

Masarykova univerzita v Brně

Přírodovědecká fakulta

Katedra mikrobiologie

Laboratorní cvičení z fyziologie bakterií

Řešitelé: Horáková Dana, Němec Miroslav

Technická spolupráce: Szostková Monika

Podporováno Fondem rozvoje vysokých škol MŠMT č. 508, F4, 2003

Obsah

1	Růst a množení bakteriálních buněk	4
1.1	Plotnová metoda	4
1.2	Bioscreen C - stanovení pH optima pro růst buněk	5
2	Bakteriální biomasa	8
2.1	Stanovení bílkovin metodou podle Bradfordové	8
2.2	Stanovení bakteriální sušiny	10
3	Půdní biomasa	12
3.1	Stanovení půdní biomasy metodou ninhydrin-reaktivního dusíku	12
3.2	Fumigační extrakční metoda pro stanovení fosforu půdní mikrobiální biomasy	14
3.3	Stanovení ATP	15
3.4	Stanovení půdní respirace	17
3.5	Stimulace půdní respirace přidavkem lehce využitelného substrátu	19
4	Studium bakteriofága	21
4.1	Stanovení jednostupňové růstové křivky fága metodou dvouvrstevného agaru	21
4.2	Stanovení průměrného fágového výnosu metodou single-burst experimentu	23
4.3	Sledování lyze hostitelských buněk v adsorpční směsi	24
4.4	Příprava fágového lyzátu ϕ 812	25
5	Indukce lyze	28
5.1	Optimalizace dávky UV záření metodou titrace uvolněných virionů	28
5.2	Průběžné sledování lyze ozářených buněk lyzogena	29
6	Dehydrogenázová aktivita bakteriálních buněk	31
6.1	Stanovení dehydrogenáz s využitím umělého akceptoru vodíku a elektronů	31
6.2	Stanovení aktivity malát dehydrogenázy	33
7	Inducibilní enzymy u bakterií	35
7.1	Kinetika indukce β -galaktosidázy	35
7.2	Změny v indukci β -galaktosidázy v přítomnosti virulentního bakteriofága	36
8	Fosfatázová aktivita	39
8.1	Stanovení fosfatázové aktivity nativních bakteriálních buněk	40
8.2	Stanovení fosfatázové aktivity HEP	41
8.3	Stanovení vlivu teploty na fosfatázovou aktivitu buněk <i>S. aureus</i> SA 812	42
9	Oxidační aktivita bakteriálních buněk	44
9.1	Vliv složení kultivačního média na oxidační aktivitu bakterií	44
9.2	Stanovení vlivu teploty na oxidační aktivitu kvasinek	46
10	Lipolytická aktivita	48
10.1	Izolace a aktivita lipáz u buněk <i>S. aureus</i>	48
10.2	Stanovení exolipáz s využitím chromogenního substrátu	50
11	Enzymatická aktivita půdního vzorku	52
11.1	Stanovení proteázové aktivity	52
11.2	Stanovení ureázové aktivity I	54
11.3	Stanovení ureázové aktivity II	55
11.4	Stanovení celulázové aktivity I	57
11.5	Stanovení celulázové aktivity II	58
12	Stanovení biodegradability ropných látek	60

12.1 Stanovení biologické rozložitelnosti hexadekanu s využitím metody Oxi-Top	60
12.2 Využití mikroorganismů k degradaci kontaminovaných půdních vzorků	61
13 Stanovení akutní toxicity	63
13.1 Stanovení změn akutní toxicity půdního výluhu v průběhu biodegradace	63

1 Růst a množení bakteriálních buněk

Úvod

Množení bakterií sledujeme zpravidla podle počtu bakteriálních buněk, který lze stanovit přímo, pomocí upravené počítací komůrky nebo nepřímo nefelometricky, výsevem na agarové plotny s následným počítáním vyrostlých kolonií nebo užitím vhodných fyziologických metod. Různé typy metod stanovení počtu bakteriálních buněk mají svoje přednosti, ale na druhé straně i nevýhody. Výhodou nefelometrického stanovení, zejména s využitím automatických systémů, je relativně rychlé a technicky málo náročné vyhodnocení, poskytující získání poměrně přesných hodnot. Na druhé straně je však tato metoda zatížena chybou vyplývající ze skutečnosti, že na zákalu buněčné suspenze se podílejí i mrtvé buňky. Tento nedostatek může být do značné míry odstraněn stanovením počtu životaschopných bakterií plotnovou metodou. Nevýhodou plotnové metody stanovení počtu buněk je však její časová a materiálová náročnost.

1.1 Plotnová metoda

Princip metody

Životaschopné mikrobiální buňky na vhodných ztužených kultivačních médiích vytvářejí kolonie, které jsou tvořeny potomstvem jedné mikrobiální buňky. Výsevem buněk na živné médium v daných časových intervalech lze posoudit změnu v počtu buněk v tekutém médiu v průběhu kultivace.

Materiál a zařízení

- **Mikroorganismy :**
Salmonella typhimurium LB 5000
- **Chemikálie a roztoky:**
tekuté [LB-médium](#) , [LB-agar](#)
- **Přístroje:**
vodní lázeň s třepačkou, termostat

Postup

Celý pracovní postup provádíme přísně sterilně ve flow-boxu. Do 10 ml LB-média naočkujeme kličku bakteriální kultury uchovávané na šikmém LB-agaru. Kultivujeme staticky 12 hodin při 37 °C. 2 ml narostlého inokula očkujeme do 100 ml LB-média (výsledná koncentrace buněk cca $5 \cdot 10^7$ CFU/ml) a kultivujeme ve vodní lázni při 37 °C (150 kvů/min., amplituda 7). Odběry vzorků provádíme v časových intervalech 0; 30; 60; 90; 120; 150; 180; 210; 240; 270; 300 minut. Sterilně odebraný vzorek (cca 2 ml) ředíme v tekutém LB-médiu. Pro časové intervaly 0-150 minut doporučujeme ředění 10^{-4} , 10^{-5} a 10^{-6} , pro ostatní časové intervaly ředění 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} . Z jednotlivých ředění vyséváme po 0,1 ml na Petriho misky s LB-agarem a rozetřeme po povrchu agaru sterilní hokejkou. Pro každé ředění volíme nejméně dvě opakování. Naočkované misky kultivujeme v termostatu při 37°C obrácené dnem vzhůru. Po 24 hodinách kultivace odečteme vytvořené kolonie a provedeme hodnocení růstu.

Vyhodnocení a závěr

Stanovení počtu buněk v bakteriální kultuře

Průměrný počet buněk ve vzorku odebraném v čase t:

$$\text{CFU/ml} = \text{počet kolonií na misce} \times 1/\text{použité ředění} \times 10$$

Sestrojení růstové křivky

Grafická závislost log CFU/ml na době kultivace buněk (t = 0-300 min.)

Růstové parametry

Výpočet doby lagu (L), průměrné konstanty rychlosti růstu (k), průměrné generační doby (g), specifické růstové rychlosti (μ)

1.2 Bioscreen C - stanovení pH optima pro růst buněk

Princip metody

Plně automatické zařízení Bioscreen C umožňuje provádět velké množství testů v několika dnech či týdnech. V jednom pokusu lze sledovat růst buněk až ve 200 vzorcích (na dvou inkubačních destičkách). Testy je možné provést 10 až 20-krát rychleji než s použitím běžných manuálních technik. Zařízení je schopno měřit pomocí speciálních filtrů zákal mikrobiální kultury v tekutém růstovém médiu. Inkubační teplotu lze nastavit od 1 do 60°C. Systém Bioscreen C se skládá z inkubační a měřicí jednotky (Obr. 1) a z počítače, ve kterém je instalován odpovídající software sloužící k zaznamenávání růstových křivek a jejich vyhodnocení. Inkubace, míchání a kinetická měření probíhají automaticky podle nastavených parametrů daného pokusu. Zařízení Bioscreen C lze využít pro běžné sledování růstu buněk, sledování vlivu antibiotik, farmak nebo růstových inhibitorů na množící se buňky, stanovení MIC, vývoj nových růstových medií, vlivu pH na růst buněk, sledování průběhu lyze buněk apod.

Materiál a zařízení

- **Mikroorganismy:**

Pseudomonas pictorum CCM 284

- **Chemikálie a roztoky:**

masopeptonový bujon č.1 ([MPB1](#)) o různé hodnotě pH; masopeptonový agar č. 1 ([MPA1](#))

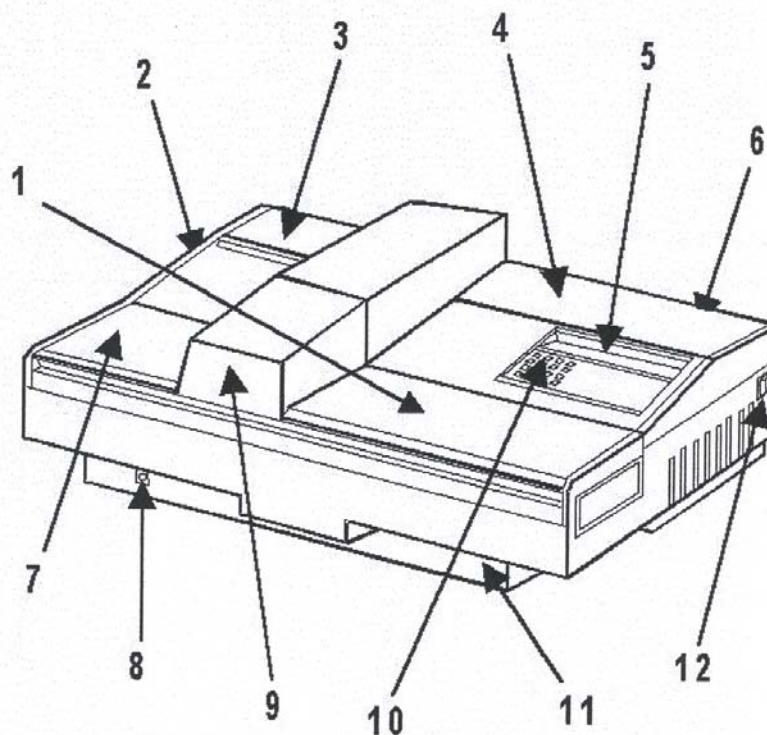
- **Přístroje :**

Bioscreen C (software BioLink v DOS, export dat do MS EXCEL)

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

Postup

Celý pracovní postup provádíme přísně sterilně ve flow-boxu. Inokulum získáme naočkováním 20 ml MPB 1 přibližně 10^8 CFU/ml *Pseudomonas pictorum* ze šikmého agaru (MPA 1). Buňky inkubujeme 24 h v termoboxu za intenzivního třepání (128 kyvů/min.) při teplotě 26 °C. Sterilní inkubační destička přístroje obsahuje 100 jamek (Obr. 2). Do 5 jamek sterilně pipetujeme 330 μ l MPB 1 o odpovídající hodnotě pH (použijeme automatickou pipetu). Např. jamky 1 až 5 plníme bujonem o hodnotě pH 5,5; jamky 6 až 10 – pH 6,5; jamky 11 až 15 – pH 7,0; jamky 16 až 20 – pH 7,5. Do všech jamek přidáme 10 μ l čerstvého inokula. Kultivaci provádíme při teplotě 26 °C po dobu 48 hodin. Měření zákalu při vlnové délce $\lambda = 600$ nm probíhá každé 2 hodiny podle nastavení parametrů na Bioscreen C.

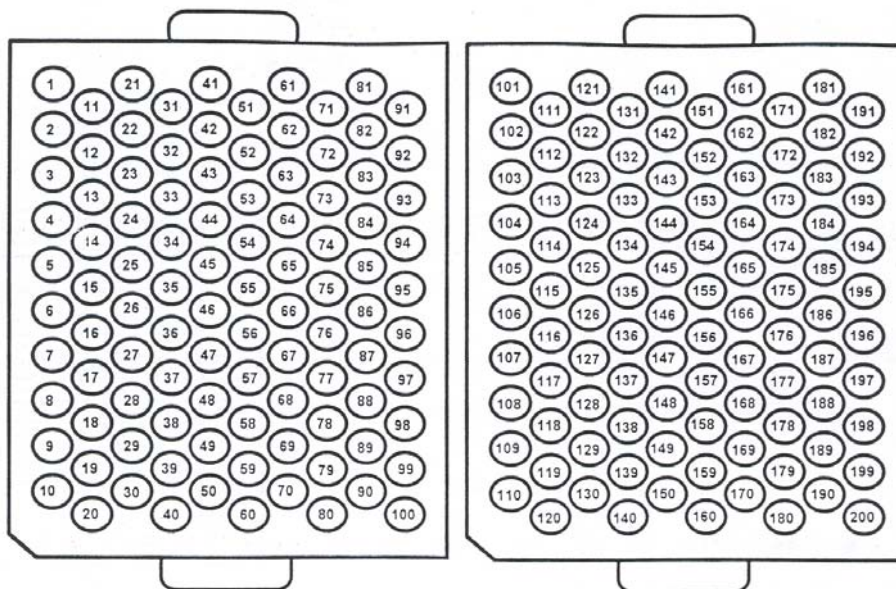


- | | |
|---------------------------------------|--|
| 1. Oddělení pro inkubaci | 7. Dávkovací systém |
| 2. Hadička pro nasávání živného media | 8. Otvor na doplnění chladícího media |
| 3. Oddělení pro filtr a lampu | 9. Oddělení pro měření OD |
| 4. Zdroj energie | 10. Klávesnice pro spuštění servisního testu |
| 5. Displej | 11. Systém pro zahřívání a ochlazování |
| 6. Místo pro zapojení PC kabelu | 12. Tlačítko pro zapnutí, vypnutí přístroje |

Obr. 1 Zařízení Bioscreen C

Nastavení parametrů přístroje (provádíme podle návodu za přítomnosti obsluhujícího personálu):

Otevřeme program v systému MS DOS. Nastavíme nový program podle návodu. Vyplníme kolonku pro bližší popis testu. Po zobrazení destičky zvolíme šipkami a mezerníkem „Simple editor“ a „Grafical well map“. Zadáme konečný objem v jamce, zadáme jednotky, ve kterých bude provedeno měření, zvolíme počet opakování pro daný vzorek a popis vzorku. Zvolíme počet vzorků. Zadáme parametry měření (pomocí všech 4 šipek a potvrzujeme Enter). Stisknutím tlačítek Ctrl + Enter odsouhlasíme parametry, kurzor umístíme na Measurement a zahájíme měření stisknutím tlačítka Enter.



Obr. 2 Inkubační destičky

Vyhodnocení a závěr

Po zpracování výsledků softwarem Bioscreen C vytisknout hodnoty OD_{600} do tabulky. Vypočítat průměrné hodnoty zákalu z 5 opakování a sestavit růstovou křivku. Z průměrných hodnot střední generační doby pro kulturační média o různé hodnotě pH (výpočet bude proveden automaticky softwarem po převedení do MS Excel) sestavit graf závislosti průměrné generační doby na zvolené hodnotě pH kulturačního média.

Literatura

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

2 Bakteriální biomasa

2.1 Stanovení bílkovin metodou podle Bradfordové

Úvod

Při některých pokusech, zaměřených zejména na studium enzymatické aktivity buněk, je nutné vztahovat naměřené hodnoty na konstantní jednotku biomasy. Tímto přepočtem obdržíme hodnoty, které lze mezi sebou srovnávat, třebaže jsou experimenty prováděny v různých časových odstupech nebo na různých mikroorganismech. V běžné laboratorní praxi je enzymatická aktivita nejčastěji vztahována na sušinu, bílkovinu, dusík apod. Pro stanovení koncentrace bílkovin může být využita celá řada metod, lišících se rozsahem stanovení a dobou nutnou k jejich provedení. Mezi nejznámější používané metody stanovení bílkovin v biologickém materiálu patří např. Biuretová metoda, Folinova metoda, Lowryho metoda, metoda dle Bradfordové, fluorescence, polarografie a další. Mezi velmi přesné metody stanovení bílkovin patří metoda dle Bradfordové, která je standardizovaná v programu spektrofotometru Spectronic GenesysTM 5.

Princip metody

Při vazbě Coomassie Brilliant Blue G250 na bílkovinu dochází k posunu absorpčního maxima z 464 nm na 595 nm. Vzrůst absorbance při 595 nm může být použit jako měřítko koncentrace bílkovin. K posunu absorpčního maxima dochází velmi rychle (2-5 min) a vybarvení je stabilní nejméně jednu hodinu. Metoda je vhodná pro všechny proteiny, ačkoliv počet vazeb s barvivem může být proměnlivý v závislosti na obsahu základních aminokyselin v bílkovině. Je proto důležité, aby standardní roztok bílkoviny měl obdobné složení jako testovaný vzorek. Hodnoty absorbance může zvyšovat přítomnost detergentů ve vzorku. Pro každé stanovení je nutné sestavení kalibrační přímky.

Materiál a zařízení

- **Mikroorganismy:**

Micrococcus luteus, *Pseudomonas putida*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* (ze sbírky ústavu)

- **Chemikálie a roztoky:**

[MPB1](#); [pufr fosfátový](#) (0,05M;pH = 7,2); zásobní roztok lidského albuminu (0,1 g v 10 ml fosfátového pufru); [čínidlo Coomassie Brilliant Blue G250](#)

- **Přístroje:**

chlazená centrifuga; fotometr Spekol 11; spektrofotometr Spectronic GenesysTM5

Postup

Příprava vzorku. 100 ml MPB 1 v promývací láhvi naočkujeme 1 kličkou zásobní kultury ze šikmého agaru. Kultivujeme 24 h při 30°C za intenzivní aerace. Takto připravené kultury různých mikroorganismů centrifugujeme v chlazené centrifuze při 6000 ot.min⁻¹ (teplota +4°C) po dobu 20 min. Supernatant opatrně slijeme, buněčný sediment resuspendujeme ve fosfátovém pufru a znovu centrifugujeme v chlazené centrifuze. Tento proces opakujeme nejméně dvakrát (tzv. promývání buněk), abychom z povrchu buněk odstranili balastní organické látky. Bakteriální sediment ředíme fosfátovým pufrům tak, aby zákal suspenze při $\lambda = 600$ nm odpovídal cca 80%. Přesnou hodnotu zákalu suspenze zaznamenejme. Sušinu bakteriální suspenze stanovíme podle postupu v kapitole 2.2.

Příprava standardů. Ředěním zásobního roztoku lidského albuminu (0,1 g /ml) destilovanou vodou připravíme 5 standardních koncentrací pro sestavení standardní přímky : 200; 400; 600; 800; 1000 μg albuminu /ml .

Měření (program Bradford-standard, Genesys)

Sestavení standardní přímky.

K 0,1 ml standardu v měřicí kyvetě přidáme 5 ml činidla Coomassie Brilliant Blue G250. Promícháme a měříme při vlnové délce 595 nm.

Posice v zásobníku:

Pozice 1	0,1 ml dest. vody + 5 ml činidla	(Blank)
Pozice 2	0,1 ml dest .vody + 5 ml činidla	(0 $\mu\text{g}/\text{ml}$)
Pozice 3	0,1 ml 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ + 5 ml činidla	(200 $\mu\text{g}/\text{ml}$)
Pozice 4	0,1 ml 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ + 5 ml činidla	(400 $\mu\text{g}/\text{ml}$)
Pozice 5	0,1 ml 600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ + 5 ml činidla	(600 $\mu\text{g}/\text{ml}$)
Pozice 6	0,1 ml 800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ + 5 ml činidla	(800 $\mu\text{g}/\text{ml}$)
Pozice 7	0,1 ml 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ + 5 ml činidla	(1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

Stanovení koncentrace bílkovin ve vzorku. K 0,1 ml vzorku přidáme 5 ml činidla, promícháme a měříme. Vzorek vkládáme na pozici 2. Na pozici 1 ponecháme kyvetu „Blank“ z předchozího měření.

Vyhodnocení a závěr

Porovnat studované kmeny na základě obsahu bílkovin vztažených na hmotnost sušiny vzorků.

Literatura

Holme D.J.,Peck,H.(1994). Analytical biochemistry.J.Wiley and Sons, Inc., New York

Bradford,M.(1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal.Biochem. 72:248-254.

2.2 Stanovení bakteriální sušiny

Úvod

Při některých pokusech, zaměřených zejména na studium enzymatické aktivity buněk, je nutné vztahovat naměřené hodnoty na určitou jednotku biomasy. Tímto přepočtem obdržíme hodnoty, které lze mezi sebou srovnávat, třebaže jsou experimenty prováděny v různých časových odstupech nebo na různých mikroorganizmech. V běžné laboratorní praxi je enzymatická aktivita nejčastěji vztahována na sušinu, bílkovinu, dusík apod. Stanovení bakteriální sušiny patří k nejjednodušším metodám umožňujícím porovnání metabolické aktivity mikrobiálních buněk. Tato metoda je však nevhodná pro mikroorganismy s vysokým obsahem lipidů, např. pro některé kvasinky.

Princip metody

Sušení biologického materiálu za zvýšené teploty

Materiál a zařízení

- **Mikroorganismy:**

Micrococcus luteus, *Pseudomonas putida*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*
(ze sbírky ústavu)

- **Materiál:**

vysušené váženky s víčkem uložené v exikátoru

- **Chemikálie a roztoky:**

[MPB1](#); [pufr fosfátový](#) (0,05M; pH = 7,2);

- **Přístroje:**

chlazená centrifuga; fotometr Spekol 11; analytické váhy s přesností 0,1 mg; sušárna

Postup

Příprava vzorku. 100 ml MPB1 v promývací láhvi naočkujeme 1 kličkou zásobní kultury ze šikmého agaru. Kultivujeme 24 h při 30°C za intenzivní aerace. Takto připravené kultury různých mikroorganismů centrifugujeme v chlazené centrifuze při 6000 ot.min⁻¹ (teplota +4°C) po dobu 20 min. Supernatant opatrně slijeme, buněčný sediment resuspendujeme ve fosfátovém pufru a znovu centrifugujeme v chlazené centrifuze. Proces promývání buněk opakujeme nejméně dvakrát. Bakteriální sediment ředíme fosfátovým pufrům tak, aby zákal suspenze při $\lambda = 600$ nm odpovídal hodnotám cca 80%, 85% a 90%. Přesné hodnoty zákalu buněčné suspenze zaznamenáme. Do připravených vysušených, označených a zvážených váženek pipetujeme po 2 ml buněčné suspenze o odpovídající hustotě ve dvou opakováních. Do dvou váženek pipetujeme pouze fosfátový pufr. Váženky s odklopenými víčky umístíme do sušárny a sušíme při 106°C. Po 24 h váženky vyjmeme, uzavřeme víčko a necháme chladnout při pokojové teplotě v exikátoru. Po zvážení provedeme výpočet podle vztahu:

$$S = (V_s - V) / 2 - (V_p - V) / 2 \text{ (mg/ml)},$$

kde

V_s je hmotnost váženky s 2 ml bakteriální suspenze

V je hmotnost použité váženky

V_p je hmotnost váženky s 2 ml fosfátového pufru

S je hmotnost bakteriální sušiny v mg/ml bakteriální suspenze

Vyhodnocení a závěr

Sestrojíme tabulku získaných hodnot. V závěru se zaměříme na odpověď, zda existuje lineární vztah mezi zákalem bakteriální suspenze, koncentrací bílkovin (viz 2.1.) a sušinou.

Literatura

Hod'ák, K., Němec, M. (1985). Praktikum z fyziologie bakterií. Skriptum UJEP Brno

3 Půdní biomasa

3.1 Stanovení půdní biomasy metodou ninhydrin-reaktivního dusíku

Úvod

Mikrobiální biomasa může být definována jako část organické hmoty v půdě, která je tvořena živými mikroorganismy menšími než $5\text{-}10\ \mu\text{m}^3$. Nejčastěji bývá vyjádřena v miligramech uhlíku obsaženém v jednom kilogramu půdy. Půdní biomasa hraje významnou roli při tvorbě struktury půdy a její stabilitě. Je rovněž významným ekologickým markerem. Ke stanovení půdní biomasy je využívána celá řada metod. Některé jsou založeny na barvení a počítání mikrobiálních buněk, jiné na fyziologických parametrech jako je ATP, respirace a výdej tepla nebo na aplikaci extrakčních technik. Při stanovení biomasy v půdě může být prováděno jednak z hlediska sledování indikátoru mikrobiální biomasy- např. produktu mikrobiálního metabolismu, který může být kvantitativně extrahován z půdy, jednak z hlediska kvantitativního stanovení celkového dusíku, organického uhlíku, fosforu a dalších složek extraktu získaného z půdního prostředí po usmrcení a lyzi mikrobiálních buněk, jejichž cytoplazma se uvolňuje do prostředí. Z prostředí jsou uvolněné složky biomasy extrahovány. V extraktu lze rovněž stanovit různými kalibračními metodami celkový dusík, anorganický a organický dusík a ninhydrin-reaktivní dusík.

Princip metody

Ninhydrin tvoří purpurově zbarvený komplex s molekulami obsahujícími α -aminonodusík, podobně jako s amoniem a jinými sloučeninami s volnou α -aminoskupinou (aminokyseliny, peptidy, proteiny). K vytvoření barevné reakce s amoniem je nutná přítomnost redukovaného ninhydrinu. Množství ninhydrin-reaktivních sloučenin uvolněných z mikrobiální biomasy působením par CHCl_3 a následně extrahovaných $0,5\text{M K}_2\text{SO}_4$ je přímo úměrné koncentraci mikrobiální biomasy v půdě.

Materiál a zařízení

- **Materiál:**

vzorek půdy, suchá hmotnost je 50 g

- **Chemikálie a roztoky:**

ninhydrin; CHCl_3 (obě látky jsou toxické!); $0,5\text{M K}_2\text{SO}_4$; [pufr citrátový](#); sorbent vody; 95% etanol s vodou (1:1), [standard ke stanovení ninhydrin-reaktivního dusíku](#)

- **Zařízení:**

vakuová sušička, vývěva, třepačka, mraznička, papírové filtry (Whatman 42), spektrofotometr

Postup

Všechny práce provádíme v digestoři s odtahem!

Vzorek vlhké půdy o hmotnosti sušiny 50 g rozvážíme po 25 g .

Kontrolní vzorek půdy v 250 ml baňce extrahujeme 100 ml $0,5\text{M K}_2\text{SO}_4$ (poměr extraktantu k hmotnosti vzorku půdy je 4:1 v/w) na třepačce (200 kyvů/min). Po 30-ti minutové extrakci vzorek filtrujeme přes papírový filtr (W42).

Další vzorek půdy navážíme do speciální skleněné ampulky o objemu 50 ml a umístíme do sušičky, která je obložena mokrou buničinou. Do prostoru sušičky umístíme lahvičku se sorbentem vody a kádinku obsahující 25 ml CHCl_3 se skleněnými kuličkami. Sušičku napojíme na vakuovou pumpu, kterou vypneme cca po 2 min. silného varu CHCl_3 . Potom inkubujeme uzavřenou sušičku v temnu při pokojové teplotě po dobu 24 h. Po fumigaci je prostor zavzdušněn a provedeno několikanásobné odsátí zbylých par CHCl_3 . Vzorek půdy je přenesen do 250 ml skleněné baňky a podroben extrakci 0,5 M K_2SO_4 a dalšímu zpracování (stejně jako u kontrolního vzorku). Oba extrakty jsou uchovávány při teplotě -15°C .

Do testovací ampulky o objemu 20 ml přidáme tzv. standardní roztoky ke stanovení ninhydrin-reaktivního dusíku, K_2SO_4 -půdní extrakt nebo kontrolní vzorek (0,6 ml). Poté přidáme citrátový pufr (1,4 ml). Po kapkách přidáváme 1 ml ninhydrinu a promícháváme. Nádobka musí být uzavřena hliníkovou zátkou. Testovací nádobku vaříme 25 minut ve vodní lázni. Za tuto dobu by mělo dojít k rozpuštění všech sraženin vzniklých po přidání reagentů. Poté přidáme 4 ml směsi etanol:voda, opět promícháme a měříme zbarvení při vlnové délce 570 nm.

Vyhodnocení a závěr

- Výpočet extrahovaného ninhydrin-reaktivního dusíku (N_{nin})

$$N_{\text{nin}}(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1} \text{ půdy}) = (S - B) : L \times N \times (K:DW + W) \times 1000$$

S.....absorbance vzorku

B.....absorbance blanku

L.....molární absorpční koeficient leucinu

N.....14 (molekulová hmotnost dusíku)

K....objem extraktu

DW..hmotnost sušiny vzorku v gramech

W....vlhkost půdy (%hmotnosti sušiny:100)

- Výpočet ninhydrin-reaktivního dusíku v mikrobiální biomase

$$B_{\text{nin}} = (N_{\text{nin}} \text{ extrahovaný z fumigované půdy}) - (N_{\text{nin}} \text{ extrahovaný z kontrolního vzorku})$$

- Výpočet uhlíku v mikrobiální biomase

$$C = B_{\text{nin}} \times 20,6$$

Pozn.: Uvedený faktor byl vypočten ze vztahu obsahu uhlíku v mikrobiální biomase a hodnot B_{nin} u 12 vzorků zpracovaných výše uvedenou fumigační extrakční metodou.

Literatura

Brookes, P.C., Landman, A., Puden, G., Jenkinson D.S. (1985). Chloroform fumigation and the release of soil nitrogen: a rapid direct extraction method to measure microbial biomass nitrogen in soil. *Soil Biol. Biochem* 17: 837-842.

Vance, E.D., Brookes, P.C., Jenkinson D.S. (1987). An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biol. Biochem.* 19: 703-707.

Amato, M., Ladd, J.N. (1988). Assay for microbial biomass based on ninhydrin-reactive nitrogen in extracts of fumigated soil. *Soil Biol. Biochem.* 20: 107-114.

Joergensen, R.G., Brookes P.C., Jenkinson, D.S. (1990). Survival of the soil microbial biomass at elevated temperatures. *Soil Biol. Biochem.* 22: 1129-1136.

3.2 Fumigační extrakční metoda pro stanovení fosforu půdní mikrobiální biomasy

Úvod

Viz kapitola 3.1.

Princip metody

K výpočtu obsahu fosforu v půdní mikrobiální biomase používáme rozdíl mezi množstvím fosfátu stanoveného ve fumigované a nefumigované půdě (Fumigace půdy je popsána v kapitole 3.1). Vzhledem k tomu, že některé fosfáty zůstávají po fumigaci sorbovány na koloidní půdní částice, je nutné provádět korekci naměřených hodnot.

Materiál a zařízení

- **Materiál:**

vzorek půdy (s malým obsahem jílu), suchá hmotnost 30g

- **Chemikálie a roztoky:**

CHCl_3 (*látka je toxická!*); roztok 0,5M NaHCO_3 ; [pufr citrátový](#); sorbent vody; 95% etanol s vodou (1:1); roztok KH_2PO_4 (250 mg fosforu $\cdot \text{l}^{-1}$); [čínidlo A](#); [čínidlo B](#); 4,5 M H_2SO_4 ; 10M NaOH

- **Zařízení:**

vakuová sušička, vývěva, třepačka, mraznička, papírové filtry (Schleicher a Schuell 595 ½), spektrofotometr, centrifuga

Postup

Fumigace a extrakce. Vlhkou půdu (30 g suché hmotnosti) rozdělíme do tří vzorků po 10 g suché hmotnosti.

První vzorek bude sloužit jako nefumigovaná kontrola. Tento vzorek umístíme do centrifugační zkumavky o objemu 250 ml a extrahujeme 200 ml roztoku 0,5M NaHCO_3 po dobu 30 min za intenzivního třepání ($150 \text{ kvů} \cdot \text{min}^{-1}$). Výslednou suspenzi centrifugujeme (2000 g) a pak filtrujeme přes papírový filtr (Schleicher a Schuell 595 ½).

Druhý vzorek (druhá nefumigovaná kontrola výtěžku) umístíme do centrifugační zkumavky o objemu 250 ml a extrahujeme 200 ml roztoku 0,5M NaHCO_3 s 1 ml roztoku KH_2PO_4 , čímž dosáhneme ve vzorku půdy zvýšenou koncentraci fosforu (o $25 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$). Podobně jako v prvním případě připravíme pro další měření filtrát vzorku.

Třetí vzorek fumigujeme podle postupu uvedeného v kapitole 3.1.. Po fumigaci vzorek zpracujeme jako nefumigovanou kontrolu bez přídavku fosforu.

Měření fosfátu. 75 ml půdního extraktu v baňce o objemu 250 ml okyselíme přídavkem 5 ml 4,5M H_2SO_4 a necháme stát 24 h při $+4 \text{ }^\circ\text{C}$. Pomocí papírku stanovíme hodnotu pH extraktu. Při hodnotě přesahující $\text{pH}=1,5$ je nutné extrakt dále okyselit 4,5 M H_2SO_4 .

Extrakt filtrujeme přes papírový filtr bezprostředně před stanovením anorganického fosforu. Zákal odstraníme centrifugací vzorku. Odebereme 5 ml filtrátu do odměrné baňky o objemu 25 ml. Přidáme 0,4 ml čínidla A a 0,8 ml čínidla B a doplníme do 25 ml destilovanou vodou. Promícháme a necháme stát cca 10 min při pokojové teplotě. Vytvořené modré zbarvení je stabilní po dobu 24 h. Zbarvení měříme při vlnové délce 882 nm na kalibrovaném fotometru. Vzorek porovnáme s kontrolou.

Vyhodnocení a závěr

Výpočet fosforu v mikrobiální biomase (**P**) provedeme podle následujícího vztahu:

$$P = E_P/k_{EP},$$
$$E_P = (F-U) : (Z-U),$$

kde E_P je extrahovaný fosfát, F je $PO_4\text{-P}$ extrahovaný z fumigované půdy, U je $PO_4\text{-P}$ extrahovaný z nefumigované půdy, Z je $PO_4\text{-P}$ extrahovaný z nefumigované půdy s přídatkem fosforu a $k_{EP} = 0,40$ (konstanta). Kalibrace je provedena přidáním známého množství mikroorganismů do půdy, fumigací a měřením poměru extrahovaného mikrobiálního P.

Literatura

Joergensen, R.G. (1995). The fumigation extraction method for microbial biomass phosphorus. In: Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry, Eds. Alef, K., Nannipieri, P., Academic Press London, UK. 394-396.

Brookes, P.C., Powlson, D.S., Jenkinson, D.S. (1982). Measurement of microbial biomass phosphorus in soil. Soil. Biol. Biochem. 14: 319-329.

3.3 Stanovení ATP

Princip metody

ATP se vyskytuje ve všech organizmech a je možné je využít pro stanovení aktivity mikroorganismů. Tato látka je přítomná v živých organizmech, ale ne v organizmech mrtvých nebo v neživé hmotě. ATP může být extrahován jak z buněk, tak i půdy nebo vody a jeho obsah se stanoví systémem, luciferin-luciferáza. Obsah ATP může být, za určitých podmínek, využit jako parametr mikrobiální biomasy v přirozených vzorcích – půda nebo i voda.

Materiál a zařízení

- **Mikroorganismy:**

vzorky půdy

- **Chemikálie a roztoky :**

[Pufr EDTA](#)-magnesium arzenátový, [extraktant](#) TCA-fosfát-paraquant, směs luciferin-luciferáza (Sigma), [standardní roztok ATP](#) 10^{-3}M v EDTA-magnesium arzenátovém pufru

- **Přístroje :**

Luminometr m90a, pH metr, centrifuga, ultrazvukový dezintegrátor Bandelin UW 200

Postup

Příprava vzorku : Vzorek vysušené půdy protlačíme přes síto o velikosti ok 2 mm. Do polypropylenové zkumavky (objem 50 ml) odvážíme 2,5 g homogenizované půdy a vložíme do ledové lázně. Do každé zkumavky přidáme 25 ml studeného extraktantu TCA-fosfát-paraquant. Extrakce se provede v ultrazvukovém dezintegrátoru (100W, 2 min, v ledové lázni). Po ozvučení zkumavky vložíme zpět do ledové vodní lázně a po 20 minutách stání v ledové lázni filtrujeme (filtrační papír Whatman No.4). Filtrát dále centrifugujeme (při $10000\text{ rpm min}^{-1}$, 0°C) po dobu 15 min. Supernatant se potom použije ke stanovení ATP. ATP stanovujeme ihned po centrifugaci nebo vzorek rychle zmrazíme na -15°C . Ve zmraženém stavu je stabilní po dobu 4 týdnů.

Stanovení ATP : V polypropylenové zkumavce (objem 20 ml) smícháme 5 ml EDTA- Mg arzenátového pufru s 50 µl supernatantu a vložíme do ledové lázně. Do měřicí kyvety napipetujeme 50 µl směsi luciferin-luciferáza a umístíme do inkubačního bloku Luminometru vytemperovaného na teplotu +25°C a po 10s změříme “relativní světelné jednotky“ (RLU). Potom přidáme 250 µl připraveného supernatantu a po 10s stanovíme RLU. Měření opakujeme třikrát v jednominutových intervalech. Jako blank slouží kyveta obsahující 50 µl EDTA- Mg arzenátového pufru a 250 µl naředěného supernatantu. Měření RLU je prováděno stejným způsobem jako při měření vzorku.

Stanovení ATP_s : V polypropylenové zkumavce smícháme 5 ml EDTA- Mg arzenátového pufru + 50 µl supernatantu + 50 µl ATP a vložíme do ledové lázně. Do měřicí kyvety napipetujeme 50 µl směsi luciferin-luciferáza a umístíme do inkubačního bloku Luminometru vytemperovaného na teplotu +25°C a po 10s změříme RLU. Potom přidáme 250 µl připraveného supernatantu s ATP a po 10s stanovíme RLU. Měření opakujeme třikrát v jednominutových intervalech. Jako blank slouží kyveta obsahující 50 µl EDTA- Mg arzenátového pufru +250 µl naředěného supernatantu+ 50 µl ATP. Měření RLU je prováděno stejným způsobem jako při měření vzorku.

Kalibrační křivka : Pro sestavení kalibrační křivky použijeme standardních roztoků ATP připravených ředěním ATP v EDTA- Mg arzenátovém pufru v rozsahu 10⁻⁵ až 10⁻⁸ M (pro sestavení kalibrační křivky použijeme nejméně 5 koncentrací ATP, přičemž každá koncentrace je ve třech variantách). Měření je prováděno stejným způsobem jako měření vzorku půdy.

Vyhodnocení a závěr

Výpočet : Koncentraci ATP ve vzorku půdy stanovíme odvozením z kalibrační křivky a vyjádříme jako množství ATP v µg na g vysušené zeminy.

Obsah ATP v půdě je možné stanovit i výpočtem s využitím vnitřního standardu

$$\text{ATP } (\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \text{ dwt}) = \frac{\mathbf{A} \times \text{ATP}_s \times 40}{\mathbf{B} - \mathbf{A}}, \quad \text{kde}$$

A – RLU/10 půdního extraktu,

B – RLU/10 půdního extraktu s přidaným vnitřním standardem ATP (v µg)

ATP_s – přidané ATP k půdnímu vzorku jako vnitřní standard (v µg)

dwt – suchá hmotnost 1 g mokré zeminy

40 – ředící faktor.

Literatura :

Martens, R. (2001). Estimation of ATP in soil : extraction methods and calculation extraction efficiency. Soil.Biol.Biochem., 33 : 973-982

3.4 Stanovení půdní respirace

Úvod

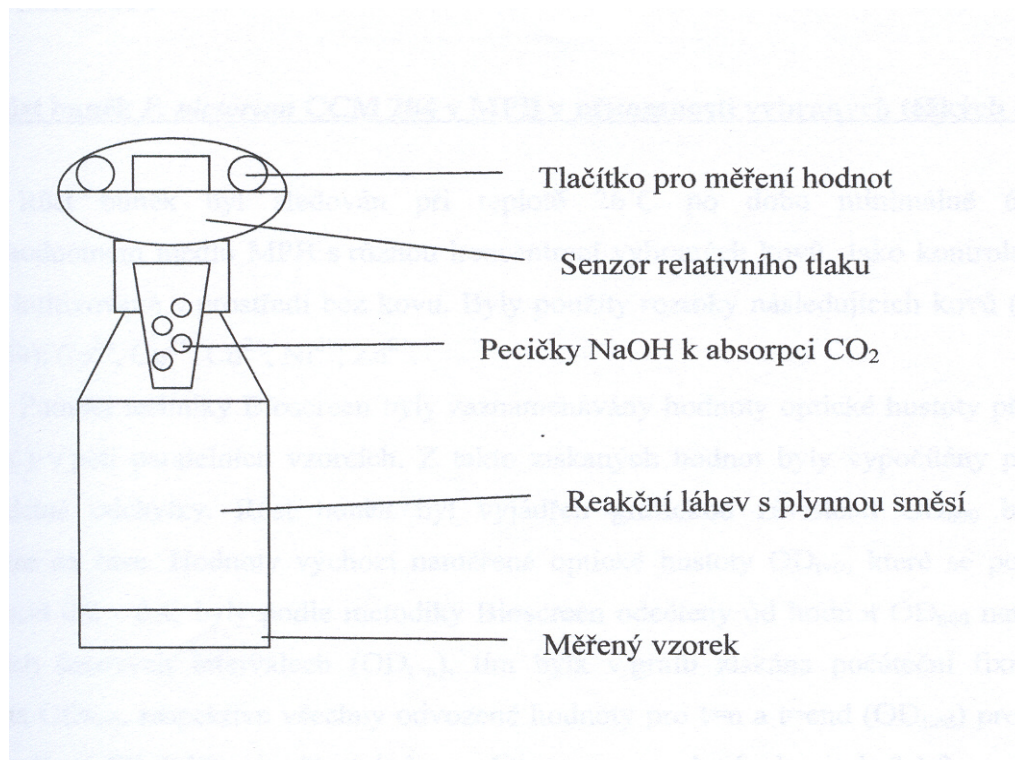
Půdní respirace je charakterizována spotřebou kyslíku (O_2) nebo uvolňováním oxidu uhličitého (CO_2) v důsledku její mikrobiální aktivity. Zahrnuje výměnu plynů z procesů aerobního a anaerobního metabolismu. Půdní respirace nás informuje o degradaci biologicky dostupných organických látek a o průběhu jejich mineralizace. Za normálních podmínek existuje ekologická rovnováha mezi půdními organizmy a jejich aktivitou. Jde o tzv. bazální respiraci půdy. Jestliže je tato rovnováha porušena (např. přidáním degradovatelné organické sloučeniny), dochází k výraznému zvýšení růstu mikroorganismů a jejich mineralizační aktivity, což se projeví změnou půdní respirace. Půdní respirace může vypovídat o biologické degradaci nejrůznějších látek v půdě, toxicitě některých polutantů v kontaminovaných půdách, o množství mikrobiální biomasy atd..

Princip metody

Metoda je založena na měření změn tlaku uvnitř uzavřeného systému v důsledku mikrobiologické respirační aktivity.

Materiál a zařízení

- **Materiál:**
vzorek půdy
- **Chemikálie a roztoky:**
čočky NaOH
- **Přístroje:**
zařízení OxiTop®-Control (WTW, Germany), termobox



Obr.3 Zařízení OxiTop- Control (WTW)

Postup

Příprava a uchování půdního vzorku

Zpracováváme čerstvé vzorky půdy o vlhkosti $50 \pm 10\%$. Vzorek protlačíme přes síto o velikosti ok 2 mm a homogenizujeme. Část homogenizovaného vzorku použijeme pro chemické analýzy (stanovení objemu, iontů apod.).

Stanovení objemu vzorku

Odměrný válec naplníme 100 ml destilované vody a přidáme 100 g půdního vzorku. Objem vody vytlačený půdním vzorkem představuje objem půdy.

Měření půdní respirace

Navážíme 200 g půdního vzorku do vzorkové láhve (Duran) o objemu 500 ml. Do víkového adaptéru vložíme gumovou absorbční nádobku s pěti ččkami NaOH a nádobu uzavřeme. Našroubujeme měřící hlavici. Láhev umístíme do termoboxu vytemperovaného na teplotu 20 °C. Půdu temperujeme po dobu dvou hodin. Poté nastartujeme měření vynulováním měřící hlavice současným stisknutím tlačítek S a M. Měření provádíme po dobu 20 dnů jednou denně. Naměřené hodnoty se zobrazí po stisknutí tlačítka M.

Vyhodnocení a závěr

Stanovení objemu půdního vzorku vypočteme ze vztahu:

$$V = m/\rho$$

Naměřené hodnoty zaznamenáme do tabulky a vynásobíme faktorem 11. Hodnoty představují mg O₂ · kg⁻¹ půdy. Provedeme výpočet půdní respirace **SR**.

$$SR = \frac{M(O_2)}{R \cdot T_{inc}} \cdot \left(\frac{V_{ges} - V_{sample}}{V_{sample}} \right) \cdot \frac{1}{\rho} \cdot 3.25 \cdot digit$$

kde

SR je půdní respirace,

M(O₂) je molekulová hmotnost kyslíku (32000 mg/mol),

R je plynová konstanta (83144 l-mbar/mol-K),

T_{inc} je inkubační teplota (293,15 K),

V_{ges} je objem reakční nádoby (0,609 litrů),

V_{sample} je objem vloženého půdního vzorku, **ρ** je hustota půdy,

digit je naměřená hodnota spotřeby kyslíku.

Půdní respiraci vyjádříme v mg O₂ /kg sušiny.

Literatura

Anderson, J.P.E., Domsch, K.H. (1978a). Mineralization of bacteria and fungi in chloroform-fumigated soils. Soil Biol. Biochem. 10:207-213.

Anderson, J.P.E., Domsch, K.H. (1978b). A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soil. Soil Biol. Biochem. 10:215-221.

3.5 Stimulace půdní respirace přidavkem lehce využitelného substrátu

Úvod

Viz kapitola 3.1.

Princip metody

Přítomnost půdní biomasy lze prokázat stimulací její respirace přidavkem lehce využitelného substrátu, nejlépe glukózy. Metoda přímo vychází z fyziologie půdních mikroorganismů. Spotřeba kyslíku je průběžně měřena respirometrem.

Materiál a zařízení

- **Materiál:**

Vzorky půdy z různých lokalit

- **Chemikálie a roztoky**

Roztok stimulační, čocky NaOH, roztok glukózy (16 mg. ml⁻¹)

- **Přístroje:**

Zařízení OxiTop® -Control (WTW, Germany), magnetická vícemístná míchačka, termobox

Postup

Úprava a preinkubace půdy.

Čerstvě odebranou půdu protlačíme přes síto o velikosti ok 4 mm. Prosátou půdu homogenizovanou promícháním nasypeme do inertních nádob (zaplníme asi 1/3 nádoby) překrytých plastovou fólií. Nádoby s půdou umístíme do temna a inkubujeme po dobu dvou týdnů při teplotě 20°C. Po preinkubaci si vzorky půdy zachovávají bazální respirační aktivitu.

Stimulace půdní respirace.

Ke stimulaci půdní respirace použijeme půdní vzorek s bazální respirační aktivitou. U vzorku stanovíme hustotu ρ (viz 3.1.) Do vzorkové láhve s bočním ramínkem (Duran) o objemu 500 ml (reálný objem láhve 0,609 litru) navážíme půdní vzorek tak, aby objem odpovídal 6,7 ml a přidáme 15 ml stimulačního roztoku. Kontrolní vzorek připravíme obdobně. Do láhve s vytvořeným půdním kalem vložíme teflonové magnetické míchadlo. Do víkového adaptéru vložíme gumovou adsorpční nádobu s pěti čockami NaOH. Nádobu uzavřeme měřicí hlavicí. Láhve umístíme do termoboxu a temperujeme po dobu 1 h na teplotu 20°C. Poté nastartujeme měření respirace stisknutím tlačítek S a M. Měření provádíme po dobu 4 h a potom do láhve se vzorkem vstříkneme bočním ramínkem 1 ml roztoku glukózy a do kontrolního vzorku 1 ml destilované vody. Měřicí hlavu vynulujeme a dále zaznamenáváme spotřebu kyslíku po dobu 10 h.

Vyhodnocení a závěr

Vytvoříme tabulku kumulované spotřeby kyslíku. Hodnoty odečtené na displeji vynásobíme faktorem 100 (faktor je určený pro použitý objem kalu a rozmezí spotřeby kyslíku 0-4000 mg . l⁻¹). Půdní respiraci vyhodnotíme podle kapitoly 3.1. Graficky zpracujeme průběh respirace vzorku a vypočteme rychlost respirace půdy po přidání glukózy.

Pozn. Metodu lze modifikovat přidavky glukózy o různé koncentraci, přidavky toxických látek nebo některých polutantů.

Literatura

Van der Werf, H., Genouw, G., Van Vooren, L., Verstraete, W.(1995). The determination of active microbial biomass by the respiration simulation method. In: *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*, Eds. Alef, K., Nannipieri, P., Acad. Press, London, UK: 405-408.

Robertz,M., Muckenheim,T., Eckl,S., Webb,L. (2000). Cost-effective method of determining soil respiration in contaminated and uncontaminated soils for scientific and routine analysis.In *Remediation engineering of contaminated soils*. Wise,D.L. et al. (Eds.), Marcel Dekker, Inc. New York-Basel, 573- 583.

4 Studium bakteriofága

Úvod

Bakteriofágy jsou viry infikující bakteriální buňky. Každý bakteriofág má širší nebo užší rozmezí hostitele. Někdy je rozmezí hostitele tak specifické, že se určitý bakteriofág množí jen v některých kmenech určitého druhu bakterií. Infekce bakteriální buňky fágovým virionem sestává ze dvou dějů: z adsorpce virionu na povrch buňky a ze vstupu (penetrace) jeho genomu do cytoplazmy. Jestliže po infekci následuje replikace fágového genomu, syntéza bílkovin fágového kapsidu a sestavování nových virionů s následnou lyzí buňky, hovoříme o lytické infekci. Fágy, které způsobují pouze lytickou infekci, označujeme jako virulentní. Kromě virulentních fágů existují tzv. temperované fágy, které vyvolávají buď lytickou infekci hostitelské buňky nebo její lyzogenizaci. Během lytické infekce dochází k uvolňování fágového potomstva v procesu lyze buňky a získáváme tzv. fágový lyzát. Počet nově vytvořených virionů či počet virionů ve fágovém lyzátu lze stanovit odvozením od počtu vytvořených plak na indikátorovém kmeni (PFU/ml). Proces uvolňování fágového potomstva z infikovaných hostitelských buněk můžeme sledovat v závislosti na době inkubace adsorpční směsi fág-hostitelská buňka metodou dvouvrstevného agaru nebo sledování procesu lyze hostitelských buněk a vzniku fágového lyzátu.

4.1 Stanovení jednostupňové růstové křivky fága metodou dvouvrstevného agaru

Princip metody

Množení virulentního fága na hostitelských buňkách je možné dokumentovat stanovením jednostupňové růstové křivky fága. Sledování uvolňování fágového potomstva je umožněno využitím metody dvouvrstevného agaru. Tato metoda vychází z předpokladu, že počet plak vytvořených po infekci buněk indikátorové kultury odpovídá přibližně počtu virionů ve fágovém lyzátu. Pro úspěšné stanovení jednostupňové růstové křivky fága je nutné dodržet podmínky ve vytvářené adsorpční směsi fág-hostitelské buňky. Významným faktorem, který se podílí na úspěšném provedení experimentu je přítomnost *adsorpčního kofaktoru* (Ca^{2+} nebo Mg^{2+}), použití hostitelských buněk z časné exponenciální fáze růstu a správné nastavení hodnoty tzv. *vkladového poměru* (IR-input ratio), který vyjadřuje poměr vložených virionů k počtu hostitelských buněk v adsorpční směsi. Hodnotu IR je vhodné zvolit v rozmezí 0,1-0,01. Při vyšších hodnotách IR může docházet k lyzi buněk ihned po adsorpci na hostitele (lyze zvenčí-lysis from without) aniž by proběhl proces virové reprodukce. Jednostupňová růstová křivka fága umožňuje stanovit počet nově uvolněných virionů připadajících na jednu vloženou fágovou částici (*BS-burst size*). Přesný počet virionů uvolněných z jedné infikované buňky a multiplicitu infekce může detekovat pouze metodou single- burst distribuce (viz 4.2.).

Materiál a zařízení

- **Mikroorganismus a bakteriofág:**

Staphylococcus aureus SA812, lyzát virulentního stafylokového fága ϕ 812 (titr cca 10^8 PFU/ml)

- **Chemikálie a roztoky :**

[tryptonový bujón \(TB\)](#) 2% a 0,7% [tryptonový agar \(TA\)](#), [pufr Tris-HCl](#) (0,05M , pH=7,2), 0,22% CaCl_2

- **Zařízení :**

vodní lázeň, ultratermostat, termostat

Postup

Příprava hostitelských buněk.

Inokulum *S. aureus* SA812 připravíme naočkováním 20 ml TB cca. 10^8 buněk ze šikmého 2% TA (jedna plná očkovací klička). Kultivujeme staticky 24 h při 37 °C. Pro přípravu hostitelských buněk SA812 z časné exponenciální fáze růstu očkujeme 3 ml inokula do 200 ml TB. Kultivujeme cca. 4 hodiny při 37 °C za intenzivního provzdušňování tak, aby výsledná hustota bakteriální suspenze odpovídala $A_{620} = 78\%$. Bakteriální kulturu 100x zředíme v TB a stanovíme počet bakteriálních buněk výsevem na 2% TA (CFU/ml).

Příprava indikátorové kultury SA812

K 20 ml inokula *S.aureus* SA812 přidáme 2 ml 0,22% CaCl_2

Příprava 0,7% TA s indikátorovou kulturou SA812

Ke 150 ml 0,7% TA , který temperujeme po celou dobu experimentu na 45°C ve vodní lázni, přidáme 15 ml indikátorové kultury SA812 s adsorpčním kofaktorem Ca^{2+}

Příprava adsorpční směsi

K 18 ml buněk SA812 (cca 10^7 CFU/ml) přidáme 2 ml 0,22% CaCl_2 . Buňky s adsorpčním kofaktorem temperujeme ve vodní lázni 30°C. Poté přidáme 0,2 ml ϕ 812 (cca 10^8 PFU/ml), promícháme a odebereme vzorek pro stanovení PFU/ml v čase $t=0$. Adsorpční směs fág-hostitelské buňky kultivujeme po dobu 120 min při teplotě 30°C. Vzorky pro stanovení PFU/ml odebíráme v čase $t= 20;40;60;80;100$ a 120 min. Počet uvolňovaných virionů v adsorpční směsi stanovíme metodou dvouvrstevného agaru na indikátorovém kmeni *S.aureus* SA 812.

Metoda dvouvrstevného agaru

0,1 ml zředěného vzorku (odebraného v čase $t=0;20;40;60;80;100;120$ min) pipetujeme na Petriho misku s 2% TA. Vzorek převrstvíme 2,5 ml 0,7% TA, který jsme předem vytemperovali na 45°C a zaočkovali indikátorovou kulturou SA812 s adsorpčním kofaktorem Ca^{2+} . Kývavým pohybem vytvoříme tenkou vrstvu 0,7% agaru a necháme v chladnu utuhnout. Po utužení 0,7% TA misky obrátíme dnem vzhůru a kultivujeme v termostatu při teplotě 30°C. Po 24 h kultivace odečítáme vytvořené plaky a vypočteme titr fágových částic v odebraném vzorku. Pro každý časový interval a vhodné ředění vyséváme fága na 2-3 misky.

Vyhodnocení a závěr

a) Výpočet PFU/ml ve vzorku odebraném v čase $t=0-120$ min provedeme ze vztahu :

$$\text{Průměrný počet plak na misce} \times 1/\text{ředění} \times 10 = \text{PFU/ml}$$

b) Sestrojíme tabulku hodnot závislosti PFU/ml na době inkubace adsorpční směsi

c) Sestrojíme jednostupňovou křivku závislosti log PFU/ml na době inkubace adsorpční směsi

d) Vypočteme hodnotu IR pro adsorpční směs

e) Vypočteme hodnotu BS

Literatura

Hod'ák, K., Němec, M. (1984). Praktikum z fyziologie bakterií. Skriptum UJEP Brno

4.2 Stanovení průměrného fágového výnosu metodou single-burst experimentu

Princip metody

Stanovení průměrného fágového výnosu na principu Poissonovy distribuce

Materiál a zařízení

- **Mikroorganismy a bakteriofág:**

kmen *Staphylococcus aureus* SA812; lyzát virulentního stafylokového fága ϕ 812 (titr lyzátu cca 10^{10} PFU/ml), lyzát mutantního stafylokokového fága ϕ 812a (titr lyzátu cca 10^{10} PFU/ml)

- **Chemikálie a roztoky:**

[tryptonový bujón \(TB\)](#), 2% a 0,7% [tryptonový agar \(TA\)](#), [pufr Tris-HCl](#) (0,05M ,pH=7,2), 0,22% CaCl_2

- **Zařízení :**

vodní lázeň, termostat

Postup

0,1 ml 24-hodinové kultury *S.aureus* SA812 bylo inokulováno do 20 ml TB. Kultivujeme po dobu 18 h při 30°C. Potom buňky 10-krát zředíme v TB (koncentrace buněk cca 10^7 CFU/ml- přesný počet stanovíme výsevem na 2% TA) a přidáme adsorpční kofaktor (do výsledné koncentrace 0,22% w/v) a vytemperovaný fágový lyzát 812 nebo 812a naředíme tak, aby hodnota vkladového poměru IR se pohybovala v rozmezí 0,03-0,04 (PFU/ml stanovíme titrací fágového lyzátu metodou dvouvrstevného agaru (viz 4.1.) Adsorpční směs fág-hostitelské buňky kultivujeme při 30°C po dobu 20 min, čímž zajistíme dokonalou adsorpci fága na hostitelské buňky. Adsorpční směs zředíme 10^{-5} v TB a rozplníme po 0,1 ml do 100 malých sterilních zkumavek a inkubujeme ve vodní lázni při 30°C po dobu 120 min. Po této době pipetujeme do zkumavek 2,5 ml 0,7% TA (45°C) s indikátorovou kulturou SA812 (viz 4.1.) a ihned vyléváme na Petriho misky s 2% TA. Po utužení 0,7% TA misky kultivujeme při 30°C v termostatu obrácené dnem vzhůru. Po 24 h kultivace hodnotíme počet plak na všech miskách.

Hodnocení

Většina misek je bez plak nebo s jednou plakou, která je vytvořena neadsorbovaným fágem. Misky s větším počtem plak ukazují fágový výnos z jedné, dvou nebo více buněk. Sestavíme tabulku se vzestupným počtem plak pro celkový počet 100 misek. Na základě hodnocení celkového počtu plak odečtených na 100 miskách a počtu buněk v adsorpční směsi lze stanovit celkový počet infikovaných buněk a průměrný fágový výnos z jedné buňky.

Výpočet. Počty plak na jednotlivých miskách se pohybují v širokém rozmezí. Z tohoto počtu je třeba vymezit misky, které představují výnos z jedné buňky, potom ze dvou buněk atd. Vycházíme z Poissonovy distribuce a výrazu, že podíl zkumavek P_0 , kde nejsou žádné plaky, je dán rovnicí :

$$P_0 = e^{-m} ,$$

kde m = průměrný počet infikovaných bakterií, připadajících na jednu zkumavku (resp.misku).

Jestliže

n_0 = počet zkumavek neobsahujících žádné infikované bakterie (resp. počet misek bez plak),
 n = celkový počet zkumavek (resp. celkový počet misek), pak za P_0 můžeme dosadit poměr n_0/n a vypočítat m podle vztahu :

$$m = -\ln P_0 = -\ln n_0/n$$

potom očekávaný počet misek bez fágového výnosu je $Z_0 = nP_0$, tedy

$$Z_0 = 100 \times e^{-m}$$

počet misek s fágovým výnosem z jedné buňky $Z_1 = m/1! \times 100 \times e^{-m}$

počet misek s fágovým výnosem ze dvou buněk $Z_2 = m^2 / 2! \times 100 \times e^{-m}$

počet misek s fágovým výnosem ze tří buněk $Z_3 = m^3 / 3! \times 100 \times e^{-m}$

Průměrný fágový výnos vypočteme ze vztahu :

Celkový počet plak (na 100 miskách) / (100 × m)

Všechny vypočtené hodnoty zaznamenáme do tabulky. Porovnáme průměrný fágový výnos fágů $\phi 812$ a $\phi 812a$

Literatura

Rosypal, S., Rosypalová, A. (1970). A spontaneous mutant of polyvalent phage 812 capable of growth on *Staphylococcus aureus* NCTC 8511 carrying prophage 53. Folia Fac. Sci. Natl. Univ. Purk. Brunensis XI:37-47.

Hod'ák, K., Horáková, D., Kazdová, M. (1987). Homogeneous magnetic field effects on the distribution of yield of virulent staphylophage 812. Folia Fac. Sci. Natl. Univ. Purk. Brunensis, Biologia 85:17-32.

Luria, S.E., Darnell, J.E. Jr., Baltimore, D., Campbell, A. (1978). General virology. J. Willey and Sons, New York.

4.3 Sledování lyze hostitelských buněk v adsorpční směsi

Princip metody

Množení virulentního fága na hostitelských buňkách je možné dokumentovat sledováním jejich lyze a vznikem fágového lyzátu. Pro sledování rychlosti projasňování bakteriální kultury v důsledku lyze buněk virulentním fágem s následnou volbou vhodného hostitele, popř. ke stanovení parametrů v adsorpční směsi, plně vyhovuje automatické sledování změny zákalu bakteriální kultury na zařízení Bioscreen C (viz 1.2.).

Materiál a zařízení

- **Mikroorganismy a bakteriofág :**

Kmeny *Staphylococcus aureus* SA812; NCTC 8511; S26; PA, lyzát virulentního stafylokového fága $\phi 812$ (titr lyzátu cca 10^{10} PFU/ml), lyzát mutantního stafylokového fága $\phi 812a$ (titr lyzátu cca 10^{10} PFU/ml).

- **Chemikálie a roztoky :**

[tryptonový bujón \(TB\)](#), 0,22% CaCl_2

- **Přístroje:**

Bioscreen C, vodní lázeň, multikanálová automatická pipeta

Postup

Příprava hostitelských buněk.

Inokula vybraných kmenů *S. aureus* (SA812;NCTC 8511, S26,PA) připravíme naočkováním 20 ml TB cca. 10^8 buněk ze šikmého 2% TA (jedna plná očkovací klička). Kultivujeme staticky 24 h při 37 °C. Pro přípravu hostitelských buněk z časné exponenciální fáze růstu očkujeme 3 ml inokula do 200 ml TB Kultivujeme cca. 4 hodiny při 37 °C za intenzivního provzdušňování tak, aby výsledná hustota bakteriální suspenze odpovídala $A_{620} = 78\%$.

Příprava adsorpční směsi

K 18 ml hostitelských buněk SA812 (cca 10^9 CFU/ml) přidáme 2 ml 1% CaCl_2 . Buňky s adsorpčním kofaktorem vytemperujeme na 30°C ve vodní lázni Poté přidáme 0,2 ml vytemperovaného ϕ 812 resp. ϕ 812a (titr lyzátů cca 10^{10} PFU/ml), promícháme a pipetujeme automatickou pipetou po 300 μ l do jamek sterilní inkubační destičky (5 jamek pro každou adsorpční směs). Podle nastavených parametrů přístroje vzorky inkubujeme při 30°C, zákal vzorků měříme po 30 min při vlnové délce 600 nm. Před odběrem a mezi odběry (po 15 min) jsou vzorky krátce protřepány, aby nedocházelo k usazení buněk. Zákal adsorpčních směsí sledujeme po dobu 24 h. Metodu můžeme modifikovat změnou koncentrace adsorpčního kofaktoru, změnou hodnoty pH kultivačního media TB v rozmezí hodnot 6- 7,5 nebo volbou nižšího či vyššího vkladového poměru IR, či volbou jiných kmenů *S.aureus* pro přípravu hostitelských buněk.

Vyhodnocení a závěr

Hodnoty OD_{600} vytiskneme do tabulky. Vypočteme rychlost lyze hostitelských buněk. Na základě výsledku experimentu stanovíme vhodný hostitelský kmen pro zvolené fágy, popř. modifikací metody vhodné podmínky pro nastavení parametrů adsorpční směsi.

Literatura

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

4.4 Příprava fágového lyzátu ϕ 812

Princip

Virulentní a polyvalentní stafylofág 812 se velmi intenzivně množí na hostitelském kmeni *S.aureus* SA 812. Pro adsorpci na hostitelské buňky vyžaduje adsorpční kofaktor Ca^{2+} . Fágy pro uskutečnění lytického cyklu s vysokou hodnotou BS vyžadují hostitelské buňky v exponenciální fázi růstu. Tyto podmínky jsou proto dodržovány v metodě přípravy fágového lyzátu v tekutém médiu. Metody uvolnění fága z vytvořených plak patří mezi méně používané metody k získání fágového lyzátu pro další experimenty. Takto připravené fágové lyzáty bývají používány zejména pro fagotypizaci a k „záchraně“ infikovaných fágových štoků.

Materiál

- **Mikroorganismus :**

Staphylococcus aureus SA 812 (hostitelský kmen pro fága ϕ 812; lyzát virulentního stafylofága ϕ 812 v TB)

- **Chemikálie a roztoky :**

[tryptonový bujón \(TB\)](#), 2% [tryptonový agar \(TA\)](#), 0,7% [tryptonový agar \(TA\)](#), chloroform p.a.

- **Přístroje a zařízení:**

termostat s vzdušnicím zařízením, vodní lázeň, chlazená centrifuga, lednice

Postup

Pomnožení virionů v tekutém prostředí. 100 ml TB v provzdušňovací láhvi naočkujeme 1 ml 18-ti hodinové kultury hostitelského kmene SA 812. Kultivujeme při teplotě 30°C po dobu 4-5h za intenzivní aerace média. Koncentrace buněk SA 812 obvykle dosahuje 10^8 CFU/ml. Přidáme 10 ml 0,22% (w/v) CaCl₂ a 10 ml fágového lyzátu 812 (titr fága musí být zvolen tak, aby hodnota IR odpovídala 0,1-0,01). Po 1 h kultivace adsorpční směsi SA812-fág ϕ 812 při 30°C (jemné provzdušňování) láhev vyjmeme z termostatu a uložíme do temna při pokojové teplotě. Vyčištěnou bakteriální suspenzi centrifugujeme v chlazené centrifuze při 10000 ot.min⁻¹ po dobu 10 min. Supernatant představuje fágový lyzát 812. Sterilizaci lyzátu provedeme několika kapkami chloroformu, který po 1-2 h působení odstraníme. Titr fága v lyzátu stanovíme metodou dvouvrstevného agaru (viz 4.1.) Lyzát uchováváme v zatavených skleněných ampulích při teplotě +4°C. Titr fága 812 je velice stabilní a v průběhu jednoho roku poklesne maximálně o půl řádu.

Uvolnění fága z vytvořených plak. Zásobní fágový lyzát ϕ 812 orientačně titrujeme a počet PFU/ml stanovíme metodou dvouvrstevného agaru (viz 4.1.). Pro přípravu fágového lyzátu zvolíme ředění fága tak, aby se po výsevu 0,1 ml na Petriho misku vytvořilo cca 10^4 plak (titr cca 10^5 PFU.ml⁻¹). Fága vyséváme na 10-20 Petriho misek s 2% TA. Převrstvíme 0,7% TA (45°C) s indikátorovou kulturou SA812 a adsorpčním kofaktorem. Kultivujeme 24 h při teplotě 37°C. Misku s plakou převrstvíme 3 ml TB a necháme stát při pokojové teplotě. Po 1 hodině vrstvu 0,7% TA s vytvořenými plakami seškrábeme sterilní skleněnou hokejkou do připravené sterilní kádinky překryté alobalem. Kádinku umístíme přes noc do lednice (+4°C). Poté kašovitou agarovou hmotu centrifugujeme ve sterilní centrifugační zkumavce s teflonovým povlakem při teplotě +4°C. Pro tuto první centrifugaci volíme nižší otáčky centrifugace (cca 5000 ot.min⁻¹). Odlitý supernatant opět centrifugujeme při vyšších otáčkách (10 000 – 12 000 ot.min⁻¹) po dobu 10 min. Vzniklý supernatant představuje fágový lyzát ϕ 812. Fágový lyzát sterilizujeme několika kapkami chloroformu, který odstraníme po 1-2 h působení. Titr lyzátu stanovíme metodou dvouvrstevného agaru. (viz 4.1.). Fágový lyzát rozplníme po 2 ml do sterilních ampulí a zatavíme. Uchováváme v lednici při teplotě +4°C.

Odpichem z jedné plak. Zásobní fágový lyzát ϕ 812 zředíme v TB na 10^3 PFU.ml⁻¹ a vyséváme metodou dvouvrstevného agaru na indikátorový kmen SA812. Do vytvořených plak provedeme opakovaný vpich očkovací jehlou. Mezi jednotlivými vpichy jehlu „opláchneme“ v malém objemu sterilního TB. Pro získání fágového štoku 812 s dostatečným počtem virionů vycházíme z předpokladu, že jedna plak je tvořena cca 10^8 fágových částic. Tuto metodu přípravy fágového lyzátu volíme většinou v případě, že zásobní fágový štok byl infikovaný. Takto připravený fágový lyzát je vhodné použít pro běžnou přípravu fágového lyzátu uvolněním z vytvořených plak. Méně vhodný je tento lyzát pro pomnožení virionů v tekutém prostředí (možnost přerůstání infekce).

Vyhodnocení a závěr

Zhodnotíme metody přípravy fágového lyzátu a uvedeme titr připravených fágových lyzátů.

Literatura

Rosypal,S., Horáková,D. (1968). The loss of sensitivity of *Staphylococcus aureus* NCTC 8511 to the polyvalent and virulent phage 812 following lysogenization with the phage 53. Publ.Fac.Sci.Nat.Univ.J.E.Purk.Brun., 496:313-326.

5 Indukce lyze

Úvod

Podle průběhu infekčního procesu se fágy rozlišují na virulentní a temperované. Při infekci buněk virulentním fágem proběhne lytický cyklus, jehož výsledkem jsou nové fágové částice, které jsou nejčastěji v procesu lyze hostitelské buňky uvolňovány do prostředí. Po infekci hostitelských buněk temperovaným fágem může, podobně jako po infekci virulentním fágem, proběhnout lytický cyklus nebo se fágový genom včlenit do chromozómu hostitelské buňky a dostává se tak do stavu profága. Tento proces přeměny hostitelské buňky na lyzogenní označujeme jako lyzogenizace. Lyzogenní kmeny získávají nové vlastnosti, které jsou podmíněny přítomností profága.

1. Jsou imunní vůči superinfekci homologickým fágem, neboť profág kóduje syntézu tzv. imunitního represoru, který specificky blokuje syntézu bílkovin potřebných k replikaci fágové DNA.
2. Lyzogenní buňky mohou za určitých podmínek uvolnit fága ze stavu profága a vstoupit do lytického cyklu, který je většinou zakončen lyzí buňky hostitele. Uvolnění profága z chromozómu lyzogeny lze indukovat působením fyzikálních nebo chemických faktorů, např. ozářením suspenze lyzogenních bakteriálních buněk UV zářením, paprsky X, γ -zářením, působením organických peroxidů, mitomycinu C aj. Při velmi nízké frekvenci může dojít ke spontánní lyzi lyzogenních buněk, takže v lyzogenní bakteriální kultuře můžeme vždy identifikovat volné fágové částice, které se podílely na její lyzogenizaci hostitelských buněk.

5.1 Optimalizace dávky UV záření metodou titrace uvolněných virionů

Princip metody

Inaktivace imunitního represoru UV zářením a navození lytického cyklu .

Materiál a zařízení

- **Mikroorganizmy:**

Lyzogenní kmen *Staphylococcus aureus* NCTC 8511 (53+), *Staphylococcus aureus* NCTC 8511 (indikátorový kmen pro temperovaného ϕ 53)

- **Chemikálie a roztoky :**

[tryptonový bujón \(TB\)](#), [tryptonový agar \(TA\)](#), (2%), [tryptonový agar \(TA\)](#), (0,7%), [pufr fosfátový](#) (0,05M, pH= 7,2), [YE konc.](#), [MPB konc.](#), [fyziologický roztok](#), 0,22% (w/v), CaCl₂

- **Přístroje :**

uzavřený box s UV-výbojkou (30W), horizontální třepací zařízení se stolkem (70 kvů.min⁻¹), chlazená centrifuga, termostat, vodní lázeň, vzdušnicí zařízení, stopky

Postup

Kličku buněk kmene *S.aureus* NCTC 8511 (53⁺) přeneseme do 20 ml TB a kultivujeme při 37°C v termostatu. Z narostlého inokula přeočkujeme 6 ml buněk lyzogena do 500 ml TB v provzdušňovací láhvi. Při jemnobublinné aeraci média buňky kultivujeme po dobu 4 h při teplotě 37°C. Bakteriální kulturu centrifugujeme při 10 000 ot.min⁻¹ po dobu 5 min. Sediment resuspendujeme v 50 ml fosfátového pufru (pH= 7,2). Vytvořenou suspenzi rozdělíme po 10 ml do sterilních Petriho misek (průměr 100 mm) a misky uzavřeme víčkem. Jednotlivou misku položíme do ozařovacího boxu na stolek horizontální třepačky. (UV výbojka je vzdálena od stolku třepačky 60 cm, žhavení výbojky alespoň 30 min před ozařováním vzorku, pracovat v rukavicích !). Zapneme třepačku a zvedneme víčko. Současně měříme čas ozařování buněk. Buňky ozařujeme 30, 45, 60, 90 nebo 120 s. Po uplynutí požadované doby ozáření zakryjeme misku víčkem, zastavíme třepačku a misku v alobalu přeneseme do temné komory (nebezpečí fotoreaktivace!). Zde buňky přeneseme pipetou do provzdušňovací láhve, přidáme připravené objemy složek výsledného média pro množení a lyzi buněk, tedy 5 ml koncentrovaného YE, 5 ml koncentrovaného MPB a 35 ml fyziologického roztoku. Buňky kultivujeme 1 h za velmi mírného provzdušňování v termostatu při teplotě 37°C. Po této krátké kultivaci láhev vyjmeme z termostatu a uložíme v temnu při pokojové teplotě. Po 24 h obsah promývací láhve centrifugujeme při 12000 ot. min⁻¹ a v supernatantu stanovíme titračně počet fágových virionů $\phi 53$ (viz 4.1 metoda dvouvrstevného agaru, indikátorový kmen NCTC 8511).

Vyhodnocení a závěr

Sestavíme tabulku závislosti titru $\phi 53$ na době ozáření lyzogenních buněk *S.aureus* NCTC 8511(53⁺). Označíme nejvhodnější dobu ozáření lyzogena pro získání fágového lyzátu $\phi 53$.

Literatura

Rosypal,S.,Horáková,D.(1968). The loss of sensitivity of *Staphylococcus aureus* NCTC 8511 to the polyvalent and virulent phage 812 following lysogenization with the phage 53. Publ.Fac.Sci.Univ.J.E.Purkyně 496: 313-326.

5.2 Průběžné sledování lyze ozářených buněk lyzogena

Princip metody

Inaktivace imunitního represoru UV zářením a navození lytického cyklu se projevuje projasňováním bakteriální kultury. Rychlost tohoto procesu můžeme sledovat kontinuálně s využitím automatického zařízení Bioscreen C.

Materiál a zařízení

- **Mikroorganismy:**

Lyzogenní kmen *Staphylococcus aureus* NCTC 8511 (53⁺),

- **Chemikálie a roztoky :**

[TB](#), [pufr fosfátový](#) (0,05M, pH= 7,2), [YE konc.](#), [MPB konc.](#), [fyziologický roztok](#), 0,22% (w/v) CaCl₂

- **Přístroje :**

uzavřený box s UV-výbojkou (30W), horizontální třepací zařízení se stolem (70 kvů.min⁻¹), chlazená centrifuga,vzdušnicí zařízení, stopky, Bioscreen C (software BioLink,MS EXCEL) <http://www.transgalactic.com/>

Postup

Buněčnou suspenzi lyzogenních buněk ve fosfátovém pufru připravíme podle 5.1. a ozáříme po různou dobu UV. Ozářené buňky v temnu 10x zředíme ve fosfátovém pufru. Do sterilní Erlenmayerovy baňky (200 ml) odebereme 10 ml buněk a přidáme 5 ml koncentrovaného YE, 5 ml koncentrovaného MPB a 35 ml fyziologického roztoku. Připravenou buněčnou suspenzi pipetujeme po 300 μ l do jamky sterilní inkubační destičky přístroje Bioscreen C. Pro každou dobu UV expozice pipetujeme vzorek do 5 jamek. Jako kontrolu použijeme neozářené buňky. Kultivaci buněk provádíme po dobu 48 h při teplotě 37°C, míchání vzorků opakujeme vždy po 30 minutách, měření po 60 min, před měřením naprogramujeme míchání vzorků.

Vyhodnocení a závěr

Zobrazíme vybrané křivky, vytiskneme, vytvoříme tabulku pro hodnocení v MS Excel a vyhodnotíme rychlost lyze buněk v závislosti na době jejich ozáření UV.

Literatura

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

6 Dehydrogenázová aktivita bakteriálních buněk

Úvod

Dehydrogenázy jsou enzymy katalyzující přenos vodíku v dýchacím řetězci. V živé buňce se vyskytují ve dvou typech, lišících se mezi sebou koenzymem. U prvního enzymu je koenzymem dinukleotid, jehož složkou je nikotinamid (NAD –nikotinamidinnukleotid nebo NADP-nikotinamidinnukleotidfosfát), u druhého typu je to flavin (FMN –flavinmononukleotid a FAD-flavinadeninnukleotid). U bakterií, podobně jako u rostlin a živočichů, jsou dehydrogenázy pojmenovány podle substrátu, jehož dehydrogenaci katalyzují. Metody stanovení jednotlivých dehydrogenáz jsou založeny na změně molekuly akceptoru vodíku. Akceptor vodíku může být přirozený nebo umělý.

6.1 Stanovení dehydrogenáz s využitím umělého akceptoru vodíku a elektronů

Princip metody

Umělé akceptory vodíku a elektronů jsou látky, které po redukcí přecházejí z bezbarvé oxidované formy na barevnou nebo naopak. Měření aktivity enzymu se pak provádí kolorimetricky. Pro stanovení dehydrogenáz u bakterií je nejčastěji používána metylenová modř, tetrazoliové soli nebo fenazinmetosulfát. Metylenové modři se využívá především při orientačních pokusech nebo při tzv. Thumbergově metodě. Tato metoda je založena na stanovení rychlosti, jakou se barevná forma odbarvuje v přítomnosti substrátu, tedy donoru vodíku a elektronů. Aby nedocházelo ke zpětné oxidaci, musí celá reakce probíhat v anaerobních podmínkách. Další nevýhodou použití metylenové modři je vedle autooxidace i její značná toxicita pro bakteriální buňku. Při běžně používané koncentraci je během 5 min usmrcena většina buněk v bakteriální suspenzi. Výhodnějším umělým akceptorem vodíku a elektronů pro stanovení dehydrogenázové aktivity mikroorganismů se jeví sloučeniny tetrazolia, zvláště pro jejich velmi nízkou toxicitu. Nejčastěji se používá tetrazoliumchlorid nebo tetrazoliumbromid, který se redukuje na červený formazan. Vzniklé červené zbarvení se pak stanoví kolorimetricky. Nevýhodou reakce je citlivost tetrazoliových solí na přímé světlo. Fenazinmetosulfát byl využíván zejména v minulosti ke stanovení dehydrogenáz manometrickými metodami. Za aerobních podmínek podléhá snadno autooxidaci.

Materiál a zařízení

- **Mikroorganismy:**

Staphylococcus aureus NCTC 8511, *Staphylococcus aureus* S26, *Staphylococcus aureus* SA 812, *Kocuria varians* CCM 1046, *Bacillus cereus* CCM 98

- **Chemikálie a roztoky:**

[MPB 1](#), [pufr fosfátový](#) (0,067M, pH=7,2), substráty ve formě 1% (w/v) roztoku ve fosfátovém pufru (sacharóza, laktóza, maltóza, glukóza, pyrohroznán, mléčnan, jantaran, glycerol), 0,1% (w/v) vodný roztok trifenylyltetrazoliumchlorid (TTC), 96% etanol.

- **Přístroje:**

termostat s provzdušňovacím zařízením, centrifuga, vodní lázeň, fotometr.

Postup

Příprava bakteriální suspenze. Ze zásobní kultury naočkujeme jednu kličku (cca 10^8 buněk) do 20 ml MPB 1 (ve 100 ml baňce) a kultivujeme při teplotě 30°C po dobu 24 h. Do 200 ml čerstvého MPB 1 přeneseme asepticky 4 ml narostlého inokula a pokračujeme v kultivaci 18 h při 30°C za intenzivního provzdušňování média. Narostlé buňky oddělíme od média centrifugací. Buňky resuspendujeme ve stejném objemu fosfátového pufru a opět centrifugujeme. Tento proces „promývání buněk“ opakujeme alespoň dvakrát. Hustotu bakteriální suspenze nastavíme nefelometricky na hodnotu $A_{620} = 85\%$. Hustotu bakteriální suspenze vyjádříme sušinou (viz 2.2.) v mg/ml.

Příprava reakční směsi pro stanovení dehydrogenázové aktivity. Reakci provádíme ve Wassermannových zkumavkách vymytých destilovanou vodou. Pro každý substrát a časový interval připravíme 2 opakování. Reakce probíhá při teplotě 37°C v uzavřené vodní lázni.

1. Reakční směs pro stanovení celkové dehydrogenázové aktivity buněk obsahuje : 0,5 ml bakteriální suspenze, 0,15 ml fosfátového pufru, 0,25 ml substrátu. Po vytemperování reakci odstartujeme přidávkem 0,1 ml 0,1% TTC. Reakci zastavujeme po 0, 10, 20, 30, 40 a 50 min inkubace přidávkem 5 ml 96% etanolu. Vytvořený formazan vytřepeme do etanolu a buňky odstraníme centrifugací ($5000 \text{ ot. min}^{-1}$ po dobu 5 min). Červeně zbarvený supernatant slijeme do čistých zkumavek a měříme na faktorizovaném fotometru (proti $100 \mu\text{g formazanu. ml}^{-1}$) při vlnové délce 485 nm.

2. Reakční směs pro stanovení dehydrogenace endogenního substrátu obsahuje: 0,5 ml bakteriální suspenze, 0,4 ml fosfátového pufru. Po vytemperování reakci odstartujeme přidávkem 0,1 ml 0,1% TTC. Další postup je shodný s postupem uvedeným pro 1. reakční směs (stanovení celkové dehydrogenázové aktivity).

Hodnocení

Z naměřených hodnot sestavíme tabulku, do které zaznamenáme koncentraci vytvořeného formazanu v přítomnosti jednotlivých substrátů vztaženého na mg sušiny zvoleného kmene. Vytvoříme graf závislosti koncentrace vytvořeného formazanu na době inkubace. Graficky zpracujeme i hodnoty koncentrace vytvořeného formazanu u kmenů s pozitivní dehydrogenací endogenního substrátu. Vypočteme dehydrogenázové jednotky pro daný substrát a kmen ($\mu\text{g formazanu. mg}^{-1} \text{ sušiny. min}^{-1}$). Složitou analýzou variance může porovnat dehydrogenázovou aktivitu jednotlivých kmenů v přítomnosti různých substrátů. Mimo to lze porovnat i tzv. relativní dehydrogenační rychlost. Ta je vyjádřena jako % aktivity vztažené na aktivitu glukózadehydrogenázy (tuto považujeme za 100%). Hodnoty pro výpočet relativní dehydrogenační aktivity představují množství vytvořeného formazanu v přítomnosti daného substrátu po odečtu endogenní dehydrogenace.

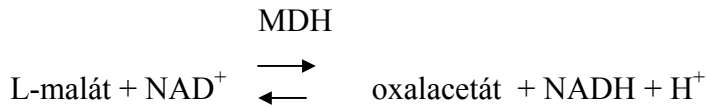
Literatura

Hodřák, K., Němec, M. (1984). Praktikum z fyziologie bakterií. Skriptum UJEP Brno.

6.2 Stanovení aktivity malát dehydrogenázy

Úvod

Malát dehydrogenáza (MDH, EC 1.1.1.37) katalyzuje vnitřní přeměnu L-malátu a oxalacetátu a vyžaduje přítomnost NAD jako koenzymu:



Byly popsány malát dehydrogenázy, které jsou NADP dependentní. Optimální pH reakce MDH se pohybuje kolem hodnoty 7,4. Enzym byl popsán u eukaryotických buněk i u bakterií. MDH je enzymem cyklu kyseliny citronové.

Mírou malátdehydrogenázové aktivity je změna optické denzity při 340 nm za jednotku času.

Materiál a zařízení

- **Mikroorganismy:**

divoký kmen kvasinky *Yarrowia lipolytica* CCM 4510

- **Chemikálie a roztoky:**

[MEB](#), [pufr fosfátový](#) (0,1M, pH= 7,5), 15mM oxalacetát, 12 mM NADH

- **Přístroje:**

spektrofotometr Genesys 5, vodní lázeň s třepačkou, ultrazvukový dezintegrátor Bandelin UW 200 s nadstavcem SH213G a sondou TT13 (řídící jednotka D200)

Postup

Příprava kvasinek. Do 100 ml MEB media v Erlenmayerových baňkách (250 ml) přidáme 2,5 ml 24-hodinového inokula. Buňky kultivujeme 20 h za intenzivního třepání při teplotě +25°C. Buňky promyjeme 0,1M fosfátovým pufrem (pH = 7,5). Sediment resuspendujeme v 15 ml 0,1M fosfátového pufru (pH=7,5) a rozbijeme ultrazvukem. Sonikaci vzorků provádíme ve skleněné kyvetě napojené na ultratermostat a chlazené na +4°C . Dezintegrace probíhá po dobu 12 min čistého času s cyklem plnění 60% pomocí sondy TT13 ponořené 2 cm v kapalině. Výkon ultrazvuku nastavíme asi na 80% celkového výkonu zařízení (200W). Po ukončení sonikace odstraníme zbytky buněčných stěn centrifugací při 10000g (10 min, +4°C) V supernatantu stanovíme koncentraci rozpustných bílkovin podle Bradfordové (viz 2.1.).

Reakční směs. Do kyvety temperované na 25°C pipetujeme 2,83 ml 0,1M fosfátového pufru (pH = 7,5), 0,1 ml 15 mM roztoku oxalacetátu a 0,05 roztoku 12mM NADH. Reakci zahájíme přidávkem 0,02 ml vzorku. Vytvořenou směs promícháme a odečteme optickou denzitu při 340 nm po 1,2,3 a 5 min. Vypočteme hodnoty $\Delta E/\text{min}$.

Jednotka enzymu oxiduje 1 μmol NADH za minutu při 25°C a hodnotě pH= 7,5.

Výpočet. Z lineární části křivky vypočteme

a) objemovou aktivitu enzymu vyjádřenou v jednotkách na ml vzorku :

$$\text{Objemová aktivita} = \frac{\Delta A_{340} / \text{min}}{6,22 \text{ mg enzymu/ml reakční směsi}}$$

b) Specifickou aktivitu vyjádřenou v jednotkách na mg bílkoviny vzorku:

$$\text{Specifická aktivita} = \frac{\text{objemová aktivita}}{\text{koncentrace}}$$

Literatura

Hayashi, M., Unemoto, T. (1967). The presence of D-malate dehydrogenase (D-Malate:NAD Oxidoreductase) in *Serratia marcescens*. *Biochim. Biophys. Acta*, 139:16-21.

7 Inducibilní enzymy u bakterií

7.1 Kinetika indukce β -galaktosidázy

Úvod

Metabolické procesy v bakteriální buňce jsou řízeny regulačními mechanismy, které ovlivňují tvorbu enzymů. Klasickým příkladem pro pozorování regulačního mechanismu je tvorba β -galaktosidázy a laktát permeázy. Regulační systém byl podrobně studován u buněk *E.coli* při využívání laktózy, která je buňkami štěpena na glukózu a galaktózu. Nejvhodnějšími induktory β -galaktosidázy jsou fosforylované β -galaktosidy, zejména galaktózo-6-fosfát. Regulace metabolismu a genetická podstata regulačních mechanismů využívání laktózy u buněk *S.aureus* jsou podobné jako u buněk *E.coli*. Rozdíly jsou patrné pouze ve stabilitě β -galaktosidázy, která je u stafylokoků poměrně labilní. Rovněž některé látky, které u *E.coli* vystupují jako účinné induktory enzymu (např. isopropyltiogalaktosid), inhibují produkci indukované β -galaktosidázy u buněk *S.aureus*. U stafylokoků je všeobecně lepším induktorem β -galaktosidázy galaktóza ve srovnání s laktózou.

Princip stanovení

Jako přirozené substráty pro indukci β -galaktosidázy může být použita např. D-laktóza nebo D-galaktóza. Ke stanovení aktivity enzymu můžeme použít chromogenní substrát o-nitrofenyl- β -D-galaktopyranosid (ONPG), který je v průběhu enzymatické reakce štěpen na barevný o-nitrofenolátový anion a D-galaktózu. Uvolněný o-nitrofenol (ONP) kvantitativně stanovíme v alkalickém prostředí při vlnové délce 420 nm.

Materiál a zařízení

- **Mikroorganismus :**

Staphylococcus aureus SA 812

- **Chemikálie a roztoky :**

[MPB 1](#); [Tris.HCl pufr](#) (0,05M, pH=7,2); 20% (w/v) vodný roztok D-galaktózy (sterilní); roztok ONPG v Tris-HCl (0,3 g/ 100 ml); 1M Na₂CO₃

- **Přístroje :**

Termostat se vzdušnicím zařízením, vodní lázeň s třepačkou, spektrofotometr, sterilní centrifugační zkumavky s teflonovým povrchem, chlazená centrifuga

Postup

Příprava bakteriální suspenze. Ze šikmého agaru zásobní kultury odebereme cca 10^8 buněk a naočkujeme 20 ml MPB 1 (ve 100 ml Erlenmayerově baňce) a kultivujeme 18 h při 30°C. Narostlé inokulum (10 ml) přeneseme do provzdušňovací láhve s 1000 ml MPB 1. Kultivujeme za intenzivní aerace po dobu 14 h při teplotě 30°C. Vytvořenou bakteriální suspenzi centrifugujeme při 6000 ot.min⁻¹ po dobu 20 min v chlazené centrifuze. K centrifugaci použijeme sterilní centrifugační zkumavky o objemu 500 ml. Buněčný sediment sterilně resuspendujeme v menším objemu MPB 1 a hustotu bakteriální suspenze nastavíme na $A_{620} = 85\%$.

Příprava indukční směsi SA 812 s galaktózou a proces indukce. Připravíme 7 Erlenmayerových baněk se 100 ml buněčné kultury SA812 ($A_{620} = 85\%$) a sterilně přidáme D-galaktózu ze zásobního roztoku (20%) tak, aby kultivační médium s buňkami obsahovalo 2,5%; 2%; 1,5%; 1%; 0,5% galaktózy. Do 7. baňky nepřidáváme induktor a tento vzorek použijeme k vyloučení konstitutivní produkce enzymu, tedy jako kontrolu. Vzorky a kontrolu kultivujeme při teplotě 30°C na třepačce s vodní lázní (150 $\text{kvů} \cdot \text{min}^{-1}$, amplituda 3). V časových intervalech 0;30;60;90;120;150;180 a 210 min odebíráme sterilní pipetou vzorky o objemu 7,5 ml do plastových centrifugačních zkumavek (objem 10 ml). Centrifugujeme při 10 000 $\text{ot} \cdot \text{min}^{-1}$ po dobu 5 min v chlazené centrifuze. K buněčnému sedimentu přidáme 1,5 ml Tris-HCl pufru a hustotu suspenze upravíme na fotometru při vlnové délce 620 nm na hodnotu 97% (přesně!).

Enzymatická reakce. Do reakční zkumavky pipetujeme 0,6 ml Tris.HCl pufru, 0,1 ml bakteriální suspenze ($A_{620} = 97\%$). Temperujeme po dobu 5 min ve vodní lázni na teplotu 37°C. Reakci odstartujeme přidáním 0,3 ml ONPG. Po 30 min inkubace reakci zastavíme přidáním 1 ml 1M Na_2CO_3 (pH reakční směsi = 10,8). Buňky odstraníme centrifugací. Supernatant, zbarvený žlutě uvolněným o-nitrofenolem, měříme při 420 nm na spektrofotometru faktorizovaném na koncentraci ONP = 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{ml}^{-1}$.

Vyhodnocení a závěr

Sestrojit křivku průběhu indukce enzymu (závislost $\mu\text{mol ONP} \cdot \text{ml}^{-1}$ na době inkubace) pro každou koncentraci induktoru.

Literatura

Creaser, E.H. (1955). The induced (adaptive) biosynthesis of β -galaktosidase in *Staphylococcus aureus*. J.gen.Microbiol., 12: 288-297.

Hengstenberg, W., Schrecker, O., Stein, R., Weil, R. (1976). Lactose transport and metabolism in *Staphylococcus aureus*. Zbl.Bact.Paras.Inf.Hygiene, 5:203-215.

Hod'ák, K., Valentová, M. (1980). Studium produkce β -galaktosidasy u vybraných kmenů *Staphylococcus aureus*. Folia Fac.Sci.Natl.Univ.Purk.Brunensis, XXI: 15-25.

7.2 Změny v indukci β -galaktosidázy v přítomnosti virulentního bakteriofága

Úvod

Adsorpce bakteriofága na bakteriální buňku vyvolává četné změny v jejím metabolismu. Po infekci stafylokokových buněk virulentním a polyvalentním fágem 812 došlo k významnému poklesu dehydrogenázové a oxidační aktivity hostitelských buněk *S.aureus*. Další studia prokázala, že u buněk *S.aureus* dochází po přidání virulentního stafylofága 812 ke snížení indukované syntézy β -galaktosidázy. Stupeň inhibice tohoto procesu je u buněk citlivých k fágu 812 do značné míry závislý na vkladovém poměru IR. Výsledky naznačují, že indukovaná syntéza β -galaktosidázy je v přímé závislosti na růstu buněk.

Princip stanovení

Jako přirozené substráty pro indukci β -galaktosidázy může být použita např. D-laktóza nebo D-galaktóza. Ke stanovení aktivity enzymu můžeme použít chromogenní substrát o-nitrofenyl- β -D-galaktopyranosid (ONPG), který je v průběhu enzymatické reakce štěpen na barevný o-nitrofenolátový anion a D-galaktózu. Uvolněný o-nitrofenol (ONP) kvantitativně stanovíme v alkalickém prostředí (pH >10) při vlnové délce 420 nm.

Materiál a zařízení

- **Mikroorganismus :**

Staphylococcus aureus SA 812 (hostitelský kmen pro fága ϕ 812; produkuje inducibilně β -galaktosidázu); lyzát virulentního stafylofága ϕ 812 v [TB](#) (příprava viz 4.3.)

- **Chemikálie a roztoky :**

[TB](#); [Tris.HCl pufr](#) (0,05M, pH=7,2), 20% (w/v) vodný roztok D-galaktózy (sterilní); roztok ONPG v Tris-HCl (0,3 g / 100 ml); 1M Na₂CO₃

- **Přístroje :**

Termostat se vzdušnicím zařízením, vodní lázeň s třepačkou, spektrofotometr, sterilní centrifugační zkumavky s teflonovým povrchem, chlazená centrifuga

Postup

Příprava buněk. Ze šikmého agaru zásobní kultury SA812 odebereme cca 10^8 buněk a naočkujeme 20 ml TB (ve 100 ml Erlenmayerově baňce) a kultivujeme 18 h při 30°C. Narostlé inokulum (10 ml) přeneseme do provzdušňovací láhve s 1000 ml TB. Kultivujeme za intenzivní aerace po dobu 14 h při teplotě 30°C. Vytvořenou bakteriální suspenzi centrifugujeme při 6000 ot.min⁻¹ po dobu 20 min v chlazené centrifuze. K centrifugaci použijeme sterilní centrifugační zkumavky o objemu 500 ml. Buněčný sediment sterilně resuspendujeme v menším objemu TB a hustotu bakteriální suspenze nastavíme na $A_{620} = 85\%$. Odebereme vzorek pro stanovení počtu buněk (CFU.ml⁻¹).

Příprava indukční směsi a proces indukce β -galaktosidázy. Naředěnou buněčnou suspenzi rozplníme po 100 ml do sterilních Erlenmayerových baněk (objem 250 ml). K buněčné suspenzi přidáme D-galaktózu ze zásobního roztoku do konečné koncentrace 1% (w/v). Současně přidáme Ca²⁺ ve formě CaCl₂ (do konečné koncentrace 2,2 · 10⁻³M) jako adsorpční kofaktor. K takto upravené buněčné suspenzi SA 812 přidáme lyzát ϕ 812 o známém titru tak, aby vkladový poměr v jednotlivých baňkách dosáhl hodnot IR= 10⁻¹; 10⁻²; 10⁻³. Jednu baňku neinfikujeme a bude nám sloužit ke sledování průběhu přirozené indukce (kontrola). Vzorky a kontrolu kultivujeme při teplotě 30°C na třepačce s vodní lázní (150 kyvů.min⁻¹, amplituda 3). V časových intervalech 0;30;60;90;120;150;180 a 210 min odebíráme sterilní pipetou vzorky o objemu 7,5 ml do plastových centrifugačních zkumavek (objem 10 ml). Centrifugujeme při 10 000 ot.min⁻¹ po dobu 5 min v chlazené centrifuze. K buněčnému sedimentu přidáme 1,5 ml Tris-HCl pufru a hustotu vytvořené bakteriální suspenze změříme při $\lambda = 620$ nm. Potom hustotu suspenze upravíme na fotometru při vlnové délce 620 nm na hodnotu 97% (přesně!).

Enzymatická reakce. Do reakční zkumavky pipetujeme 0,6 ml Tris.HCl pufru, 0,1 ml bakteriální suspenze ($A_{620} = 97\%$). Temperujeme po dobu 5 min ve vodní lázni na teplotu 37°C. Reakci odstartujeme přidávkem 0,3 ml ONPG. Po 30 min inkubace reakci zastavíme přidávkem 1 ml 1M Na₂CO₃ (pH reakční směsi = 10,8). Buňky odstraníme krátkodobou centrifugací při 12000 ot. min⁻¹. Supernatant, který je zbarvený žlutě uvolněným o-nitrofenolem, měříme při 420 nm na spektrofotometru faktorizovaném na koncentraci ONP=100 μ mol.ml⁻¹.

Vyhodnocení a závěr

Sestrojit křivku průběhu indukce enzymu (závislost $\mu\text{mol ONP} \cdot \text{ml}^{-1}$ na době inkubace) pro každou hodnotu IR.

Sestrojit křivky závislosti OD_{620} na době inkubace indukční směsi .

Literatura

Ghos,A.,Poddar,R.K. (1977). Reduced synthesis of β -galaktosidase in *Escherichia coli* infected with phage ϕX174 . *Can.J.Microbiol.*,23:1069-1077.

Hod'ák,K., Horáková,D., Kazdová,M. (1980). Inhibice indukované syntesy β -galaktosidasy u *Staphylococcus aureus* po infekci virulentním fágem. I. Vliv vkladového poměru. *Folia Fac.Sci.Nat.Univ.Purk.Brunensis*,XXI : 27-35.

8 Fosfatázová aktivita

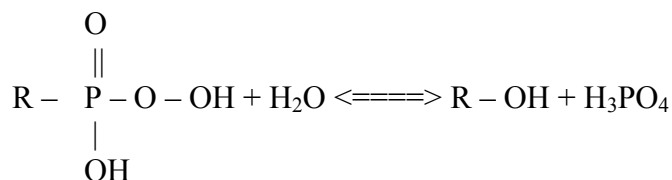
Úvod

Fosfatázy jsou hydrolytické enzymy, které štěpí estery kyseliny fosforečné (fosfolipidy, fosfoproteiny apod.). Jsou hojně zastoupeny v prokaryotických a eukaryotických buňkách, kde jsou součástí regulačních a syntetických procesů. Podle mezinárodní nomenklatury enzymů patří fosfatázy do třetí hlavní třídy enzymů, tedy mezi hydrolázy a do první podtřídy, ve které jsou hydrolázy katalyzující štěpení esterových vazeb. Jsou označeny kódem EC 3.1. Podle vztahu k substrátu lze fosfatázy rozdělit do dvou základních skupin:

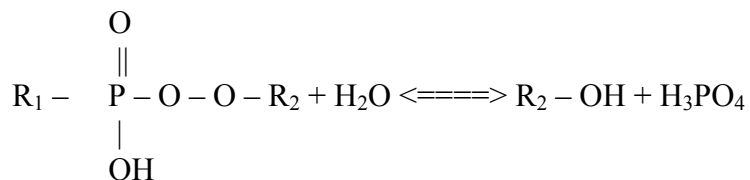
a) enzymy specifické pro jeden typ substrátu (např. fosfomonoesterázy, fosfodiesterázy a pyrofosfatázy)

b) enzymy specifické k více substrátům (např. adenosintrifosfatázy, hexózodifosfatázy)

Fosfomonoesterázy obecně katalyzují hydrolýzu monoesterů kyseliny fosforečné podle schématu:



Fosfodiesterázy obecně katalyzují hydrolýzu esterické vazby kyseliny fosforečné v diesterech podle schématu:

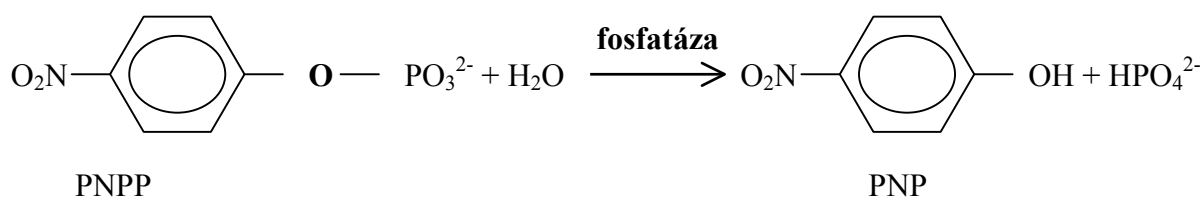


Fosfomonoesterázy se rozdělují do čtyř skupin (klasifikační číslo EC 3.1.3.1. až EC 3.1.3.4.), z nichž nejvýznamnější jsou enzymy EC 3.1.3.1. alkalické fosfatázy a EC 3.1.3.2. kyselé fosfatázy. V závislosti na producentním organismu vykazují alkalické fosfatázy vysokou aktivitu v širokém rozmezí hodnoty pH (pH=7,2 až 10,5). Kyselé fosfatázy vykazují nejvyšší fosfatázovou aktivitu při hodnotě pH okolo 5. Alkalická fosfatáza u mikroorganismů bývá velice často vázaná na struktury buňky, pouze malá část je sekretována do prostředí.

8.1 Stanovení fosfatázové aktivity nativních bakteriálních buněk

Princip metody

Principem stanovení fosfatázové aktivity je měření vznikajícího produktu hydrolyzy esterů. Metoda je založena na skutečnosti, že při této reakci enzym nerozlišuje mezi organickými skupinami **R** a katalyzuje i přeměnu syntetických analogů. Proto lze enzymatickou reakci provádět s nejrůznějšími substráty. Průběh reakce pak sledujeme spektrofotometricky. Nejčastěji používaným substrátem pro laboratorní stanovení fosfatázové aktivity je 4-nitrofenylfosfát (PNPP). Jedná se o chromogenní substrát, který se při reakci mění na žlutě zbarvený 4-nitrofenolátový anion.



Materiál a zařízení

- **Mikroorganismy:**

Agrobacterium tumefaciens CCM 1000

- **Chemikálie a roztoky:**

[MPB1](#); [MPA 1](#); [Tris-HCl pufr](#) (0,05M, pH=7,2); 4-nitrofenylfosfát (PNPP) v koncentracích 2000; 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,625 µg.ml⁻¹; 1M NaOH

- **Přístroje:**

Vodní lázeň, termostat, chlazená centrifuga, fotometr

Postup

Příprava bakteriálních buněk

20 ml MPB 1 naočkujeme jednou plnou bakteriologickou kličkou kultury buněk *Agrobacterium tumefaciens* CCM 1000 ze zásobního šikmého agaru (MPA). Kultivujeme staticky 24 hodin při 30°C. Odebereme 10 ml připraveného inokula a sterilně přeneseme do 200 ml MPB1 v provzdušňovací láhvi. Za intenzivního provzdušňování kultivujeme 24 hodin při 30°C. Poté kulturu centrifugujeme v chlazené centrifuze (+4°C) při 6000 otáčkách po dobu 30 minut (*pozor, buňky špatně sedimentují!*). Buněčný sediment dvakrát promyjeme opakovanou centrifugací v Tris-HCl pufru. Promyté buňky resuspendujeme v Tris-HCl pufru na požadovanou hustotu A₆₂₀ = cca 75% a stanovíme sušinu (viz 2.2).

Příprava reakční směsi a slepého vzorku

Do 16 zkumavek pipetujeme po 0,6 ml Tris-HCl a 1 ml bakteriální suspenze (A₆₂₀ = cca 75%). Do dalších 8 zkumavek pipetujeme po 1,6 ml Tris.HCl pufru (slepé vzorky). Všechny zkumavky temperujeme ve vodní lázni při 37°C po dobu 5 min. Pro každou koncentraci PNPP připravujeme 2 vzorky s buňkami a 1 slepý vzorek. Enzymatickou reakci nastartujeme přidávkem 0,2 ml PNPP v odpovídající koncentraci. Inkubace vzorků probíhá ve vodní lázni při 37°C po dobu 20 min. Reakci zastavíme alkalizací vzorků přidávkem 2 ml 1 M NaOH.

Buňky odstraníme centrifugací ($10000 \text{ ot. min}^{-1}$ po dobu 5 min). Žluté zbarvení supernatantu měříme při $\lambda = 400 \text{ nm}$ na kalibrovaném fotometru (faktorizace fotometru provedena pro koncentraci $100 \mu\text{g PNP. ml}^{-1}$).

Vyhodnocení a závěr

Výpočet sušiny ve vzorku.

Graf závislosti aktivity enzymu ($\text{nmol PNP. mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) na koncentraci PNPP (nmol. ml^{-1}).

Stanovení hodnoty K_M .

Literatura

Barnes, E.H., Morris, J.F. (1951). A quantitative study of the phosphatase activity of *Micrococcus pyogenes*. J. Bacteriol. 73: 100-104.

Hod'ák, K., Němec, M. (1985). Praktikum z fyziologie bakterií, Skriptum UJEP Brno

8.2 Stanovení fosfatázové aktivity HEP

Příprava acetonového prášku (HEP) s fosfatázovou aktivitou

Princip metody

Buňky *Agrobacterium tumefaciens* vykazují vysokou fosfatázovou aktivitou při $\text{pH}=7,2$. Rychlým vysušením a částečnou perforací buněk ledovým acetonem můžeme připravit hrubý enzymatický preparát (HEP), který lze dlouhodobě využívat pro studium fosfatáz vázaných na zbytky buněk. HEP ve formě prášku uchováváme v uzavřených ampulích při $+4^\circ\text{C}$. Enzymatická aktivita preparátu je stabilní minimálně po dobu 6 měsíců.

Materiál a zařízení

- **Mikroorganismy:**

Agrobacterium tumefaciens CCM 1000

- **Chemikálie a roztoky:**

[MPB1](#); [Tris-HCl pufr](#) ($0,05\text{M}$, $\text{pH}=7,2$); aceton; éter; destilovaná voda; 4-nitrofenylfosfát (PNPP) v koncentracích 2000; 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; $15,625 \mu\text{g. ml}^{-1}$

- **Přístroje:**

termostat, centrifuga, olejová vývěva

Postup

20 ml MPB1 naočkujeme jednou plnou bakteriologickou kličkou kultury buněk *Agrobacterium tumefaciens* CCM 1000 ze zásobního šikmého agaru. Kultivujeme staticky 24 h při 30°C. 10 ml připraveného inokula sterilně přeneseme do 200 ml MPB 1 v provzdušňovací láhvi. Za intenzivního provzdušňování kultivujeme 24 h při 30°C. Poté kulturu zcentrifugujeme v chlazené centrifuze (+4°C) při 6000 ot.min⁻¹ po dobu 20 minut. Buněčný sediment dvakrát promyjeme v Tris-HCl pufru (dodržíme stejné podmínky jako při předchozí centrifugaci). Sediment resuspendujeme v malém množství destilované vody a přelijeme do skleněné baňky o objemu 1 litr. (*Další pracovní postup provádíme v rukavicích v digestoři vybavené odtahem vznikajících par!*). Postupně přiléváme vychlazený aceton (-5 °C) a stále protřepáváme. Sledujeme vznik sraženiny. Objem přidaného acetonu volíme individuálně podle kvality srážení buněk, obvykle se pohybuje v rozmezí 200 až 400 ml. Sražené buňky necháme 5 až 10 minut sedimentovat. Potom přistoupíme k filtraci vysušených a částečně perforovaných buněk přes dvojitý filtr (typ filtračního papíru 2R/80g). Filtr umístíme do Büchnerovy nálevky a aceton odsajeme s pomocí olejové vývěvy. Buňky zachycené na filtračním papíru dosušíme malým množstvím éteru (cca 30 ml). Vysušené buňky zachycené na filtračním papíru musejí mít čistě bílou barvu. Pokud pozorujeme barvu spíše nažloutlou, zopakujeme vysušení éterem. Filtrační papír s buňkami vyjmeme z Büchnerovy nálevky pinzetou a necháme sušit v digestoři při pokojové teplotě do druhého dne. Vytvořený prášek (hrubý enzymový preparát- HEP) seškrábeme z filtračního papíru skalpelem, homogenizujeme v třence a uchovááme v lednici ve skleněné uzavřené nádobě (pro dlouhodobější experimenty nejlépe v zatavených ampulích se sorbentem vody).

Stanovení fosfatázové aktivity HEP při pH=7,2

Připravíme reakční směs obsahující 1 ml roztoku HEP (0,1 mg.ml⁻¹) a 0,6 ml 0,05M Tris-HCl. Temperujeme při 37°C po dobu 5 min. Reakci nastartujeme přidáním 0,2 ml PNPP o různé koncentraci a inkubujeme při 37°C po dobu 10 min (dobu inkubace můžeme zkrátit na 5 min nebo prodloužit na 15 min podle rychlosti uvolňování PNP). Další postup je uveden v bodě 8.1.

Pozn. Vzorky není třeba před měřením centrifugovat!

Vyhodnocení a závěr

Graf závislosti aktivity HEP (nmol PNP.mg⁻¹.min⁻¹) na koncentraci PNPP (nmol.ml⁻¹)
Stanovení hodnoty K_M.

8.3 Stanovení vlivu teploty na fosfatázovou aktivitu buněk *S. aureus*

SA 812

Materiál a zařízení

- **Mikroorganismy:**

Staphylococcus aureus SA 812

- **Chemikálie a roztoky:**

[MPB1](#); [Tris-HCl pufr](#) (0,05M, pH=7,2); PNPP (0,4 g ve 100 ml vody); 1M NaOH

- **Přístroje:**

termostat, chlazená centrifuga, vodní lázně, spektrofotometr

Postup

Jednou plnou bakteriologickou kličkou naočkujeme 20 ml MPB 1 a necháme kultivovat v termostatu 18 h při 30 °C. Tímto inokulem (20 ml) naočkujeme 1 litr MPB1 v provzdušňovací láhvi a opět kultivujeme 18 h při 30 °C za intenzivního provzdušňování. Bakteriální kulturu zcentrifugujeme v chlazené centrifuze (6000 ot.min⁻¹, 10 min). Supernatant odlijeme a buňky resuspendujeme v Tris-HCl pufru. Opět zcentrifugujeme při dodržení stejných parametrů jako při předchozí centrifugaci. Buněčný sediment zředíme v Tris-HCl pufru a hustotu buněk nastavíme na $A_{620}=75\%$. Stanovíme sušinu buněčné suspenze (viz 2.2.).

Reakční směs připravíme do skleněných zkumavek o objemu 10 ml. Pro každou inkubační teplotu (37 °C, 45 °C, 50 °C) použijeme 12 zkumavek pro vzorek a 12 zkumavek pro kontrolu možného spontánního štěpení PNPP. Do všech 12 zkumavek pro vzorek pipetujeme po 1 ml buněčné suspenze ($A_{620}=75\%$) a 0,6 ml Tris-HCl pufru. Buňky krátce temperujeme a přidáme 0,4 ml PNPP. Do dalších 12 zkumavek (kontrola) pipetujeme místo buněk stejný objem pufru a přidáme 0,4 ml PNPP pro sledování možného rozkladu při určité teplotě inkubace v čase. Enzymatickou reakci ve vzorcích i spontánní štěpení v kontrole zastavíme po 0, 5, 10, 15, 20 a 30 min inkubace přidávkem 2 ml 1M NaOH k reakční směsi. Pro každý časový interval použijeme dvě opakování. Bakteriální buňky odstraníme centrifugací (6000 ot. min⁻¹, 10 min). Supernatant přelijeme do skleněných zkumavek a stanovíme koncentraci uvolněného PNP na spektrofotometru při $\lambda = 400$ nm (faktorizace spektrofotometru při 100 $\mu\text{g PNP.ml}^{-1}$)

Vyhodnocení a závěr

Sestrojíme křivku závislosti koncentrace uvolněného PNP ($\mu\text{g.ml}^{-1}$) na době inkubace (min) pro jednotlivé inkubační teploty (po odečtu hodnot spontánního rozkladu PNPP). Posoudíme vliv zvolené teploty na fosfatázovou aktivitu buněk studovaného kmene.

Literatura

Čoupková, D., Hoďák, K. (1975). Phosphatase activity of *Staphylococcus aureus* strains. Folia Fac.Sci.Nat.Univ.Purk.Brunensis XVI: 79-88.

9 Oxidační aktivita bakteriálních buněk

Úvod

Kyslíková elektroda je široce využívána v biochemii a fyziologii bakterií k měření rychlosti spotřeby kyslíku na oxidaci substrátu. Tato metoda je velmi citlivá a rychlá v porovnání s metodami manometrickými. Měření spotřeby kyslíku probíhá kontinuálně a je dokumentováno záznamem. Výhodou tohoto měření je skutečnost, že spotřebu kyslíku můžeme sledovat od prvních okamžiků kontaktu buněk se substrátem. Měření spotřeby kyslíku probíhá za přítomnosti CO₂, tedy za podmínek, které jsou velice blízké podmínkám přirozeným. Spotřeba kyslíku je stanovena na základě elektrochemické reakce, nikoliv na výměně plynů mezi tekutou a plynnou fází. S výhodou se využívá modifikované Clarkovy elektrody Ag/AgCl, kryté polyetylenovou membránou, přičemž jako elektrolyt slouží 0,2M KCl.

9.1 Vliv složení kultivačního média na oxidační aktivitu bakterií

Princip metody

Stanovení oxidační aktivity buněk *Staphylococcus aureus* s využitím modifikované Clarkovy elektrody.

Materiál a zařízení

- **Mikroorganismy:**

kmeny *Staphylococcus aureus* SA812, NCTC 8511, S26, SA66

- **Chemikálie a roztoky:**

[MPB1](#), [MPA 1](#), MPB1 s glukózou (1% w/v), MPA1 s glukózou (1% w/v), [pufr fosfátový](#) (0,02M, pH=7,2), nasycený roztok Na₂SO₃, 1% (w/v) roztoky cukrů ve fosfátovém pufru, elektrolyt 0,2M KCl.

- **Přístroje :**

chlazená centrifuga, modifikovaná Clarkova elektroda, skleněná reakční nádoba s dvojitou stěnou a bočním ramínkem, ultratermostat, jednokanálový zapisovač, elektromagnetická míchačka, zařízení pro provzdušňování, spektrofotometr Spekol 11, magnetická míchačka.

Postup

Příprava bakteriální suspenze: Bakteriální buňky odebereme z čerstvé zásobní kultury na šikmém agaru a kultivujeme v 20 ml MPB 1 nebo v MPB 1 s glukózou při 30°C po dobu 24 h. Připravené inokulum vyséváme po 0,2 ml na Petriho misky s MPA nebo MPA s glukózou, rozetřeme po povrchu agaru sterilní skleněnou hokejkou a kultivujeme po dobu 38 h při teplotě 30°C (použijeme asi 10-15 misek pro každé médium). Po kultivaci setřeme nárůst buněk hokejkou do kádinky, přidáme 20 ml 0,2 M fosfátového pufru a lžičku skleněných kuliček. Buňky protřepeme a vytvoříme buněčnou suspenzi. Doplníme do objemu 100 ml 0,2M fosfátovým pufrům a centrifugujeme v chlazené centrifuze při 5000 ot.min⁻¹ po dobu 15 min. Sediment buněk resuspendujeme v malém objemu fosfátového pufru a buňky se stěny centrifugační zkumavky odstraníme silnou tyčinkou se zaoblenými konci nebo dnem zkumavky. Přidáme pufr do objemu 100 ml a buňky opět centrifugujeme. Tento proces „promývání buněk“ ve fosfátovém pufru opakujeme nejméně dvakrát. Buněčný sediment z posledního promytí resuspendujeme opět v malém objemu 0,2M fosfátového pufru a shluky buněk odstraníme protřepáním se skleněnými kuličkami. Buňky zředíme ve fosfátovém pufru tak, aby 1 ml husté suspenze obsahoval přibližně 20 mg sušiny (na spektrofotometru při vlnové délce 600 nm nastavíme hustotu suspenze na 99,5%). Oxidační aktivita buněk se podstatně nemění během 24 h (suspenze uložena při +4°C).

Měření spotřeby O₂ bude prováděno modifikovanou Clarkovou elektrodou (chyba měření připravenou elektrodou se má pohybovat kolem 3% a je stanovena v prostředí bez kyslíku po přidání nasyceného roztoku Na₂S₂O₃). Polarizační napětí volíme 800 mV, citlivost elektrody je 5 mV a rychlost posunu záznamového papíru nastavíme na 2 cm . min⁻¹. Čistá elektroda je pokryta polypropylenou membránou upevněnou kroužkem. Reakční nádobku upevníme do stojanu tak, aby byla v kontaktu s magnetickou míchačkou. Nádobka obsahuje 3,5 ml dokonale provzdušněného fosfátového pufru a je temperována na teplotu 30°C napojením pláště na ultratermostat. Elektrodu ponoříme do naplněné reakční nádoby s míchadlem. K vyrovnání koncentrace O₂ v pufru mícháme obsah nádoby po dobu 2 min. Potom přidáme 0,05 ml bakteriální suspenze (bočním ramínkem nádoby) a po dobu 3 min sledujeme spotřebu kyslíku nutného k oxidaci endogenního substrátu. Spotřebu kyslíku zaznamenáváme pomocí jednonábového zapisovače. Po 3 minutách sledování oxidace endogenního substrátu přidáme 0,05 ml exogenního uhlíkatého substrátu a pokračujeme v měření po dobu dalších 3 min. Měření provedeme pro buňky kultivované na MPA a na MPA s glukózou. Jako exogenní substráty doporučujeme použít D-glukózu, D-arabinózu, glycerol, Na-mléčnan a Na-acetát.

Vyhodnocení a závěr

Naměřené hodnoty spotřeby kyslíku pro oxidaci endogenního substrátu a po přidavku exogenního substrátu zaznamenáme do tabulky. Výpočet spotřeby kyslíku pro oxidaci jednotlivých substrátů vyjádříme hodnotou Q_{O_2} . Za podmínek našeho pokusu provedeme výpočet podle následující rovnice:

$$Q_{O_2} = \frac{a \times V \times p \times 60}{D \times t \times v \times \text{sušina}}, \text{ kde}$$

a = $\mu\text{l O}_2$ v 1 ml fosfátovém pufru při 30°C (v 1 litru 0,02M fosfátového pufru při 30°C je obsaženo 7,14 mg O₂),

V = celkový objem kapaliny v reakční nádobce (v ml),

v = celkový objem přidávané buněčné suspenze a substrátu (v ml),

p = pokles obsahu kyslíku v mm (odečteme ze záznamu zapisovače)

d = délka záznamu na zapisovači v mm

t = doba vyjádřená na záznamu v mm

sušina = suchá hmotnost bakteriální suspenze v mg.ml⁻¹

Do tabulky zaznamenáme hodnoty Q_{O₂} pro bakteriální buňky kultivované na MPA a na MPA s glukózou. Vyhodnoťte vliv glukózy v kultivačním médiu na oxidační aktivitu bakteriálních buněk.

Literatura

Hanovcová,I., Hod'ák,K., Němec,M. (1975). Staphylococcal oxidation of hydrocarbons measured by oxygraphy. Folia Fac.Sci.Nat.Univ.Purk.Brunensis XVI (49) : 33-47.

9.2 Stanovení vlivu teploty na oxidační aktivitu kvasinek

Úvod

Kvasinka *Yarrowia lipolytica* je striktně aerobní a využívá n-alkany jako zdroj uhlíku. Bylo zjištěno, že může oxidovat vznikající 1-alkenol specifickou, membránově vázanou alkohol oxidázou. Rovněž velmi dobře byla popsána NAD(P) dependentní alkoholdehydrogenáza, glycerol-3-P dehydrogenáza (NAD) a glycerol-3-P dehydrogenáza (FAD). Bylo zjištěno, že poslední dvě jmenované oxidorektutázy jsou inducibilní. Na rychlosti oxidace glycerolu se může značnou měrou podílet teplota reakční směsi, hodnota pH prostředí a doba uchovávání kvasinkové suspenze (při +4°C).

Materiál a zařízení

- **Mikroorganizmy :**

Yarrowia lipolytica CCM 4510

- **Chemikálie a roztoky:**

[MEB](#), [MEA](#), [fosfátový pufr](#) (0,05 M, pH=7,2), [čínidlo Coomassie Brilliant Blue G250](#), standardy pro stanovení bílkovin (viz 2.1.), 1% (w/v) glycerol v destilované vodě

- **Přístroje:**

termostat, třepačka s vodní lázní, chlazená centrifuga, modifikovaná Clarkova elektroda, velká skleněná reakční nádobka s dvojitou stěnou a bočním ramínkem, ultratermostat, jednonálový zapisovač, elektromagnetická míchačka, zařízení pro provzdušňování, spektrofotometr Spekol 11, spektrofotometr.

Postup

Příprava inokula a buněčné suspenze. 50 ml MEB naočkujeme plnou kličkou buněk *Y.lipolytica* ze zásobního šikmého agaru MEA. Buňky kultivujeme po dobu 24 h při 30°C. 1,5 ml připraveného inokula přeneseme do 150 ml MEB a kultivujeme na třepačce ve vodní lázni po dobu 20 h při teplotě 30°C. Narostlou kvasinkovou kulturu centrifugujeme při 5000 ot.min.⁻¹ po dobu 40 min (teplota +4°C). Buněčný sediment opakovaně promyjeme v 0,05M fosfátovém pufru (pH=7,2). Buněčnou suspenzi po posledním promytí ředíme ve fosfátovém pufru na hustotu OD₆₂₀ = 90% a stanovíme koncentraci bílkovin metodou Bradfordové.

Stanovení oxidázové aktivity. Měření provádíme modifikovanou Clarkovou elektrodou

(nastavení viz 9.1.). Teplotu reakční směsi měníme tak, že nastavíme ultratermostat na teplotu 30, 37, 40, 45, 47 resp 50°C. Do reakční nádoby s 3,2 ml vytemperovaného fosfátového pufru (nasyčený kyslíkem) pipetujeme 20 µl buněčné suspenze. Po dobu 2 minut sledujeme spotřebu kyslíku na oxidaci endogenního substrátu. Potom přidáme 10 µl vytemperovaného 1% glycerolu a zaznamenáme spotřebu kyslíku po přidání tohoto exogenního substrátu (2 minuty). Spotřebu kyslíku korigujeme rozpustností kyslíku v pufru za dané teploty.

Vyhodnocení a závěr

Naměřené hodnoty spotřeby kyslíku na oxidaci endogenního substrátu a exogenního substrátu zaznamenáme do tabulky. Oxidační aktivitu vyjádříme v $\text{mmol O}_2 \cdot \text{mg}^{-1} \text{ bílkoviny} \cdot \text{min}^{-1}$. Průkaznost vlivu teplot na oxidační aktivitu buněk vyhodnotíme statisticky.

Literatura

Formánek, P., Horáková, D. (2000). Oxidase activity of *Yarrowia lipolytica* W1 cells. Scripta Fac. Sci. Nat. Univ. Masaryk. Brun. 26: 3-11.

10 Lipolytická aktivita

Úvod

Lipolytické enzymy jsou definovány jako karboxylesterázy, které hydrolyzují acylglyceroly. Lipolytické enzymy, které hydrolyzují acylglyceroly s uhlíkatým řetězcem mastných kyselin kratším než 10 C, jsou považovány za esterázy nebo karboxylázy (EC 3.1.1.1). Enzymy, které hydrolyzují acylglyceroly obsahující řetězce mastných kyselin s počtem uhlíků ≥ 10 , jsou označovány jako lipázy nebo také jako triacylglycerol acylhydrolázy (EC 3.1.1.3). Esterázy jsou aktivní ve vodných roztocích, zatímco „pravé“ lipázy jsou aktivnější spíše na rozhraní voda-lipid než ve vodní fázi (tzv. interfacial activation phenomenon).

Specifita lipolytického enzymu je kontrolována

- a) molekulárními vlastnostmi enzymu,
- b) strukturou substrátu,
- c) faktory ovlivňujícími vazbu enzymu k substrátu.

Lipolytické enzymy jsou děleny do tří skupin:

První skupina je nespecifická. Lipolytické enzymy této skupiny uvolňují mastné kyseliny ze všech tří pozic acylglycerolu a kompletně hydrolyzují triacylglyceroly na mastné kyseliny a glycerol.

Druhá skupina lipolytických enzymů je 1,3-specifická. Uvolňuje mastné kyseliny z vnějších pozic triacylglycerolu a dává vznik 1,2-diacylglycerolům, 2,3-diacylglycerolům a 2-monoacylglycerolům za uvolnění mastných kyselin. Dlouhá inkubace triacylglycerolu s 1,3-specifickými lipázami vede většinou k úplné hydrolýze triacylglycerolů na mastné kyseliny a glycerol.

Třetí skupina zahrnuje lipolytické enzymy, které preferují určité mastné kyseliny. Jde například o lipázu B izolovanou z kvasinkovité houby *Geotrichum candidum*. Tyto lipázy se však u bakterií nevyskytují.

Většina bakteriálních lipáz patří mezi extracelulární enzymy, které jsou uvolňovány do prostředí během pozdní exponenciální a časně stacionární růstové fáze. Většina mikroorganismů může produkovat více než jeden typ extracelulárních lipáz, které hydrolyzují různé dlouhé řetězce mastných kyselin. Produkci lipáz ovlivňuje celá řada vnějších faktorů, zejména teplota, pH prostředí, zdroje dusíku a tuků, koncentrace anorganických solí a dostupnost kyslíku. Stanovení lipolytické aktivity u některých bakterií je důležitý diagnostický test. Kvantitativní stanovení aktivity lipáz je možné provádět titrimetricky, fotometricky nebo fluorescenčními metodami, např. s využitím 4-metyl-umbelliferon heptanoátu. Fotometrické stanovení je založeno na uvolnění chromogenní složky substrátu, např. 4-nitrofenylpalmitátu, po působení enzymu. Základem titrimetrického průkazu lipolytické aktivity je přesné stanovení množství uvolněných mastných kyselin. Jako substrát je obvykle používán olivový olej nebo jiné přirozené tuky. Důležitým faktorem ovlivňujícím přesnost stanovení je příprava dokonale emulgovaného a stabilního substrátu.

10.1 Izolace a aktivita lipáz u buněk *S.aureus*

Princip metody

Titrační stanovení volných mastných kyselin uvolněných v procesu působení částečně purifikovaných lipáz na Tween 80 .

Materiál a zařízení

- **Mikroorganizmy:**

S.aureus CCM 5771, *S. aureus* SA 812, *S. aureus* SA 66, *S. aureus* NCTC 8511

- **Chemikálie a roztoky:**

[kultivační médium KM, MPB 1](#); [Tris-HCl pufr](#) (0,05M, pH=7,2); 96% etanol; ledová kyselina octová; 0,1M NaOH; 0,05M NaOH; 0,1M HCl; [Tween 80](#) (polyoxyetylenesorbitan monooleat, 1% emulze v 0,05M Tris-HCl pufru, homogenizovaný); směs 96% etanol : aceton v poměru 1:1; deionizovaná voda;

- **Přístroje:**

termostat s provzdušňovacím zařízením, chlazená centrifuga, pH metr s elektrodou upravenou pro nevodné prostředí, vodní lázeň, magnetická míchačka, byreta

Postup

Izolace lipázy

Ze zásobní kultury naočkujeme cca 10^8 buněk bakterií do 20 ml MPB 1 a kultivujeme 18 hodin při 30 °C. Kultivační médium (500 ml) naočkujeme 20 ml narostlého inokula a pokračujeme v kultivaci 24 h při stejné teplotě za intenzivního provzdušňování. Po skončené kultivaci buňky odcentrifugujeme na chlazené centrifuze (+4 °C) při 8000 ot. min^{-1} po dobu 20 min. Čirý supernatant umístíme na 6 hodin do chladničky a potom provedeme izolaci lipáz. Při izolaci postupujeme podle následujícího schématu:

500 ml ochlazeného supernatantu (pH upraveno ledovou kys. octovou na hodnotu 4,3)

+

500 ml 96% etanolu (+4°C)

↓

uložit na 24 h do +4 °C

↓

centrifugace (6000 otáček min^{-1} , 30 min, +4°C)

↓

sediment + 400 ml deionizované vody (pH upravit na 8,9 pomocí 0,1M NaOH)

↓

centrifugace (3000 otáček min^{-1} , 20 min, +4 °C)

↓

supernatant- pomalu upravit pH na 4,3 pomocí 0,1M HCl

↓

centrifugace 1500 otáček min^{-1} , 20 min, +4 °C

↓

sediment rozpustit ve 40 ml 0,05M Tris-HCl pufru

Stanovení lipolytické aktivity. Do Erlenmayerových baněk (100 ml) napipetujeme 5 ml Tris-HCl pufru, 0,4 ml vzorku a temperujeme 15 min ve vodní lázni (37 °C). Potom přidáme 5 ml 1% Tween 80 vytemperovaného na 37 °C. Enzymatickou reakci zastavíme po 20 min přidáním 20 ml směsi aceton: etanol (1:1). Množství uvolněných mastných kyselin stanovíme titrací 0,05M NaOH. Jako kontrola slouží Tris-HCl pufr (5,4 ml) s 5 ml 1% Tween 80. Stanovení volných mastných kyselin provedeme titrací 0,05M NaOH do hodnoty pH=12.

K měření hodnoty pH používáme elektrodu upravenou pro nevodné prostředí (úprava elektrody podle Hoďák, Němec, 1985). Spotřeba 0,05M NaOH vyjádříme v μmolech (po odečtu spotřeby 0,05 M NaOH při titraci kontroly).

Koncentraci bílkovin ve vzorku stanovíme metodou dle Bradfordové (viz 2.1)

Vyhodnocení a závěr

Porovnáme aktivitu lipáz jednotlivých kmenů *S.aureus* na základě :

- 1) Stanovení objemové aktivity (μmol spotřebovaného NaOH : objemu vzorku v reakční směsi),
 - 2) Stanovení specifické aktivity (objemová aktivita vztažena na mg bílkoviny vzorku).
- Hodnoty vyneseme do tabulky a statisticky vyhodnotíme průkaznost rozdílů v aktivitě lipázy u studovaných kmenů.

Literatura

Ota, Y., Yamada, K. (1967). Lipase from *Candida lipolytica*. Part III. Further studies on the activation of the enzyme systems with bile or calcium salts. *Agric. Biol. Chem.* 31:809-810.

Hod'ák, K., Němec, M. (1985). Praktikum z fyziologie bakterií. Skriptum UJEP Brno.

10.2 Stanovení exolipáz s využitím chromogenního substrátu

Princip metody

Fotometrické stanovení lipolytické aktivity s využitím štěpení umělého chromogenního substrátu.

Materiál a metody

- **Mikroorganismy :**

Serratia marcescens CCM 303

- **Chemikálie a roztoky:**

Minimální médium M9, 4-nitrofenylpalmitát, izopropanol, pufř fosfátový (0,05 M, pH=8,0), deoxycholát sodný, arabská guma.

- **Přístroje:**

termostat s provzdušňovacím zařízením, chlazená centrifuga, pH metr s elektrodou pro nevodné prostředí, vodní lázeň, magnetická míchačka, byreta

Postup

Kultivace mikroorganismů. Minimální syntetické médium M9 naočkujeme buňkami kmene *S.marcescens* tak, aby výsledná hustota buněk dosáhla hodnoty 0,5% při 580 nm. Kultivujeme na třepačce ve vodní lázni při teplotě 30°C po dobu 24 h . Buňky odstředíme (+4°C) 15 min při 5000 ot.min⁻¹. Supernatant použijeme pro stanovení aktivity exolipáz.

Příprava chromogenního substrátu. 10 ml izopropanolu obsahujícím 30 mg 4-nitrofenylpalmitátu smícháme s 90 ml 0,05M fosfátového pufřu (pH=8,0), který obsahuje 207 mg deoxycholátu sodného a 100 mg arabské gumy.

Stanovení lipázové aktivity. 2,4 ml čerstvého roztoku chromogenního substrátu temperujeme na teplotu 37°C. Poté přidáme 0,1 ml supernatantu. Inkubujeme 15 min při teplotě 37°C. Reakci zastavíme přidáním 2,5 ml 1M NaOH. Koncentraci uvolněného 4-nitrofenolu stanovíme na fotometru při vlnové délce 400 nm (faktorizace proti 4-nitrofenolu). Naměřené hodnoty korigujeme kontrolou, ve které supernatant nahradíme čerstvým kultivačním médiem M9.

Vyhodnocení a závěr

Výpočet aktivity exolipázy. Jedna jednotka enzymu je definována jako 1 nmol 4-nitrofenolu (enzymaticky uvolněný ze substrátu) ml⁻¹.min⁻¹.

Literatura

- Beisson,F.,Tiss,A.,Riviere,C.,Verger,R. (2000).** Methods for lipase detection and assay: A critical review. *European Journal of Lipid Science and Technology*,102(2): 133-153.
- Chen,L.,Daniel,R.M., Coolbear,T. (2003).** Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders. *Internatiol Dairy Journal* 13(4) : 255-275 .
- Jaeger,K.E.,Ransac,S.,Dijkstra,B.W., Colson,C.,van Heuvel, M., Misset,O.(1994).** Bacterial lipases. *FEMS Microbiol.Rev.*,15(1) :29-63

11 Enzymatická aktivita půdního vzorku

11.1 Stanovení proteázové aktivity

Úvod

Proteázy, detekované u mikroorganismů, rostlin a živočichů, katalyzují hydrolýzu proteinů na peptidy a oligopeptidů na aminokyseliny. Z důvodu vysoké molekulové hmotnosti proteinů se uskutečňuje první enzymatický stupeň degradace proteinů na vnější straně mikrobiální buňky. Sloučeniny s nízkou molekulovou hmotností, jako např. aminokyseliny, mohou být transportovány do buněk specifickými transportními systémy. Zde jsou potom aminokyseliny deaminovány. Projevem degradace proteinů v půdě je uvolňování amoniaku. Proteázy v půdě jsou přítomné jak v živých a aktivních buňkách, tak i v mrtvých buňkách nebo ve formě volných enzymů adsorbovaných k organickým, anorganickým nebo organominerálním částicím. Nejvyšší proteázová aktivita v půdě může být zaznamenána při pH =8 a teplotním optimu okolo 55 °C. Při teplotě blízké se 60 °C jsou však enzymy již denaturovány. Při sušení nebo skladování různých vzorků půd na vzduchu (teplota -8 až 22 °C) dochází k výraznému snížení jejich proteázové aktivity. V přírodě dochází ke změnám proteázové aktivity půdy v závislosti na ročním období, tedy bez výrazné korelace se změnami mikrobiální populace. Proteázová aktivita se snižuje v hlubších vrstvách půdy a naopak vzrůstá po obohacení půdy organickými sloučeninami přidanými např. ve formě slámy. Proteázy můžeme z půdy extrahovat a stanovit jejich aktivitu. Pro stanovení proteázové aktivity v půdě lze využít různé substráty jako kasein, azokasein, želatinu, peptidy, albuminy a různé postupy lišící se v inkubačních podmínkách vzorků a v délce inkubace (2 až 16 h).

Princip metody

Metoda podle Ladd and Butler (1972) je založena na stanovení TCA-rozpustných derivátů tyrozinu uvolněných po inkubaci půdy s kaseinát sodným po dobu 2 h při 50 °C s využitím Folin-Ciocalteu činidla. Metoda stanovení proteázové aktivity půdního vzorku může být modifikována změnou hodnotou pH prostředí a teplotních podmínek reakce. Různé typy půd vykazují významné rozdíly v proteázové aktivitě i za podmínek metody podle Ladd a Butler (1972)

Materiál a zařízení

- **Materiál:**

půdní vzorky

- **Chemikálie a roztoky:**

[Tris-HCl pufr](#) (0,05 M, pH=8,1), 2% kaseinát sodný, 15% trichloroctová kyselina (TCA), [čínidlo alkalické](#), [čínidlo Folin-Ciocalteu \(33%\)](#), standardní roztok tyrozinu (500 µg.ml⁻¹)

- **Přístroje:**

spektrofotometr, vodní lázeň s třepačkou, centrifuga

Postup

Příprava vzorku. Vlhkou půdu přesijeme přes síto (průměr otvorů 2 mm). 1 g takto homogenizované půdy nasypane do centrifugační zkumavky se závitkem (25 ml) a přidáme 5 ml 0,05M Tris-HCl pufru (pH=8,1) a 5 ml 2% kaseinátu sodného. Zkumavky uzavřeme, obsah protřepeme a vzorek inkubujeme 2 h při 50 °C ve vodní lázni s třepačkou. Na konci kultivace přidáme 5 ml 15% TCA a obsah důkladně protřepeme.

Příprava kontroly. Navážíme 1 g homogenizované půdy a přidáme 5 ml 0,05 Tris-HCl pufru (pH=8,1). Zkumavky důkladně protřepeme a inkubujeme společně se vzorkem půdy ve vodní lázni s třepačkou při teplotě 55°C. Ke kontrolnímu vzorku přidáme na konci kultivace 5 ml 2% kaseinátu sodného a ihned přidáme 5 ml 15% TCA.

Stanovení. Vzorek i kontrolu centrifugujeme při 10 000 – 12 000 ot. min⁻¹ po dobu 10 min. Ze zkumavek opatrně odpipetujeme 5 ml čirého supernatantu , přidáme 7,5 ml alkalického činidla a inkubujeme 15 min při pokojové teplotě. Potom přidáme 5 ml Folin-Ciocalteu činidla, směs zfiltrujeme přes papírový filtr do skleněné zkumavky. Absorbanci vzorku i kontroly změříme nejdříve po 1h při vlnové délce 700 nm (naměřené hodnoty absorbance jsou pak konstantní po dobu několika dalších hodin).

Příprava kalibrační křivky. Do skleněných zkumavek pipetujeme 0,1,2,3,4,5 ml standardního roztoku tyrozinu. Do každé zkumavky přidáme 5 ml kaseinátu sodného a všechny zkumavky doplníme do objemu 10 ml 0,05M Tris-HCl pufrům. Přidáme 5 ml 15% roztoku TCA a provedeme měření jako u vzorku a kontroly. Kalibrační křivku připravujeme pro každou analýzu!!

Pozn. Supernatanty můžeme uchovávat max. po dobu 5 h při teplotě +4°C. Fumigace chloroformem nemá vliv na proteázovou aktivitu půdních vzorků.

Vyhodnocení a závěr

Naměřené hodnoty pro vzorky korigujeme hodnotami naměřenými v kontrole. Výpočet provedeme ze vztahu :

$$\text{proteázová aktivita} = \frac{C \times 15}{\text{sušina}} \quad (\mu\text{g tyrozinu} \cdot \text{g}^{-1} \text{sušina} \cdot 2 \text{ h}^{-1})$$

kde **sušina** je suchá váha 1 g vlhké půdy, **15** je konečný objem roztoku přidaného k půdnímu vzorku, **C** je naměřená koncentrace tyrozinu ($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ supernatantu nebo filtrátu).

Literatura

Alef, K., Nannipieri, P. (1995). Protease activity. In Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry (Alef, K., Nannipieri, P. Eds.), Academic Press, Harcourt Brace and Company Publishers, London : 313-315.

Ladd, J.N., Butler, J.H.A. (1972). Short-term assays of soil proteolytic enzyme activities using proteins and dipeptide derivatives as substrates. Soil Biol. Biochem. 4: 19-30.

11.2 Stanovení ureázové aktivity I.

Úvod

Enzym ureáza katalyzuje hydrolýzu močoviny na CO₂ a NH₃ v průběhu reakce založené na tvorbě karbamátů jako intermediátů.



Enzym je produkován nejen mikrobiálními buňkami, ale i rostlinnými a živočišnými buňkami. Může katalyzovat také hydrolýzu hydroxymočoviny, dihydroxymočoviny a semikarbazidu. Tento enzym obsahuje nikl a jeho molekulová hmotnost se pohybuje v rozmezí 151 000 až 480 000 Da. Pro stanovení ureázové aktivity půdy byla navržena celá řada metod. Principem těchto stanovení je nejčastěji sledování uvolněného amoniaku. Jiné metody stanovují zbytkovou močovinu po hydrolýze půdy. Autoři navržených metod nejsou jednotní v názoru na pH optimum ureázové aktivity v půdě. Za pH optimum bývá považována jak hodnota pH v rozmezí 6 až 7, tak i v rozmezí 8,8 až 10. Ureáza v půdě bývá vázaná na půdní organickou hmotu a půdní minerály. Teplotní optimum pro enzymatickou reakci se pohybuje kolem 60 °C a ureáza samotná je denaturovaná při 70 °C. Inkubační teplota vzorků pro stanovení ureázové aktivity se rovněž pohybuje v širokém teplotním rozmezí 15° až 42 °C (nejčastěji 30 °C). Ureáza extrahovaná z půdy je rezistentní k teplotní a proteolytické denaturaci, neboť často vytváří vysokomolekulární komplexy s organickými složkami půdy. Aktivita ureázy v půdě je velmi stabilní a málokdy je ovlivňována sušením půdy na vzduchu, zářením nebo skladováním půdy při teplotě v rozmezí -60°C až + 22°C. Aktivita ureázy v půdě významně nekoreluje s obsahem půdní biomasy a může být různým způsobem ovlivňována těžkými kovy, koncentrací kyslíku a obsahem dusíku v různých typech půd. Značná pozornost je věnována studiu inhibitorů ureázové aktivity, které mohou být využívány v zemědělství k zabránění průběhu rychlé hydrolýzy močoviny po hnojení.

Princip metody

Metoda je založena na stanovení amoniaku uvolněného po inkubaci půdních vzorků

Materiál a zařízení

- **Materiál:**

půdní vzorky

- **Chemikálie a roztoky:**

toluen, [Tris-HCl pufr](#) (0,05 M ,pH=9,0), [standard NH₄-N](#) (50µg NH₄-N ml⁻¹), [čínidla ke stanovení NH₄-N](#), [roztok ke stanovení ureázy](#), [0,2 M močovina](#), MgO vysušený při 600-700°C po dobu 2 h (po vychlazení uložit do exikátoru se silikagelem), 0,005 M H₂SO₄

- **Přístroje:**

pH-metr, titrační zařízení (nejlépe automatické), inkubátor, zařízení k destilaci parou.

Postup (provádíme v digestoři s odtahem)

Příprava vzorku. 5 g vlhké homogenizované půdy vsypeme do odměrné baňky o objemu 50 ml, přidáme 0,2 ml toluenu a 9 ml Tris-HCl pufru (pH=9,0). Obsah v baňce promícháme a přidáme 1 ml močoviny (0,2M) Intenzivně protřepeme (cca 5 s). Potom baňku uzavřeme zátkou a inkubujeme po dobu 2 h při teplotě 37 °C. Po inkubaci půdního vzorku přidáme přibližně 35 ml roztoku ke stanovení ureázy (KCl + Ag₂SO₄). Intenzivně třepeme 5s a potom baňku ponecháme stát přibližně po dobu 5 min v digestoři při pokojové teplotě. Objem vzorku upravíme na 50 ml dalším přídatkem roztoku pro stanovení ureázy.

Příprava kontroly. Celý postup je shodný jako ve vzorku. Pouze po přidání 35 ml roztoku pro stanovení ureázy přidáme 1 ml 0,2 M močoviny.

Pozn. Doporučuje se provádět stanovení alespoň ve třech opakováních. Reakce má lineární průběh po dobu 5 h.

Stanovení uvolněného amoniaku. Do Erlenmayerovy baňky pipetujeme 5 ml indikátoru s kyselinou boritou. Do destilační baňky (objem 100 ml) napipetujeme 20 ml vytvořené půdní suspenze a přidáme 0,2g MgO. Destilujeme parou, destilát jímáme do Erlenmayerovy baňky s indikátorem do objemu 30 ml. Destilát titrujeme 0,005 M H₂SO₄ (1 ml 0,005M kyseliny sírové odpovídá 70 μg NH₄-N).

Vyhodnocení a závěr

Provedeme výpočet uvolněného NH₄-N po korekci naměřených výsledků kontrolou. Výpočet provedeme podle vztahu :

$$\text{Ureázová aktivita} = \frac{\mathbf{C} \times \mathbf{50}}{\text{sušina} \times \mathbf{5}} \quad (\mu\text{g NH}_4\text{-N} \cdot \text{g}^{-1} \text{sušina} \cdot 2 \text{ h}^{-1})$$

kde **sušina** je suchá váha 1 g vlhké půdy, **50** je celkový objem půdní suspenze, **5** je hmotnost použité půdy v testu, **C** je naměřená koncentrace NH₄-N(μg NH₄-N ml⁻¹ půdní suspenze).

Literatura

Tabatabai, M.A., Bremner, J.M. (1972). Assay of urease activity in soil. Soil Biol.Biochem.4 : 479-487.

11.3 Stanovení ureázové aktivity II.

Princip metody

Metoda je založena na kolorimetrickém stanovení amoniaku po inkubaci půdních vzorků s močovinou.

Materiál a zařízení

- **Materiál:**
půdní vzorky

- **Chemikálie a roztoky:**

močovina (2,4 g ve 500 ml destilované vody), [roztok salicylátu sodného](#), [roztok KCl, 0,3M NaOH](#), 0,1 % roztok dichloroisokyanidu sodného, [borátový pufr](#) (pH=10), [standardy NH₄-N \(I + II\)](#).

- **Přístroje:**

pH-metr, spektrofotometr, třepačka

Postup

Postup pro „nepufrovanou metodu“

5 g půdního vzorku (homogenizovaná vlhká půda) vysypeme do Erlenmayerovy baňky o objemu 100 ml. Přidáme 2,5 ml roztoku močoviny. Uzavřenou baňku inkubujeme po dobu 2 h při 37°C. Po inkubaci přidáme 50 ml roztoku KCl a baňku umístíme na 30 min. do třepačky. Vzniklou suspenzi filtrujeme přes papírový filtr a ve filtrátu stanovíme koncentraci uvolněného amoniaku. Kontrolní vzorek připravíme tak, že močovinu přidáme těsně před přidáním roztoku KCl (tedy až na konci kultivace).

Pozn. Doporučují se vždy tři opakování.

Stanovení amoniaku: 1 ml čistého filtrátu pipetujeme do Erlenmayerovy baňky o objemu 50 ml. Přidáme 9 ml destilované vody, 5 ml roztoku Na-salicylát/NaOH a 2 ml roztoku dichlorokyanidu sodného. Baňku ponecháme 30 min. stát při pokojové teplotě. Kolorimetrické stanovení provádíme při vlnové délce 690 nm.

Postup pro „pufrovanou metodu“

Do Erlenmayerovy baňky o objemu 100 ml navážíme 5g vlhké půdy (viz výše), přidáme 2,5ml roztoku močoviny a 20 ml borátového pufru. Další kroky odpovídají postupu popsanému pro „nepufrovanou metodu“ s tím rozdílem, že na konci inkubace přidáme jen 30 ml roztoku KCl.

Kalibrační křivky

1 ml standardu NH₄-N (II) ve zkumavkách zředíme 9 ml destilované vody a vypočteme koncentrace (0, 1, 1,5, 2, 2,5 μg NH₄-N ml⁻¹)

Vyhodnocení a závěr

Naměřené výsledky korigujeme slepým vzorkem a vypočteme ureázovou aktivitu podle vztahu :

$$\frac{\mu\text{g NH}_4\text{-N} \cdot \text{ml}^{-1} \times V \times 10}{\text{sušina} \times 5} = \text{ureázová aktivita } (\mu\text{g NH}_4\text{-N g}^{-1} \text{ sušina 2 h}^{-1})$$

kde **sušina** je suchá hmotnost 1g vlhké půdy, **V** je celkový objem extraktu (52,5 ml), **10** je ředící faktor a **5** je hmotnost půdy, která byla použita k analýze.

Pozn. Ureázová aktivita půdy je vyšší při stanovení „pufrovanou metodou“.

Literatura

Kandeler, E., Gerber, H. (1988). Short-term assay of soil urease activity using colorimetric determination of ammonium. Biol.Fertil. Soils, 6: 68-72.

11.4 Stanovení celulózové aktivity I

Úvod

Celulóza je obvyklým strukturálním polysacharidem ve stěnách rostlinných buněk. Mikrobiální degradace celulózy patří k významným přírodním procesům, které se podílejí na likvidaci rostlinných zbytků. Po chemické stránce je celulóza lineárním polymerem D-glukózy s $\beta(1-4)$ glukosidickými vazbami. Molekulová hmotnost celulózy se podle zdroje pohybuje mezi 50 000 a 250 000. Je zajímavé, že celulóza má vysokou afinitu k vodě, ale je v ní zcela nerozpustná. Enzym celulóza katalyzuje hydrolyzu celulózy na D-glukózu a je tvořena nejméně třemi enzymy : endo- β -1,4-glukanáza (EC 3.2.1.4); exo- β -1,4-glukanáza (EC 3.2.1.91) a β -glukosidáza (EC 3.2.1.22). Exocelulázy se váží ke krystalické celulóze a štěpí celuloooligosacharidy od neredukovaného konce celulózové molekuly. Endocelulázy štěpí glukosidické vazby mezi nekystalickými částmi celulózy, β -glukosidáza odštěpuje glukózu z celuloooligosacharidů a aryl- β -glukosidů. Citlivost celulózy k enzymatickému ataku je dána stupněm její krystalizace, charakterem navázaných látek a velikostí povrchu. Degradace celulózy v půdě probíhá velmi pomalu. Rychlost degradace celulózy je ovlivněna zejména obsahem vody v půdě, hodnotou pH a teplotou prostředí. Všeobecně se uvádí, že celulázy vykazují optimální aktivitu při pH 5-6 a teplotě v rozmezí 30 – 50°C. Celulázy v půdě jsou nejčastěji produkovány houbami. Pouze 5 druhů rodu *Actinomyces* může na celulóze růst a využívat ji jako jediný zdroj uhlíku. Významnými celulolytickými mikroorganismy v půdě jsou rovněž zástupci rodu *Clostridium*, kteří štěpí celulózu za anaerobních podmínek.

Princip metody

Metoda je založena na stanovení redukujících cukrů po inkubaci půdního vzorku s karboxymetylcelulózou po dobu 24 h při teplotě 50°C. **Může být stanovena pouze aktivita endonukleázy a β -glukosidázy.**

Materiál a zařízení

- **Materiál:**
půdní vzorky
- **Chemikálie a roztoky:**
[Acetátový pufr](#) (2M, pH= 5,5), [roztok karboxymetylcelulózy \(KMC\)](#), [činitla pro stanovení redukujících cukrů I](#), roztok glukozomonohydrátu (28 mg v 1000 ml dest.vody)
- **Přístroje :**
spektrofotometr, inkubátor, vodní lázeň do 100°C

Postup

Příprava vzorků a kontroly. Vlhkou ornici a vlhkou lesní půdu odděleně protlačíme přes síto o velikosti ok 2 mm. Do Erlenmayerovy baňky navážíme 10 g vlhké homogenizované ornice a 5 g lesní půdy. Přidáme 15 ml acetátového pufru a 15 ml KMC. Baňku uzavřeme a inkubujeme 24 h při teplotě 50°C. Po inkubaci vytvořenou půdní suspenzi filtrujeme. Současně připravíme kontrolu, ke které přidáváme 15ml KMC až po inkubaci bezprostředně před filtrací. Filtrát ředíme tak, že 1 ml vzorku z orné půdy přidáme do 20 ml destilované vody a 1 ml vzorky z lesní půdy přidáme do 30 ml destilované vody. Vzorky rozpipetujeme po 1 ml do zkumavek, přidáme 1 ml činidla A a 1 ml činidla B (pH vzorků musí být vyšší než 10,5!) Uzavřeme zkumavky, promícháme a vaříme ve vodní lázni (100°C) po dobu 15 min. Vzorky ochladíme ve vodní lázni na 20°C (chlazení cca 5 min.) a přidáme 5 ml činidla C (pH nižší než 2). Promícháme a ponecháme při pokojové teplotě po dobu 60 min. Vzorky proměříme na spektrofotometru při vlnové délce 690 nm (zbarvení je trvalé po dobu přibližně 30 min.!!)

Kalibrační křivka. Do zkumavek pipetujeme 0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9; 1,0 ml glukózy (28 mg v 1000 ml dest.vody). Doplňme destilovanou vodou na 1 ml a stanovíme redukující cukry (jako u vzorku).

Vyhodnocení a závěr

Vypočet ekvivalentů glukózy provedeme podle vztahu :

$$\frac{C \times V \times f}{sw \times sušiny} = \text{ekvivalenty glukózy } (\mu\text{g g}^{-1}\text{sušiny } 24\text{h}^{-1})$$

kde **C** je naměřená hodnota koncentrace glukózy (mg glukózy . ml⁻¹ filtrátu), **V** je objem suspenze (v tomto systému V=30 ml), **f** je ředící faktor (20 pro ornici a 40 pro lesní půdu), **sw** je hmotnost mokré půdy (10g nebo 5 g), **sušina** představuje suchou hmotu 1 g vlhké půdy.

Porovnáme aktivitu celuláz sledovaných vzorků.

Pozn.Metoda je doporučena hlavně pro lesní půdy. Pro ornou půdu dává relativně nízké hodnoty. Vysoušení vzorků na vzduchu snižuje enzymatickou aktivitu půdy.

Literatura

Schinner,F.,Von Mersi ,W. (1990). Xylanase-,CM-cellulase- and invertase activity in soil: an improved method. Soil Biol.Biochem.22:511-515.

11.5 Stanovení celulázové aktivity II

Princip metody

Stanovení redukujících cukrů uvolněných po inkubaci půdních vzorků s celulózou. Touto metodou lze stanovit celkovou celulázu (endoglukanázu, exoglukanázu a β-glukosidázu).

Materiál a zařízení

- **Materiál:**

půdní vzorky

- **Chemikálie a roztoky:**

[Acetátový pufr](#) (0,1M, pH= 5,5), mikrokrytalická celulóza (MCC), [činidla pro stanovení redukujících cukrů II](#), [roztok arzenát-molybdenát](#), standard glukózy.

- **Přístroje :**

spektrofotometr, inkubátor, vodní lázeň do 100°C, centrifuga

Postup

Příprava vzorků a kontroly. 1 g vlhké půdy navážíme do Erlenmayerovy baňky (25 ml) a přidáme 5 ml acetátového pufru a 0,5 g MCC. Uzavřeme baňku a inkubujeme na třepačce ve vodní lázni při teplotě 40°C po dobu 16 h . Reakci zastavíme tak, že vzorek centrifugujeme při 2500g po dobu 10 min. Kontrolu připravíme tak, že MCC přidáme až po inkubaci, bezprostředně před centrifugací. Reakce provádíme vždy ve dvou opakováních. Stanovíme redukující cukry v supernatantu: do testovací zkumavky pipetujeme 1 ml supernatantu a přidáme 1 ml činidla . Zkumavky uzavřeme a vaříme (vroucí vodní lázeň) po dobu 20 min. Po ochlazení přidáme 1 ml roztoku arzenát-molybdenan a dobře protřepeme. Přidáme 3 ml destilované vody a měříme při vlnové délce 520 nm.

Kalibrační přímka: viz stanovení celulózy aktivity I.

Vyhodnocení a závěr

Zaznamenáme naměřené hodnoty pro vzorky a tyto korigujeme hodnotami pro kontrolu.

Provedeme výpočet :

$$\frac{C \times V}{\text{sušina}} = \text{ekvivalenty glukózy } (\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \text{sušiny } 16 \text{ h}^{-1})$$

kde **C** je naměřená koncentrace glukózy ($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ supernatantu), **V** je objem suspenze půdy (v tomto experimentu $V = 5,5 \text{ ml}$) a **sušina** je suchá hmotnost 1 g vlhké půdy.

Pozn. Enzymatická reakce je lineární po dobu 16h. Inkubace půdní suspenze s azidem brání asimilaci glukózy půdními mikroorganismy.

Literatura

Hope, C.F.A., Burns, R.G. (1987). Activity, origins and location of cellulase in a silt loam soil. Biol.Fertil.Soils 5 :164-170.

12 Stanovení biodegradability ropných látek

Úvod

Na procesech biologické degradace ropných látek se podílí více než 70 rodů mikroorganismů. Bylo prokázáno, že v prostředí, které je kontaminováno ropnými uhlovodíky, procentuální zastoupení degradátorů ropy a ropných uhlovodíků prudce stoupá. Vysoká rychlost biodegradace je typická pouze pro nasycené uhlovodíky a lehké aromatické uhlovodíky. Extrémně nízkou rychlostí jsou degradovány vysokomolekulární aromáty, asfaltické uhlovodíky a pryskyřice. Anaerobní degradace uhlovodíků v přírodě probíhá jen velmi pomalu. Pro úplnou mineralizaci uhlovodíků je vždy nutný tzv. „respirační stupeň“. Za aerobních podmínek slouží kyslík jednak jako terminální akceptor elektronů, které jsou uvolňovány během oxidace organického substrátu, jednak jako reaktant, při primárním ataku uhlikatého substrátu. Využívání molekulového kyslíku v mikrobiálních katabolických reakcích je podmíněno specifickými enzymy – oxygenázami (monooxygenázy a dioxygenázy). Předpověď degradace polutantu v aerobním prostředí vychází často z laboratorní studie biodegradability, při níž může být sledována např. spotřeba kyslíku na oxidaci kontaminující látky nebo produkce CO₂ při úplné mineralizaci uhlikatého substrátu. Často je sledován i úbytek polutantu v závislosti na době inkubace vzorku, podmínkách prostředí (pH, teplota, poměr uhlíku, dusíku a fosforu v prostředí, přítomnost aktivátorů apod.), či stanovení primárních reakčních meziproduktů biodegradace.

12.1 Stanovení biologické rozložitelnosti hexadekanu s využitím

metody Oxi-Top

Princip metody

Manometrická metoda měření spotřeby kyslíku v průběhu oxidace organického substrátu hexadekanu, který slouží jako jediný zdroj uhlíku.

Materiál a zařízení

- **Mikroorganismy :**

Yarrowia lipolytica CCM 4510, *Pseudomonas putida* CCM 4307, *Geotrichum candidum* CCM 8170.

- **Chemikálie a roztoky:**

[MPB 1](#), [MEB](#), [definované minerální medium DMA](#), hexadekan (zdroj uhlíku), NaOH, [pufr Tris-HCl](#) (0,05M ,pH= 7,2) ,nitřníkační inhibitor NHP600 (WTW)

- **Přístroje :**

zařízení Oxi-Top® (WTW), kalibrované láhve WTW, měřicí hlavy, gumová nádobka na NaOH (odstranění CO₂ z prostředí), vodní lázeň, termostat, chlazená centrifuga, magnetická míchačka, termobox.

Postup

Příprava bakteriální suspenze. Ze zásobního šikmého agaru přeočkujeme cca 10^8 buněk (jedna plná očkovací klička) do 20 ml MPB 1 (resp.MEB pro kvasinky). Kultivujeme při 30°C po dobu 24 h. 2 ml připraveného inokula očkujeme 250 ml MPB1 (resp.MEB) a kultivujeme 16h při teplotě 26°C za intenzivního třepání ($125 \text{ kyvů} \cdot \text{min}^{-1}$, amplituda 6). Narostlé buňky centrifugujeme při $6000 \text{ ot} \cdot \text{min}^{-1}$ po dobu 20 min. Sediment buněk resuspendujeme ve stejném objemu Tris-HCl a centrifugujeme. Promývání buněk opakujeme nejméně třikrát. Buněčný sediment naředíme v DMA tak, aby zákal buněčné suspenze při vlnové délce 600 nm odpovídal 85%. Ze suspenze odebereme vzorky pro stanovení sušiny (viz.2.2).

Příprava vzorku. Do kalibrovaných láhví o objemu 500 ml pipetujeme 22,6 ml buněk v DMA ($\text{O.D.}_{600} = 85\%$), přidáme 0,1 ml sterilního hexadekanu a několik zrněk nitrifikačního inhibitoru. Do láhve umístíme sterilní teflonové míchadlo a láhev uzavřeme gumovou nádobkou se 3 čočkami NaOH a měřicí hlavou. Láhev umístíme na magnetickou míchačku umístěnou v termoboxu. Měření spotřeby kyslíku zahájíme přibližně po 2 hodinách inkubace (temperování vzorků a stabilizace prostředí). Měření provádíme dvakrát denně po dobu 5 dnů. Přesně zaznamenejme hodnoty na displeji a dobu měření.

Příprava kontroly: Do láhve pipetujeme 22,7 ml buněk v DMA. Další postup jako u vzorků.

Vyhodnocení a závěr

Naměřené hodnoty uspořádáme do tabulky. Provedeme přepočítání pro objem 22,7 ml tak, že naměřené hodnoty vynásobíme faktorem 100 (přepočítávací faktor podle metodiky výrobce). Hodnoty spotřeby kyslíku v $\text{mg O}_2 \cdot \text{l}^{-1}$ vztáhneme na sušinu vložené biomasy a výsledky korigujeme spotřebou kyslíku v kontrole. Hodnoty zaznamenejme do tabulky a sestrojíme graf závislosti spotřeby kyslíku na době inkubace. Degradční schopnost jednotlivých kmenů porovnáme výpočtem $\text{mg O}_2 \cdot \text{mg}^{-1} \text{sušiny} \cdot \text{den}^{-1}$.

Literatura

Robertz,M., Muckenheim,T., Eckl,S., Webb,L. (2000). Cost-effective method of determining soil respiration in contaminated and uncontaminated soils for scientific and routine analysis.In Remediation engineering of contaminated soils Wise,D.L. et al. (Eds.), Marcel Dekker, Inc. New York-Basel, pp. 573- 583.

12.2 Využití mikroorganismů k degradaci kontaminovaných půdních vzorků

Princip metody

Čištění půd kontaminovaných ropou a ropnými deriváty je v praxi urychlováno aplikací mikrobiálních preparátů s vysokou degradační aktivitou. Mikrobiální preparáty mohou být tvořeny jedním nebo několika kmeny degradujících mikroorganismů. O vhodnosti aplikace těchto preparátů do terénu se můžeme přesvědčit laboratorním pokusem s využitím metody Oxi-Top.

Materiál a zařízení

- **Mikroorganismy:**

Pseudomonas putida CCM 4307, *Geotrichum candidum* CCM 8170

- **Chemikálie a roztoky:**

vzorek kontaminované půdy, [MPB 1](#), [MEB](#), [DMA](#) (zdroj dusíku, fosforu a hořčíku), NaOH, [Tris-HCl](#) (0,05M, pH=7,2), nitrifikační inhibitor NTH600 (WTW)

- **Přístroje :**

zařízení Oxi-Top® (WTW), kalibrované láhve WTW, měřicí hlavy, gumová nádobka na NaOH (odstranění CO₂ z prostředí), vodní lázeň, termostat, chlazená centrifuga, magnetická míchačka, termobox.

Postup

Příprava bakteriální suspenze jako u 12.1.

Příprava vzorku. Půdu protlačíme přes síto o průměru ok 2 mm. Do reakční láhve navážíme 10 g homogenizované půdy a přidáme 10 ml DMA. Vzniklou suspenzi doplníme do objemu 20 ml DMA. Vzorek doplníme 2,7 ml bakteriální suspenze (pro každý kmen připravíme 2 reakční láhve) a přidáme několik zrněk inhibitoru nitrifikace. Do láhve umístíme teflonové míchadlo a láhev uzavřeme gumovou nádobkou s NaOH a měřicí hlavou Oxi-Top. Láhev umístíme na magnetickou míchačku do termoboxu temperovaného na 26°C. Po 2 hodinách zahájíme měření půdní respirace vynulováním hodnot na displeji. Odečet hodnot provádíme po dobu 5 dnů.

Příprava „fertilizované“ kontroly 1. Do reakční láhve navážíme 10 g homogenizované půdy a přidáme 10 ml DMA (zdroj dusíku a fosforu). Vzniklou suspenzi doplníme do objemu 22,7 ml DMA. Dále jako u vzorku. Kontrola slouží pro sledování půdní respirace „fertilizovaného“ vzorku kontaminované půdy.

Příprava kontroly 2. Připravíme jako kontrolu 1 s tím rozdílem, že místo DMA přidáme sterilní destilovanou vodu.

Vyhodnocení a závěr

Naměřené hodnoty uspořádáme do tabulky. Provedeme přepočítání pro objem 22,7 ml tak, že naměřené hodnoty vynásobíme faktorem 100 (přepočítávací faktor podle metodiky výrobce). Hodnoty spotřeby kyslíku vyjádříme v mg O₂.l⁻¹, zaznamenáme do tabulky a sestrojíme graf závislosti spotřeby kyslíku (k oxidaci organického substrátu ve vzorku resp. kontrole) na době inkubace. Posoudíme možnost využití aplikovaného mikroorganismu pro praktickou aplikaci v odběrové lokalitě.

Literatura

Robertz,M., Muckenheim,T., Eckl,S., Webb,L. (2000). Cost-effective method of determining soil respiration in contaminated and uncontaminated soils for scientific and routine analysis. In Remediation engineering of contaminated soils Wise,D.L.et al. (Eds.), Marcel Dekker, Inc. New York-Basel, pp. 573- 583.

13 Stanovení akutní toxicity

Úvod

Bakteriální bioluminiscenční test toxicity (BBTT), v laboratořích známý pod komerčním názvem MicrotoxTM, byl již v 70. let využíván ke stanovení toxicity chemicky definovaných vzorků a později také ke stanovení toxicity vzorků z prostředí. Monitorování xenobiotik v životním prostředí je v současné době hlavní oblastí využití BBTT, kdy se mohou v plné míře uplatnit výhody tohoto testu – jednoduché provedení, rychlost odpovědi (je možné měřit rychlost odpovědi od začátku kontaktu toxikantu s testovacím organismem) a dobrá reprodukovatelnost výsledků. Široké uplatnění získává BBTT jako screeningová metoda při monitorování podzemních, povrchových, odpadních i průmyslových vod, chemických individuů, komplexů a směsí látek (dobře rozpustných ve vodě). Problematictější je stanovení toxicity půdy. V tomto případě musí být nejprve provedena extrakce vzorku a výluh, obvykle vodní, je potom použit ke stanovení toxicity pomocí BBTT. A právě proces extrakce je významným zdrojem chyb, protože použitým extrakčním postupem nemusí být vyloužena všechna xenobiotika přítomná ve vzorku. Metoda BBTT je také označována jako “test akutní toxicity“. V komerčním provedení jsou používány jako testovací organismy *Photobacterium phosphoreum* nebo *Vibrio fischeri*.

13.1 Stanovení změn akutní toxicity půdního výluhu v průběhu biodegradace

Princip metody

Principem metody BBTT je změna v luminiscenci světélkujících bakterií vlivem negativního působení toxického vzorku. Množství emitovaného světla se měří luminometrem před a po přidání testované látky a ze změny, zpravidla poklesu, intenzity světla se počítá toxický účinek. Ten obvykle závisí nejen na koncentraci účinné látky, ale také na době působení. Proto se provádí měření v sérii zkumavek obsahujících různá ředění toxikantu, která se měří v čase.

Emise světelného kvanta je spojena s přechodem excitovaných elektronů z vyšších energetických hladin na nižší. U prokaryot se procesu bioluminiscence účastní specifický membránový enzym - *luciferáza* – využívající jako koenzym flavinmononukleotid (FMN). Substrátem je alifatický aldehyd, který je za účasti kyslíku a redukovaného flavinového koenzymu (FMNH₂) excitován a po vyzáření světelného kvanta oxidován na mastnou kyselinu. Kyslík jako akceptor vodíku elektronů z FMNH₂ je redukován na vodu.



Materiál a zařízení

- **Mikroorganizmy :**

Photobacterium phosphoreum LX – 1, *Geotrichum candidum* CCM 8170

- **Chemikálie a roztoky :**

MEB, DMA, pufr Tris-HCl (0,05M; pH=7,2), deionizovaná voda, 2% NaCl v deionizované vodě

- **Přístroje :**

Luminometr m90a, magnetická míchačka, termostat, stopky, třepačka, centrifuga, ultratermostat LAUDA

Postup

Příprava bakteriální suspenze. Ze zásobního šikmého agaru *Geotrichum candidum* CCM 8170 přeočkujeme cca 10^8 buněk (jedna plná očkovací klička) do 20 ml MEB. Kultivujeme při 30°C po dobu 24 h a 2 ml připraveného inokula přeočkujeme do 250 ml MEB a pokračujeme v kultivaci dalších 16h při teplotě 26°C za intenzivního třepání (125 kvů min^{-1} , amplituda 6). Narostlé buňky centrifugujeme při 6000 ot.min^{-1} po dobu 20 min. Sediment buněk resuspendujeme ve stejném objemu Tris-HCl a centrifugujeme. Promývání buněk opakujeme nejméně třikrát. Buněčný sediment naředíme v DMA tak, aby zákal buněčné suspenze při vlnové délce 600 nm odpovídal 90%.

Příprava vzorku. Vzorek kontaminované půdy protlačíme přes síto o velikosti ok 2 mm. Do reagenční láhve odvážíme 10 g homogenizované půdy a přidáme DMA do celkového objemu 20 ml. Vzorek doplníme 2,7 ml promyté suspenze *Geotrichum candidum* CCM 8170 ($A_{600} = 85\%$), do láhve umístíme teflonové míchadlo a láhev opatříme uzávěrem s uhlíkovou vložkou (k zamezení výdechu nežádoucích plynů). Celkově připravíme 6 lahví. Tři budou sloužit ke stanovení původní toxicity vzorku a další tři se umístí na míchačku do termostatu temperovaného na 26 °C a kultivujeme po dobu 14 dní. Po této době stanovíme toxicitu vzorků.

Extrakce vzorku. Do reagenční láhve napipetujeme 85 ml deionizované vody a třepeme intenzivně 24 h při pokojové teplotě. Potom necháme stát 2 h a supernatant centrifugujeme při 8000 ot.min^{-1} . Ke stanovení toxicity použijeme supernatant, který zředíme podle potřeby ředící řadou (např. 1:1, 1:2,5, 1:5, 1:10, 1:20) v 2% NaCl.

Resuscitace testovacího kmene. Otevřeme lyofilizovanou kulturu *Photobacterium phosphoreum* LX – 1, přidáme 0,6 ml 2% NaCl vytemperovaného na +1 °C a homogenizujeme otáčením zkumavkou. Doba resuscitace je minimálně 15 min v ledové vodní lázni (0 – 2 °C).

Příprava pracovní suspenze bakterií pro BBTT. K 6,5 ml 2% NaCl (vytemperovaného na +15 °C) přidáme 0,1 ml resuscitovaných buněk. Do 12 připravených měřících zkumavek po důkladném promíchání napipetujeme po 0,4 ml pracovní suspenze a zkumavky umístíme do inkubačního bloku luminometru a temperujeme dalších 15 min. při teplotě +15°C.

Měření bioluminiscence : Nejprve změříme aktuální luminiscenci v první zkumavce a vložíme zpět do inkubačního boxu, přidáme 0,4 ml vytemperovaného 2% NaCl (slouží jako kontrola) několikanásobným odebráním kapaliny a opětovným vstříknutím důkladně promícháme. Potom změříme intenzitu luminiscence ve druhé zkumavce a přidáme 0,4 ml vzorku ředěného 1:20 a promícháme. Postupně měříme počáteční luminiscenci v ostatních zkumavkách a vždy po změření přidáme 0,4 ml zvolených ředění vzorku. V temperaci pokračujeme dalších 5, 15 respektive 30 minut a změříme intenzitu emitovaného světla postupně ve všech zkumavkách. Kontrolní zkumavky a ředění vzorku připravujeme ve dvou opakováních v jedné sadě měření.

Vyhodnocení a závěr

Mírou toxicity daného vzorku je tzv. efektivní koncentrace, která způsobí definovanou změnu bioluminiscence, obvykle úbytek. K posouzení toxicity se používá většinou hodnoty EC50 – tj. koncentrace způsobující 50% úbytek bioluminiscence ve srovnání s kontrolou v daném čase [tedy EC50 (5,15,30)], pokud byl vzorek s kulturou v kontaktu 5, 15 respektive 30 minut za takto definovaných podmínek. Při praktickém měření však nelze ředění dosáhnout právě takové koncentrace, která způsobí 50% úbytek bioluminiscence. Sleduje se proto toxicita látky v ředící řadě. Pro jednotlivé vzorky se tedy změní hodnoty luminiscence v čase 0 a t – I(0) a I(t), pro kontrolu IB(0) a IB(t). Kontrola sleduje přirozené vyhasínání bioluminiscence a je vyjádřena koeficientem $R(t) = IB(t) / IB(0)$. Ke kvantitativnímu vyhodnocení se používá hodnota $\Gamma(t,15) = [I(t_0) - I(t_{15})] / I(t_{15})$. Logaritmus Γ se vynáší proti logaritmu koncentrace a ze získané závislosti lze na ose x odečíst log EC50. Výpočty hodnoty Γ se provádí pomocí programu MICROTOX pro MS-DOS (I.Janda, 1992). Pro hodnocení velmi heterogenních vzorků (půda, vzorky ze skládek apod.) se obvykle používá jen hodnota Γ s konstatováním, že vzorky vykazující hodnotu Γ větší než 1, 000 jsou považovány za akutně toxické.

Literatura

Bullich, A.A., Tung,K-K. and Schneider, G. (1990). The luminiscent bakteria toxicity test : its potential as an *in vitro* alternative. J.Biol.Chem., 5 : 71-77

Damborský, J. a Němec, M. (1996). Použití bakteriálního bioluminiscenčního testu toxicity. Vodní hospodářství 1:23-25

DIN 38412, Teil 34. Testverfahren mit Wasserorganismen (Gruppe L)

Text byl jazykově upraven podle:

Petráčková,V., Kraus,J. a kol. (1998). Akademický slovník cizích slov, Academia Praha.

Inovace Fyziologie bakterií - cvičení a Cvičení z environmentální mikrobiologie

Mgr. Andrej Strásky

Práce byla podporována z grantu FRVŠ TO G4 1594/2008

Příprava homogenní bakteriální suspenze

Teorie

Streptomycety jsou vláknité půdní bakterie vytvářející mycelium z vícebuněčných hyf. Růst probíhá prodlužováním hyf v terminálních částech nebo větvením. Jsou to aerobní bakterie a při kultivaci musí být intenzivně třepány. Díky své myceliální povaze rostou při klasické kultivaci v tekutém živném médiu v podobě nehomogenních shluků a kuliček (Obr. 1), které znemožňují přípravu standardní suspenze ze streptomycetálních hyf. Ke správnému průběhu a vyhodnocení některých laboratorních experimentů je nutné použít homogenní bakteriální suspenzi. Tu je jednoduché připravit u bakterií rostoucích disperzně nebo v usazenině. U streptomycet toho dosahujeme částečným zamezením tvorby nepravidelných shluků využitím speciálních kultivačních technik. Ty zahrnují použití přednostně bohatých kompletních živných médií, dispergantů, mechanických pomůcek (Obr. ..) apod. Nejdůležitějším parametrem ovlivňujícím rozptýlenost růstu u těchto mikroorganismů je však stav počátečního inokula, především jeho hustota, aspoň částečně stejný fyziologický stav buněk, kterého lze dosáhnout předklíčením spor a dostatečným rozptýlením předklíčených spor.

DŮLEŽITÉ UPOZORNĚNÍ: Streptomycety jsou velmi náchylné a citlivé na kontaminaci jinými druhy bakterií nebo plísní. Všechny práce se streptomycetami v první části úlohy provádíme v laminárním nebo biohazard boxu s velkou opatrností!

Princip

Pro správné vyhodnocení biosorpčního experimentu je nutné použít homogenní bakteriální suspenzi. Naočkování masivním inokulem předklíčených spor zabezpečí stejný výchozí stav kultury. Rozptýlení spor dosahujeme obvykle mechanicky pomocí ultrazvuku. Prodlužováním hyf mycelia a tvorbou shluků může dojít k limitaci zásobování živinami buněk ve starších částech mycelia, a tím ke zvýšení fyziologické variability bakteriální kultury. Kompletní médium zabezpečuje lepší výživu mycelia a poskytuje podmínky pro rychlejší růst jako definované médium. Rychleji rostoucí hyfy vykazují menší tendenci ke shlukování. Koncentrovaný roztok sacharózy (34%) v médiu působí jako dispergant. Stočená spirála (Obr. 2) z nerezavějící oceli napomáhá separaci hyf a vytváření drobných shluků mechanickým působením při intenzivním třepání (pro bližší představu, jedná se o obdobu „tříštění se“ o překážku).

Obr. 1: Kompaktní sluky streptomycet v tekutém médiu Obr. 2: Stočená spirála v médiu



Úloha: Připravte homogenní buněčnou suspenzi o předepsaných parametrech a stanovte její sušinu

Postup

Pomůcky: automatické pipety, třepačka Elpan 357, horkovzdušná sušárna MLW, Erlenmayerovy baňky s ocelovými spirálami, ultrazvuková sonda Bandelin

Média a roztoky:

GMM (germinační médium):

Casamino acids	2g
Yeast extract	1 g
KH ₂ PO ₄	6,8 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	2g
MgSO ₄	0,2g
CaCl ₂	0,01g
Demineralizovaná voda	1000 ml
pH=7,0	

YEMES:

Yeast extract	4 g
Malt extract	10g
Glukóza	4 g
Sacharóza	340 g
Demineralizovaná voda	1000 ml
pH=7,2)	

Tris-HCl pufr:

0,2 M HCl 20 ml HCl (35-38%) do 1180 ml demineralizované H₂O

0,2 M Tris 24,2 g do 1000 ml demineralizované H₂O

Pufr o pH=7,2 získáme smícháním 44,2 ml 0,2 M HCl a 50 ml 0,2 M Tris a doplníme do 200 ml demineralizovanou vodou.

Jeden ml ze zásobní suspenze spor v 40% glycerolu přeneseme do sterilní Eppendorfovy zkumavky a zcentrifugujeme při 10 000 g po dobu 10 minut (+4°C). Supernatant slijeme a spory resuspendujeme v 1 ml demineralizované vody. Tento krok je potřebný k odstranění glycerolu, který může narušovat synchronní germinaci spor. Přeneseme 1 ml suspenze spor v demineralizované vodě do 30 ml germinačního média GMM a kultivujeme 6 hodin při 32°C na třepačce (150 kyvů za minutu). Následně médium s předklíčenými sporami sterilně přeneseme do sterilní 50 ml centrifugační zkumavky a centrifugujeme při 7000 g po dobu 10 minut (+ 4°C). Sediment resuspendujeme v 4 ml YEMES média pomocí ultrazvuku. Špičku ultrazvukové sondy uchovávanou v 96% etanolu a necháme volně oschnout a suchou ponoříme do suspenze spor. Parametry sonikace: doba sonikace 10 sekund, cyklus 60 procent, výkon 40 procent. Do Erlenmayerových baněk obsahujících 80 ml YEMES média a spirály z nerezové oceli naočkujeme po 1 ml ze suspenze sonikovaných spor a kultivujeme 48 hodin na orbitální třepačce při 200 rpm a amplitudě 7 při teplotě 30°C.

OD TÉTO CHVÍLE NEMUSÍME PRACOVAT STERILNĚ

YEMES médium s narostlou biomasou přelijeme do centrifugačních zkumavek a centrifugujeme po dobu 15 min při 7000 g (+ 4°C), supernatant slijeme a pelet promyjeme 25 ml Tris-HCl pufr (0,1 M, pH 7,2). Opět centrifugujeme při stejných parametrech. Postup opakujeme třikrát. Promytý pelet resuspendujeme v 25 ml Tris-HCl pufru a sonikujeme pomocí ultrazvukové sondy Bandelin. Parametry sonikace: výkon 40 procent, doba cyklu 90 procent, doba sonikace 10 sekund. Tuto suspenzi vlijeme do 150 ml Tris-HCL pufru (0,1 M, pH 7,2). Změříme absorbanci suspenze při $\lambda=600$ nm. Absorbance by se měla pohybovat v rozmezí 0,9-1,1

Jako první stanovíme bakteriální sušinu v 1 ml. Promícháme připravenou suspenzi hyf a do 3 připravených předsušených a na analytických vahách zvážených váženek odpipetujeme 4 ml

suspenze. Zopakujeme stejný postup pro Tris-HCl pufr (0,1 M, pH 7,2). Obě sady váženek sušíme v horkovzdušné sušárně při 120°C po dobu 48 hod. Po vysušení váženky opět zvažíme. Z aritmetických průměrů hodnot vypočteme hmotnost sušiny bakteriální suspenze v mg/ml.

Biosorpční experiment

Teorie

Mikroorganismy se v prostředí běžně setkávají s kovy. Některé jsou esenciální, potřebné pro řádné fungování enzymatických dějů, jiné esenciální nejsou, tudíž pro buňku z biologického hlediska jsou nepotřebné. Obě skupiny kovů v nadbytečných koncentracích však mohou působit na buňku toxicky, především kompetitivní vazbou na funkční skupiny biomolekul, což vede k poškození struktur molekul enzymů a nukleových kyselin.

Bakterie si v průběhu času vyvinuly několik různých mechanismů pro udržení homeostázy nebo rezistence. Podle způsobu mechanismu je dělíme na: aktivní efflux z buňky, bariéra v propustnosti pro kov, kompartmentalizaci, enzymatická „proměna“ na méně toxickou formu, vyvazování a imobilizace intracelulární a extracelulární, redukce citlivosti cílových struktur. Jako rezistentní nebo tolerantní kmeny označujeme kmeny mikroorganismů schopných přežít dané koncentrace kovů.

Adsorpce kovů z vodního roztoku na komponenty bakteriálních buněk je jednou z nejběžnějších interakcí mezi ionty kovů a bakteriálními buňkami. Afinitu kovů k mikrobiální biomase určuje chemické složení povrchových struktur mikroorganismu. Na povrchu buněk se nacházejí molekuly, které obsahují funkční skupiny schopné reagovat s kovy fyzikálně-chemickými interakcemi. Jde především o karboxylové, hydroxylové, aminové a fosforylové skupiny. **Biosorpce** je pasivní proces nezávislý na metabolismu mikroorganismu. Kovy jsou schopné se vázat též na mrtvou biomasu. Pokud jde o proces závislý na energii vzniklé metabolismem mikroorganismu, tak hovoříme o **bioakumulaci**. V průběhu biosorpce se mohou uplatnit následující dílčí procesy:

1. Fyzikální adsorpce – vazba za účasti van der Waalsových sil a elektrostatických interakcí
2. Inotová výměna – výměna iontů ve sloučeninách buněčné stěny za komplementární ionty kovů
3. Komplexace – tvorba koordinačních vazeb mezi kationy kovu a některými funkčními skupinami komponent buněčné stěny (především karboxy- a aminoskupiny)

K posuzování účinnosti a kvantifikaci biosorpce je používáno zjištění rovnovážného stavu procesu sorpce. Systém dosáhne rovnováhy v momentě, kdy množství navázaného kovu už dále neroste s časem. K matematickému popisu rovnováhy jsou nejčastěji použity dva modely adsorpčních izoterm - Langmuirův a Freundlichův. Oba modely platí pro jednoduchý systém s jedním typem sorbentu a biosorpce v jedné vrstvě.

Langmuirův model předpokládá, že stechiometrický poměr vazebných míst a vázaných individuí je 1:1 a vazebná místa mají stejnou afinitu k iontům.

Je popsán rovnicí:

$$q = q_{\max} \left(\frac{bC_f}{1 + bC_f} \right)$$

kde q je množství vázaného kovu

q_{\max} je nejvyšší množství navázaného kovu

C_f je rovnovážná koncentrace kovu v roztoku

b je Langmuirova konstanta

Freundlichův model vychází z předpokladu, že místa s vyšší afinitou jsou obsazována ionty jako první a je určen vztahem

$$q = kC_e^{1/n}$$

k a n jsou empiricky stanovené konstanty, k se vztahem k maximální vazebné kapacitě a n k afinitě vazby. Vyšší hodnoty k a n a nižší hodnoty b ukazují na vyšší afinitu biomasy ke kovům.

Použití mikroorganismů k bioremediacím kontaminovaných míst nebo odpadů může být alternativní strategií proti chemickým metodám dekontaminace. Pro tento způsob využití se hledají kmeny s vysokou biosorpční nebo bioakumulační kapacitou, nebo jiným mechanismem rezistence.

Princip

Po přidání známého množství těžkého kovu k bakteriální homogenní suspenzi dochází k vazbě na povrch buněk. Rychlost vazby a množství vázaného kovu závisí na celé řadě faktorů např. struktura a komponenty buněčné stěny, množství biomasy, koncentrace kovů, fyzikálně-chemické vlastnosti prostředí (pH, teplota apod.). Biosorpční kapacita je množství kovu navázaného jednotku biomasy. Tu vypočteme z hodnot získaných při stanovení množství nenavázaného kovu a bakteriální sušiny. Rovnováhy reakce se dosáhne v momentě, kdy množství navázaného kovu již dále neroste s časem. Experiment je navržen pro tři těžké kovy: kadmium (neesenciální kov), zinek a měď (esenciální kovy). Při použití streptomycet pro biosorpční experiment je interakce těžkých kovů s buněčnými povrchy vizuálně identifikovatelná změnou vzhledu suspenze. Po přidání pozitivně nabitých iontů těžkých kovů dochází k jejich vazbě na negativně nabité buněčné povrchy a hyfy v suspenzi precipitují do velkých shluků. Tento jev je viditelný na obrázcích 1 a 2. Při použití mědi je navíc viditelné lehce namodralé zbarvení biomasy hyf mycelia opět demonstrující vazbu mědi na buněčné povrchy. Ke stanovení průběhu biosorpce budeme v časových intervalech odebrat vzorky, u kterých oddělíme filtrací biomasu od supernatantu, ve kterém stanovíme zbylý kov. Z rozdílu mezi počáteční koncentrací a koncentrací ve vzorku zjistíme množství navázaného kovu na biomasu. Použitý způsob oddělení biomasy od supernatantu je dostatečně rychlý, aby bylo možné sledovat časový průběh biosorpce, která je u živých streptomycet velmi rychlá. Zvolená doba trvání je obecně pro biosorpční experimenty krátká, pro tento typ biomasy se však ukázala být naprosto dostačující.

Úloha: Stanovte časový průběh biosorpce, biosorpční kapacitu a zhodnoťte biosorpční schopnosti vybraných kmenů streptomycet výpočtem konstant adsorpčních izoterm.

Obr. 1: Výchozí buněčná suspenze



Obr. 2: Buněčná suspenze po přidavku kovu



Postup

Pomůcky: automatické pipety, stříkačkové filtry (polyethersulfonová membrána), stříkačky, odsávací aparatura Visiprep, vývěva, třepačka Elpan 357, ultrazvuková sonda Bandelin

Chemikálie a roztoky: Zásobní roztoky těžkých kovů (v deionizované vodě): Cu^{II} 0,3 M (použitá sůl $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), Zn^{II} 0,3 M (použitá sůl ZnCl_2), Cd^{II} 0,3 M (použitá sůl $\text{CdCl}_2 \cdot 2,5 \text{H}_2\text{O}$); 0,05M Tris-HCl pufr (pH 7,2)

Příprava na měření

Před samotným prováděním prací se důkladně seznámte s pracovním postupem a jeho časovými posloupnostmi. Do připravených Erlenmayerových baněk rozpipetujeme alikvoty z připravené buněčné suspenze podle následující tabulky, celkem tedy budeme mít 6 Erlenmayerových baněk se suspenzí.

Tab. 1: Objemové poměry komponent reakční směsi

Finální koncentrace kovu	Objem bakt. suspenze	Objem roztoku kovu
0,3 mM	24,975 ml	0,025 ml
3 mM	24,75 ml	0,25 ml

Celý biosorpční experiment provedeme z kapacitních a ergonomických důvodů postupně. Nejdřív pro nižší koncentraci 0,3 mM kovu a teprve po ukončení této části pro 3 mM koncentraci. Pracujeme ve skupinách po 3 studentech. Každý člen provádí práce týkající se jednoho kovu a jedné koncentrace, tj. provede celkem pět odběrů vzorků z 1 Erlenmayerovy baňky.

Pro jímání filtrátu poslouží Wassermanovy zkumavky, které nejprve popíšeme značkou kmene, kovu, jeho koncentrace a pořadovým číslem odběru. Připravíme aparaturu k pokusu. Do nástavce uvnitř tlakové nádoby vložíme popsané Wassermanovy zkumavky. Víko nádoby uzavřeme a dbáme na to, aby hadičky ze spojek ve víku nádoby vedli do zkumavek. Do spojek na víku aparatury nainstalujeme filtry a stříkačky podle Obr. 4. Protože první dva odběry následují těsně po sobě, je proto nutné do aparatury nainstalovat zkumavky, filtry a stříkačky pro oba první odběry. Připojíme vývěvu pomocí hadice k ventilu ve spodní části čelní strany aparatury. Ujistíme se, že vývěva je zapojená do elektrické sítě. Společně s vedoucím cvičení ještě jednou provedeme kontrolu aparatury a dostupnosti potřebných laboratorních pomůcek a pokud je všechno připravené přikročíme k vlastnímu pokusu. Tento krok kontroly je důležitý, na odstraňování problémů během experimentu není čas a případné prodlevy by zkreslily výsledky. Nasadíme si latexové rukavice a během práce dbáme na to, abychom nepotřísnilí pracovní plochy roztoky kovů.

Obr. 3: Filtrační aparatura Visiprep



Obr. 4: Zkumavka s filtrem



Měření

Do suspenze bakterií napipetujeme odpovídající množství zásobního roztoku kovu, promícháme a umístíme na třepačku nastavenou na 170 kyvů za minutu. V stanoveném časovém intervalu pomocí automatické pipety odebereme ze suspenze 2 ml a ihned je vypustíme do stříkačky. Zapneme vývěvu. Po odsátí celého objemu pootočením pojistného ventilu zrušíme podtlak v nádobě filtrační aparatury a vypneme vývěvu. Zkumavky se vzorky odložíme do nástavce a vyměníme zkumavky, filtry a špičky na pipetách ze nové a celý postup opakujeme v následujícím časovém intervalu. Vzorky budeme odebírat v intervalech 30 sekund, 75 sekund, 5, 10 a 60 minut od přidavku roztoku kovu k buněčné suspenzi. Po 60 minutách je dokončen biosorpční experiment pro daný kmen při nižší koncentraci kovu. Vystřídáme skupiny a výše popsany postup zopakujeme pro vyšší koncentraci kovu.

Hodnocení

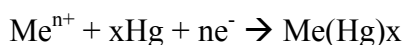
Pomocí dat z následující úlohy vypočítejte a srovnajte sorpční kapacitu kmenů pro použité kovy (množství kovu navázaného na gram sušiny), pokuste se vypočítat adsorpční izotermy. Sestavte tabulku a grafy časového průběhu biosorpce, porovnejte množství vázaných kovů podle jejich výchozí koncentrace.

Voltametrické stanovení těžkých kovů

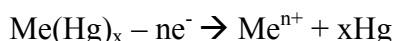
Teorie

Pro stanovení obsahu těžkých kovů ve vzorcích se používá široké spektrum analytických metod, od spektrálních (např. optická emisní spektrometrie, atomová absorpční spektrometrie) nebo hmotnostních technik (hmotnostní spektrometrie), až po elektrochemické metody. Elektrochemické metody mají úzký vztah k české vědě. Za objev polarografie dostal vědec J. Heyrovský Nobelovu cenu. Elektrochemické metody jsou založeny na sledování změn elektrického proudu v závislosti na hodnotě elektrodového potenciálu, ke kterým dochází v přítomnosti sledované látky. V přítomnosti depolarizátoru, tedy látky, která podléhá vlivem vloženého potenciálu elektrochemickým proměnám, začne při určité hodnotě systémem protékat elektrický proud, který je registrován elektrodami.

Elektrochemická stripping analýza zahrnuje metody, které při stanovení využívají prekoncentraci analytu ze vzorku na elektrodě před jeho samotným stanovením. Toto nahromadění analytu z roztoku na elektrodě má za následek dosažení vyšší citlivosti ve srovnání s konvenčními technikami. Dalšími výhodami jsou rychlost analýzy a lineární odezvy v širokém koncentračním rozsahu. Druhým krokem je samotné měření, při kterém dochází ke katodickému nebo anodickému rozpouštění nahromaděného analytu. Voltametrické stripping techniky se dělí na katodické a anodické. Při této práci budeme používat anodickou modifikaci s názvem diferenciální pulzní anodická stripping voltametrie. Diferenční pulzní voltametrie je modifikací se zahrnutím prekoncentračního kroku a sledování v režimu diferenciální pulzní voltametrie. V průběhu prekoncentračního kroku se vlivem vloženého potenciálu hromadí a redukuje kovy přítomné v analytu na elektrodě a tvoří se rtuť slitiny-amalgámy. Tento děj lze vyjádřit rovnicí

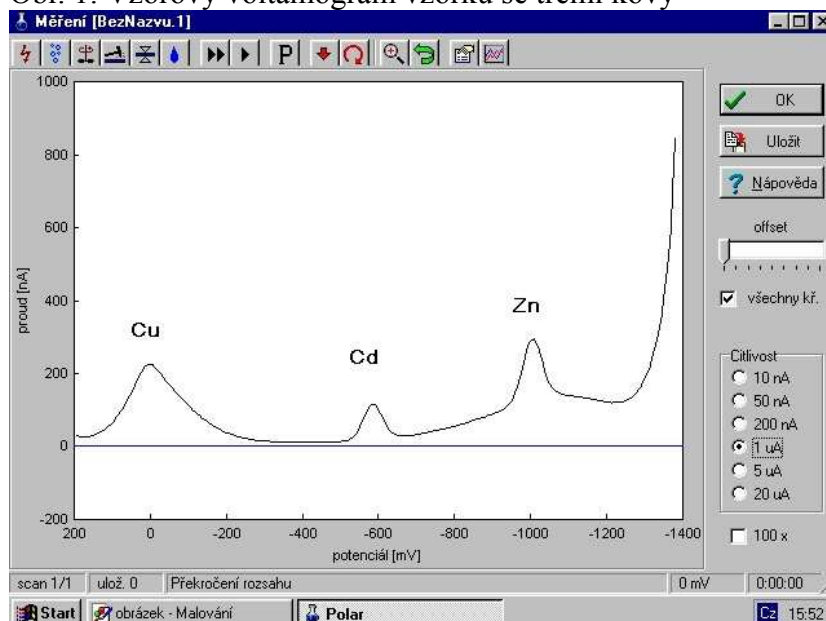


V průběhu anodického scanu stripping kroku se potenciál elektrody mění pulzy o konstantní velikosti a probíhá zpětná oxidace a rozpouštění iontů kovu zpět do roztoku podle rovnice



Výsledek měření je zaznamenán jako voltamogram – graf závislosti proudu na vloženém potenciálu

Obr. 1: Vzorový voltamogram vzorku se třemi kovy



Princip

Ke stanovení obsahu těžkých kovů ve vzorcích použijeme jednu z modifikací voltametrických metod, a to diferenčně pulzní anodickou stripping voltametrii pomocí přístroje EcoTribo Polarograph (Obr. 2) Přístroj bude pracovat v módu tříelektrodeového zapojení, které poskytuje lepší výsledky díky eliminaci rušivých vlivů. Jako pracovní elektroda slouží visící rtuťová kapka (HMDE), jako referentní nasycená argenochloridová elektroda a jako třetí pomocnou použijeme platinovou elektrodu. Probíhající elektrochemické procesy při měření jsou komplexní s množstvím reakcí, které jsou ovlivňovány mnohými parametry. Proto se k eliminaci chyb používá měření vzorku v nadbytku indiferentního pracovního elektrolytu, který zajišťuje konstantní prostředí.

Po zahájení měření v průběhu prekoncentračního kroku se studovaný analyt akumuluje na povrchu nebo na pracovní elektrodě. Aplikací dostatečně negativního konstantního potenciálu dochází k redukci a vylučování iontů sledovaného kovu na elektrodě a tvorbě amalgámů (slitiny kovu a rtuti). Tento krok se nazývá depozice a probíhá za neustálého míchání. Mechanické míchání spolu s elektrickými silami zabezpečují přívod analyzovaného kovu k elektrodě.

Následně probíhá tzv. anodický scan, kdy dochází k cíleným změnám potenciálu pracovní elektrody v kladném směru tj. od zápornějšího potenciálu ke kladném. Sleduje se chování látky na/v elektrodě, v tomto případě dochází k oxidaci a elektrolytickému rozpouštění kovu z elektrody zpět do roztoku. Tyto elektrochemické změny jsou doprovázeny změnami proudu. Změny intenzity proudu jsou úměrné množství kovu v analytu a jsou zaznamenány v podobě proudových píků ve voltamogramu. Z výšky (nebo plochy) píků lze zjistit množství kovu v měřeném objemu vzorku a stanovit jeho koncentraci. K vyhodnocení se používá dvou metod - metoda kalibrační přímky (se standardizací na podmínky měření, tj. vzorky kalibrační přímky musí být měřeny za stejných podmínek jako neznámé vzorky) a metoda standardního přídatku. Při metodě standardního přídatku se ke vzorku přidává známé množství kovu a podle změny odezvy v proudových pících se vypočítá množství analytu.

Úloha: Změřte hodnoty proudových píků a z dat zjistěte koncentrace jednotlivých kovů ve vzorcích, statisticky vyhodnoťte získaná data z jednotlivých měření.

Obr. 2: Analyzátor EcoTribo polarograf



Postup

Pomůcky: EcoTribo UM μ E polarograf, automatické pipety

Chemikálie a roztoky:

Zásobní roztoky těžkých kovů (v deionizované vodě): Cu^{II} 0,3 M (použitá sůl CuCl₂ · 2H₂O), Zn^{II} 0,3 M (použitá sůl ZnCl₂), Cd^{II} 0,3 M (použitá sůl CdCl₂ · 2,5 H₂O);

Acetátový pufr 0,1M o pH 4,8

Kys. octová 0,2 M 11,55 ml ledové kys. octové doplníme do 1000 ml demineralizovanou vodou
Octan sodný 0,2 M 27,2 g CH₃COONa v 1000 ml

Acetátový pufr 0,1 M o pH 4,8 získáme smíchaním 20 ml 0,2 M kys. octové a 30 ml 0,2 M octanu sodného a doplníme na 100 ml demineralizovanou vodou

Příprava měření

Pracovní a platinová elektroda jsou již zapojené v hlavě přístroje, proto jen skontrolujeme správnost zapojení: pracovní elektroda – boční kabel zdířka WORK, horní zdvojený kabel zdířka SENSOR; platinová elektroda - zdířka AUX. Referentní argentochloridovou elektrodu opatrně vyjmeme z uchovávacího roztoku, jemně opláchneme demineralizovanou vodou, nainstalujeme do držáku a zapojíme do zdířky REF na hlavě přístroje. Zapneme počítač k němuž je připojen přístroj. Pro obsluhu přístroje EcoTribo Polarograf slouží software PolarPro verze 4.0 běžící pod operačním systémem Windows 95. Software spustíme pomocí ikony Polar. Po spuštění vytvoříme nový soubor, zadáme datum a iniciály operátora. Dále se zadávají vlastnosti vzorku, které slouží k výpočtu koncentrace při hodnocení vzorku. Pro pevný vzorek se vyplňuje celkové množství kapaliny v elektrolytické nádobce (měřený objem), množství vzorku převedené po naředění do nádoby (aliquotní objem), koeficient ředění (1 je vzorek neředěný, 2 je zředění 1:1, atd.), objem, v němž je látka rozpouštěna (původní objem) a navážka. U kapalného vzorku se původní objem a navážka nevyplňují, resp. jsou ignorovány při výpočtu. Kliknutím na ikonu **P** nastavíme parametry měření podle níže uvedených tabulek. Nastavený počáteční potenciál musí být aspoň o 300 mV nižší jako předpokládaný potenciál píku kovu. My použijeme potenciály nižší o 400 mV, protože měření provedená s tímto nastavením vykazují vyšší citlivost. Přehled použitých potenciálů pro používané elektrolytické prostředí je v následující tabulce.

Tab. 1: Potenciály měřených kovů


Kov	Potenciál proudového píku (mV)	Počáteční potenciál (mV)	Konečný potenciál (mV)
Měď Cu	+15	-400	+200
Kadmium Cd	-580	-900	+400
Zinek Zn	-1000	-1400	+800

Pozn. Potenciály proudových píků se mohou měnit v závislosti na použitém základním elektrolytu

Tab. 2: Parametry měření

Rychlost scanu	40 mV/s
doba bublání	600 s
počet měření	3
potenciál akumulace	0 mV
doba akumulace	30 s
klidová doba	15 s
výška pulsu	50 mV
šířka pulsu	80 ms

Měření

Do měřicí nádoby napipetujeme 6 ml roztoku základního elektrolytu. Základní elektrolyt je acetátový pufr o pH 4,6. Umístíme měřicí kyvetu do držáku a probubláváme dusíkem z připojené bomby po dobu 5 minut. Po probublání jako první naměříme blank. Měření podle nastavených parametrů spustíme kliknutím na ikonu  Po spuštění měření zachovááme klid, vyvarujeme se hlavně otřesů pracovního stolu s polarografem. Naměřené křivky uložíme pomocí tlačítka "Uložit" pod názvem blank.

Poté přidáme pomocí automatické pipety 0,1 ml vzorku a probubláme 2 minuty dusíkem. Po skončení měření uložíme křivky pomocí tlačítka "Uložit". Nyní ke vzorku přidáme pomocí automatické pipety tzv. standardní přídavek. Standardním přídávkem je 0,1 ml roztoku kovu o koncentraci 3 mM. Spustíme měření a uložíme křivky. Postup zopakujeme ještě jednou.

Měření ukončíme podle následujících pokynů. Poklepeme na tlačítko se symbolem kladívka. Tím odklepeme zbylou rtuťovou kapku z elektrody do měřeného roztoku. Obsah kyvety vylijeme do připravené nádoby na odpad. **Pracujeme opatrně, nyní vzorky kromě měřených těžkých kovů obsahují i rtuť a za žádných okolností nesmí být vylité do umyvadla!** Kyvetu následně důkladně vypláchneme demineralizovanou vodou. Pod elektrody ve stojanu umístíme připravenou nádobku a taktéž opláchneme demineralizovanou vodou z připravené stříčky a jemně osušíme buničinou. Tím jsme připraveni na další měření.

Hodnocení

Pokud máme změřeny všechny vzorky, uzavřeme panel měření a otevřeme v horní liště z kontextové nabídky panel Hodnocení. Do dialogového okna zadáme název látky, přibližnou hodnotu potenciálu očekávaných proudových píků, metodu hodnocení (standardní přídavek nebo kalibrační přímka) a stiskneme OK. V novém dialogu vyplníme podle obrázku parametry u křivek – zda jde o křivky blanku, vzorku, nebo přídaveků. Zadáme množství kovu v jednom standardním přídávku a objem tohoto přídávku. Po vyplnění všech položek klikneme na Autopeak. Program pak pro každou křivku automaticky vyhodnotí proudová maxima (v μA) v okolí námi zadaného potenciálu a jejich polohu (v mV). Vypočte také koncentraci analytu ve vzorku. Pro jednotlivá měření spočítejte také základní statistické údaje. Vše uveďte v tabulkách a grafech. Data použijte v dalších výpočtech pro biosorpční experiment.

Produkce a stanovení metalothioneinu

Úvod

Metalothionein (MT) byl poprvé izolován v roce 1957 jako hlavní protein vázající kadmium v extraktu kůry ledvin koně. MT jsou intracelulární proteiny s nízkou molekulovou hmotností (6-7 kDa), které obsahují značné množství cysteinových zbytků a mají vysokou afinitu ke kovovým iontům. Přítomnost metalothioneinů v genomech eukaryotických organismů je dobře dokumentována (včetně lidského genomu, který obsahuje nejméně 16 genů pro metalothioneiny), naopak zprávy o jejich přítomnosti v genomech prokaryot jsou kusé (několik druhů sinic, některé pseudomonády, nově *M. tuberculosis*).

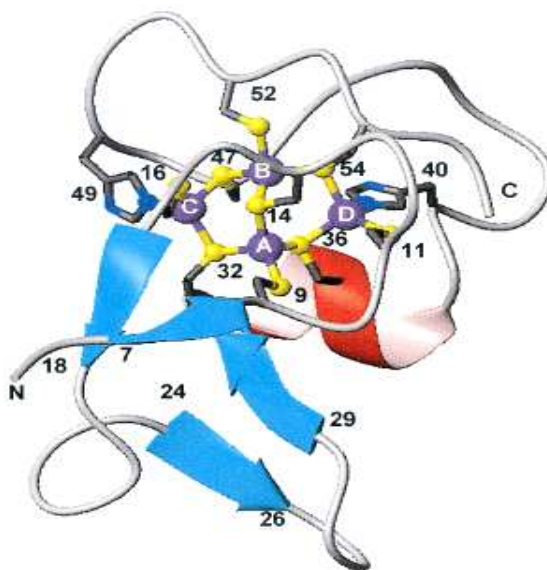
Metalothioneiny, které buňky produkují, se podílejí na udržování homeostázy bakteriální buňky. Především zabezpečují:

- detoxikaci nadbytku kovových iontů jako je zinku, měď, kadmium aj.
- Jsou zásobárna přebytečných kovových iontů, která může být mobilizována v podmínkách s limitující koncentrací daných prvků.
- hrají roli také v ochraně buňky před oxidativním stresem.

Na rozdíl od savčího metalothioneinu, MT bakterií, např. sinic, obsahuje ve své aminokyselinové sekvenci kromě cysteinu také histidin. Histidinové zbytky mají, stejně jako cysteinové zbytky, vysokou afinitu k přechodným kovům, takže se podílí na jejich koordinaci oba tyto aminokyselinové zbytky. Pozice aminokyselin vázajících kov je v molekule konzervativní. Rozdíly mezi prokaryotickými a eukaryotickými MT jsou nejen v aminokyselinovém složení a primární struktuře, ale také v terciární struktuře.

Eukaryotické MT se skládají ze dvou domén, které jsou spojeny krátkým lineárním úsekem. Molekula prokaryotického MT je tvořena 1 doménou s jednoduchou „kapsou“, ve které dochází k vazbě iontů kovů (4 atomy kovu na jednu molekulu MT; fialovou barvou jsou naznačeny ionty zinku). Exprese MT je indukována subletální koncentrací těžkých kovů.

Obr. 1: Struktura prokaryotického metalothioneinu



SM médium:

Yeast extract	0,5 g
Casamino acids	0,5 g
L-asparagin	0,5 g
Glukóza	10 g
H ₂ O	1000 ml

Pro přípravu SMS média přidáme 340 g sacharózy.

Zásobní roztoky těžkých kovů (v deionizované vodě): Cu^{II} 0,3 M (použitá sůl CuCl₂ · 2H₂O), Zn^{II} 0,3 M (použitá sůl ZnCl₂), Cd^{II} 0,3 M (použitá sůl CdCl₂ · 2,5 H₂O); 0,05M Tris-HCl pufr o pH 7,2, Bug Buster Protein Extraction Reagent (Novagen); Lysozym (Sigma); Elmannovo činidlo pro stanovení metalothioneinu – 0,003M DTNB - 5,5-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina; Metallothionein I from rabbit liver (SIGMA)

Stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC) pomocí BIOSCREEN C

Minimální inhibiční koncentraci stanovíme pro 3 kovy: měď, zinek a kadmium. Nejdříve připravíme inokulum z předklíčených spor. Jeden ml ze zásobní suspenze spor v 40% glycerolu přeneseme do sterilní Eppendorfovy zkumavky a zcentrifugujeme při 10 000x g po dobu 10 minut (při +4°C). Supernatant slijeme a spory resuspendujeme v 1 ml demineralizované vody. Suspenze spor v demineralizované vodě přeneseme do 30 ml germinačního média GMM a kultivujeme 6 hodin při 32°C na třepačce (150 rpm). Následně médium s předklíčenými spory sterilně přeneseme do sterilní 50 ml centrifugační zkumavky a centrifugujeme při 7000x g po dobu 10 minut. Sediment resuspendujeme v 3,5 ml SM média pomocí ultrazvuku.

Sterilní inkubační destička přístroje obsahuje 100 jamek (Obr. 2). Do každé jamky za použití automatické pipety sterilně napipetujeme 270 µL SM média s odpovídající koncentrací kovu. Každá koncentrace bude napipetována 3x. Do všech jamek pak přidáme 30 µl inokula. Použité koncentrace kovů v médiu: **0,05 mM; 0,1 mM; 0,2 mM; 0,3 mM; 0,4 mM; 0,6 mM; 0,9 mM; 1,5 mM; 3mM** (Pozn. jedná se o koncentraci, ne o množství, tj. roztok kovu je 3 milimolární, a ne 3 milimoly kovu). Každou koncentraci kovu v médiu si nejdříve připravíme do čistých sterilních zkumavek a teprve z nich tuto směs sterilně pipetujeme do deštičky. **Je nutné pečlivě koncentrace propočítat, protože přidáním inokula přímo do jamky kultivační deštičky dojde k dalšímu zředění koncentrace kovu v médiu!** Proto je zřejmé, že koncentrace kovu v médiu ve zkumavkách musí být vyšší jako výše uvedená. Tuto finální koncentraci dosáhneme až přímo v jamce přidáním předpsaného objemu inokula!

Jako negativní kontrola slouží nezaočkované médium, jako pozitivní kontrola zaočkované médium bez přítomnosti kovů. Měření zákalu při vlnové délce $\lambda = 600$ nm probíhá každé 2 hodiny podle nastavení parametrů na Bioscreen C.

Extrakce termostabilních bílkovin u bakteriálního kmene *Streptomyces sp. ON3*

Jeden ml ze zásobní suspenze spor v 40% glycerolu přeneseme do sterilní Eppendorfovy zkumavky a zcentrifugujeme při 10 000 g po dobu 10 minut při +10°C. Supernatant slijeme a spory resuspendujeme v 1 ml demineralizované vody. Inokulujeme 1 ml suspenze spor v demineralizované vodě do 30 ml germinačního média GMM a kultivujeme 6 hodin při 32°C na třepačce (150 rpm). Následně médium s předklíčenými spory sterilně přeneseme do sterilní 50 ml centrifugační zkumavky acentrifugujeme při 7000 po dobu 10 minut. Sediment resuspendujeme v 4 ml SMS médiapomocí ultrazvuku. Parametry sonikace: délka sonikace 10 sekund, pracovní cyklus 60 %, výkon 40 %. Do Erlenmayerových baněk obsahujících 80 ml SMS média s koncentrací zinku 0,1 mM a spirály z nerezové oceli naočkujeme po 1 ml ze

suspenze sonikovaných spor a kultivujeme 48 hodin na orbitální třepačce při 200 rpm a amplitudě 5. SMS médium s narostlou biomasou přelijeme do centrifugačních zkumavek a centrifugujeme po dobu 15 min při 7000x g, supernatant slijeme, a pelet promyjeme 25 ml Tris-HCl pufrům (0,1M, pH=7,2). Opět centrifugujeme při stejných parametrech. Celý postup opakujeme třikrát. Promytý pelet použijeme pro extrakci termostabilních na cystein bohatých proteinů.

Nejdříve zvážíme sediment buněk – **stanovení hmotnosti mokré hmoty**. K sedimentu se přidá Bug Buster Protein Extraction Reagent (Novagen) tak, aby připadlo 5 ml na 1 g sedimentu. K rozbití buněčných stěn hyf dojde působením lysozymu, který se přidá k reakční směsi do výsledné koncentrace 5 mg/ml. Nakonec se přidá dithiotreitol do výsledné koncentrace 0,5 mM. Směs obou komponent a bakteriálního sedimentu inkubujeme na třepačce po dobu 40 minut při pokojové teplotě. Po inkubaci směs centrifugujeme po dobu 30 minut při 14 000 ot./min a + 4°C.

Supernatant odpipetujeme do čistých Eppendrofových zkumavek (1,5 ml). Tyto zkumavky inkubujeme 20 minut při 100°C v termobloku a potom rychle ochladíme v ledové lázni po dobu cca 60 minut. Opětovně centrifugujeme 90 minut při 14 000 ot./min a +4°C. Supernatant obsahující termostabilní bílkoviny přeneseme do popsaných čistých zkumavek. Supernatant lze použít okamžitě k stanovení koncentrace nebo uchovat při teplotě nejméně -20°C.

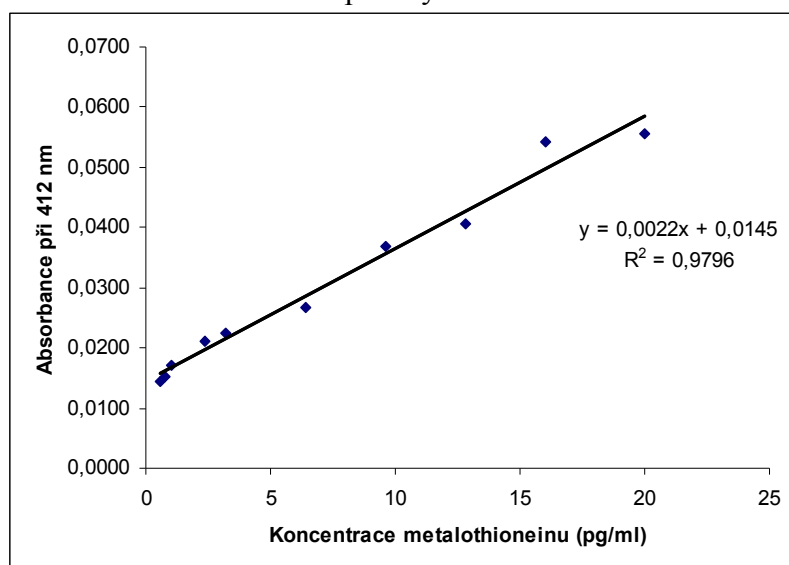
Stanovení koncentrace metalothioneinu

Do plastových zkumavek se napipetuje 100 µl supernatantu vytemperovaného na laboratorní teplotu a 5 µl činidla DTNB. Po dobu 5 minut se nechá probíhat reakce Ellmanova činidla se sulfhydrylovými skupinami cysteinu nebo histidinu. Po ukončení reakce v mikrokyvetě změříme absorbanci při 412 nm. Měření provedeme na spektrofotometru UV/VIS Lambda 11. Jako blank použijeme 100 µl Tris-HCl pufru (0,05M, pH 7,2) + 5 µl DTNB.

Hodnocení

Pro stanovení koncentrace metalothioneinu se sestrojí standardní křivka získaná měřením absorbance koncentrační řady připravené ředěním MT z králíčích jater v Tris-HCl pufru (0,005M, pH 7,2) v rozsahu 1 – 25 pg/ml. Výpočet koncentrace metalothioneinu ve vzorku se provede z rovnice regresní přímky. Vypočteme množství produkovaného MT v přítomnosti jednotlivých těžkých kovů se vztáhne na 1g mokré hmoty daného vzorku. Množství vyprodukovaného MT v přítomnosti jednotlivých kovů v kultivačním prostředí porovnáme s obsahem MT v kontrole kultivované bez kovů.

Obr. 3: Příklad kalibrační přímky



Pokročlé techniky stanovení metalothioneinu

V této úloze si ukážeme použití pokročilých technik k přečištění proteinů ze směsi a jejich detekci. Z praktického hlediska je úloha rozčleněna do tří samostatných úloh.

Úloha: Přečistěte izolovaný metalothionein, stanovte jeho přítomnost, molekulovou hmotnost, množství a čistotu ve vzorku

Přečištění metalothioneinu pomocí chelatační afinitní chromatografie (IMAC)

Teorie

Chelatační afinitní chromatografie je jednou z metod založených na specifické interakci mezi biomolekulou a ligandem (karboxymetylaspartát, tris(karboxymetyl) etylendiamín, N-(2-pyridylmetyl)glycin). V případě, že je ligand imobilizován na vhodné stacionární fázi a provádíme chromatografii, hovoříme o chromatografii afinitní. A právě jednou z posledních zavedených chromatografických technik je chelatační afinitní chromatografie, založená na vzájemné interakci mezi biopolymerem v roztoku a kovovými ionty vázanými na pevné fázi, obvykle hydrofilním polymeru. Vychází se z úzkého vztahu chování proteinů při IMAC a množství imidazolových a thiolových skupin na povrchu interagujícího proteinu. Tato interakce vynikne po potlačení elektrostatické a hydrofobní interakce, které také mohou mít vliv na chování proteinu při IMAC. Vliv elektrostatické interakce se dá odstranit použitím vysoké iontové síly v médiu (obvykle se používá NaCl v koncentraci od 0.5 do 1 mol/l). Proteiny se v koloně na pevnou fázi váží pomocí koordinační vazby, která je reverzibilní. Největší využití našla IMAC, hlavně v počátcích svého vývoje, při purifikaci proteinů krevní plazmy. Velice důležitou aplikací IMAC se v posledních letech stává jednokroková purifikace rekombinantních proteinů obsahujících navíc takzvanou histidinovou kotvu, která zprostředkuje vazbu proteinu na kolonu. Interakce chelatačního nosiče se separovaným proteinem je pak natolik silná, že můžeme podmínky separace nastavit tak, aby v ideálním případě interagoval pouze námi separovaný protein. Imobilizovaným kovovým iontem bývá v tomto případě většinou Ni^{2+} nebo Cu^{2+} .

Princip

Kolona obsahuje polymer, který váže dvoumocné ionty. Ty dodáme do kolony při její přípravě promytím kolony roztokem těchto iontů. Po aplikaci vzorku do takto připravené kolony proběhne interakce mezi kovem a proteinem. Vznikají koordinační vazby mezi akceptorem elektronů – kovem a donorem elektronů – aminokyselinovým zbytkem s vysokou elektronovou hustotou (His, Cys, Trp) orientovaném na povrchu proteinu. Tím dojde k zadržení proteinů bohatých na tyto aminokyseliny v koloně a jejich odseparování z roztoku, který kolonou proteče prostý těchto proteinů. K eluci proteinů z kolony využijeme působení kyseliny etylendiamintetraaminoctové (EDTA), která je silným chelatačním činidlem (váže kovy) a proto ruší koordinační vazby mezi molekulami proteinů a ionty kovů v nosiči kolony. Proteiny jsou tedy vytěšňovány z vazeb a přečištěné eluovány do roztoku.

Postup

Pomůcky: Injekční stříkačky a jehly,

Chemikálie: Tris-HCl pufr pH 7,4, králičí metalothionein, 0,1M CuSO₄, EDTA 0,5 M MT bude přečištěn pomocí chelatačního nosiče HiTrap Chelating HP (Amersham Biosciences, UK).

Obr. 1: Kolona s nosičem HiTrap Chelating HP



Příprava kolonky

a/ kolonka se promyje 5 ml deionizované vody (vymytí etanolu, který je použit při uchovávání kolonky)

b/ kolonku promyjeme 5 ml 0,1M CuSO₄ v deionizované vodě (nebo NiSO₄)

c/ znovu promyjeme 5 ml deionizované vody

Purifikace

a/ provedeme ekvilibraci kolonky promytím 5 ml 50mM Tris-HCl pufrém pH 7,4 + NaCl (ve výsledné koncentraci 0,15M) – **ekvilibrační pufr**

b/ nanese 1 ml vzorku

c/ promyjeme 10 ml ekvilibračního pufru

d/ eluce – celkem 5 ml EDTA v 50mM Tris-HCl pufru pH 7,4 – **eluční pufr**

1/ 1 ml 0,01 mM EDTA v 50mM Tris-HCl pufru pH 7,4

2/ 1 ml 0,05 mM EDTA v 50mM Tris-HCl pufru pH 7,4

3/ 1 ml 0,1 mM EDTA v 50mM Tris-HCl pufru pH 7,4

4/ 1 ml 0,5 mM EDTA v 50mM Tris-HCl pufru pH 7,4

5/ 1 ml 1 mM EDTA v 50mM Tris-HCl pufru pH 7,4

Vzorky po 0,5 ml jímáme do čistých zkumavek.

Reekvilibrace

a/ kolonku promyjeme 5 ml 50 mM Tris-HCl pufrém pH 7,4 + EDTA (ve výsledné koncentraci 0,05 mM)

b/ promytí 5 ml deionizované vody

c/ promytí 5 ml 20% etanolem

d/ uchovávání při teplotě +5-10°C

Hodnocení

V jednotlivých frakcích stanovíme obsah MT (podle výše uvedené metody). Pro stanovení koncentrace metalothioneinu se sestrojí standardní křivka získaná měřením absorbance koncentrační řady připravené ředěním metalothioneinu z králičích jater v Tris-HCl pufru (0,005M, pH 7,2) v rozsahu 1 – 25 pg/ml. Výpočet koncentrace metalothioneinu ve vzorku se provede z rovnice regresní přímky. Čistotu získaného preparátu ověříme SDS PAGE a HPLC.

Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v prostředí dodecyl sulfátu sodného – SDS-PAGE

Teorie

Zkratka **SDS-PAGE** označuje elektroforézu v polyakrylamidovém gelu v prostředí dodecylsulfátu sodného. Je to separační technika používaná k rozdělení směsi proteinů na jednotlivé frakce. Pohyb nabitých molekul v matici je vyvolán působením elektrického pole. Podstatou separace je rozdílná pohyblivost proteinů na základě elektroforetické mobility. Ta je podmíněna délkou polypeptidového řetězce, molekulovou hmotností, stupněm rozbavení (denaturaci) proteinu, posttranslačními modifikacemi a dalšími faktory. Gel působí jako síto a matrice, ve které jsou pohybující se složky ukotveny. Proteiny o stejné velikosti doputují v matici na stejné místo a po vizualizaci vytvoří tzv. band nebo-li proužek. K vizualizaci neviditelných molekul proteinů v matici se používá barvení různými technikami např. Coomassie blue, barvení stříbrem nebo barvení fluorescenčními barvivy. Podmínkou je, aby barviva byla schopna vazby na proteiny. Molekuly proteinu nacházející se po proběhnutí elektroforézy ve stejném proužku jsou stejné velikosti. Pokud jsou proužky ve vzájemně jiné poloze, tak v nich obsažené proteiny jsou nestejné velikosti (jedná se tedy o různé proteiny). Molekulovou hmotnost proteinů v proužku určujeme pomocí polohy tzv. markerů, tedy proteinů o známé molekulové hmotnosti, které jsou podrobeny elektroforéze ve stejném gelu (a za stejných podmínek) jako vzorek.

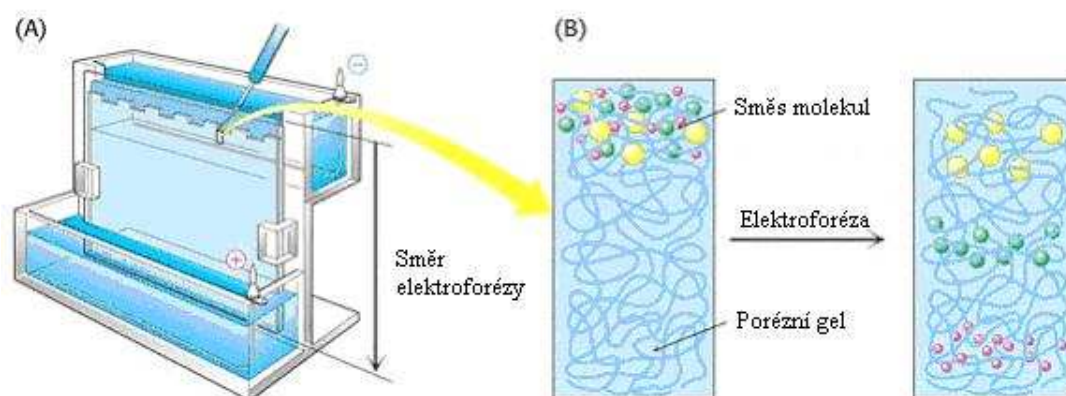
Tato metoda nachází široké uplatnění v řadě vědních disciplín, např. mikrobiologie, molekulární biologie, imunologie, forenzní vědy...

Princip

Molekuly proteinů mají amfoterní charakter, jejich náboj je tedy závislý na pH. Migraci v elektrickém poli v gelu ovlivňuje kromě náboje také prostorový tvar molekul proteinů. Dodecylsulfát sodný je detergent, který se váže na molekuly proteinů (v poměru 1,4 g SDS na 1 g bílkoviny), denaturuje je a poskytuje jim uniformní náboj. Ke zrušení sekundární, terciární a kvarterní struktury dopomáhá také přídavek merkaptoethanolu, který redukuje disulfidické můstky. Po působení SDS jsou proteiny nabity negativně a tudíž se v elektrickém poli pohybují k anodě (tedy elektrodě s kladným nábojem). Dělení probíhá pouze na základě velikosti molekuly. Polyakrylamidový gel působí jako prostorové síto, jeho póry jsou různého průměru, délky a tvaru. Větší molekuly proteinů jsou v tomto sítu brzděny, naopak menší molekuly putují rychleji, protože díky menší velikosti snadněji procházejí póry gelu. Ve výsledku se tak proteiny rozdělí, skupina proteinů o stejné velikosti doputuje ve shluku do stejné vzdálenosti. Elektroforézu je nutné zastavit v určitém čase. Kdybychom nechali elektrické napětí působit delší dobu, tak všechny proteiny doputují až k anodě.

Po skončení elektroforézy je nutné vizualizovat proteiny v gelu pomocí metody barvení Coomassie blue. Coomassie blue je barvivo, které proniká maticí a váže se na molekuly proteinů. Po obarvení jsou oblasti gelu s proteiny zbarveny modře. Proteiny v konkrétním proužku mají stejnou elektroforetickou mobilitu (tudíž by měly být stejné molekulové hmotnosti). Metalothioneiny jsou proteiny o malé molekulové hmotnosti (do 10 kDa), proto by odpovídající proužky měly objevovat v čele gelu.

Obr.1: SDS-PAGE: princip



Postup

Pomůcky: mikrodávkořač Hamilton, sestava pro elektroforézu Biometra, zdroj napětí

Chemikálie a roztoky:

Roztoky pro SDS-PAGE

1) NaPBS puřr

Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O (Lachema)	1,45 g
NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O (Lachema)	0,15 g
NaCl (Lach-Ner)	4 g
Deionizovaná voda (ddH ₂ O)	500 ml

pH roztoku upravit na hodnotu 7,3
skladovat při teplotě +4°C

2) Puřr na zpracování vzorku

Tris (Biotech, Serva)	1,5 g
ddH ₂ O.....	50 ml

rozpusťit, upravit pH na hodnotu 6,8

Merkaptoetanol (Merk)	10 ml
Glycerol (Sigma - Aldrich)	25,2 g (20 ml)
SDS (Merk)	4 g.....rozpusťt při 37°C
ddH ₂ O.....	doplnit na 100 ml

skladovat při teplotě +4°C

3) 0,1% zásobní roztok bromfenolové modři (BFM)

BFM (Sigma – Aldrich)	0,1 g
ddH ₂ O.....	100 ml

skladovat při teplotě +4°C

4) Roztok akrylamidu

Akrylamid (Sigma - Aldrich)	29,2 g
N,N'-metylenbisakrylamid (Sigma – Aldrich)	0,8 g
ddH ₂ O.....	50 ml

doplnit na objem 100 ml
skladovat při teplotě +4°C

5) Pufr pro separační gel

Tris (Biotech, Serva)18,15 g
ddH₂O.....50 ml

rozpustit a upravit pH na hodnotu 8,8 pomocí HCl

ddH₂O.....doplnit na 100 ml

skladovat při teplotě +4°C

6) Pufr pro stacking/koncentrační gel

Tris (Biotech, Serva)6 g

ddH₂O.....50 ml

rozpustit a upravit pH na hodnotu 6,8 pomocí HCl

ddH₂O.....doplnit na 100 ml

skladovat při +4°C

7) 10% roztok dodecyl sulfátu sodného (SDS)

SDS (Merk)2,5 g

ddH₂O.....25 ml

rozpustit při teplotě 37°C

uchovat při laboratorní teplotě

8) Pufr do zásobníků (Tank/ELFO pufr)

Tris (Biotech, Serva)2,25 g

Glycin (Biotech, Serva)10,8 g

SDS (Merk)0,75 g

ddH₂O.....750 ml

pH upravit na hodnotu 8,3 – 8,6; připravit vždy čerstvý

9) Zředěný pufr pro separační gel s 0,1% SDS

Pufr pro separační gel (č. 5).....2,5 ml

10% roztok SDS (č. 7).....0,1 ml

ddH₂O.....7,5 ml

připravit vždy čerstvý

10) 10% roztok persíranu amonného

Persíran amonný (Fluka, Chemika)0,1 g

ddH₂O.....1 ml

pH upravit na hodnotu 5 – 6, připravit vždy čerstvý

11) Pufr pro zpracování vzorku obsahující BFM

Pufr (č. 2).....2,5 ml

0,1% roztok BFM.....0,1 ml

ddH₂O.....2,5 ml

skladovat při teplotě +4°C

12) Fixační roztok

Trichloroocetová kyselina (Fluka, Chemika)9 g

ddH₂O.....300 ml

uchovat při laboratorní teplotě, použít maximálně 2x

13) Barvicí roztok

Coomassie Blue G-250 (Fluka, Chemika).....0,2 g

Metanol (Penta)200 ml

Kyselina octová (Penta)40 ml

ddH₂O.....160 ml

uchovat při laboratorní teplotě, použít maximálně 2x, před každým použitím přefiltrujeme

14) Odbarvovací roztok

Metanol (Penta)250 ml

Kyselina octová (Penta).....	100 ml
ddH ₂ O.....	650 ml

uchovat při laboratorní teplotě, použít maximálně 2x

15) Inhibitor proteáz AEBSF

5 mg inhibitoru AEBSF (Sigma - Aldrich) se rozpustí ve 200 ml deionizované vody upravit pH pod hodnotu 7, uchovávat v lednici při 2 – 8°C

Separační gel

ddH ₂ O.....	13,4 ml
Pufř pro separační gel.....	10 ml
Roztok akrylamidu.....	16 ml
10% SDS.....	0,8 ml
TEMED (Merk)	20 µl
Roztok persíranu amonného	140 µl

- povrch gelu se přelije nasyceným isobutanolem (Penta)

Stacking (koncentrační) gel

ddH ₂ O	11,3 ml
Pufř pro stacking gel	5 ml
Roztok akrylamidu	3,4 ml
10% SDS	0,2 ml
TEMED (Merk)	25 µl
Roztok persíranu amonného	100 µl

Elektroforéza se provádí na zařízení Biometra. Prvním krokem elektroforézy je vždy **příprava skel**. Ta se nejprve musí zbavit případných nečistot (omytí detergentem, deionizovanou vodou a ethanolem), vloží se těsnění a přichytí svorkami. Mezi skla se vloží hřeben a odměří 1,5 cm od konce zoubků a od tohoto místa se odměří 11 cm.

Druhým bodem postupu je příprava **separačního gelu**. Tento se připraví smícháním všech komponent a nalitím takového objemu, aby výška hladiny byla cca 3 mm nad horní značku; povrch gelu se přelije 2 ml isobutanolu a nechá se 50 minut (maximálně 1 hod) polymerovat. Po uplynutí doby polymerace se isobutanol slije a povrch gelu se třikrát opláchneme deionizovanou vodou. Následuje přelití 2 ml zředěného pufru pro separační gel s 0,1% SDS. Celá sestava se překryje PE folií (zábrana odpařování) a nechá se polymerovat přes noc. Následující den se připraví **stacking (koncentrační) gel** smícháním daných komponent. Ještě před přípravou koncentračního gelu je nutné povrch separačního gelu omýt pufrem pro stacking (koncentrační) gel a osušit filtračním papírem. Následně se separační gel převrství roztokem koncentračního gelu, vložíme "hřebínek" a sestava se nechá 65 minut polymerovat na vyvážené ploše při laboratorní teplotě.

Dále :

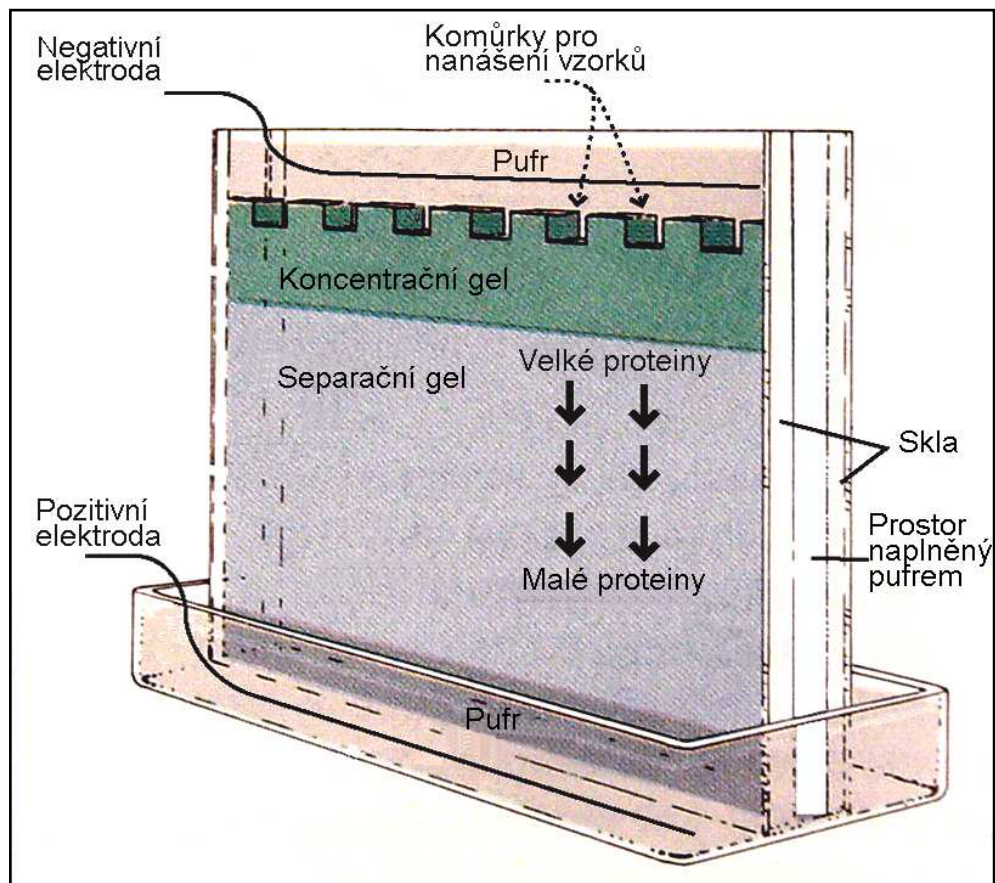
- tenkou tužkou na sklo označíme šterbiny na gelu (pro rychlejší orientaci označíme každou pátou jamku číslem)
- opatrně vyjmeme hřeben a jamky vypláchneme 2x pufrem do zásobníku (tank pufř)
- do dolního zásobníku nalejeme tank pufř
- odstraníme těsnění ze středu skel, vysušíme zbylou kapalinu a opatrně ponoříme dolní část skel do pufru spodního zásobníku tak, aby se do prostoru mezi skly nedostaly bublinky

- skla upevníme k aparatuře pomocí svorek tak, aby vyříznuté sklo směřovalo k vaně a naplníme štěrbinu v gelu do poloviny tank pufr
- do jednotlivých jamek pipetujeme 20 μ l vzorku, markeru nebo blanku mikrodávkačem Hamilton (pipetování podle schématu: 1. a 18. jamka pufr pro zpracování vzorku s BFM (tzv. „blank“); 2. jamka molekulový marker (SigmaMarker); do ostatních analyzovaný vzorek (připraví se smícháním 35 μ l vzorku a 10 μ l bromfenolové modři)
- štěrbinu doplníme tank pufr a naplníme jím i horní zásobník a prostor mezi skly a vanou
- připojí se elektrody, zdroj se nastaví na 15 mA a čas 450 minut
- elektroforézu ukončíme v momentě, kdy trasovací barvivo (jamka 1. a 18.) dosáhne spodní značky – 11 cm)
- po celou dobu elektroforézy musí být aparatura napojena na vodní lázeň o teplotě 20 °C.

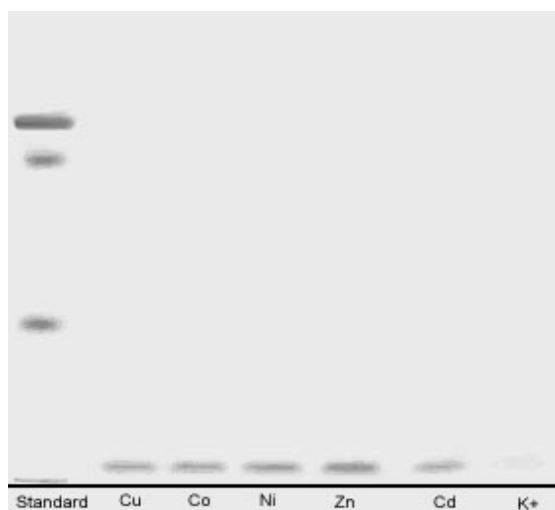
Posledními kroky SDS-PAGE je fixace, barvení a odbarvování gelu. Opatrně se oddělí skla, odstraní se horní koncentrační gel a zbylý separační gel se zvlhčí starším odbarvovacím pufr. Poté se gel přenesse do plastové nádoby s fixačním roztokem. V tomto roztoku se gel promývá na třepačce 10 minut. Po uplynutí této doby se gel opláchne starším odbarvovacím roztokem a přidá se roztok barvicí. Nádoba s gelem se překryje PE folií a jemně se na třepačce promývá přes noc. Druhý den se barvicí roztok slije, gel se opět opláchne starším odbarvovacím roztokem a následně se přidá čerstvý odbarvovací roztok a nechá se působit 10 minut. Tento krok se opakuje ještě dvakrát vždy s novým odbarvovacím roztokem. Podle intenzity zbarvení vzorků se může čas odbarvování prodloužit či zkrátit.

Nakonec gel sejmem skenerem a jako soubor .tif je uložen v počítači.

Obr. 2: Schéma zařízení pro elektroforézu



Obr. 3: Příklad elektroforegramu vzorku s obsahem MT



Hodnocení

Porovnáme počet proužků v jednotlivých bězích a podle markeru stanovíme orientačně molekulovou hmotnost bílkoviny v každém ze vzorků.

High Performance Liquid Chromatography, HPLC

Teorie

Separční metody jsou většinou založeny na rozdílné distribuci dělených látek mezi dvě různé nemísitelné fáze. Chromatografie je separační (dělicí) a současně i analytická metoda, umožňuje prokázat přítomnost složek analytu, rozdělovat je, identifikovat a kvantifikovat.

Chromatografické techniky je možné rozdělit podle několika hledisek:

- 1) **povaha mobilní fáze:** plynová (GC), kapalinová (LC)
- 2) **způsob provedení :** kolonová (sloupcová), plošná (planární)
- 3) **princip separace :** rozdělovací, adsorpční, iontově výměnná, gelová, afinitní
- 4) **pracovní způsob:** eluční (analytická ch.), frontální, vytěšňovací
- 5) **účel:** analytická, preparativní (preparační)

HPLC znamená vysokoúčinná kapalinová chromatografie (někteří ji označují také jako *high-priced liquid chromatography*, bohužel pravdivě). Jako mobilní fáze je používaná kapalina, uspořádáním je to kolonová chromatografie. Podle použitých fází rozlišujeme na chromatografii s **normálními** fázemi (stacionární fáze je polární a mobilní fáze nepolární), nebo chromatografii s **obrácenými (reverzními)** fázemi (RP-HPLC, stacionární fáze je nepolární a mobilní fáze polární). V současnosti je tak využívána RP-HPLC, že často se tato varianta označuje jako HPLC. Jak napovídá zkratka, tato metoda pracuje s vysokými pracovními tlaky v systému, kterými je kapalina (mobilní fáze) "tlačena" přes sorbent (pevná fáze). To umožňuje použít stacionární fázi s větším povrchem, na kterém dochází k interakcím pevná fáze-mobilní fáze, čímž se dosahuje dokonalejší a rychlejší dělení látek. Obecně má každý typ HPLC jiný typ interakcí, mechanismus rozdělování látek ze směsi na koloně. Retence látky na koloně závisí na jejich chemické struktuře, složení a geometrii stacionární fáze, a také na složení prostředí.

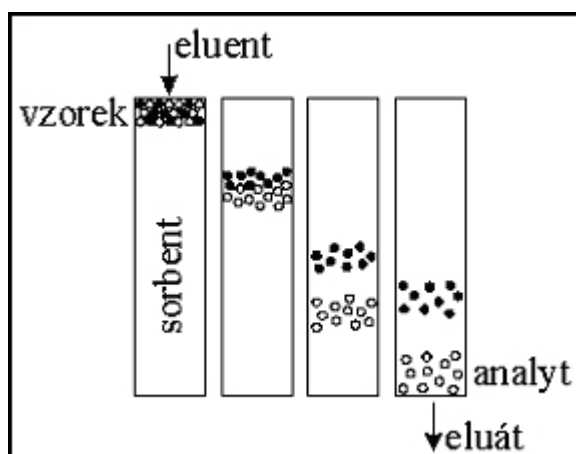
Hlavní procesy podílející se na rozdělování mohou být fyzikálně-chemická adsorbce, absorbce složek vzorku z mobilní fáze, iontová výměna probíhající na povrchu pevné fáze, separace složek na základě efektivní velikosti molekul vzorku v pórovité struktuře pevné fáze. Po rozdělení jsou látky detekovány na detektorech. Použití typu detektoru závisí na druhu analytu a analýzy. Obecně další kritéria, které se u detektorů berou do úvahy jsou: selektivita, citlivost, detekční limit, stabilita signálu, opakovatelnost výsledků, lineární rozsah. Typy nejčastěji používaných detektorů jsou UV/VIS absorbční detektor, refraktometrický, fluorescenční, vodivostní a v současné době se prudce rozvíjí použití hmotnostního spektrometru jako detektoru. Chromatografie nachází široké využití v chemii, medicíně, analýzách léčiv, potravin, vzorků z životního prostředí atd.

Princip

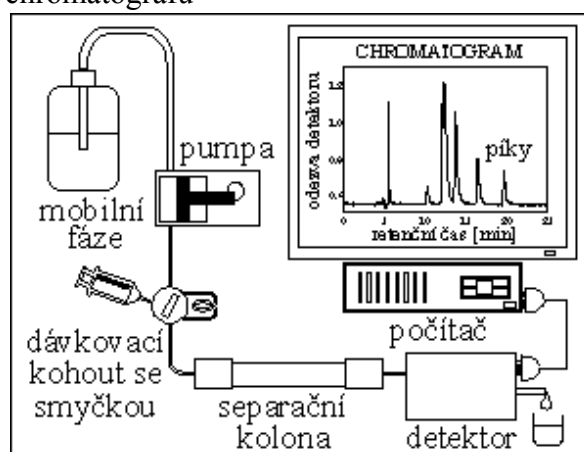
Chromatografický systém zahrnuje tři komponenty: mobilní fázi, vzorek a stacionární fázi. Separace (dělení) probíhá v koloně, která obsahuje stacionární (nepohyblivou) fázi = sorbent a mobilní (pohyblivou) fázi = eluent. Rozdílné analyty (dělené látky) mají rozdílnou afinitu ke stacionární fázi, a tak podléhají různé distribuci (rozdělování) mezi mobilní a stacionární fázi (Obr. 1). Tyto rozdílné interakce mají za následek, že analyty jsou rozdílně zadržovány a zpouzdňovány (retardovány). Pevné fáze v koloně mohou být různých typů a podle toho se vyznačují interakcemi, které se podílejí na rozdělování směsi. K přečištění a izolaci metalothioneinu použijeme hydrofobní stacionární fázi tvořenou porézním silikagelem

s navázanými alkylovými skupinami $C_{18}H_{37}$. Jedná se tedy o HPLC s reverzní fází. Při použití této stacionární fáze mají méně polární molekuly delší retenční čas, zatímco polárnější molekuly jsou eluovány rychleji. Detekce je zabezpečena UV/VIS detektorem. Množství absorbovaného světla závisí na množství konkrétní sloučeniny, která v čase prochází paprskem. Výsledek je zaznamenán v podobě píků v chromatogramu. Každý pík představuje sloučeninu ze směsi. Za dodržení stejných podmínek je retenční čas pro danou sloučeninu stejný. Tento fakt lze využít k identifikaci sloučeniny. Kvantifikace látky se provádí integrací plochy píku. Analýzy jsou prováděny na kapalinovém chromatografu, jeho komponenty a typické uspořádání je na Obr. 2.

Obr. 1: Schéma procesu na koloně



Obr. 2: Schéma uspořádání kapalinového chromatografu



Postup

Pomůcky: kapalinový chromatograf Agilent 1100 (Obr. 3) vybavený autosamplerm (Obr. 4) a ovládaný PC, vialky k autosampleru, automatické pipety

Chemikálie: Kyselina trifluoroctová, acetonitril

Obr. 3: Kapalinový chromatograf Agilent 1100



Obr. 4: Autosampler v akci



Nejdříve nastavíme parametry metody.

Podmínky:

Kolona - Agilent Poroshell 300SB C18

Metoda – C:\CHEM32\1\METHODS\IZOKRAT.M

Průtok - 1ml/min.

Mobilní fáze: A – 0,1% TFA (kys. trifluoroctová) v demi H₂O,

B – 0,75% TFA v acetonitrilu

Izokraticky (25%B, 75%A)

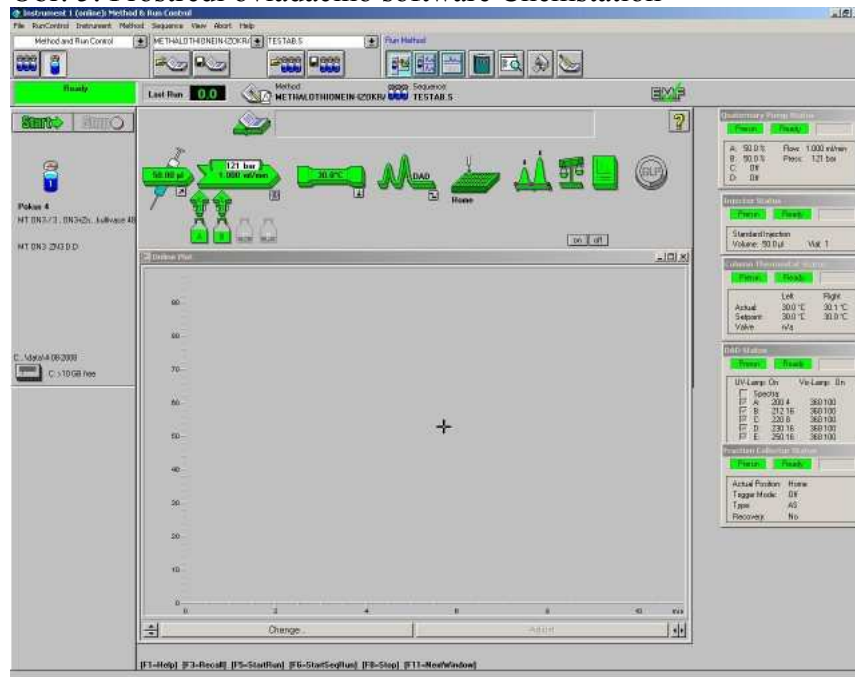
Vlnová délka $\lambda=200\text{nm}$

Teplota kolony +30°C

Objem vzorku – 10 μl

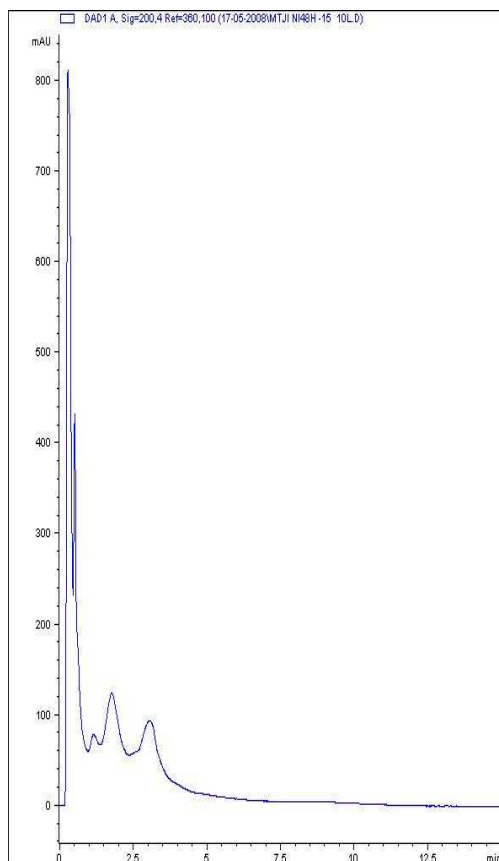
Doba trvání – 15 min.

Obr. 5: Prostředí ovládacího software Chemstation

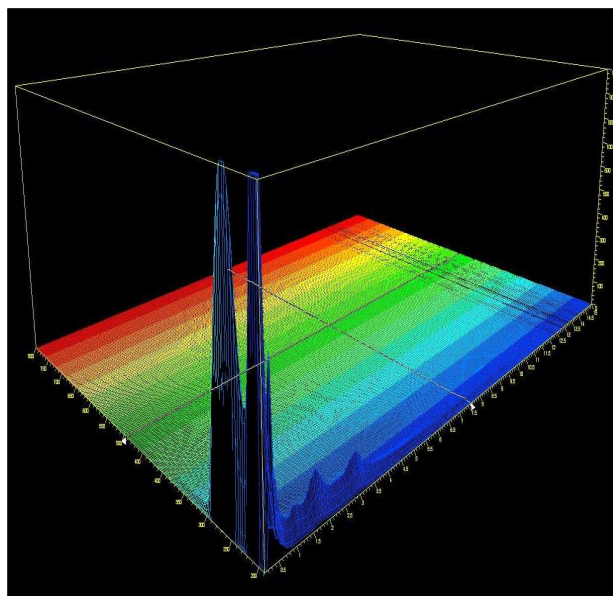


Vialku, do které jsme nepipetovali 100 μ l vzorku, vložíme do autosampleru a znáčkneme tlačítko start. Po skončené analýze se na monitoru objeví závěrečný protokol obsahující: podmínky experimentu, grafické znázornění průběhu dělení s jednotlivými píky a jejich retenčním časem, vypočtenou plochu píků a % plochy připadající na každý pík. Chromatogram lze převést do 3 D spektra.

Obr. 6: Příklad záznamu průběhu analýzy



Obr. 7: 3D spektra v jednotlivých píkách



Hodnocení

Porovnáme počet píků a retenční časy zjištěné v jednotlivých vzorcích.

Masarykova univerzita v Brně

Přírodovědecká fakulta

Ústav experimentální biologie

Oddělení mikrobiologie a molekulární biotechnologie

Doplnění laboratorního cvičení z Fyziologie bakterií

Řešitelé: Kopecká Jana, Sedláček Ivo, Balážová Tereza

Podporováno Fordem rozvoje vysokých škol MŠMT č. 424, G4, 2013

14 Měření schopnosti kvasinek flokulovat

Úvod

Kvasinky patří celosvětově k průmyslově nejvyužívanějším mikroorganismům (potravinářství, farmacie, různé oblasti vědy, techniky i medicíny, modelové organizmy, atd.). Buňka kvasinek je eukaryotního typu, má ovšem silnou a pevnou buněčnou stěnu tvořenou převážně glukany, glykozylovanými proteiny (manany) a chitinem.

Flokulace je reverzibilní schopnost kvasinek tvořit větší celky, shlukovat se a následně se rychle usazovat nebo stoupat na povrch média. Je ovlivněna celou řadou faktorů (kmen kvasinek, médium, typ kultivace, čas, pH, atd.). Objevuje se spontánně na konci kvašení, usnadňuje odstraňování buněk z fermentačního média a tedy i výrazně zlehčuje získávání produktu, namísto použití filtrace. Pro průmyslové aplikace (pivovarnictví, vinařství, produkce bioetanolu a zpracování odpadních vod) je flokulace vítanou vlastností kvasinek.

Komponenty flokulace jsou buněčné stěny kvasinek, tedy α -mannany, proteiny (FloP = zymolektiny) a vápenaté ionty. Mechanismus flokulace popisuje lektinová teorie z roku 1982, podle které „čnící“ povrchový protein (zymolektin) z buňky a v přítomnosti Ca^{2+} váže cukernaté zbytky na povrchu sousední buňky. Tyto znalosti se využívají při měření schopnosti kvasinek shlukovat se (promývání buněk či přidání vápenatých iontů). Přidání cukru do roztoku může zablokovat lektiny pro vazbu na sousední buňky a tedy i pro flokulaci. Je známa i koflokulace mezi kvasinkami a bakteriemi.

14.1 Flokulační test – modifikovaný Helmův sedimentační test

Princip metody

Principem metody je porovnání rychlosti sedimentace buněk v přítomnosti a nepřítomnosti dvojmocných iontů. Proto jedna část narostlých buněk je promyta EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová, Chelaton 2 - "sekvestruje", vyváže ionty). Druhá část kultury je naopak promyta roztokem obsahujícím Ca^{2+} . Rozdíl v rychlosti sedimentace se stanoví nefelometricky – stanovení procenta flokulace.

Materiál a zařízení

- **Mikroorganismy:**
Saccharomyces cerevisiae, *Saccharomyces pastorianus*
- **Chemikálie a roztoky:**
YPD médium (2% pepton, 2% D-glukóza, 1% kvasničný extrakt; pH 6,34)
EDTA 50 mM, pH 7,0
promývací roztok – CaSO_4 0,51 g/l
sedimentační roztok - CaSO_4 0,51 g/l; octan sodný 6,8 g/l; kyselina octová 4,05 g/l; etanol 4% (v/v); pH 4,5
- **Přístroje:**
centrifuga, pH metr, vortex
spektrofotometr Spekol 20

Postup

Flokulační test je prováděn s buňkami, které byly kultivovány po dobu 48, 72 nebo 96 hodin při 30°C za daných kultivačních podmínek (staticky nebo při třepání 120kyvů) metodou dle Lawrence a Smart (2007).

Buňky narostlé v 20 ml média centrifugujeme při pokojové teplotě (5000 rpm, 10 min). Supernatant odlijeme do skleněné kádinky a změříme pH. Sediment buněk resuspendujeme v destilované vodě a naředíme na koncentraci buněk $10^8/\text{ml}$ (odpovídá přibližně hodnotě absorbance $1,700 \pm 0,050$ na přístroji Spekol 20 při 620 nm). Ze suspenze odebereme $400 \mu\text{l}$ do dvou zkumavek označených **A** a **B**.

Suspenzi ve zkumavce **A** promyjeme 1 ml destilované vody a centrifugujeme (5000 rpm, 5 min). Sediment resuspendujeme v 1 ml 50 mM EDTA (pH 7,0), důkladně promícháme a poté přeneseme 1 ml suspenze do 9 ml destilované vody. Po promíchání přeneseme 1 ml suspenze do 2 ml destilované vody a ihned změříme absorbanci při 600 nm (**A**).

Suspenzi ve zkumavce **B** promyjeme 1 ml promývacího roztoku a centrifugujeme (5000 rpm, 5 min). Sediment resuspendujeme v 1 ml sedimentačního roztoku, řádně promícháme a přeneseme 1 ml suspenze do zkumavky. Takto se vzorek ponechá 20 min stát v klidu. Po této době odebereme svrchních $100 \mu\text{l}$ a přeneseme do $900 \mu\text{l}$ destilované vody. Ke vzorku přidáme 2 ml destilované vody a ihned změříme absorbanci při 600 nm (**B**).

Míru flokulace vypočteme podle vzorce:

$$\%F \equiv \frac{A - B}{A} \times 100$$

kde A = absorbance vzorku ze zkumavky A; B = absorbance vzorku ze zkumavky B.

Vyhodnocení a závěr

Z naměřených hodnot vypočteme % flokulace pro jednotlivé kmeny v daném typu kultivace a vytvoříme tabulku (hodnoty od všech skupin ve cvičení). Sestrojíme graf, kde je osa x – kmen kvasinek; osa y - % flokulace; vedlejší osa y – pH a statisticky porovnáme získané výsledky (závislost flokulace na podmínkách kultivace a rozdíl mezi studovanými kmeny).

Literatura

Lawrence S.J., Smart K.A. (2007). Impact of CO₂-induced anaerobiosis on the assessment of brewing yeast flocculation. J. Am. Soc. Brew. Chem. 65: 208-213.

Mazán M., Mazánová K., Farkaš V. (2006). Bunková stena húb – výzva pre výskum nových antimykotík. Chem. Listy. 100: 433-439.

Miki B.L.A., Hung Poon N., James A.P., Seligy V.L. (1982). Possible mechanism for flocculation interaction governed by gene *FLO1* in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol. 150: 878-889.

Peng X., Sun J., Iserentant D., Michiels C., Verachtert H. (2001). Flocculation and coflocculation of bacteria by yeast. Appl. Microbiol. Biotechnol. 55: 777-781.

Stewart G.G. (2009). The Horace Brown Medal Lecture: Forty years of brewing research. J. Inst. Brew. 115: 3-29.