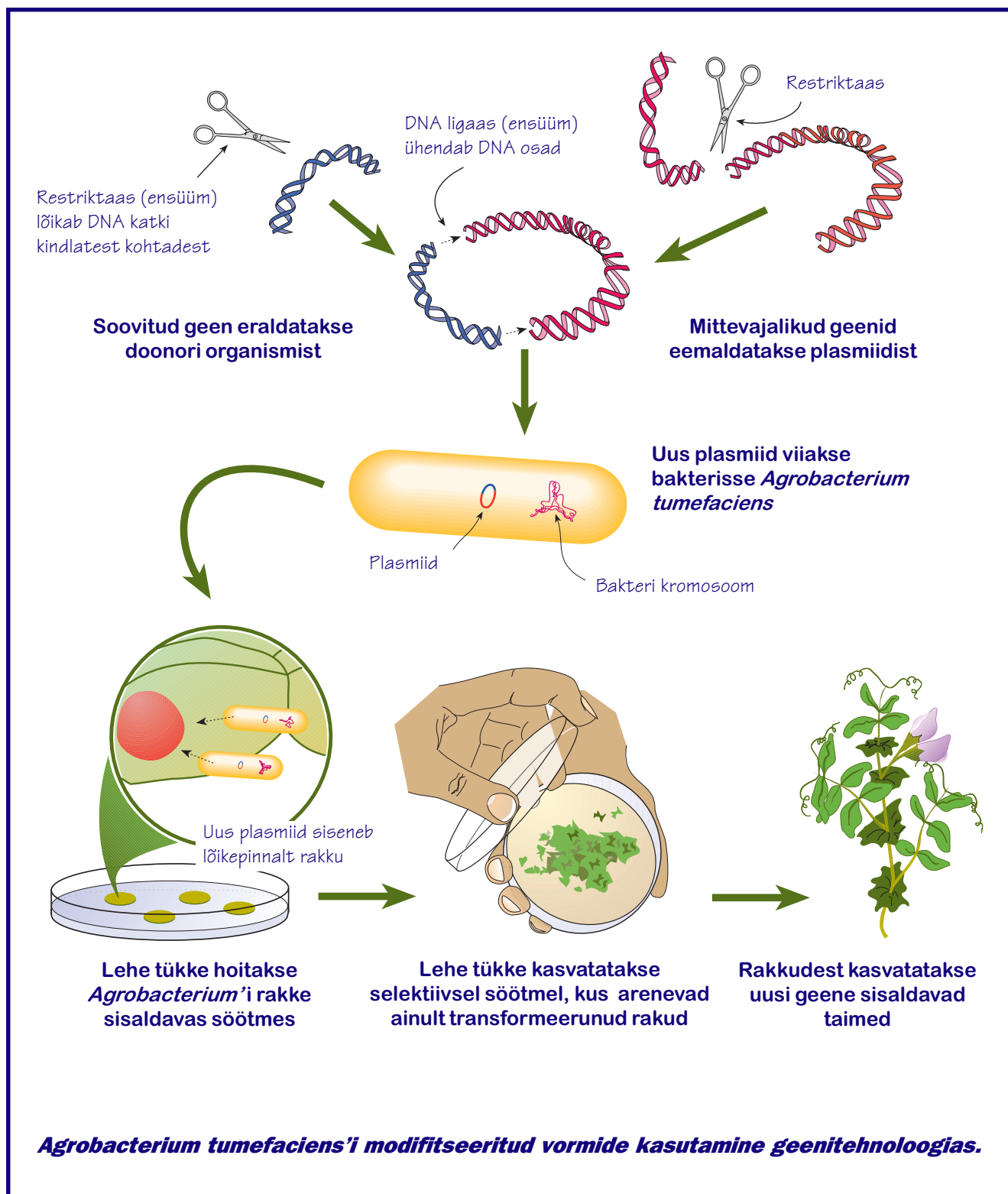
Ohutusnõuded

Seda katset peab läbi viima laboris järgides bakterikultuuridega töötamise üldisi ohutusnõudeid.

NB! *Agrobacterium tumefaciens* on ohtlik taimepatogeen ning sellega töötamiseks on mõnedes riikides kehtestatud ranged nõuded. Enne *Agrobacterium tumefaciens*'i kasutamist veenduge, et see on kooskõlas kohalike seadustega.

Tänu

Katse töötas välja Uta Nellen Koolibioloogia ja Keskkonnahariduse Keskusest (Hamburg). EIBE tänab teda loa eest seda katset kasutada.





Lisa 1

Mikrobioloogilised söötmed

MOODUL
1

Biotehnoloogiaalase Hariduse Euroopa Initsiatiivgrupp

Agar- ja vedelsöötmed valmistatakse tööstuslikult toodetavatest ainetest tootja instruktsioonide järgi. Enne kasutamist tuleb söötmeid autoklaavida 15 minutit temperatuuril 121 °C. Valmis söötmeid võib säilitada kasutuskõlblikena temperatuuril ~4 °C mitu kuud.

Tärkliseagar

Agar	20,7 g
Lahustuv tärklis	2,0 g

Lisage niipalju destilleeritud vett, et segu ruumala oleks 1 l ja autoklaavige 15 minutit temperatuuril 121 °C.

MacConkey agar streptomütsiiniga

MacConkey agar	50,0 g
Destilleeritud vesi	990 ml

Pärast 15-minutilist autoklaavimist temperatuuril 121 °C laske agaril jahtuda 50 °C-ni ja seejärel lisage

streptomütsiinsulfaadi lahus 200 mg/10 ml

Selle söötmega tasse võib säilitada vaid mõne päeva külmkapis temperatuuril ~4 °C.



Lisa 2

Mikrobioloogiaalased töövõtted

MOODUL 1

Biotehnoloogiaalase Hariduse Euroopa Initsiatiivgrupp

Aerosoolid

Aerosoolid on mikroorganisme sisaldavad väikesed piisakesed, mis on juhuslikult õhku sattunud. Need võivad seal püsida pool tundi või kauemgi ning on potentsiaalsed saasteallikad. Aerosool, mis pärineb mahapillatud kultuuridelt, võib põhjustada naha või silmade nakkust. Kui kultuure pipeteeritakse suuga, siis võib mikroorganisme ka kogemata alla neelata.

Laboratoorsed tööd

Laboratoorsete tööde läbiviimisel tuleb silmas pidada alljärgnevaid ohutusnõudeid.

Tuleb olla ettevaatlik, et midagi ei satuks käelt suhu (nt. pliitsi närimisel, siltide keelega ületõmbamisel või suuga pipeteerimisel). Laboris on keelatud süüa, juua ja suitsetada.

Õpilased peavad laboris kandma kitleid. Enne praktiliste tööde algust tuleb kätel olevad nahavigastused katta veekindla plaastriga.

Enne ja pärast iga praktikumi tuleb labori lauad üle pesta desinfitseeriva lahusega. Neid saate koolilaborite varustajatelt.

Õpetajad, laborandid ja õpilased peavad pärast praktikumi alati käsi pesema.

Mahapillatud ja purunenud vahendid Mikrobioloogiliste kultuuridega juhtunud õnnetuste puhul tuleb toimida järgnevalt:

Soovitav on kanda ühekordselt kasutatavaid kindaid. Mikroorganisme sisaldav purunenud nõu või mahapillatud kultuur tuleb katta riidega, mida on eelnevalt leotatud desinfitseerivas vahendis. 10 minuti pärast tuleb jäägid paberkäterättide ja prügikühvliga ära koristada. Saastunud materjal visatakse spetsiaalsesse prügikonteinerisse või prügikotti, mida enne äraviskamist autoklaavitakse. Ka prügikühvel tuleb autoklaavida või asetada 24 tunniks desinfitseerivasse vahendisse.

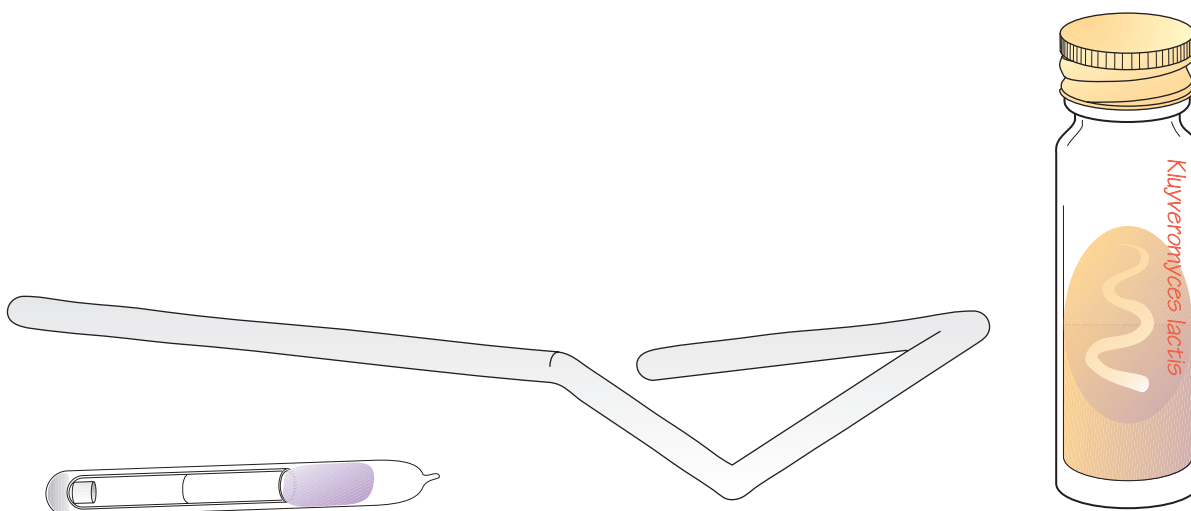
Riiete või naha saastumine

Saastunud nahapiirkonda tuleb koheselt pesta. Tugevasti saastunud riided pannakse enne pesemist desinfitseerivasse lahusesse.

Saastunud puhastuslapid tuleb autoklaavida või panna desinfitseerivasse lahusesse.

Mikroorganismide allikad

Kõiki mikroorganisme tuleb käsitleda kui potentsiaalselt ohtlikke. Käesolevas moodulis kasutatavad organismid on õigete töövõtete korral väheohtlikud. Tellige neid ainult kindlast allikatest.



Steriilsust tagavad tövõtted

Steriilsust tagavate tövõtete eesmärgiks on:

- a) saada ja säilitada puhtad kultuurid;
- b) tagada ohutus mikroorganismidega töötamisel.

Puhas kultuur sisaldab ainult ühte liiki, segatud kultuur aga kahte või enam liiki mikroorganisme.

Alati esineb saastumise oht, sest mikroorganisme on kõikjal: nahal, õhus ja esemetel. Selleks, et tagada kultuuride puhtus, on vaja kasutada steriliseeritud tövõvahendeid ja söötmeid ning vältida saastumist. Need on steriilsuse säilitamise peamised põhimõtted.

On alusetu loota, et nooremad õpilased valdaksid steriilsust tagavaid tövõtteid täiuslikult. Käesoleva mooduli mõned katsed eeldavad siiski täieliku steriilsuse tagamist. Nendel juhtudel kasutage järgmisi protseduure:

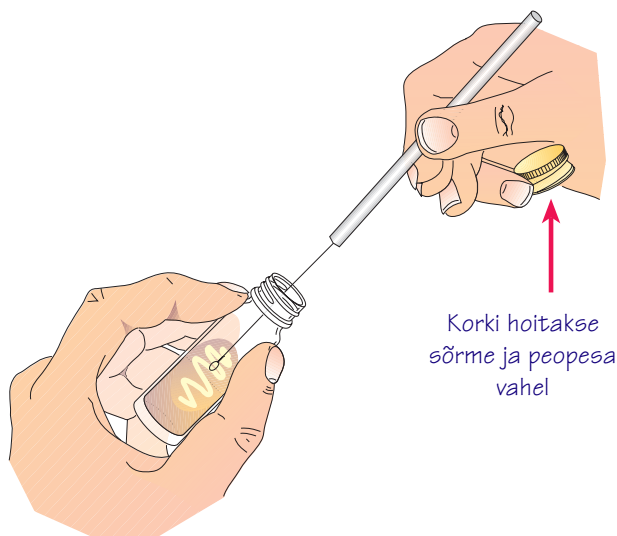
Steriliseerige söötmed enne kasutamist autoklaavimisega. Kasutage steriilseid nõusid (kolbe, Petri tasse jne.) ja hoidke saastumise vältimiseks neil kaaned peal.

Töötada tuleb Bunseni põleti kõrval, siis kannab leegi kohal esinev tõusev õhuvool söötmeid ja puhtaid kultuure saastavad mikroorganismid eemale.

Ärge eemaldage korki ja kaasi nõudelt kauemaks kui vaja. Avades mikrobioloogilist kultuuri sisaldava pudeli, ärge korki kuhugi asetage, vaid hoidke seda seni käes, kuni saate selle peale tagasi panna. Sellega hoiate ära laua ja kultuuri saastumise. Pudeli avamisel tuleb selle suuet kuumutada 1-2 sekundit, sest nii hävitatakse seal olevad mikroorganismid ja tekitatakse soe õhuvool, mis aitab ära hoida kultuuri juhuslikku saastumist.

Harjutamise tulemusena on võimalik hoida pudelit ühes käes ja külviaasa teises käes nii,

et väikese sõrme ja peopesa vahel hoitakse veel korki või kaant. (Sellisel hoidmisel on oluline, et külviaasa ülesvõtmisel lõdvendatakse pisut korki hoidmise haaret.) Vajadusel võivad kaks õpilast sooritada vastavat katset koos.



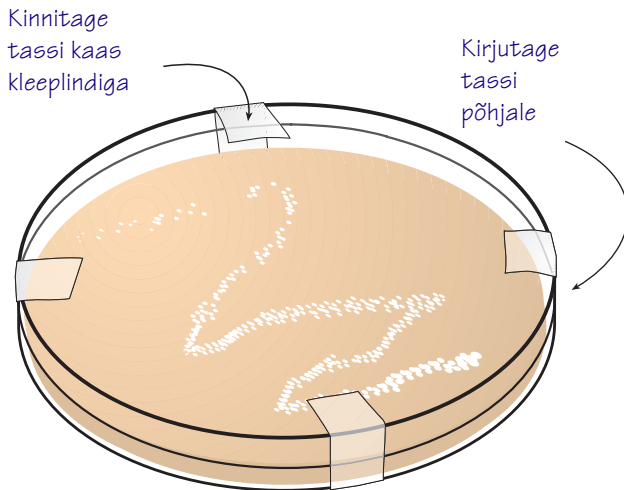
Külviaasa tuleb kuumutada, kuni kogu leegis olev osa hakkab hõõguma. Seda tuleb teha nii enne kui pärast kultuuride käsitlemist. Külviaasa tuleb lähendada Bunseni põleti leegile aeglaselt, et vähendada särise- mist ja aerosoolide teket.

Sel ajal kui põletit ei kasutata, on soovitatav reguleerida leek kollaseks, sest see on hästi märgatav. Külviaasade, traatide ja pudeli- kaelade steriliseerimiseks tuleks kasutada umbes 5 cm kõrgust sinist leeki.

Vältige töölaua saastumist. Steriliseerige instrumendid kohe pärast kasutamist, pipetid asetage kohe värske desinfitseeriva lahusega nõusse.

Kultuuride kasvatamine

Kirjutage Petri tasside alumistele külgedele enne külvamist nimi, kuupäev ja kasutatud organismi nimi või allikas. Vajadusel kleepige Petri tassi alus ja kaas kleeplindiga kinni, nagu on näidatud joonisel.



Kinnikleepimine hoiab ära tassi juhusliku avanemise ja saastumise. NB! Ärge tõmmake kleeplinti horisontaalselt ümber äärte, sest selline kinnitus võib luua tassi sees anaeroobsed tingimused.

Bakterid

Bakterikultuuri kasvatamisel Petri tassil pööratakse see ümber. Nii langeb kondenseerunud vesi kaanele ega satu kolooniatele. (Kui steriilsel Petri tassil on palju kondenseerunud vett, tuleb tass enne kasutamist kuivatada.)

Bakterikolooniad ilmuvad nähtavale peale 2-3-päevast kasvatamist temperatuuril 25-30 °C.

Seened

Seeni sisaldavaid Petri tasse ei ole vaja tagurpidi keerata. Seenekultuure kasvatatakse umbes 7 päeva. Kuigi toatemperatuur (21 °C) on küllaldane, võimaldab termostaat protsessi paremini kontrollida.

Jäätmete likvideerimine ja steriliseerimine

Kõik praktikumis kasutatud materjalid tuleb likvideerida õigel viisil, et vältida labori ja inimeste saastumist. Nõud, mida kasutati kultuuride kasvatamiseks ja säilitamiseks, tuleb enne järgmist kasutamist autoklaavida, pesta desinfitseeriva vahendiga ja loputada.

Laborisse on vaja kahte autoklaavimiskotti: üks taaskasutatavate klaasnõude jaoks ja teine äravisatava materjali jaoks. Igas töökohas peaks olema üks suur nõu pipettide ja teine väike - mikroskoobi alusklaaside jaoks. Purunenud klaas visatakse metallämbrisse.

Äravisatavad plastmassist pipetid, mikroskoobi alus- ja katteklaid ning kultuuridest väljajambunud vedelik tuleb panna väikesesse desinfitseeriva vedelikuga nõusse. Plastmassist pipetid autoklaavitakse ja visatakse seejärel ära. Mikroskoobi alus- ja katteklaid leotatakse 24 tundi desinfitseerivas vedelikus, pestakse ja loputatakse.

Seejärel võib neid uuesti kasutada. Klaasist pipetid tuleks asetada suuremasse nõusse. Ärge võtke pumpa pipeti küljest ära enne, kui pipeti ots on viidud desinfitseerivas vedelikku, sest muidu võivad tekkida aerosoolid. Pipetid tuleb enne uut kasutamist autoklaavida, pesta ja loputada.

Saastunud paberrätid, lapid ja plastmassist Petri tassid tuleb panna äravisatavate asjade autoklaavimiskotti. Saastunud klaasnõud, kaasaarvatud klaasist Petri tassid, asetatakse klaasist asjade autoklaavimiskotti.

Klaasnõud, mis ei ole saastunud, pestakse tavaliselt. Purunenud klaas visatakse spetsiaalselt selle jaoks mõeldud prügikasti. Kui saastunud klaasnõu puruneb, tuleb see enne äraviskamist autoklaavida. Purunenud klaasi, mis pole mikroorganismidega kokkupuutes olnud, võib kohe ära visata.

Autoklaavimine

Steriliseerimine on kõigi mikroorganismide ja nende spooride täielik hävitamine. Kogu varustus tuleb enne praktikumi steriliseerida. Kultuurid ja saastunud materjal steriliseeritakse ka pärast kasutamist, et need seejärel ohutult likvideerida. Söötmete, vesilahuste ja kultuuride steriliseerimiseks sobib kõige paremini autoklaavimine. Selleks kasutatakse kõrgsurvel olevat auru, tavaliselt temperatuuril 121 °C. Niiske kuumus tapab mikroorganisme paremini kui kuiv, sest aur denatureerib nende valke. Autoklaavida saab ka koduse kiirkeetjaga, kuid kuna selle maht on väike, siis võib tekkida raskusi kogu klassi jaoks materjali steriliseerimisega.

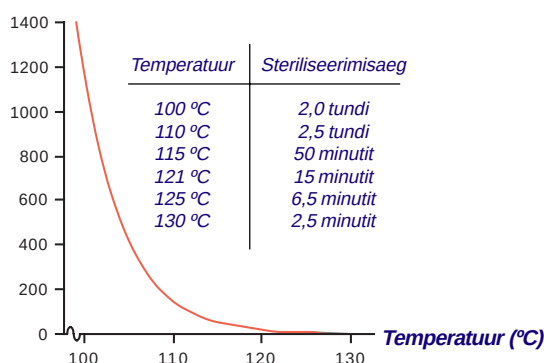
Autoklaavimise põhimõtted

Alljärgnevalt on esitatud korrektse autoklaavimise kaks olulisemat nõuet:

1. Autoklaavist tuleb õhk täielikult eemaldada. See garanteerib kõrgel temperatuuril oleva auru kokkupuute steriliseeritavate pindadega. Õhu juuresolekul on samal rõhul oleva auru temperatuur madalam. Steriliseeritavad materjalid ei tohi olla tihedalt pakitud. Õhk peab saama nende vahelt väljuda. Kinnikeerataivate kaantega pudelid ja purgid ei tohi olla suletud, sest rõhk võib nende sees ohtlikult kõrgele tõusta.
2. Autoklaavimine peab kestma piisavalt pikka aega, et kuumus saaks tungida Petri tassis või teistes nõudes oleva söötmeni. Järgnev tabel näitab, kui kaua tuleb mingil temperatuuril söötmeid või töövahendeid autoklaavida.

Väike erinevus temperatuuris põhjustab suuri erinevusi autoklaavimise ajas. Temperatuur

Steriliseerimisaeg (minutites)



peab määratud aja jooksul mõjuma kõigile steriliseeritavatele materjalidele, nt. söötmele fermenteri sisemuses.

Autoklaavimise koguaeg koosneb kolmest osast:

- **temperatuuri ühtlustumise aeg** - aeg, mis kulub autoklaavi keskel paiknevatel materjalidel nõutud temperatuuri saavutamiseks;
- **hoidmise aeg** - minimaalne aeg, mille kestel etteantud temperatuuril kõik elusorganismid surevad;
- **ohutuse tagamise aeg** - tavaliselt moodustab see poole hoidmise ajast.

Kodused kiirkeetjad töötavad temperatuuril 121 °C. Seega steriliseerimise aeg moodustub umbes 5-minutilise ühtlustumise ajast, 15-minutilise hoidmise ajast ja umbes 5-minutilise ohutuse tagamise ajast, mis annab kokku 25 minutit.

Nõu	Maht	Steriliseerimisaeg
Katseklaas	20 ml	12-14 min.
Kolb	50 ml	12-14 min.
Kolb	200 ml	12-15 min.
Fermenter	1 l	20-25 min.

Karamellistumine

Spetsiaalsed autoklaavid töötavad ka kõrgemal temperatuuril kui 121 °C. Kuigi aja kokkuhoid võib näida kasulik, tuleb meeles pidada, et kõrgem temperatuur mõjub teatud söötmetele lagundavalt. Näiteks glükoosilahus karamellistub kõrgel temperatuuril moodustades ühendeid, mis võivad olla mikroorganismidele mürgised. Seda reaktsiooni saab glükoosi puhul vältida keskkonna reaktsiooni viimisega pH 4-ni. Vajadusel saab pärast steriliseerimist pH-d jälle muuta.

Maillard'i reaktsioon

Söötmete lämmastikühendid ja süsivesikud tekitavad kõrgel temperatuuril pruunistumise reaktsiooni (Maillard'i reaktsiooni). Moodustuvad ühendid on mõnede mikroorganismidele mürgised. Teatud juhtudel võib osutuda vajalikuks autoklaavida süsivesikud ja ülejäänud osa söötme eraldi, nt. piimaagari ettevalmistamisel.

Autoklaavi kasutamine ja hooldamine

Kiirkeetja või autoklaavi kasutamisel tuleb alati järgida tootjapoolseid instruktsioone. Eriti hoolikalt peab jälgima, et autoklaavis oleks piisavalt vett. Koduses majapidamises kasutatavatesse kiirkeetjatesse tuleb panna vähemalt 250 ml vett, kuid suuremates autoklaavides kulub seda tunduvalt rohkem. Destilleeritud või deioniseeritud vee kasutamine hoiab ära katlakivi moodustumise. Pärast kasutamist kuivatatakse autoklaav hoolikalt. Kui seda ei tehta, siis võib autoklaavi põhi kahjustuda, mille tagajärjel see rõhu all väljapoole kummub.

Pärast autoklaavi kasutamist laske veeaurul ja õhul umbes ühe minuti jooksul väljuda, enne kui sulete väljalaskekraani. Kui autoklaavi tsükkel on lõppenud, tuleb lasta selle sisul jahtuda ning siserõhul ümbritseva atmosfääri rõhuni langeda. Autoklaavi ega selle klappe ei tohi avada, kui need on rõhu all, sest see võib põhjustada põletusi. Kaane enneaegne allalaskmine ja seejärel rõhu vähendamine võib ajada

vedeliku autoklaavis keema. Agar või toitelahus võivad keeda üle nõude äärte.

Keemiline steriliseerimine

Steriliseerida võib erinevate kemikaalidega. Laborikatsetes kasutatakse kõige sagedamini fenoolseid ühendeid ja hüpokloriteid. Fenoolsed ühendid on efektiivsed bakterite ja seente vastu, kuid ei hävita eoseid ja kõiki viirusi. Kokkupuude kummi, puu ja plastikuga inaktiveerib neid ühendeid teatud määral. Laborites kasutatakse fenoolseid ühendeid pindade desinfitseerimiseks ja äravisatava materjali hoidmise nõudes.

Hüpokloritid (nt. valgendajad) ei ole kõige sobivamad Petri tasside steriliseerimiseks, sest valgud ja plastmassist materjalid võivad neid inaktiveerida. 5% *Domestos*'e (Lever) või *Chlorate I* lahust võib kasutada äravisatava materjali nõudes.



Lisa 3

Lüofiliseeritud kultuuriga ampulli avamine

Biotehnoloogialase Hariduse Euroopa Initsiatiivgrupp

MOODUL
1

Ampulli avamine



NB! Kaitseprillide kandmine on kohustuslik, sest ampulli avamisel võib lennata klaasikilde.

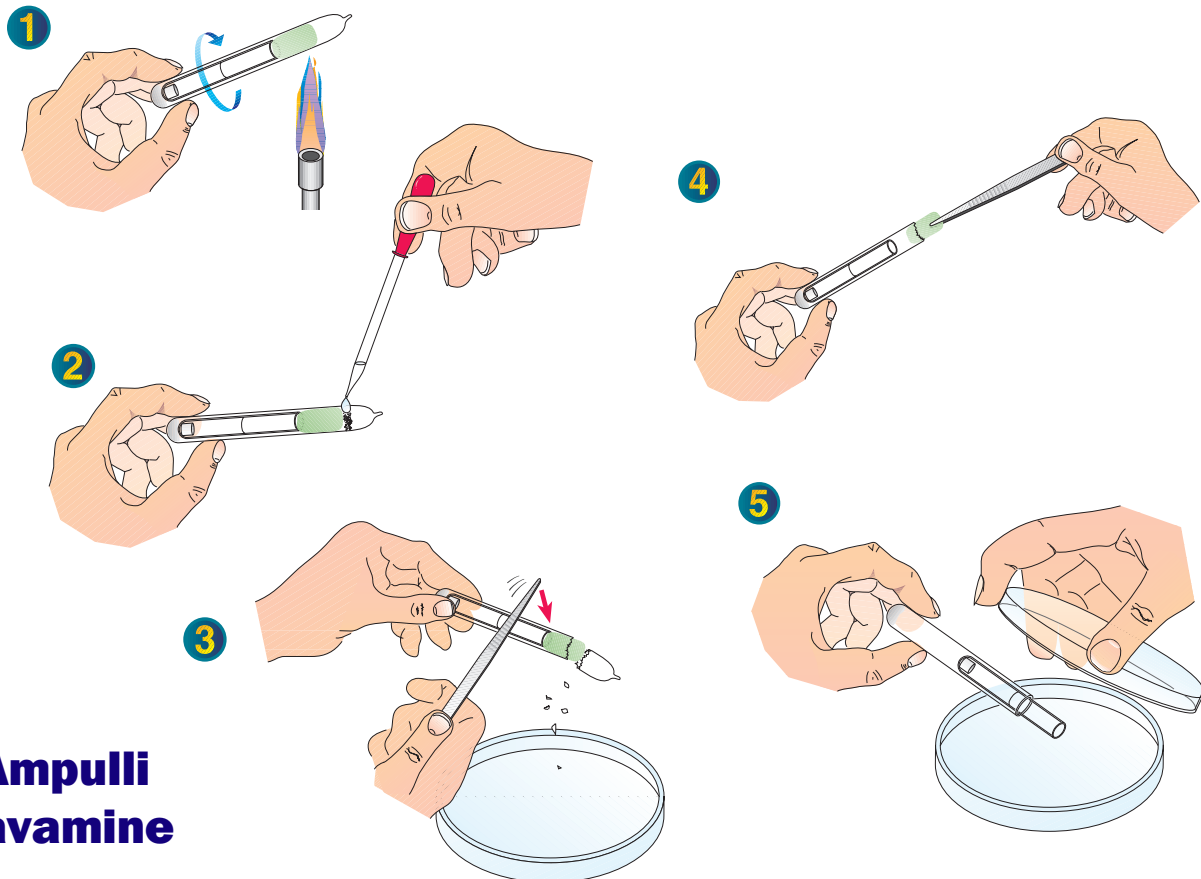
1. Kuumutage veidi ampulli teravat otsa igast küljest Bunseni põleti leegis (vt. joonist).
2. Tilgutage pipetiga üks tilk külma vett ampulli kuumutatud otsale. Klaasile peaks tekkima mõra.
3. Murdke pintsettidega ampulli ots ära, nii et klaasikillud kukuksid Petri tassile. Klaasikillud visake selleks ettenähtud nõusse.
4. Eemaldage pintsettidega vatikork, mis hoiab sisemist katseklaasi ampullis paigal.
5. Kallake sisemine katseklaas ettevaatlikult Petri tassile. Katke tass kaanega.

Lüofiliseeritud kultuuri elustamine

1. Eemaldage pintsettidega vatikork ja kuumutage sisemise katseklaasi suuet.
2. Lisage sisemisse katseklaasi umbes 1 ml steriilset toitelahust.
3. Kuumutage uuesti katseklaasi suuet ja asetage vatikork tagasi. Kultuur elustub ligikaudu 20 minuti jooksul.
4. Segage steriilse külviaasaga katseklaasi sisu hästi läbi ja valage sisu steriilsesse katseklaasi, mis sisaldab umbes 5 ml toitelahust.
5. Hoidke kultuuri ööpäeva jooksul temperatuuril 30 °C.

Järgmisel päeval ...

6. Viige steriilse külviaasaga tilk mikroorganismide segu agariga tassile. *Sellega kontrollime, kas kultuur pole saastunud: tassil peaksid kasvama bakkama ainult ühte tüüpi kolooniad.*



**Ampulli
avamine**