

Kolo: Celoštátne

Kategória: A

Teoreticko-praktická časť – Praktická úloha č. 1

Mikrobiológia

Identifikácia rôznych druhov mikroorganizmov morfológickými a biochemickými testami

Správne rozpoznanie a taxonomické roztriedenie rôznych druhov mikroorganizmov je kľúčové pre základný výskum, ale napr. aj v medicíne a biotechnológiách. Súčasné metódy molekulárnej taxonómie umožňujú analyzovať DNA z veľkého množstva vzoriek naraz a identifikovať tak pôvod takmer ľubovoľného mikroorganizmu, o ktorom máme dostatok informácií. Napriek tomu sú aj v dnešnej dobe využívané niektoré jednoduché morfológické a biochemické testy, na základe ktorých vieme jednoznačne odlíšiť špecifické typy baktérií a jednobunkových eukaryotických organizmov aj bez prístupu k moderným technológiám. V tejto úlohe sa naučíte tri jednoduché testy, ktoré vám umožnia rozlíšiť a pomenovať známe druhy mikroorganizmov.

Úloha 1: Monochromatické farbenie mikroorganizmu neznámeho druhu (X)

Pomôcky: Petriho miska s bunkami neznámeho druhu mikroorganizmu (X), mikroskop s imerzným objektívom, 1x podložné sklíčko, bakteriologické očko, skúmavka s destilovanou vodou, pinzeta, prázdna Petriho miska, metylénové modré farbivo, kadička s vodou, papierová utierka, imerzný olej

Bunky baktérií, ktoré sú výrazne menšie ako eukaryotické mikroorganizmy, sú ťažko pozorovateľné vo svetelnom mikroskope. Monochromatické farbenie umožňuje jednoduchým spôsobom za použitia jedného druhu farbiva vizualizovať baktérie a identifikovať ich tvar a usporiadanie. Vašou prvou úlohou bude pripraviť si fixovaný preparát neznámeho druhu baktérií (použite baktérie nachádzajúce sa na miske označenej značkou „X“), zafarbiť bunky a pozorovať ich v mikroskope.

Príprava fixovaného preparátu

Do stredu podložného sklíčka umiestnite pomocou kvapkadla kvapku destilovanej vody. Bakteriologickým očkom odoberte z Petriho misky malé množstvo buniek neznámeho mikroorganizmu a opatrne ich rozsuspendujte v destilovanej vode. Pomocou očka rozotrite suspenziu rovnomerne po povrchu celého sklíčka a počkajte 10 minút, kým tekutina zaschne. Potom požiadajte vedúceho úlohy aby vám zapol plynový kahan, uchopte podložné sklíčko pinzetou a trikrát ním prejdite ponad plameň kahanu. Dávajte pozor, aby ste svoj preparát nespálili. Ak by ste mali silné podozrenie, že váš preparát je spálený, vypýtajte si nové podložné sklíčko od vedúceho úlohy a vytvorte nový preparát.

Farbenie fixovaného preparátu

Roztok metylénového modrého farbiva nalejte na fixovaný preparát (umiestnený do prázdnej Petriho misky) tak, aby bol celý prekrytý a nechajte farbivo pôsobiť 5 minút. Po 5 minútach opláchnite

zafarbený preparát v kadičke s vodou. Preparát opatrne osušte priložením papierovej utierky (utierku iba priložte, nešúchajte ňou po sklíčku).

Pozorovanie zafarbených baktérií v mikroskope

Do stredu podložného sklíčka s pripraveným fixovaným preparátom vám vedúci úlohy na požiadanie kvapne kvapku imerzného oleja. Následne umiestnite preparát na posuvný stolček mikroskopu. Nastavte si na mikroskope imerzný objektív (obvykle je označený čiernym prúžkom) a zdvihnite posuvný stolček pomocou makroskrutky mikroskopu tak, aby sa objektív dotkol imerzného oleja. Obráz doostriete pomocou mikroskrutky, dávajte však pozor aby ste nevydvihli stolček príliš vysoko, inak môžete poškodiť objektív aj svoj preparát. Pozorujte zafarbené baktérie a odpovedzte na nasledujúce otázky:

1. Medzi známe diagnostické postupy, dlhodobo využívané na určovanie druhov vyšetřovaných mikroorganizmov patří tzv. Gramovo farbenie. Princípom je inkubácia buniek s farbivom a následné pozorovanie, či bunky farbivo zadržávajú alebo sa odfarbia. Ktorá vlastnosť buniek rozhoduje o tom, či bunky ostanú zafarbené (grampozitívne mikroorganizmy) alebo sa odfarbia (gramnegatívne mikroorganizmy)?
 - a. Grampozitívne mikroorganizmy sú schopné vstrebať farbivo a rozkladať ho na jednoduché organické látky, ktoré ďalej metabolizujú a získavajú z nich energiu potrebnú pre rast a delenie.
 - b. Cytoplazmatická membrána gramnegatívnych mikroorganizmov je nepriechodná pre anorganické látky (Gramovo farbivo je takouto látkou) a tým pádom sa farbivo do týchto buniek nedostáva.
 - c. Hrubá bunková stena grampozitívnych mikroorganizmov obsahuje množstvo peptidoglykánov (látok zložených z proteínov a sacharidov), ktoré zadržávajú farbivo na povrchu bunky.
 - d. Gramnegatívne mikroorganizmy vytvárajú zhluky, ktoré bránia farbivu aby sa dostalo k bunkám ukrytým vo vnútri zhluku.

2. Vo vašej prvej úlohe ste pripravovali fixovaný preparát, ale za určitých okolností je možné pozorovať mikroskopom aj živé bunky (tzv. natívny preparát). Ktoré z nasledujúcich tvrdení popisujúcich výhody a nevýhody oboch typov preparátov je pravdivé?
 - a. Nevýhodou fixovaného preparátu je, že v dôsledku procesu fixácie môže v bunkách dôjsť k zmenám, ktoré je možné pozorovať v mikroskope.
 - b. Výhodou fixovaného preparátu je, že na ňom môžeme pozorovať aktivitu jednotlivých bunkových organel.
 - c. Nevýhodou natívneho preparátu je, že živé bunky aktívne udržiavajú svoj tvar, čo znemožňuje ich pozorovanie v mikroskope.
 - d. Výhodou natívneho preparátu je, že živé bunky sú prichytené na podložnom sklíčku a nepohybujú sa, čo uľahčuje zaostrenie mikroskopu.

Úloha 2: Katalázový test baktérií neznámeho druhu (Y)

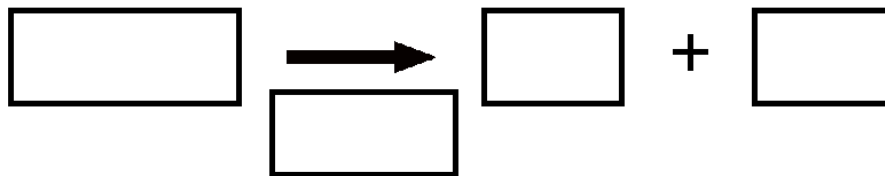
Pomôcky: Petriho miska s neznámym druhom mikroorganizmu (Y), roztok 3% peroxidu vodíka, 1x podložné sklíčko, kvapkadlo

Týmto testom je možné určiť, či sa v bakteriálnych bunkách nachádza kataláza, enzým schopný katalyzovať rozklad peroxidu vodíka a tým chrániť bunku pred poškodením reaktívnymi formami kyslíka. Na základe tohto testu je možné rozlíšiť niektoré morfológicky podobné druhy baktérií.

Stanovenie prítomnosti katalázy v bakteriálnej suspenzii

Kvapkadlom naneste kvapku 3% roztoku peroxidu vodíka na podložné sklíčko. Bakteriologickým očkom odoberte malé množstvo buniek baktérií z petriho misky označenej značkou „Y“ a rozsuspendujte ich v peroxide vodíka. Pozorujte, akým spôsobom sa menia vlastnosti bunkovej suspenzie a odpovedzte na nasledujúce otázky:

3. Kataláza zabezpečuje rozklad peroxidu vodíka. Aké molekuly vznikajú pri rozklade peroxidu vodíka? Zapište rovnicu chemickej reakcie, v ktorej vyznačíte reaktanty, produkty a katalyzátor.



4. Kataláza patrí medzi enzýmy brániace bunku pred poškodením reaktívnymi formami kyslíka (jednou takouto formou je aj peroxid vodíka). Tieto reaktívne formy kyslíka produkujú vo veľkej miere samotné bunky ako vedľajšie produkty metabolizmu. Ktoré z nasledujúcich tvrdení, popisujúcich vznik reaktívnych foriem kyslíka, je pravdivé?
 - a. Reaktívne formy kyslíka nepoškodzujú chromozómy eukaryotických buniek, pretože kyslík nie je schopný prechádzať jadrovou membránou.
 - b. V bakteriálnych bunkách produkujú reaktívne formy kyslíka ribozómy ako vedľajší produkt pri spájaní aminokyselín do peptidových reťazcov.
 - c. Reaktívne formy kyslíka nie sú nebezpečné pre baktérie, pretože nie sú schopné prechádzať bakteriálnou bunkovou stenou.
 - d. Reaktívne formy kyslíka produkujú v eukaryotických bunkách najmä mitochondrie, keďže v nich prebieha bunkové dýchanie.

Úloha 3: Test β -galaktozidázovej aktivity

Pomôcky: skúmavka s bunkami neznámeho mikroorganizmu (Z), skúmavka s roztokom X-gal, kvapkadlo

β -galaktozidáza je enzým, ktorý v bunkách mikroorganizmov zabezpečuje rozklad disacharidov na monosacharidy. V prípade, že je substrátom tohto enzýmu syntetická chemikália X-gal, zložená z galaktózy a 5-brómo-4-chlóro-3-hydroxyindolu, β -galaktozidáza rozštípe X-gal na galaktózu a 5-brómo-4-chlóro-3-hydroxyindol, ktorý sa spontánne oxiduje a vytvára špecifické zafarbenie. V prípade, že sa v bunkách β -galaktozidáza nenachádza, farebný produkt sa nevytvorí.

Stanovenie prítomnosti β -galaktozidázy v bakteriálnej suspenzii

Pomocou kvapkadla preneste bunky zo skúmavky označenej „Z“ do skúmavky označenej „X-gal“. Premiešajte bunky s roztokom, počkajte 30-40 minút a pozorujte, akým spôsobom sa zmení zafarbenie bunkovej suspenzie. Odpovedzte na nasledujúce otázky:

5. Jednou z úloh β -galaktozidázy v bunkovom metabolizme je štiepenie špecifického disacharidu na jednoduché cukry - glukózu a galaktózu, ktoré bunky dokážu bez problémov metabolizovať. Enzým s podobnou funkciou sa nachádza aj v ľudských bunkách a jeho disfunkcia vedie k jednej z často sa vyskytujúcich porúch metabolizmu. Ako sa nazýva táto porucha? Aké sú jej prejavy?

6. Pre úspech β -galaktozidázového testu je kľúčová prítomnosť chemikálie nazývanej SDS v roztoku X-gal. Táto látka pôsobí ako detergent, čo znamená, že je schopná rozrušovať lipidové membrány buniek. Prečo bez tejto látky nie je možné uskutočniť β -galaktozidázový test?

Výsledky experimentov:

Do vyznačených rámečkov tejto tabuľky zaznačte výsledky jednotlivých testov, zodpovedajúce neznámym druhom mikroorganizmov a pokúste sa určiť, ktoré druhy sú reprezentované značkami „X“, „Y“, „Z“.

Hodnotenie tvaru buniek: vyberte si niektorú z možností, ktoré sú uvedené v tabuľke so zoznamom mikroorganizmov, prípadne popis upravte podľa vlastného pozorovania a vpíšte výsledok pozorovaní do príslušného políčka v tabuľke. Ak sa vám popis nezmesť do políčka v tabuľke, využite priestor v spodnej časti tohto hárku a na druhej strane.

Hodnotenie katalázového a β -galaktozidázového testu: použite symboly „√“ resp. „X“ v závislosti od toho, či ste zaznamenali alebo nezaznamenali aktivitu príslušného enzýmu a pozorovanie krátko popíšte v spodnom riadku označenom slovom „pozorovanie“.

V závislosti od toho, ako dopadli vaše experimenty vyberte zo zoznamu mikroorganizmov tie, ktoré pravdepodobne prislúchajú testovaným subjektom „X“, „Y“ a „Z“.

Vzorka	Tvar buniek	Katalázový test	β -galaktozidázový test	Predpokladaný druh
X		-	-	
Y	-		-	
Z	-	-		
Pozorovanie				-

Zoznam mikroorganizmov:

Druh	Tvar baktérií	Katalázový test	β -galaktozidázový test
<i>Bacillus subtilis</i>	podlhovastý, tvorí retiazky, resp. zhluky	-	-
<i>Clostridium difficile</i>	podlhovastý, iba samostatné bunky	-	-
<i>Micrococcus luteus</i>	guľatý, tvorí retiazky	+	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	guľatý, tvorí strapce	-	-
<i>Kluyveromyces lactis</i>	guľatý, samostatné bunky	-	+