

**VILNIAUS UNIVERSITETAS**  
**GAMTOS MOKSLŲ FAKULTETAS**  
Augalų fiziologijos ir mikrobiologijos katedra

**Alma Vaitkevičiūtė**

**BAKTERIJŲ, AUGANČIŲ ANT POLIETILENINIŲ PAVIRŠIŲ,  
ATRANKA IR IDENTIFIKAVIMAS**

Magistro darbas

Darbo vadovas:  
Prof. dr. **Donaldas Čitavičius**

Vilnius  
2007

## Turinys

ĮVADAS.....	4
I. LITERATŪROS APŽVALGA.....	6
1. Biodegradacija.....	6
2. Polietilenas.....	7
3. Polietileno biodegradacija, dėka bioplėvelių.....	9
4. Lengvai biodegraduojami plastikai.....	10
5. Sūrių mikroflora .....	12
6. Ekstremofilai.....	13
7. Psichrofilai.....	15
8. Klasifikacija ir identifikacija.....	16
II. TYRIMO METODAI.....	18
1. Pavyzdžių surinkimas.....	18
2. Terpės ir tyrimų metodai.....	18
2.1 Pavyzdžių išsėjimas.....	19
2.2 Bakterinių kamienų išskyrimas.....	19
2.3 Augimo priklausomybės nuo temperatūros įvertinimas.....	19
2.4 Bakterijų fiziologinės analizės metodai.....	19
2.4.1 Sielės struktūros įvertinimas Gramo būdu.....	19
2.4.2 Bakterijų judrumo nustatymas.....	20
2.4.3 Cukrų hidrolizės testas.....	20
2.4.4 BBL Crystal identifikavimo sistema.....	21
2.4.5 Krakmolo hidrolizės testas.....	21
2.4.6 Želatinos hidrolizės rezultatai.....	21
2.4.7 Kazeino hidrolizės rezultatai.....	22
2.4.8 Triptofano skaidymas.....	22
2.4.9 Oksidazės testas.....	23
2.4.10 Katalazės testas.....	23
2.5 Angliavandenių įsisavinimas.....	23
2.6 Identifikavimas.....	24
2.6.1 Chromosominės DNR išskyrimas.....	24

2.6.2 Polimerazinė grandininė reakcija (PGR) .....	24
2.6.3 DNR gryninimas.....	25
2.6.4 DNR koncentracijos nustatymas.....	25
2.6.5 Sekvenavimas.....	25
III. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS.....	26
1. Pavyzdžių surinkimas ir išsėjimas.....	26
2. Bakterinių kamienų išskyrimas.....	26
3. Augimo priklausomybės nuo temperatūros įvertinimo rezultatai.....	27
4. Sielės struktūros įvertinimas Gramo būdu, bakterijų judrumo nustatymas.....	27
5. Cukrų hidrolizės rezultatai.....	28
6. BBL Crystal identifikavimo sistemos rezultatai.....	29
7. Krakmolo hidrolizės testo rezultatai.....	30
8. Želatinos hidrolizės testo rezultatai.....	30
9. Kazeino hidrolizės testo rezultatai.....	31
10. Tryptofano skaidymas iki indolo.....	31
11. Oksidazės testo rezultatai.....	32
12. Katalazės testo rezultatai.....	32
13. Klasterinė analizė.....	32
14. Gebėjimo įsisavinti tetradekaną (C <sub>14</sub> H <sub>30</sub> ), heksadekaną (C <sub>16</sub> H <sub>34</sub> ), dokožaną (C <sub>22</sub> H <sub>46</sub> ) įvertinimo rezultatai.....	32
14.1 Bakterinių kamienų kultivavimas EFA ir Kozero mineralinėje terpėse, pridėjus tetradekano..	33
14.2 Bakterinių kamienų kultivavimas EFA ir Kozero mineralinėje terpėse, pridėjus heksadekano	35
14.3 Bakterinių kamienų kultivavimas EFA ir Kozero mineralinėje terpėse, pridėjus dokožano.....	37
15. Bakterijų identifikavimas pagal 16 S RNR geno analizę.....	40
IŠVADOS.....	42
SANTRAUKA.....	43
SUMMARY.....	44
PADĖKA.....	45
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	46

## Įvadas

Vystantis mokslams, tokiems kaip biochemija, mikrobiologija ir inžineriniai mokslai, didelis dėmesys yra skiriamas mikroorganizmų išskyrimui, identifikavimui, jų poveikio nustatymui. Ypač svarbūs mikroorganizmai, galintys užteršti maisto produktus ir sukelti įvairius negalavimus. Yra stebimi maisto produktų gamybos technologiniai procesai, siekiama sumažinti mikrobiologinį užterštumą.

Sūrių gamyba išsiskiria iš kitų gaminių gamybos ilgu technologiniu procesu, kurio pagrindinę dalį sudaro brandinimas. Šiam procesui reikalinga tam tikra patalpų temperatūra, santykinė oro drėgmė. Priklausomai nuo sūrių rūšies, jie brandinami 2-8 mėnesius. Tačiau italų „parmezas“ laikomas subrendusiu tik tuomet, kai esti brandintas trejus metus ir ilgiau.

Sūriai brandinimo metu yra laikomi supakavus juos į polietileningą plėvelę vakuuminio būdu. Polietilenei plėvelei nekenkia drėgmė, ji nelaidi orui, nepraleidžia kvapų ir pro ją nepatenka bakterijos iš aplinkos, tačiau plėvelė gali būti pažeidžiama, todėl svarbu kad sūrių laikymo patalpoje ir ant polietileningų plėvelių paviršiaus būtų kuo mažesnis mikrobiologinis užterštumas.

Sūrio brandinimas vyksta, atsižvelgiant į proceso trukmę, 4–14 °C temperatūroje, esant 80 - 95 % drėgnumui; brandinimo metu sūriai nuolatos vartomi ir šluostomi. Tokie produktai laikomi sandėliuose – šaldytuvuose, kur atrodo mikroorganizmai neišgyvena. Mikroorganizmų atsparumas žemai temperatūrai skiriasi. Esant +4 °C temperatūrai, daugelio gyvybinė veikla nutraukiama, tačiau psichrofilų (vystosi žemose temperatūrose) žema temperatūra neužmuša, o tik pristabdo ar sulėtina jų veiklą. Ilgai laikant sūrius sandėliuose – šaldytuvuose, mikroorganizmai gali pažeisti polietileningą plėvelę ir užteršti produktą, pakeisti jo skonį, sumažinti produkto laikymo trukmę, todėl yra svarbu nustatyti čia besidauginančius mikroorganizmus ir imtis prevencinių priemonių jiems sumažinti.

### **Darbo tikslas:**

- Išskirti, identifiikuoti bakterijas, įvertinti jų gebėjimą įsisavinti medžiagas, sudarytas iš daug anglies (C) atomų turinčių grandinių.

### **Darbo uždaviniai:**

- pavyzdžių surinkimas;
- izoliatų išskyrimas;

- augimo priklausomybės nuo temperatūros įvertinimas;
- fiziologinių savybių įvertinimas:
  - ląstelės sienelės tipo nustatymas;
  - cukrų rauginimo įvertinimas;
  - želatinos hidrolizė;
  - krakmolo hidrolizė;
  - kazeino hidrolizė;
  - triptofano skaidymas;
  - oksidazės testas;
  - katalazės testas;
- gebėjimo įsisavinti tetradekaną ( $C_{14}H_{30}$ ), heksadekaną ( $C_{16}H_{34}$ ), dokožaną ( $C_{22}H_{46}$ ) įvertinimas;
- identifikavimas.

# I. LITERATŪROS APŽVALGA

## 1. Biodegradacija

Mikroorganizmai yra labai svarbūs biologiniame medžiagų skaidyme, įskaitant ir sintetinius polimerus, esančius natūralioje aplinkoje. Tai ir yra vadinama - biodegradacija - mikrobiologinis skaidymas, vykstantis lėtai (Seneviratne, 2006). Biodegradacija - tai medžiagų ardymas, katalizuojant fermentams *in vitro* ir *in vivo* (10). Biodegradacija gali būti apibūdinama trim etapais:

- Pirminė biodegradacija. Medžiagos pirminės struktūros suardymas, ko pasekoje prarandamos specifinės ardomos medžiagos savybės.
- Aplinkai priimtina biodegradacija. Ardymo metu pašalinamos nepageidaujamos skaidomos medžiagos savybės. Tai dažnai atitinka pirminę biodegradaciją, bet ji priklauso nuo sąlygų, į kurias pateko biodegraduojamas produktas.
- Galutinė biodegradacija. Galutinis junginio ardymas iki visiškai oksiduotų ir redukuotų molekulių, tokių kaip anglies dioksidas / metanas, nitratas / amonis ir vanduo. Yra žinoma, kad biodegradacijos produktai gali būti kenksmingesni nei ardoma medžiaga (IUPAC Compendium of Chemical Terminology, 1997).

Natūraliai vykstanti biodegradacija – organinių junginių ardymas, kurį atlieka vietiniai mikroorganizmai. Dauguma mikroorganizmų gali transformuoti natūraliai esančius ir nenatūralius angliavandenilius dėka tiesioginio metabolizmo (Morash, 2002). Terminas „biodegradacija“ siejasi su galutine organinių junginių mineralizacija iki anglies dioksido, vandens, neorganinių junginių arba siejasi su organinių teršalų transformacija iki organinių junginių. Biodegradacijos metu organinės medžiagos ardymas vykdomas dėka fermentų, kuriuos gamina mikroorganizmai (Sdano – Sereno ir kt., 2000). Fermentai yra specifiniai substratams, kuriuos jie veikia. Dažniausiai angliavandeniliai nėra galutinai suskaidomi, bet tik transformuojami iki tarpinių produktų, kurie nėra tokie kenksmingi, kaip pradinis junginys. Biodegradacija yra pagrindas elektronų pernešimo procese. Biologinė energija yra gaunama iš oksidacijos metu redukuotų medžiagų. Mikroorganizmų fermentai katalizuoja elektronų pernešimą. Aerobinė biodegradacija yra daug efektyvesnė nei anaerobinė. Populiacijos greit adaptuojasi ir pasiekia didelį populiacijos tankį (10).

Biodegradacija priklauso ir nuo pačios biodegraduojamos medžiagos:

- Vandenyje tirpūs junginiai paprastai greičiau degraduojami negu mažiau tirpios medžiagos.

- n – alkanai, n – alkilaromatiniai ir aromatiniai junginiai, turintys 5 – 22 anglies atomus (C<sub>5</sub> – C<sub>22</sub>) yra lengvai biodegrazuojami.
- n – alkanai, n – alkilaromatiniai ir aromatiniai junginiai, turintys daugiau nei 22 anglies atomus (> C<sub>22</sub>) labai blogai tirpsta vandenyje ir yra sunkiai degraduojami.
- Aromatiniai ir cikloparafininiai junginiai su 4 ir daugiau žiedų labai blogai biodegrazuojami (10).

Biodegradacijai turi įtakos ir temperatūra. Temperatūra yra kontroliuojantis biodegradacijos veiksnys. Aukštesnės temperatūros rezultate yra didesnis metabolinis aktyvumas ir didesnis biodegradacijos greitis. Biodegradacija visiškai sustoja arba sulėtėja kai temperatūra yra apie 0 °C (Erikson ir kt., 2001)

Biodegradaciją įtakoja pH. Biodegradacijai pH 5 – 9 yra priimtinas. Optimaliam medžiagų skaidymui būdingas pH yra 6,5 – 8,5.

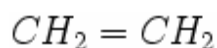
Deguonis daugeliui mikroorganizmų yra galutinis elektronų akceptorius. Biodegradaciją efektyvesnė yra aerobinėmis sąlygomis.

Maisto medžiagų prieinamumas labai svarbus biodegradacijai. Mikroorganizmų metabolizmas ir augimas yra priklausomi, kol būtinos mitybinės medžiagos yra reikiamoje formoje, pakankamomis koncentracijomis ir tinkamu santykiu. Anglis (C), azotas (N), ir fosforas (P) yra pagrindiniai elementai. Biodegrazuojama medžiaga mikroorganizmams yra kaip anglies šaltinis (10).

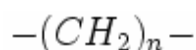
## 2. Polietilenas

Polietilenas, arba polietenas (termoplastinis etileno polimeras) – vienas paprasčiausių ir pigiausių polimerų, baltas chemiškai inertiškas plastikas. Labai geras dielektrikas. Polietilenas - tai bendrinis pavadinimas polimerų, susidarančių polimerizuojant eteną (Žemaitis, 2003).

Polietileno monomero, etileno, teisingiau vadinamo etenu, cheminė formulė yra:



Polietileną sudaro ilgos grandinės:

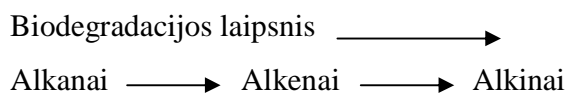


Pateikta polietileno formulė yra idealizuota, nes visi polietilenai sudaryti iš labai ar nelabai šakotų makromolekulių (Stuart, 2003). Polietilenas skirstomas į rūšis pagal polimerinių grandinių šakotumą. Žemo tankio polietilenas (angl. LDPE, Low density polyethene) sudarytas iš labai šakotų

makromolekulių. Dėl savo sudėtingos struktūros jos nesuglunda tarpusavy, dėl to tarpmolekulinės traukos jėgos yra sąlyginai mažos. Toks polietilenas yra tąsus ir minkštas. Buityje jis dažniausiai sutinkamas polietileninių maišelių ar plėvelių pavidalu. Aukšto tankio polietilenas (angl. HDPE, High density polyethene) sudarytas iš ilgų mažai šakotų molekulių, kurios suglunda labai tankiai, tarp jų susidaro tarpmolekulinės traukos ryšiai. Aukšto tankio polietilenas buitroje randamas ploviklių, baliklių, pieno butelių pavidalu (Žemaitis, 2001).

Etilenas yra nesotus alifatinis angliavandenilis. Alifatinių angliavandenilių biodegradacijai turi įtakos:

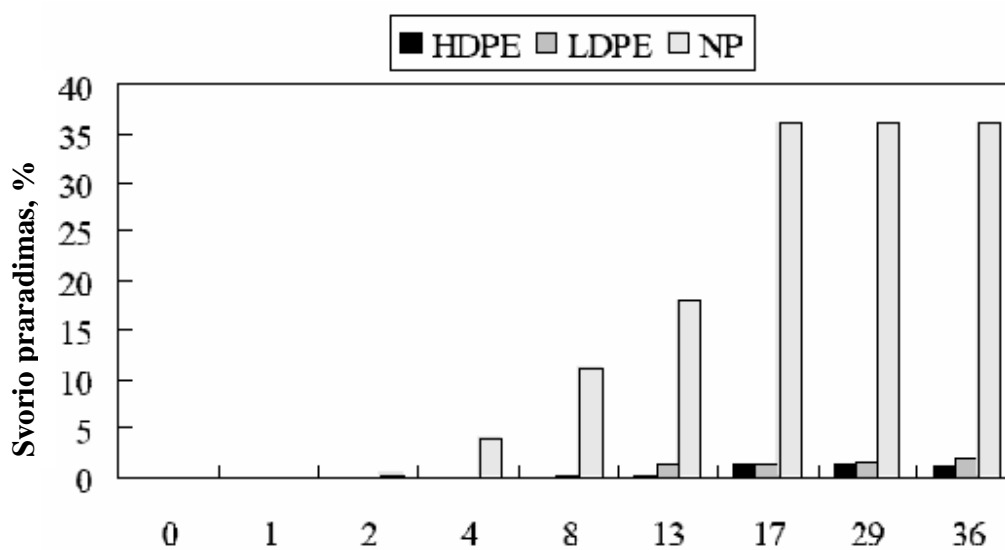
- Grandinės ilgis svarbus biodegradabilumui;
- Biodegradaciją gerina mažėjantis prisotinimo laipsnis ir didėjantis reaktyvumas;
- Grandinės atsišakojimai turi įtakos biodegradacijai (didesnis šakotumas skatina biodegradaciją).



Aukšto ir žemo tankio polietilenai yra dažniausiai naudojami sintetiniai plastikai. Jie yra lėtai degraduojantys natūralioje aplinkoje, ir taip sukeliantys įvairias aplinkos problemas (Stuart, 2003).

Buvo atliktas eksperimentas su aukšto tankio (HPDE), žemo tankio (LPDE) polietilenais ir su polietilenu, į kurio sudėtį įeina 9 % krakmolo (PN). Buvo stebima kaip mikroorganizmai degraduoja šiuos plastikus. Visi šie polietilenai buvo laikomi dirvožemyje, kambario temperatūroje, 15 mėnesių, palaikant 40 % drėgmę. Buvo matuojamas kiekvieno pavyzdžio masė prieš ir po eksperimento (1 pav.). svorio pokytis HDPE ir LDPE buvo labai nežymus, o NP degradacija – spartus mikrobiologinis procesas, nes į jos sudėtį įeina natūralus polimeras – krakmolai, kuri bakterijos lengvai naudoja kaip anglies šaltinį (Yüksel ir kt., 2004). Šis eksperimentas parodo, kad aukšto ir žemo tankio polietilenai sunkiai biodegraduojami, šiam procesui reikia ilgo laiko tarpo.





1 pav. HDPE, LDPE ir NP svorio praradimas eksperimento metu.

### 3. Polietileno biodegradacija, dėka bioplėvelių

Didelis dėmesys yra skiriamas sunkiai skylančių sintetinių polimerų biodegradacijai, naudojant mikroorganizmus. Yra plėtojamos daugialąstelių mikroorganizmų bendrijų, dar vadinamų bioplėvelėmis, prisitvirtinimas prie sintetinių polimerų paviršių. Nustatyta, kad tai yra aktyvus degradavimo veiksnys. Natūralioje ir dirbtinėje aplinkose dauguma mikroorganizmų formuoja bioplėveles ant kietų paviršių ir jų metabolinis aktyvumas yra daug didesnis nei atskirų organizmų. Todėl yra galimybė vystyti bioplėvelių technologijas sintetinių polimerų degradacijai (Seneviratne, 2006).

Mikroorganizmai labai svarbūs biologiniame ardyme medžiagų tokių, kaip sintetiniai polimerai. Didėja susidomėjimas sunkiai biodegraduojamų sintetinių polimerų biodegradacija, naudojant efektyvius mikroorganizmus ir kultivuojant daugialąstelines mikroorganizmų bendrijas, vadinamas bioplėvelėmis, prisitvirtinusias ant sintetinių atliekų. Dauguma mikroorganizmų populiacijų formuoja bioplėveles ant kietų paviršių ir jų metabolinis aktyvumas yra efektyvesnis nei atskirų mikroorganizmų (Seneviratne, 2006).

Tiriant polietileno biodegradaciją, buvo atliktas tyrimas, kurio tikslas išskirti efektyviai vykdančius biodegradaciją mikroorganizmus, nuo skirtingų tipų polietileno paviršių, buvusių po žeme 2 – 4 metus. Bakterijos ir grybai buvo identifikuoti remiantis morfologinėmis, fiziologinėmis savybėmis, biocheminiais testais. Buvo išskirtos 25 bakterijos ir 6 grybiniai izoliatai. Jie buvo kultivuojami atskirai mineralinių druskų terpėje su vieninteliu anglies šaltiniu – polietilenu. Šio

eksperimento metu išskirti efektyviausi mikroorganizmai: grybas *Penicillium frequentus* ir bakterija *Bacillus mycoides*. Kultivuojant atskirai, *P. frequentus* sumažino polietileno svorį 0.50 %, *B. mycoides* - 0.01 %. Šių dviejų mikroorganizmų suformuota bioplėvelė ant polietileno sumažino jo svorį 7 %.

Mikrobinė degradacija kietų polimerų, tokių kaip polietilenas, reikalauja bioplėvelių formavimo ant polimerų paviršių, tai įgalina mikroorganizmus efektyviau naudoti netirpų substratą, veikiant fermentams (Yüksel ir kt., 2004).

Eksperto metu *P. frequentus* ant polietileno formavo micelio tinklą, kuris kolonizavo *B. mycoides*. Angliavandenilinė grandinė pradeda degraduoti veikiant fermentui alkanų monooskigenazei. Alkanų monooskigenazės homologas buvo rastas kai kurių *Bacillus spp.* genomuose, tačiau *Penicillium spp.* nerasta šio fermento.

Polietileno hidrofobiškumas dažnai trukdo bakterijoms pristvirtinti prie paviršių, nes dauguma bakterijų paviršių yra hidrofiliniai. Siūliniai grybai gali pristvirtinti prie hidrofobinių paviršių dėka hidrofobinių baltymų gaminimo (Seneviratne, 2006).

*Penicillium* – *Bacillus* bioplėvelių formavimas gali pagerinti polietilenų degradaciją.

#### 4. Lengvai biodegruojami plastikai

Plastikų gamyboje naudojama daug toksinių medžiagų. Neseniai pradėta domėtis biodegruojamais plastikais, kuriuos suskaido bakterijos, vadinamos biodestruktoriais. Kai kurios bakterijos gali naudoti nuodingas medžiagas savo mitybai. Airijos mokslininkai, atrado dirvožemio bakterijas, kurios naudoja toksinę medžiagą styreną ir paverčia ją kitos rūšies nenuodingu plastikumu. Procesas, kurio metu metabolizuojamos toksinės medžiagos yra vadinamas biokatalize (Byunotae ir kt., 1991).

Sunku būtų įsivaizduoti dabartinį gyvenimą be plastiko ir jo gaminių. Jis naudojamas beveik visose pramonės šakose. Didžiausia problema tame, kad plastikas atsparus cheminiams veiksniams ir yra ilgaamžis (Atlas, 1993). Pastaruoju metu plastiką gaminančios įmonės didelį dėmesį skiria plastiko gaminiams, kuriuos galėtų lengvai suskaidyti mikroorganizmai. Skirtingai nei sintetiniai polimerai, dauguma biopolimerų yra skaidomi mikroorganizmų, vadinasi, jie gali būti ardomi grybų ar bakterijų iki natūralių metabolitinių produktų. Yra trijų rūšių tokie plastikai:

- Fotodegruojami. Naudingi, kadangi ultravioletinė radiacija gali suardyti jų polimerinę struktūrą ir taip juos paruošti bakterijų skaidymui (Atlas, 1993).

- Surišti su krakmolu. Dažniausiai naudojami pirkinčių maišelių gamybai, kur sujungtas krakmolos palaiko trumpų polietileno fragmentų struktūrą. Tokiam polietilenui patekus į dirvožemį, bakterijos pradės skaidyti krakmolą ir išlaisvins polimerų fragmentus, kuriuos toliau galės skaidyti kitos bakterijos.
- „Bakteriniai“. Yra pakankamai nauji ir labai įdomūs, kadangi jų gamyboje (polimerų formavimui) naudojamos bakterijos.

Buvo nustatyta, kad dauguma bakterijų sintetina poly – B – hidroksialkanoatą (PHA), poly – B – hidroksibutiratą (PHB). PHB yra tarpląsteliniai intarpai, kurie tarnauja kaip bakterijų lipidų saugykla. PHB gamyba iššaukia pusiausvyros sutrikimus: anglies ir energijos perteklius ir yra limituojantis augimo faktorius (Fiechter, 1990). PHB yra kaip anglies ir energijos šaltinis bakterijoms bado metu ir yra svarbus mikroorganizmų išgyvenimui. PHA gamyba nustatyta įvairiuose mikroorganizmuose, *Alcaligenes eutrophus* įskaitant rūšis *Clostridium*, *Pseudomonas* gentyse ir kt. Ne visos bakterijos formuoja PHA intarpus, pvz., enterobakterijos visiškai neformuoja PHA (Ojumu ir kt., 2004)

Nustatyta, kad PHB tam tikrame tūryje yra kietas plastikas. Įrodyta, kad PHB taip pat turi daugelį pagrindinių cheminių ir fizikinių savybių (lydymosi taškas, kristališkumas, molekulinis svoris), kaip polipropilenas (1 lentelė).

1 lentelė. PHA ir polipropileno fizinės savybės (Ojumu ir kt., 2004).

Savybė	PHB	Polipropilenas
Lydimosi taškas (°C)	175	176
Kristališkumas (%)	80	70
Tempimo stiprumo riba (MPa)	40	34.5
Ilgėjimas iki lūžio (%)	6	400
Smūginis tūsumas (v/m)	50	45

Iš kitų lengvai biodegruojamų plastikų PHA išsiskiria tuo, kad yra biologinės kilmės, jieirsta natūraliai ir visiškai. Bakterijos PHA suskaido iki anglies dioksido ir vandens

Biopolimerų gamybai naudojamas krakmolos, nes jis lengvai atsinaujinanti nebrangi medžiaga. Krakmolo koncentracija lengvai degraduojamuose plastikuose yra 5 – 90 % plastiko svorio. Biopolimerai yra veikiami fermentų kuriuos išskiria mikroorganizmai. Bvo atlikti tyrimai su lengvai degraduojamais plastikais, juos lengvai skaidė *Phanerochaete* ir *Streptomyces* genčių atstovai (Byunotae ir kt., 1991)

## 5. Sūrių mikroflora

Sūrio gamybai daugiausia naudojamos pradinės kultūros: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*.

Kietųjų sūrių gamybai netinka labai užterštas mikrobais pienas, taip pat netinka ir pienas, kuriame yra mažai arba visai nėra pieno rūgšties bakterijų. Pienui nokstant, ne tik padidėja pieno rūgšties bakterijų skaičius ir pieno rūgštingumas, bet atitinkamai pakinta pieno baltymai.

Nuo antrinio pakaitinimo temperatūros labai priklauso tolesni bakteriologiniai procesai. 40°C temperatūroje mezofilinių pieno rūgšties bakterijų (*Streptococcus lactis* ir kt.) veikla yra stabdoma, bet jos išlieka gyvybingos, todėl po pašildymo streptokokai toliau energingai dauginasi. 54-59°C temperatūroje dauguma mezofilinių pieno rūgšties bakterijų per 30-40 min. žūva, tuo tarpu termofilinės pieno rūgšties bakterijos (*Streptococcus thermophilus*, *Thermobacterium helveticum*, *Bact. casei* ir kt.), kurių optimali temperatūra apie 45°C, išlieka gyvos, ir temperatūrai nukritus, jos energingai pradeda daugintis (Gudonis, 2000).

Po antrinio pakaitinimo sūrio masė dedama į formas ir presuojama. Presavimo laikas, taip pat ir sūrių gabalų dydis priklauso nuo sūrio rūšies. Presuojant sūrio masėje bakterijos energingai dauginasi. Vyrauja pieno rūgšties bakterijos, nes didėjant sūrio masės rūgštingumui, kitoms bakterijoms (*E. Coli*, puvinio ir kt.) vystytis sąlygos nepalankios. Be to, kai kurios pieno rūgšties bakterijos gamina antibiotines medžiagas, slopinančias kitų bakterijų vystymąsi. Sūriuose, su žema antrinio pakaitinimo temperatūra, vyrauja *Streptococcus lactis*, o kituose - *Streptococcus thermophilus*, *Bact. casei* ir kitos termofilinės pieno rūgšties bakterijos (Bhowmik, Marth, 1990).

Sūrių nokinimas. Pagrindiniai mikrobiologiniai procesai sūryje vyksta nokinimo metu; pakinta sūriuose esantis pienas cukrus, baltymai, o kartais ir riebalai. Sūris įgauna būdingą skonį, kvapą, struktūrą. Sūrių nokinime dalyvauja šliužo fermentas ir pieno rūgšties bakterijos. Minkštuose sūriuose, kurių reakcija rūgštesnė, aktyvesnis yra šliužo fermentas, proteolitiniai pieno rūgšties bakterijų endofermentai čia mažiau veiks. Be to, tų sūrių nokime dažnai dar dalyvauja gleivinės bakterijos ir pelėsiai. Kietųjų sūrių nokinime, kur reakcija yra mažiau rūgšti, pagrindinę vietą užima pieno rūgšties bakterijos, šliužo fermentas čia turi mažiau reikšmės (Gudonis, 2000).

Pieno rūgšties bakterijos labai svarbios sūrio gaminimo procese, yra pagrindinė dalis natūralios mikrofloros. Pieno rūgšties bakterijos gamina antimikrobines medžiagas, įskaitant organines rūgštis (pieno rūgštis, acto rūgštis, skruzdžių rūgštis) anglies dioksidą, vandenilio

peroksida, etanolį, bacteriocinus, kurie gali inhibuoti patogenines bakterijas tokias, kaip *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus* ir *Listeria monocytogenes* (Kuzmicka ir kt., 2007).

Sūriams nokstant, jų paviršiuje vystosi įvairūs mikrobai, kurie dažniausiai yra kenksmingi, todėl su jais reikia kovoti. Paviršiaus mikroflora sūriams suteikia blogą skonį ir kvapą, visiškai pakeičia jų nokimo eigą. Patogeninių bakterijų buvimas sūryje kelia pavojų vartotojo sveikatai. Pasterizacijos metu yra sumažinamas *Listeria monocytogenes* ir *Salmonella* skaičius. Nepageidaujamos mikrofloros augimas gali pakenkti sūriui. Coli grupės bakterijos sukelia defektą dar vadinama „ankstyvuojų sūrio pūtimu“, o *Clostridium* genties bakterijos sukelia „vėlyvąjį sūrio pūtimą“ defektą (Kuzmicka ir kt., 2007).

Pirmiausia paviršiuje pradeda vystytis įvairūs grybeliai, dažniausiai pelėšiai ir mielės, o reakcijai pašarmėjus, įvairios gleives gaminančios bakterijos.

Kai kurių sūrių rūšių paviršius yra nelygus, todėl plovimu sunku visus mikrobus pašalinti. Ant tokių sūrių paviršiaus užveisiamos specialios gleivinės bakterijos. Susidariusios sūrio paviršiuje gleivės trukdo pelėšiams ir kitiems kenksmingiems mikrobams vystytis. Pastaruoju laiku, norint supaprastinti sūrių paviršiaus priežiūrą pradėta jų paviršius aptepti medicinišku vazelinu arba padengiamas polimerine plėvele (Kuzmicka ir kt., 2007).

Labai svarbu užtikrinti, kad sūriuose ir ant jų paviršių nesidaugintų patogeninės bakterijos tokios kaip *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus* ir *Listeria monocytogenes* (Novakova ir kt., 2006).

## 6. Ekstremofilai

Bakterijos yra veikiamos aplinkos cheminių ir fizinių sąlygų. Suprasdami aplinkos įtaką, galime paaiškinti bakterijų pasiskirstymą.

Ekstremofilai yra organizmai, kurių augimui reikia ekstremalių sąlygų. Dauguma ekstremofilų yra poliekstremofilai. Jie auga aplinkose, kur aukšta temperatūra, pH, slėgis ir druskos koncentracija, žema temperatūra, pH, vandens prieinamumas. Ekstremofilai – tai organizmai, kurie gali toleruoti ekstremalias sąlygas, įskaitant radiaciją ar toksiškus junginius. Dauguma ekstremofilų yra mikroorganizmai, kurie klesti sąlygomis, kurios mūsų akimis žiūrint, yra ekstremalios.

Ekstremofilai yra klasifikuojami pagal jų augimo sąlygas (Madigan, Marrs, 1997):

- Termofilai/hipertermofilai;
- Psichrofilai;

- Acidofilai;
- Alkalofilai;
- Pjezofilai (=barofilai);
- Endolitai;
- Halofilai;
- Metanogenai;
- Oligotrofai;
- Toksitolerantai;
- Kserotolerantai;
- Atsparūs spinduliuotei.

Ektremofilai labai svarbūs biotechnologijoje, kadangi gali gaminti neįprastus, unikalius stabilius fermentus. Taip pat jie yra geras šaltinis kalalizatorių, naudojamų pramonėje (2, 3, 4, 5 lentelės).

2 lentelė: Termofilų ir jų produktų panaudojimas biotechnologijose

Termofilai ir jų produktai	Panaudojimas biotechnologijose
$\alpha$ -amilazė	krakmolo hidrolizė gaminant tirpius dekstrinus, kukurūzų sirupą
Ksilanazė	popieriaus balinimas
Lipazės, pulululanazės	detergentai
Alkoholdehidrogenazė	cheminė sintezė
DNR polimerazė	PGR
Proteazės	maisto gamyba, odos pramonė
Visas organizmas	naftos degradacija

3 lentelė: Psichrofilų ir jų produktų panaudojimas biotechnologijose

Psichrofilai ir jų produktai	Panaudojimas biotechnologijose
Lipazės, proteazės	sūrių brandinimui
Proteazės, amilazės, lipazės	detergentai
Sušaldyti baltymai	ledų pramonė
Polinesočios riebalų rūgštys	maisto papildai
Visas organizmas	bioremediacija, aplinkos biosensoriai

4 lentelė. Halofilų ir jų produktų panaudojimas biotecnologijose.

Halofilai ir jų produktai	Panaudojimas biotecnologijose
Halofilų membranos	farmacijos pramonė
Glicerolis	suderinti tirpalai farmacijos pramonė
Visas organizmas	dervų, gumų atstatymui, metalų išgavimui

5 lentelė. Alkalofilų produktų panaudojimas biotecnologijose

Alkalofilų produktai	Panaudojimas biotecnologijose
Celiulazės	detergentų, polimerų degradacija

## 7. Psichrofilai

Temperatūra yra vienas iš svarbiausių aplinkos faktorių, veikiančių bakterijų augimą ir išgyvenamumą. Yra įrodymų, kad mikroorganizmai egzistuoja ledynuose, amžino įšalo žemėje, kur temperatūra gerokai žemiau vandens užšalimo taško (Buford ir kt., 2004).

Psichrofilai yra mikroorganizmai, kurie gyvena ir auga geriau žemose temperatūrose nuo -10 iki +20 °C. Optimali temperatūra yra 15 °C ir žemiau. Jie kaip kontrastas termofilams, kurie auga neįprastai aukštesnėse temperatūrose. Psichrofilai naudoja įvairius metabolinius kelius, įskaitant fotosintezę, chemoautotrofiją ir heterotrofiją (Madigan, Marrs, 1997):).

Yra du metabolizmo lygiai mikroorganizmams gyvenantiems ekstremaliose sąlygose, tokiose kaip žema temperatūra (Morita, 1997):

1. Palaikymo metabolizmas – energija reikalinga osmotinei reguliacijai, viduląstelinio pH palaikymui, judrumui, energijos disipacijai ir kt. Jis priklauso nuo mitybinių medžiagų prieinamumo, taip pat ir nuo temperatūros.
2. Išgyvenimo metabolizmas – energija reikalinga tik makromolekulinei žalos taisyti.

Fiziologiniai psichrofilų atsparumo ypatumai:

- Fermentai ir ribosomos aktyvios žemoje temperatūroje;
- Gali inaktyvuotis vidutinėje temperatūroje (~25°C);
- Dauguma membranų lipidų turi nesočias arba trumpos grandinės riebalų rūgštis;
- Riebalų rūgščių cis padėtis keičiama į trans padėtį; Gebėjimas keisti membranų takumą. Šaltyje membranos yra pusiau skystame pavidale;
- Aukštesnėje temperatūroje membranos tampa nelaidžios;
- Psichrofilų augimas ir metabolizmas labai priklauso nuo pasiekiamo vandens

Mezofilų membrana prie nulinės temperatūros tampa kieta ir nepralaidi gyvybiškai svarbioms molekulėms. Mokslininkai nustatė, kad psichrofilai savo membranas palaiko pratakias didindami van der Valso traukos jėgą sąveikoje tarp membranos lipidų uodegėlių. Sukuria baltymus „antifrizus“ tam, kad palaikytų skystą vidinę terpę ir apsaugotų DNR, kai temperatūra yra žemiau vandens užšalimo taško (Madigan ir kt., 1995)

Yra dvi pagrindinės psichrofilų grupės:

- obligatiniai;
- fakultatyviniai.

Obligatiniai psichrofilai yra tie mikroorganizmai, kurių optimali augimo temperatūra yra 15°C ir žemiau. Jie negali augti, kai temperatūra yra 20 °C ir daugiau. Psichrofilai randami ledynuose ir prie vandens užšalimo taško jūros dugne. Šis skirstymas darosi gana komplikotas, nes vis daugiau atrandama mikroorganizmų, kurie turi platų augimo temperatūrų diapazoną (Erikson ir kt., 2001).

Fakultatyviniai psichrofilai (dar vadinami psichrotrofais) gali augti prie nulinės temperatūros ir apytiksliai iki 40 °C, optimalus augimas +20 °C. Jie egzistuoja didesniais kiekiais nei obligatiniai psichrofilai. Psichrotrofai negali augti prie temperatūros žemiau 0 °C, tačiau jie gali palaikyti pagrindines gyvybines funkcijas. Toleruoja šaltį, bet nėra fiziologiškai specializuoti kaip obligatiniai psichrofilai ir paprastai nerandami pačiose šalčiausiose vietose. Fakultatyviniai psichrofilai yra labai svarbūs maisto mikrobiologams, nes gali augti šaldytuvuose ir užteršti maisto produktus (Master, Mohn, 1998).

## **8. Klasifikacija ir identifikacija**

Klasifikacija siekia apibūdinti rūšių įvairovę, įvardijant ir sugrupuojant bakterijas. Bakterijos gali būti klasifikuojamos, remiantis ląstelės struktūra, ląstelės metabolizmu, arba remiantis ląstelių komponentų (DNR, riebiosios rūgštys, pigmentai, antigenai) skirtumais.

Identifikacija - tai praktinis klasifikacijos kriterijų panaudojimas organizmams atpažinti, patvirtinti kamieno autentiškumą arba išskirti ir identifikuoti ligą sukeltantį organizmą (Berekaa ir kt.).

Dauguma taksonomijos specialistų linkę prisilaikyti polifazinės taksonomijos (apima tiek genomine, tiek fenotipinę informaciją) pagal tam tikrą skirtingų požymių skaičių. Tačiau tai ilgas,



daug laiko atimantis darbas. Šiuo metu vis dažniau pasirenkama filogenetinė bakterijų klasifikacija, kurios pagrindą sudaro genų sekos. Iš pradžių tai buvo 16S rRNR pagrindu, bet neseniai pradėti naudoti kiti genai, dažnai jų grupės iki septynių vienetų, o dabar multi genų sekos. Klasifikacijos rezultatas yra grupės kamienų priskyrimas įvairiems taksonominiams lygiams. Genotipiniai tyrimai yra plačiau naudojami praktikoje. Atliekant tyrimus tikimasi, kad fenotipinių testų rezultatai koreliuos su genotipiniu testų rezultatais.

Klasikinė fenotipinė analizė leidžia klasifikuoti taksonus pakankamai didelėse ribose (šeimos, eilės lygmenyje). Pagrindiniai morfologiniai požymiai: ląstelės forma, dydis, judrumas, endosporų formavimas, intarpai, spalva, kolonijų morfologija. Fiziologinių ypatybių skiriamoji geba labai maža.

16S rRNR analizė leidžia suskirstyti prokariotus į visus taksonus, išskyrus rūšį. PGR – polimerazinė grandininė reakcija (angl. PCR; Polymerase chain reaction) – tai molekulinės biologijos metodas, leidžiantis padauginti (amplifikuoti) DNR *in vitro* (mėgintuvėlyje). Tai greitas ir lankstus fermentinis metodas norimam DNR fragmentui pagausinti *in vitro*. Taip gaunama pakankamai medžiagos tolimesniems biologinės medžiagos tyrimams. PGR yra naudojama genetiniams susirgimams ir vėžiui diagnozuoti, mikroorganizmų ir virusų detekcijai, teisminei ekspertizei ir t.t. Daugelio pasaulio mokslinių laboratorijų PGR naudojama tokiems rutininiais darbams atlikti, kaip klonų analizavimas, restrikcinių žemėlapių sudarymas, subklonavimas, DNR sekos nustatymas (sekvenavimas), mutagenėzė ir t.t. PGR gali būti padauginamas ne ilgesnis kaip keleto tūkstančių nukleotidų porų fragmentas (Madigan, 1995).

DNR hibridizacija – tai metodas, leidžiantis identifikuoti žemesnius taksonus (genties ribose, tarp rūšių ir tarp kamienų). Kita genotipinė charakteristika – G + C kiekis. Galima identifikuoti rūšį ir gentį. Ši analizė neįvertina pirminės struktūros (Bereka ir kt., 2000).

## II. TYRIMO METODAI

### 1. Pavyzdžių surinkimas

Naudojama sanitarinio stovio tikrinimo metodika. Nuoplovos imamos steriliais vatos tamponais. Nuoplovų mėginį imant, tamponas sudrėkinamas, palenkiant mėgintuvėlį ir nuleidžiant tamponą žemyn. Paėmus nuoplovas, kamštis su tamponu vėl įkišamas į mėgintuvėlį taip, kad tamponas pasinertų į skiediklį.

### 2. Terpės ir tyrimų metodai

Triptono sojos agaras (TSA).

Sudėtis:

- triptonas – 15,0 g/l;
- soja – 5,0 g/l;
- natrio chloridas – 5,0 g/l;
- agaras – 15 g/l.

40 g sausos terpės ištirpinama 1 litre vandens. Išpilstoma į buteliukus ir mėgintuvėlius. Sterilizuojama autoklave 15 min esant 121 °C.

Sterilus distiliuotas vanduo.

Tyrimams naudojamas distiliuotas vanduo, kuriame nėra medžiagų, slopinančių ar kitaip veikiančių mikroorganizmų augimą. Distiliuotas vanduo išpilstomas į mėgintuvėlius ir sterilizuojamas 20 min. autoklave 121 ± 1 °C.

Fiziologinis peptono tirpalas.

Sudėtis:

- kazeinato fermentinio hidrolizato peptonas – 1,0 g;
- natrio chloridas (NaCl) – 8,5 g;
- vanduo – 1000 ml

Komponentai ištirpinami vandenyje, pH paderinamas, kad po sterilizavimo jis būtų 7,0 ± 0,2 esant 25 °C temperatūrai.

## 2.1 Pavyzdžių išsėjimas

Surinkti pavyzdžiai išsėjami. Į Petri lėkšteles įpilama po 1 ml skiediklio (nulinio ir pirmo skiedimo) iš mėgintuvėlio, kuriame buvo įmerktas tamponas. Į kiekvieną Petri lėkštelę įpilama nuo 12 ml iki 15 ml TSA. Sumaišomas pasėtas skiediklis su terpe. Leidžiama mišiniui sustingti, paliekant Petri lėkšteles ant šalto horizontalaus paviršiaus. Inkubuojama 3 paras 22 °C temperatūroje.

## 2.2 Bakterinių kamienų išskyrimas

Kolonijos išaugusios Petri lėkštelėse ant TSA, tyrinėjamos lupa. Atrenkamos atskiros kolonijos pagal jų formą, spalvą, profilį, kraštą ir kilpele perkeliamos į mėgintuvėlius su nuožulniu TSA ir inkubuojama 22 °C temperatūroje.

## 2.3 Augimo priklausomybės nuo temperatūros įvertinimas

Bakterijos, užaugintos 22 °C temperatūroje. Mėgintuvėliuose su fiziologiniu tirpalu padaroma atitinkama bakterijų suspensija ir išsėjama kilpele ant lėkštelių, kurios bus inkubuojamos 3 paras temperatūrose: +4°C (šaldytuvas), +4 - +6°C (sandėlys - šaldytuvas), +22°C, +30°C, +37°C, +44°C.

## 2.4 Bakterijų fiziologinės analizės metodai

Tolimesniems tyrimams atrinktų 12 bakterinių kamienų fiziologinės analizės vertinimui pagrindinai naudoti metodai aprašyti Bergey's manual of systematic bacteriology, 1989m.

### 2.4.1 Sienelės struktūros įvertinimas Gramo būdu

Reagentai:

- kristalvioleto tirpalas 0.3%
- liugolio tirpalas 10%
- etilo alkoholis 40%

- safranino spiritinis tirpalas 2.5%

Ant karščiu fiksuoto preparato lašiname kristalvioleto, po 30 sekundžių nuplauname jį liugolio tirpalu, po 60 sekundžių užlašiname etilo alkoholio ir nuplauname distiliuotu H<sub>2</sub>O, po to užlašiname safranino, po 60 sekundžių nuplauname dist. H<sub>2</sub>O ir stebime preparatą imersiniu mikroskopu.

Nustatomos gram – neigiamos ir gram – teigiamos bakterijos, jų formos (kokai, lazdelės).

KOH 3 % (kalio šarmu) patvirtinamos gram – teigiamos ar gram – neigiamos bakterijos.

### 2.4.2 Bakterijų judrumo nustatymas

Daromas gyvas preparatas bakterijų judrumui nustatyti.

### 2.4.3 Cukrų hidrolizės testas

Terpės paruošimui naudoti reagentai:

- KCl 0.2g
- mielių ekstraktas 0.2g
- MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O 0.2g
- (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1g
- distiliuoto vandens iki 1000 ml, pH 7.0

Naudojami cukrai: rafinozė, maltozė, fruktozė, ksilozė, galaktozė, dulcitas, gliukozė.

Naudotas indikatorius: bromkrezolis 0.04%.

Į 4.5ml terpės įpilama 0.5ml atitinkamo 5% cukraus tirpalo ir 0.04% indikatoriaus - bromkrezolio tirpalo. Su kilpele paimta kultūra užsėjama į skystą terpę. Mėgintuvėliai inkubuojami 22 °C temperatūroje iki 5 parų. Rezultatai tikrinami kas parą. Jei eksperimento metu bakteriniai kamienai asimiliuoja atitinkamą cukrų iki rūgščių, terpė nusidažo geltona spalva, jei neasimiliuoja, terpė lieka nepakitusi, t. y. violetinės spalvos. Taip pat teigiamą testo rezultatą rodo terpės drumstimas. Tai parodo, kad kultūra asimiliuoja cukrų, bet ne iki rūgščių.

### 2.4.4 BBL Crystal identifikavimo sistema

Naudojamos priemonės:

BBL Crystal dangtelis

BBL Crystal pagrindas su terpėm

BBL Crystal mėgintuvėliai su tirpalu inokuliatui

Į jau paruoštą tirpalą inokuliatui įdedame atitinkamos kultūros. Supurtytas skystis supilamas į BBL Crystal dangtelius ir uždengiamas BBL Crystal pagrindu su terpėm. Rinkiniai inkubuojami +22<sup>0</sup>C temperatūroje 24 valandas. Jeigu tam tikra medžiaga asimiliuojama įvyksta spalvinė reakcija.

### 2.4.5 Krakmolo hidrolizės testas

Terpė:

- Tirpus krakmolas 10g
- MB (triptonas 10g, mėsos ekstraktas 5g, NaCl 5g) 20g
- agaras 20g
- distiliuotas H<sub>2</sub>O iki 1000 ml

Reagentas:

- liugolio tirpalas 10%

1g tirpaus krakmolo ištirpinama 10ml šalto vandens ir sumaišoma su 100ml agarizuotos, mitybinio buljono MB, terpės. Kiekviena kultūra išsėjama ant dviejų šios terpės lėkštelių ir kultivuojama 22<sup>0</sup>C temperatūroje iki 5 parų. Rezultatai tikrinami po 3 ir 5 dienų užpylus ant lėkštelių liugolio tirpalo. Aplink teigiamu amilaziniu aktyvumu pasižyminčią kultūrą susidaro skaidri zona.

### 2.4.6 Želatinos hidrolizės testas

Terpė:

- želatinos terpė (,Lab-Lemco‘ milteliai 3 g, peptonas 5g, želatina 120g) 128g
- dist. H<sub>2</sub>O iki 1000 ml

Kultūros buvo perkeliamos į mėgintuvėlius su želatinos terpe ir inkubuojamos 16 dienų. Aktyvumas tikrinamas kas dvi dienas išėmus mėgintuvėlius iš 22<sup>0</sup>C temperatūros ir perkėlus juos į 4<sup>0</sup>C temperatūrą. Mėgintuvėliuose, kuriuose kultūros vykdo želatinos hidrolizę, terpė nesustingsta.

### 2.4.7 Kazeino hidrolizės testas

Terpė:

- pieno miltelių terpė (drėgmė 5g, pelenai 8g, bendras azoto kiekis 5.3g, cukrūs 48g, eterio tirpalo ekstraktas 0.25g) 66.5g
- agaras 20g
- dist. H<sub>2</sub>O iki 1000 ml

Proteolitiniam aktyvumui nustatyti kultūros išsėjamos ant agarizuotos pieno miltelių terpės. Aktyvumas tikrinamas po izoliatų kultivavimo dvi paras +22<sup>0</sup>C temperatūroje. Aplink teigiamu aktyvumu pasižyminčią kultūrą matoma skaidri zona.

### 2.4.8 Triptofano skaidymas

Terpė:

- Kazeino rūgšties hidrolizatas 10 g
- Triptofanas 1 g
- Natrio chloridas 5 g

16 g sausos terpės ištirpinama 1 litre vandens. Išpilstoma į mėgintuvėlius. Sterilizuojama autoklave 15 min esant 121 °C.

Kovačo reagentas:

- 1% tetrametil – parafenilenediamino – dihidrochlorido tirpalas distiliuotame vandenyje.

Kultūros kultivuojamos mėgintuvuose su terpe 24 valandas +22<sup>0</sup>C temperatūroje.

Šis testas parodomas į terpę su kultivuojama kultūra pridant Kovačo reagento. Jei triptofanas skaidomas iki indolo, tai susidaro raudonas žiedas terpės paviršiuje.

### 2.4.9 Oksidazės testas

Kovačo reagentas:

1% tetrametil – parafenilenediamino – dihidrochlorido tirpalas distiliuotame vandenyje.

Kilpele kultūros užsėjamos ant TSA. inkubuojamos 24 valandas +22 °C temperatūroje. Tada į Petri lėkštelę įdedamas filtrinis popierius ir užlašinamas Kovačo reagento. Teigiama reakcija: kolonijos nusidažo purpurine spalva per 10 sekundžių.

### 2.4.10 Katalazės testas

Vandenilio peroksido 30 % lašas užlašinamas ant švarios skaidrės, emulsija gaunama įdėjus pilną kilpelę kultūros, ją maišant. Teigiama reakcija: deguonies išsiskyrimas rodo katalazės buvimą.

## 2.5 Angliavandenilių įsisavinimas

**EFA terpė g/l:**

$K_2HPO_4$	10g
$KH_2PO_4$	4 g
$(NH_4)_2SO_4$	1 g
Mielių ekstraktas	0,5 g
pH = 7,2	

**Kozero mineralinė terpė g/l:**

$NaCl_2$	2 g
$NH_4H_2PO_4$	2 g
$K_2HPO_4$	1 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,4 g
pH = 7,0	

Kultūros paraleliai užsėjamos į skystas EFA ir Kozero mineralinę terpes. Inkubuojama +22°C. Rezultatai tikrinami kas parą kultūrų užsėtų į terpes su tetradekanu ir heksadekanu, kas 2 paras su dokošanu. Matuojamas terpių drumstumas, naudojant drumstumo matuoklį TURBIQUANT

1500 IR. Jei eksperimento metu bakterijos įsisavina angliavandenilį, drumstumas didėja – bakterijų daugėja.

## 2.6 Identifikavimas

### 2.6.1 Chromosominės DNR išskyrimas

Mitybiniame agare (TSA) bakterijos auginamos per naktį. Nuo agaro bakterijos buvo nuplaunamos 1 ml TNE buferio (1 M Tris–OH – 10 µl, NaCl – 2 µl, 0,5 M EDTA – 20 µl, H<sub>2</sub>O – 968 µl) ir perkeliamos į mikromėgintuvėlį. Ląstelės surenkamos centrifuguojant 3 min. 15000 g, atsargiai pašalinami buferio likučiai. Nusodintos ląstelės buvo resuspenduojamos 135 µl TNE, dar pridedama 135 µl TNE su 2% Triton X – 100, sumaišoma kelis kartus apverčiant mėgintuvėlį. Pridėjus 30 µl lizocimo (5 mg / ml) inkubuojama 30 min. 37 °C temperatūroje. Po to buvo pridedama 15 µl proteazės K tirpalo ir inkubuojama 65 °C temperatūroje 2 val.

### 2.6.2 Polimerazinė grandininė reakcija (PGR)

16 S RNR geno amplifikavimui buvo naudojamas fermentas 2 × PCR Master Mix (UAB „Fermentas“, Lietuva), kurio sudėtyje 0,05 vnt/µl Taq DNR polimerazė (rekombinantinė); reakcijos buferis; 4 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,4 mM kiekvienos dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP). Polimerazės grandininė reakcija buvo atlikta naudojant Mastercycler Personal PGR aparatą (Eppendorf, Vokietija).

16 S RNR geno amplifikavimui naudoti pradmenys:

#### W001

5' > d (AGA GTT TGA TCM TGG CTC) < 3' (Godon ir kt., 1997)

#### W002

5' > d (GNT ACC TTG TTA CGA CTT) < 3' (Godon ir kt., 1997), („Roth“, Vokietija)

16 S RNR geno amplifikavimui buvo naudota PGR programa:

94°C 3 min,

94°C 1 min, 55°C 1 min, 72°C 1 min

72°C 10 min

PGR reakcija buvo atliekama laikantis gamintojo rekomendacijų.



### **2.6.3 DNR gryninimas**

PGR produktui gryninti buvo naudojamas DNA Extraction Kit rinkinys (UAB „Fermentas“, Lietuva). Rinkinys skirtas DNR gryninimui iš agarozės gelio, bet siekiant išvengti ardančio UV poveikio, DNR buvo gryninama tiesiai iš PGR mišinio.

### **2.6.4 DNR koncentracijos nustatymas**

DNR koncentracija buvo nustatyta elektroforezės agarozės gelyje būdu. Buvo naudojamas MassRuller™ Express DNA LADDER, LR žymuo (UAB „Fermentas“, Lietuva). Koncentracija nustatyta remiantis gamintojo rekomendacijomis.

### **2.6.5 Sekvenavimas**

Nukleotidų sekos buvo nustatytos Biotechnologijos instituto Sekvenavimo centre, naudojant automatinį 16 kapiliarų genetinį analizatorių 3130xl (Applied Biosystems). Buvo atliekama fluorescentiniais dažais žymėtų DNR fragmentų elektroforezė, jų detekcija lazeriu ir kompiuterinė analizė. DNR sekvenavimo reakcijos ruošiamos naudojant sekvenavimo rinkinį BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit ir remiasi DNR grandinės terminacijos (Sanger-dideoxy) metodu su fluorescenciškai žymėtais terminatoriais (dNTP). Su šiuo rinkiniu sekvenuotas PGR produktas. Sekvenavimui naudoti pradmenys W001 ir W002 (žr. sk. 2. 6. 2)

### III. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

#### 1. Pavyzdžių surinkimas ir išsėjimas

2005 metais (spalio, lapkričio, gruodžio mėnesiais) buvo imamos nuoplovos nuo sūrių (2004 m. spalio mėnesio gamybos) polietileninių pakuočių sūrių saugojimo patalpoje, kur temperatūra 4 – 6°C. Kiekvieną mėnesį buvo paimta po 30 mėginių, kurie išsėjami, inkubuojami ir toliau analizuojami. Iš viso išskirta 350 bakterinių kamienų.

#### 2. Bakterinių kamienų išskyrimas

Kolonijos buvo augintos Petri lėkštelėse ant TSA agaro. Tyrinėjant lupa kolonijas, jų dydį, formą, kraštą, spalvą išskirta 12 bakterinių kamienų (6 lentelė).

6 lentelė. Bakterinių kamienų kolonijų charakteristikos.

Bakterinis kamienas	Dydis	Forma	Spalva	Kraštas
S1	smulkios (1 – 2 mm)	netaisyklinga	balta, į pilkumą	Banguotas
S2	vidutinės (2 – 4 mm)	netaisyklinga	gelsva	Banguotas
S3	smulkios (1 – 2 mm)	apvali	balta	Lygus
S4	vidutinės (2 – 4 mm)	netaisyklinga	balta, į pilkumą	Šakotas
S5	vidutinės (2 – 4 mm)	netaisyklinga	balta, į pilkumą	Banguotas
S6	smulkios (1 – 2 mm)	apvali	rusva	Lygus
S7	vidutinės (2 – 4 mm)	netaisyklinga	balta	Šakotas
S8	taškinės ( $\leq 1$ mm)	ovali	gelsva	Lygus
S9	vidutinės (2 – 4 mm)	netaisyklinga	balta, į pilkumą	Banguotas
S10	smulkios (1 – 2 mm)	apvali	rusva	Lygus
S11	smulkios (1 – 2 mm)	apvali	gelsva	Lygus
S12	smulkios (1 – 2 mm)	apvali	rusva	Lygus

### 3. Augimo priklausomybės nuo temperatūros įvertinimas

Bakterijos buvo išsėjamos ant lėkštelių su TSA agaru. Inkubuojant bakterijas prie + 4°C, +22°C, +30°C, +37°C, +44°C temperatūrų, nustatytas skirtingas jų augimas. Geriausiai augo prie 22°C temperatūros. Bakteriniai kamienai visiškai neaugo prie 44°C temperatūros (7 lentelė). + 4 °C temperatūroje augimas yra, bet labai silpnas. Kadangi bakterijos išskirtos iš sūrių saugojimo sandėlio, nuo sūrių polietileningų paviršių, kur temperatūra yra + 4 - +6°C, tikėtina, kad priklausys psichrofilams. Įvertinus augimo priklausomybę nuo temperatūros, galima teigti, kad bakteriniai kamienai priklauso fakultatyviniams psichrofilams (psichrotrofams), kurių augimo temperatūros yra nuo 0°C iki +40 °C.

7 lentelė. Bakterinių kamienų auginimas įvairiose temperatūrose.

Bakterinio kamieno numeris	Inkubavimo temperatūros					
	+ 4 °C	+4 - +6 °C (sandėlys - šaldytuvai)	+22 °C	+30 °C	+37 °C	+44 °C
S1	+ -	+ -	+++	+++	+++	-
S2	+ -	+ -	++++	+++	+++	-
S3	+ -	+ -	+++	+++	++	-
S4	+ -	+ -	+++	++	++	-
S5	+ -	+ -	++	+++	+++	-
S6	+ -	+ -	++	+++	++	-
S7	+ -	+ -	+++	+++	++	-
S8	+ -	+ -	+++	++++	++	-
S9	+ -	+ -	+++	+++	+ -	
S10	+ -	+ -	++	++	+++	-
S11	++	+ -	++++	++	+ -	-
S12	+ -	+ -	++++	+++	++	+ -

++++ - labai geras augimas; +++ - geras augimas; ++ - silpnas augimas; + - augimas yra, bet labai silpnas.

### 4. Sielės struktūros įvertinimas Gramo būdu, bakterijų judrumo nustatymas

Atlikus dažymą Gramo būdu, nustatyta, kad visi bakteriniai kamienai yra Gram – teigiami. Tai patvirtinta ir 3 % KOH. Izoliatas nudažius, tirtos ląstelių formos. Nustatytos rutulinės bakterijos (kokai), kurių tarpe buvo: monokokai, diplokokai, streptokokai ir tetrakokai (8 lentelė).

Darant gyvus bakterinių kamienų preparatus, įvertintas bakterijų judrumas (8 lentelė). Visi bakteriniai kamieniai buvo nejudrūs.

8 lentelė. Bateriainių kamienų dažymas Gramo būdu, ląstelių formos ir judrumo nustatymas.

Bakteriniai kamieniai	Dažymas Gramo būdu	Ląstelių forma	Judrumas
S1, S3, S4, S5, S6, S11, S12	Gram +	diplokokai	nejudrios
S2	Gram +	tetrakokai	nejudrios
S8, S9	Gram +	streptokokai	nejudrios
S7	Gram +	monokokai	nejudrios

## 5. Cukrų hidrolizės rezultatai

Kai kurių cukrų skaidymas buvo tiriamas naudojantis BBL Crystal identifikavimo sistema, kitų cukrų (rafinozės, maltozės, fruktozės, ksilozės, galaktozės, dulcito, gliukozės) skaidymas nustatytas, atliekant cukrų hidrolizės testą. (9 lentelė) R – raide pažymėtas rezultatas rodo, kad cukrai buvo skaidomi iki rūgščių, d – raide žymi kolonijų augimą, įvertinant vizualiai pagal terpės drumstimąsi, o tuščias laukelis rodo, kad kultūros atitinkamo cukraus neasimiliavo. Atlikus tyrimą nustatyta, kad visi 12 bakterinių kamienų neskaidė rafinozės, o fruktozė ir gliukozė buvo labiausiai skaidomi cukrai (9 lentelė).

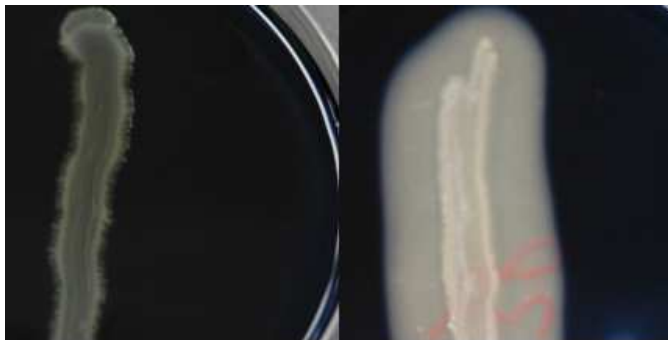
9 lentelė. Cukrų hidrolizės rezultatai.

Izoliatai	Cukrai						
	Rafinozė	Maltozė	Fruktozė	Ksilozė	Galaktozė	Dulcitas	Gliukozė
S1		d	R	d	R	d	d
S2		d	d			d	d
S3			R	d			d
S4			R				d
S5			R		d		R
S6		d	R				R
S7		d		d			
S8							d
S9			d				d
S10			R	d			R
S11			d				R
S12			d	d			d



## 7. Krakmolo hidrolizės testo rezultatai

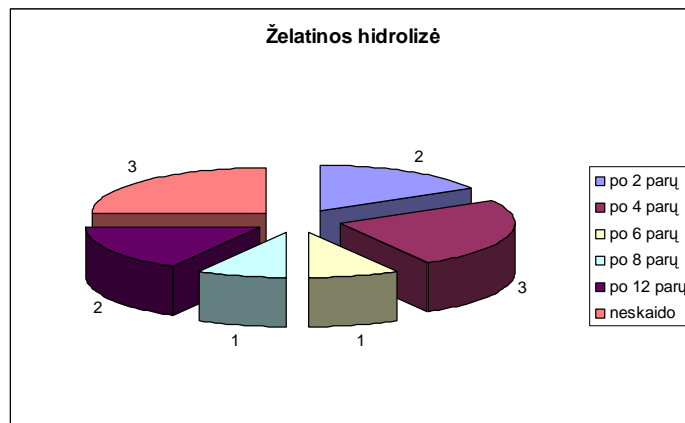
Kultūros buvo perkeltos į Petri lėkštes su krakmolo terpe ir inkubuotos +22 °C iki 5 parų. Rezultatai tikrinami po 3 ir 5 dienų, užpylus ant lėkštelių liugolio tirpalo. Aplink amilaziniu aktyvumu pasižyminčias kultūras buvo matomos skaidrios zonos (2 pav). 10 bakterinių kamienų pasižymėjo amilaziniu aktyvumu. Neigiamą rezultatą rodė S1 ir S12 bakteriniai kamienai.



2 pav. Aplink amilaziniu aktyvumu pasižyminčias kultūras matomos skaidrios zonos.

## 8. Želatinos hidrolizės testo rezultatai

Kultūros buvo perkeltos į mėgintuvėlius su želatinos terpe. Inkubuojant +22 °C ir tikrinant kas dvi paras nustatyta, kad po 2 parų - 2 bakteriniai kamienai (S1 ir S12) hidrolizavo želatiną, po 4 parų - 3 (S6, S9, S11), po 6 parų – 1 (S8), po 8 parų – 1 (S5), po 10 parų - nei vienas nevykdė želatinos hidrolizės, o po 12 parų – 2 bakteriniai kamienai (S4 ir S7) hidrolizavo želatiną.. Po 14 ir 16 parų inkubavimo nustatyta, kad 3 bakteriniai kamienai visiškai nevykdė želatinos hidrolizės (3 pav.).



3 pav. Želatinos hidrolizės rezultatai

## 9. Kazeino hidrolizės testo rezultatas

Kultūros buvo išsėtos ant agarizuotos pieno miltelių terpės. Po 2 parų inkubavimo 22 °C proteolitiniu aktyvumu pasižymėjo 11 bakterinių kamienų iš 12. Neigiamą reakciją rodė S10 bakterinis kamienas. Tai rodo, kad 11 kamienų gali asimiliuoti baltyminės kilmės medžiagas ir panaudoti jas kaip alternatyvų C ir N šaltinį (4 pav).



4 pav. Kazeino hidrolizės rezultatai.

## 10. Triptofano skaidymas iki indolo

Šis testas parodomas pridėjant Kovačo reagento į terpę su kultivuojama kultūra. Jei indolo yra, susiformuoja raudonas žiedas terpės paviršiuje. Atlikus šį testą, 3 bakteriniai kamienai (S1, S11, S12) skaidė triptofaną iki indolo.

## 11. Oksidazės testo rezultatai

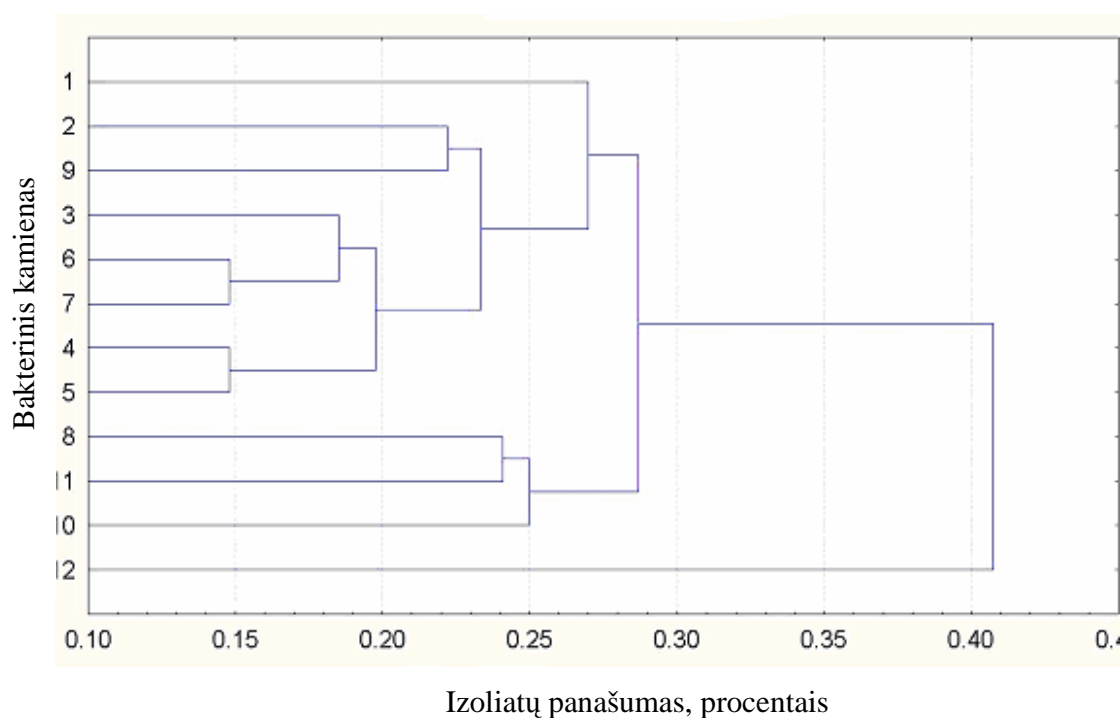
Oksidazės testas naudojamas nustatyti ar bakterijos gamina tam tikrą citochromo c oksidazę. Teigiamą oksidazę reiškia, kad bakterija turi citochromo c oksidazę ir dėlto gali panaudoti deguonį energijos gamybai. Atlikus oksidazės testą, teigiamą rezultatą rodė 2 bakteriniai kamienai (S11, S12), visų kitų bakterinių kamienų oksidazės testas buvo neigiamas.

## 12. Katalazės testo rezultatai

Atlikus katalazės testą, nustatyta teigiama reakcija visiems 12 bakterinių kamienų: deguonies išsiskyrimas rodo katalazės buvimą.

## 13. Klasterinė analizė

Buvo atlikta klasterinė analizė, remiantis morfologiniais požymiais bei biocheminių testų rezultatais. Atlikus klasterinę analizę, nustatyta, kad bakterinių kamienų panašumas yra gana didelis: didžiausias panašumas 85% nustatytas tarp S4 ir S5, S6 ir S7 izoliatų (5 pav).



5 pav. Klasterinė analizė (skalėje nurodyti procentai: 0,15 - reiškia kad izoliatai panašūs 85% ir t.t.).

## 14. Gebėjimo įsisavinti tetradekaną ( $C_{14}H_{30}$ ), heksadekaną ( $C_{16}H_{34}$ ), dokožaną ( $C_{22}H_{46}$ ) įvertinimo rezultatai

Šio eksperimento tikslas yra įrodyti, kad tiriami bakteriniai kamieniai gali naudoti polietileną kaip anglies šaltinį, nes visos tyrimo bakterijos buvo išskirtos nuo polietileninių paviršių. Polietileną



sudaro ilgos –  $(\text{CH}_2)_n$  – grandinės, todėl jis sunkiai biodegraduojamas, tai procesas vykstantis metų metus. Dėl šios priežasties, eksperimentui naudoti angliavandeniliai: tetradekanas ( $\text{C}_{12}\text{H}_{30}$ ) (skysta medžiaga), heksadekanas ( $\text{C}_{16}\text{H}_{34}$ ) (skysta medžiaga) ir dokošanas ( $\text{C}_{22}\text{H}_{46}$ ) (miltelių pavidalo medžiaga). Įvertintas bakterinių kamienų gebėjimas įsisavinti šiuos angliavandenius kaip polietileno fragmentus.

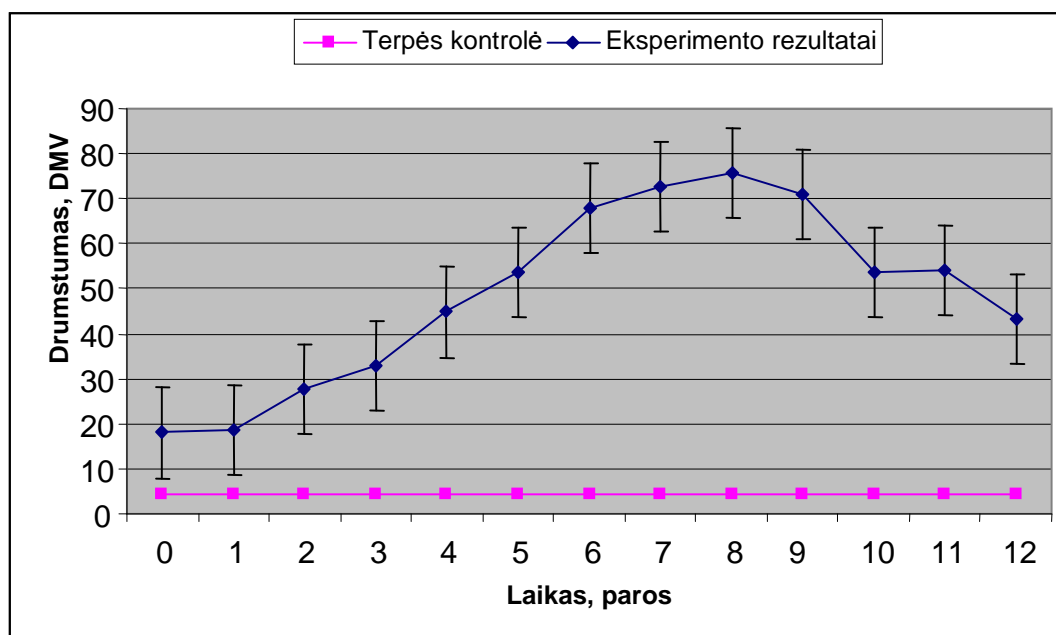
Bakterijos gerai dauginasi skystose terpėse, kur jas iš visų pusių supa mitybinis tirpalas. Skaidrus mitybinis tirpalas, įvedus į jį kultivuojamą kultūrą, laikui bėgant susidrumščia, nes bakterijos pradeda naudoti terpėje esančias mitybines medžiagas, pradeda daugintis, todėl tirpalas susidrumščia. Šio eksperimento metu buvo matuojamas terpės drumstumas (DMV – drumstumo matavimo vienetai). Kadangi analizuojami bakteriniai kamienai eksperimento metu įsisavino tetradekaną, heksadekaną ir dokošanas, vadinasi, per ilgą laiko tarpą pradėtų naudoti polietileną kaip anglies šaltinį.

#### 14.1 Bakterinių kamienų kultivavimas EFA ir Kozero mineralinėje terpėse, pridėjus tetradekano

Kozero mineralinėje terpėje su tetradekanu bakterijos buvo inkubuojamos iki 12 parų. Rezultatai tikrinami kas parą, buvo matuojamas terpės drumstumas. Nustatyta, kad visų bakterinių kamienų terpės drumstumas pradeda ženkliai didėti po 2 parų, o mažėti po 8 parų (11 lentelė). Buvo apskaičiuoti kiekvienos paros terpių drumstumo vidurkiai ( $\pm 10$  DMV) ir nubrėžta kreivė (6 pav.). Terpės kontrolė (be bakterijų kultūros) visą eksperimento laikotarpį buvo 4.5 DMV.

11 lentelė. Bakterinių kamienų kultivavimas Kozero mineralinėje terpėje, pridėjus tetradekano.

Bakteriniai kamienai	Paros												
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
S1	17,9	18,1	29,9	33,3	52,2	69,1	73,8	77,3	78,2	74,9	53,2	51,3	41,2
S2	18,3	18,7	28,7	31,2	47,3	52,9	68,7	71,2	74,5	70,3	60,1	58,7	49,8
S3	18,0	18,9	25,6	29,4	46,4	51,3	71,0	74,4	76,7	71,2	56,7	52,4	47,3
S4	17,7	18,3	29,4	34,5	40,8	57,8	69,3	73,5	77,5	69,9	59,8	51,3	42,3
S5	18,2	18,8	27,8	32,3	51,2	59,7	61,2	70,1	74,2	71,3	63,4	58,7	44,7
S6	17,8	18,1	24,7	30,1	47,3	58,3	72,1	75,8	78,1	73,4	61,2	57,3	48,2
S7	18,1	18,5	27,9	32,7	39,7	45,6	67,4	72,9	75,3	71,2	58,7	49,2	37,8
S8	17,7	18,3	31,0	32,4	41,8	49,8	63,8	69,3	72,7	67,3	58,3	51,4	40,3
S9	18,3	18,9	25,6	34,4	44,5	52,3	71,5	75,8	78,2	72,6	62,2	57,7	49,4
S10	18,2	19,0	22,3	37,2	39,1	48,7	64,9	69,7	72,4	68,2	55,7	51,6	42,3
S11	17,7	18,4	26,7	33,1	47,3	53,4	67,2	74,1	77,2	72,6	62,6	59,3	41,4
S12	17,9	18,9	32,5	34,2	39,7	46,9	63,4	68,9	73,8	70,1	51,3	47,8	35,6

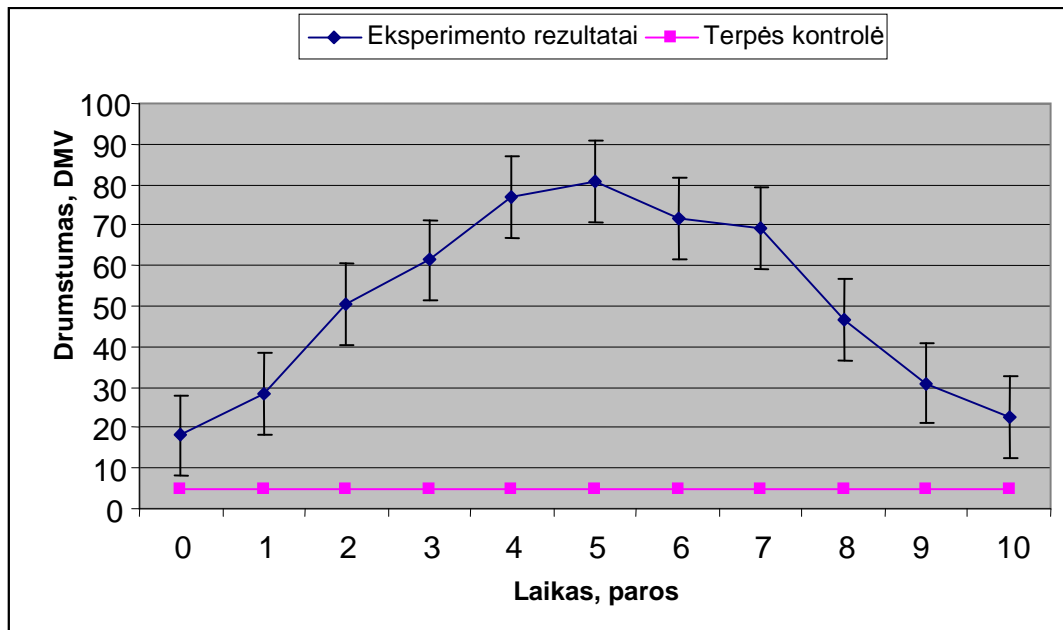


6 pav. Bakterinių kamienų kultivavimas Kozero mineralinėje terpėje, pridėjus tetradekano (drumstumo vidurkiai  $\pm 10$  DMV).

EFA terpėje su tetradekanu bakterijos buvo inkubuojamos 10 parų. Rezultatai tikrinami kas parą, buvo matuojamas terpės drumstumas. Nustatytas žymus terpės drumstumo padidėjimas jau po paros, pvz., S7 bakterinio kamieno terpės drumstumas po paros siekė 35,2 DMV. Terpės drumstumas pradeda mažėti po 6 parų (12 lentelė). Buvo apskaičiuoti kiekvienos paros terpių drumstumo vidurkiai ( $\pm 10$  DMV) ir nubrėžta kreivė (7 pav.). Terpės kontrolė (be bakterijų kultūros) visą eksperimento laikotarpį buvo 4.8 DMV.

12 lentelė. Bakterinių kamienų kultivavimas EFA terpėje, pridėjus tetradekano.

Bakteriniai kamieniai	Paros										
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
S1	18,5	23,4	53,2	72,5	89,3	91,2	82,7	79,1	35,8	29,2	21,3
S2	18,7	21,5	41,0	69,7	92,3	93,7	86,1	81,4	48,4	37,2	24,5
S3	17,5	25,3	43,2	45,8	63,1	70,2	65,8	64,3	42,2	33,1	27,4
S4	18,0	24,7	44,9	49,6	66,4	73,4	67,5	60,2	38,3	30,3	22,8
S5	17,7	31,2	51,2	63,4	73,1	79,2	71,9	66,5	35,2	28,3	21,9
S6	18,2	32,3	55,6	61,5	78,2	81,3	74,5	70,2	55,4	37,2	25,6
S7	18,5	35,2	61,2	63,4	79,9	82,4	76,5	71,6	47,2	29,7	21,8
S8	17,8	28,1	47,2	52,3	69,3	74,3	68,3	63,7	51,2	27,2	19,3
S9	17,5	23,3	49,8	59,8	71,2	75,6	67,8	60,4	55,6	31,4	26,4
S10	18,0	29,7	53,7	57,2	73,4	78,2	71,2	66,8	43,2	22,1	18,7
S11	18,1	31,2	51,3	67,8	81,3	85,6	79,4	71,2	57,8	38,9	22,4
S12	18,3	33,4	52,5	72,3	83,5	84,3	77,6	68,2	49,3	27,8	19,9



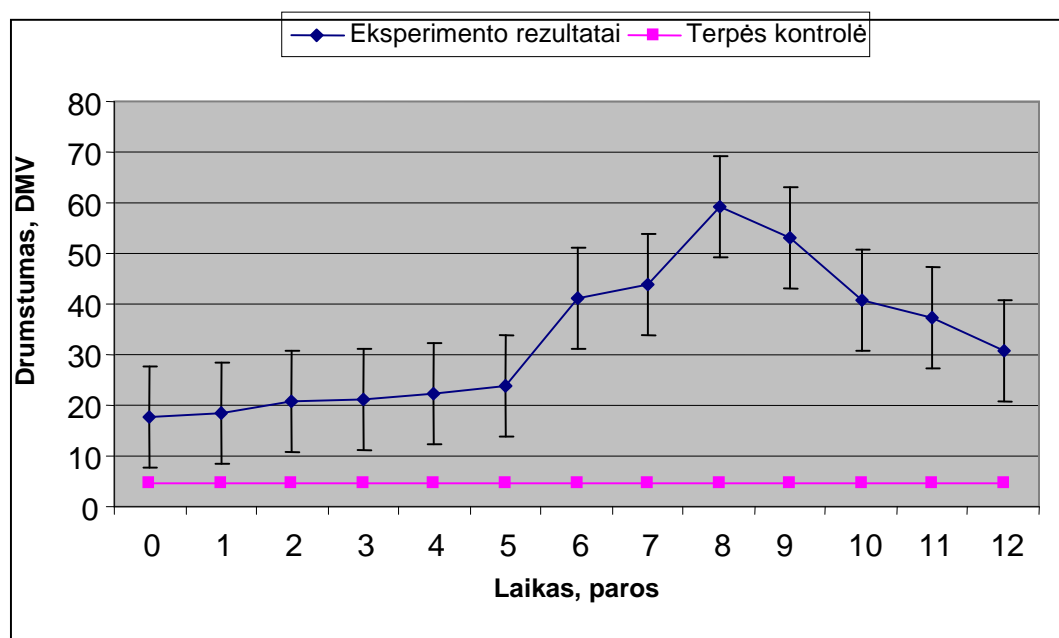
7 pav. Bakterinių kamienų kultivavimas EFA terpėje, pridėjus tetradekano (drumstumo vidurkiai  $\pm 10$  DMV).

#### 14.2 Bakterinių kamienų kultivavimas EFA ir Kozero mineralinėje terpėse, pridėjus heksadekano

Kozero mineralinėje terpėje su heksadekanu bakterijos buvo inkubuojamos 12 parų. Rezultatai buvo tikrinami kas parą, buvo matuojamas terpės drumstumas. Nustatyta, kad terpės drumstumas labai nežymiai didėja iki 5 paros, po to ženkliai didėja iki 8 paros, toliau stebimas drumstumo mažėjimas (13 lentelė). Buvo apskaičiuoti kiekvienos paros terpių drumstumo vidurkiai ( $\pm 10$  DMV) ir nubrėžta kreivė (8 pav.). Terpės kontrolė (be bakterijų kultūros) visą eksperimento laikotarpį buvo 4.7 DMV.

13 lentelė. Bakterinių kamienų kultivavimas Kozero mineralinėje terpėje, pridėjus heksadekano.

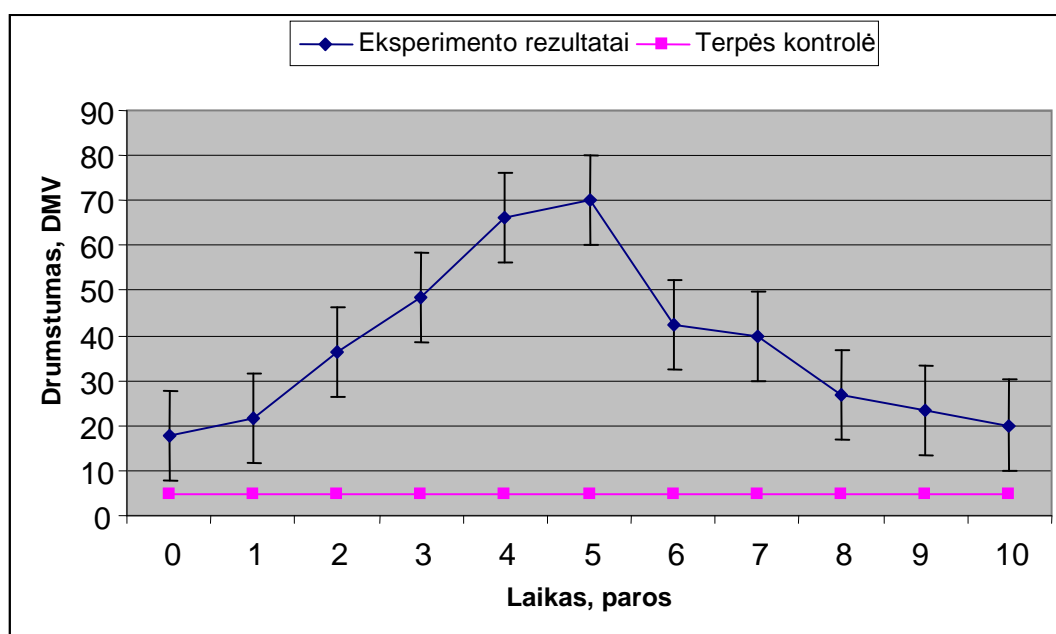
Bakteriniai kamienai	Paros												
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
S1	18,1	18,9	22,3	22,5	24,4	27,2	59,3	59,7	61,4	60,1	42,2	40,1	32,3
S2	17,9	18,0	19,3	19,6	20,1	22,3	43,6	45,2	55,8	53,3	42,8	39,7	30,1
S3	17,5	17,7	18,9	19,0	19,8	23,4	30,5	33,3	45,0	41,2	41,0	38,3	29,7
S4	18,2	19,5	24,3	24,5	24,6	25,2	44,3	47,2	66,1	51,3	27,5	27,0	23,4
S5	18,0	18,3	22,3	23,2	25,4	26,1	43,8	48,3	54,5	50,7	48,9	46,4	37,8
S6	17,3	18,1	19,9	20,3	21,0	23,2	42,6	43,3	70,1	66,9	47,2	39,3	31,6
S7	17,9	18,7	20,4	21,2	24,6	25,0	37,6	42,4	51,4	47,2	32,8	30,1	27,1
S8	18,1	19,2	23,5	23,9	24,1	24,7	40,1	48,9	67,1	52,6	34,6	31,2	25,4
S9	18,2	18,9	19,4	19,5	19,9	21,2	36,1	37,2	53,8	50,5	45,1	42,3	36,3
S10	18,0	18,2	18,7	19,1	20,5	22,6	42,3	43,3	64,3	49,7	37,6	33,7	28,2
S11	17,3	17,8	19,9	19,9	20,2	21,7	36,2	39,2	52,4	50,3	44,3	41,1	32,3
S12	17,5	17,9	18,8	19,3	22,4	23,8	34,3	37,3	69,4	60,7	45,6	40,8	34,9

8 pav. Bakterinių kamienų kultivavimas Kozero mineralinėje terpėje, pridėjus heksadekano (drumstumo vidurkiai  $\pm 10$  DMV).

EFA terpėje su heksadekanu bakterijos buvo inkubuojamos 10 parų. Rezultatai tikrinami kas parą, buvo matuojamas terpės drumstumas. Nustatytas žymus terpės drumstumo padidėjimas po 2 parų, o mažėjimas stebimas po 5 parų (14 lentelė). Buvo apskaičiuoti kiekvienos paros terpių drumstumo vidurkiai ( $\pm 10$  DMV) ir nubrėžta kreivė (9 pav.). Terpės kontrolė (be bakterijų kultūros) visą eksperimento laikotarpį buvo 4.9 DMV.

14 lentelė. Bakterinių kamienų kultivavimas EFA terpėj, pridėjus heksadekano.

Bakteriniai kamieniai	Paros										
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
S1	18,4	20,3	41,0	52,1	71,3	75,7	33,4	30,2	26,1	25,2	24,9
S2	18,8	19,2	29,2	49,4	85,7	86,3	55,4	53,1	46,7	33,1	21,7
S3	17,1	19,7	26,8	42,5	55,1	62,8	46,3	42,7	25,6	23,3	21,5
S4	17,5	20,1	32,3	39,8	49,4	51,2	26,0	25,3	19,4	17,3	16,2
S5	17,3	18,9	33,1	54,3	68,8	73,5	36,6	35,2	28,7	25,4	23,6
S6	18,4	22,3	44,6	51,2	71,5	72,7	30,1	27,6	23,4	20,1	16,4
S7	18,1	24,2	44,9	63,3	84,3	80,2	61,9	56,6	29,4	26,5	24,9
S8	17,5	21,7	32,1	43,7	61,3	67,4	49,1	47,3	29,7	27,2	25,8
S9	17,3	24,5	35,9	39,7	53,4	59,8	36,5	33,4	21,1	19,8	16,5
S10	18,2	21,9	45,7	49,2	74,4	81,8	50,0	42,5	23,1	20,3	16,3
S11	18,6	23,4	37,9	51,4	64,0	68,3	46,9	41,9	18,5	17,2	12,5
S12	17,5	25,7	33,4	43,2	56,7	61,2	36,7	35,4	28,7	24,4	21,3

9 pav. Bakterinių kamienų kultivavimas EFA terpėj, pridėjus heksadekano (drumstumo vidurkiai  $\pm 10$  DMV)

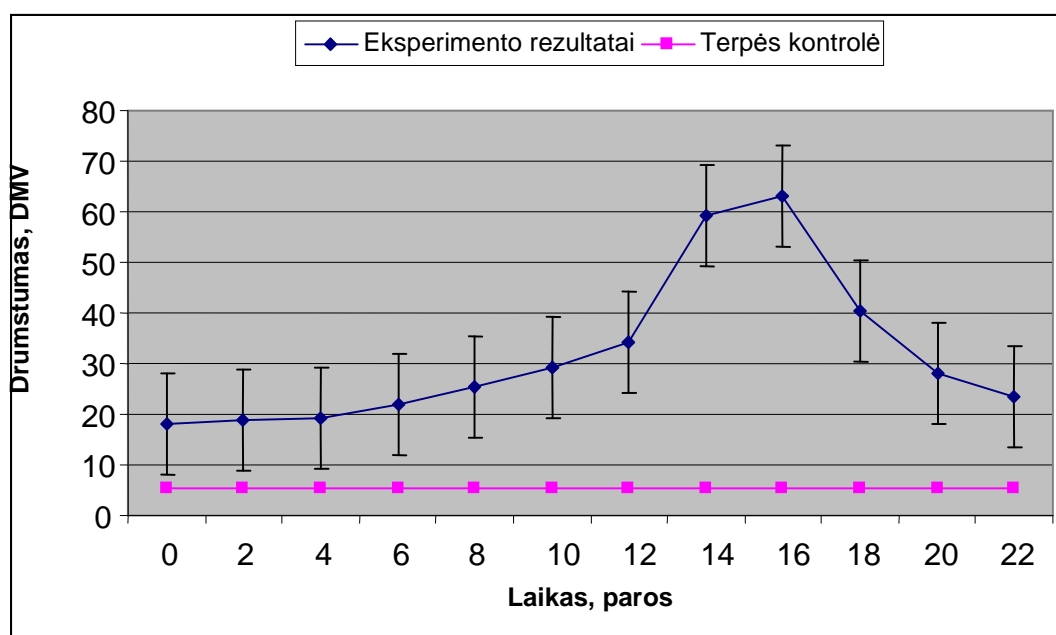
### 14.3 Bakterinių kamienų kultivavimas EFA ir Kozero mineralinėje terpėse, pridėjus dokozano

Kozero mineralinėje terpėje su dokošanu bakterijos buvo inkubuojamos iki 22 parų. Rezultatai buvo tikrinami kas 2 paros, buvo matuojamas terpės drumstumas. Nustatyta, kad terpės drumstumas ženkliai pradeda didėti po 8 parų (15 lentelė). Lėtą drumstimąsi galėjo įtakoti tai, kad

dokozanas – kieta medžiaga. Buvo apskaičiuoti kiekvienos paros terpių drumstumo vidurkiai ( $\pm 10$  DMV) ir nubrėžta kreivė (10 pav.). Terpės kontrolė (be bakterijų kultūros) visą eksperimento laikotarpį buvo 5.4 DMV.

15 lentelė. Izoliatų kultivavimas Kozero mineralinėje terpėje, pridėjus dokozano.

Bakteriniai kamieniai	Paros											
	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22
S1	18,1	18,4	19,3	21,2	24,8	30,2	38,9	54,7	59,2	37,2	29,0	28,7
S2	17,8	18,3	18,9	19,9	25,7	29,3	34,7	56,3	57,4	34,4	28,7	26,3
S3	18,3	18,7	19,1	19,8	26,8	31,3	31,8	59,7	63,0	38,9	29,1	25,4
S4	17,7	18,1	19,2	22,3	25,2	28,7	30,3	61,2	64,3	41,2	27,3	24,3
S5	18,5	18,6	18,9	19,7	24,9	29,6	32,9	53,7	61,7	39,1	26,9	22,4
S6	17,7	18,1	18,7	19,6	27,3	32,7	37,6	57,6	64,2	42,7	25,1	20,5
S7	18,8	18,9	19,5	22,3	26,2	27,3	35,7	58,7	64,3	43,8	29,2	22,8
S8	18,5	19,1	19,7	23,4	27,3	31,3	37,8	59,9	62,7	39,1	27,6	21,3
S9	18,0	19,3	19,9	22,9	23,1	26,7	30,6	62,4	65,3	43,7	29,1	22,7
S10	18,1	18,7	19,5	23,7	24,6	27,3	32,7	61,8	66,9	41,2	32,3	24,9
S11	18,9	19,1	20,1	24,8	25,7	28,9	36,5	67,9	69,1	39,9	26,7	21,5
S12	18,5	18,6	19,8	22,8	23,2	26,7	31,6	55,9	60,3	40,7	23,4	19,8



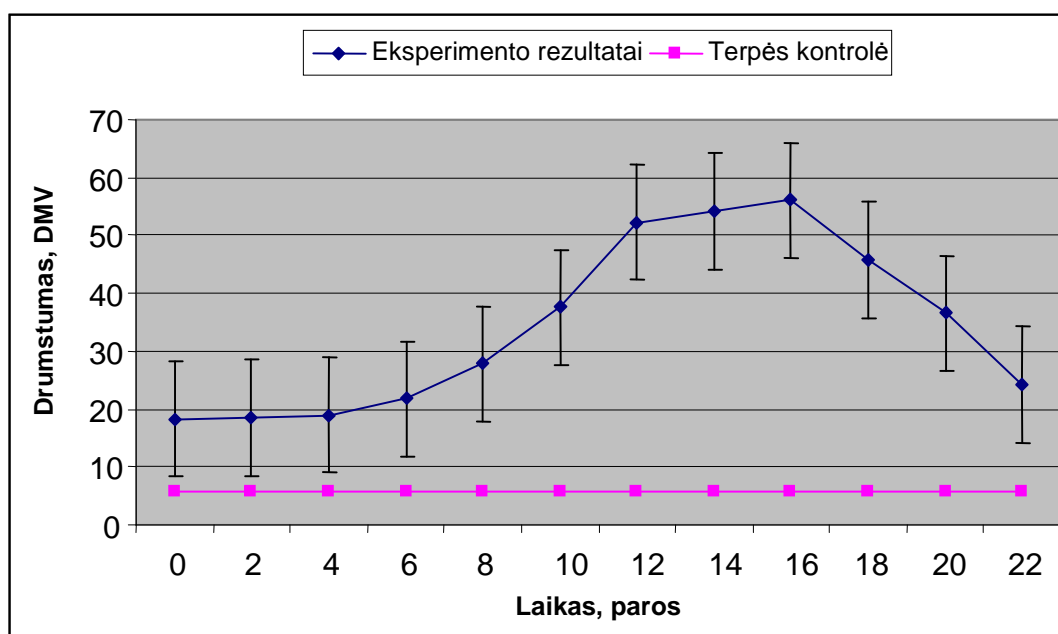
10 pav. Bakterinių kamienų kultivavimas Kozero mineralinėje terpėje, pridėjus dokozano (drumstumo vidurkiai  $\pm 10$  DMV)

EFA terpėje su dokozanu bakterijos buvo inkubuojamos iki 22 parų. Rezultatai tikrinami kas 2 paras, buvo matuojamas terpės drumstumas. Nustatytas drumstumo didėjimas po 8 parų (16 lentelė). Buvo apskaičiuoti kiekvienos paros terpių drumstumo vidurkiai ( $\pm 10$  DMV) ir nubrėžta

kreivė (11 pav.). Terpės kontrolė (be bakterijų kultūros) visą eksperimento laikotarpį buvo 5.7 DMV.

16 lentelė. Bakterinių kamienų kultivavimas EFA terpėj, pridėjus dokozano

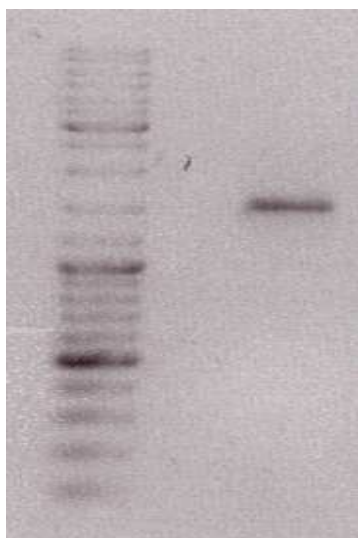
Bakteriniai kamienai	Paros											
	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22
S1	18,6	18,7	19,1	20,3	24,4	38,2	52,3	53,4	56,1	47,0	40,2	23,4
S2	17,9	18,0	18,7	20,1	22,7	32,3	53,8	54,2	57,2	46,3	39,9	21,0
S3	18,1	18,1	18,3	19,2	27,3	36,7	57,2	57,9	58,3	44,2	37,8	25,7
S4	18,4	18,3	18,9	19,1	28,7	40,1	51,4	54,3	56,7	47,9	41,2	21,3
S5	18,7	18,9	19,1	21,4	30,2	33,2	49,8	53,7	54,1	42,3	36,7	20,2
S6	18,3	18,5	18,8	22,7	24,4	35,8	48,3	50,3	53,0	41,8	34,3	24,3
S7	18,0	18,3	19,2	20,6	25,6	36,5	50,4	52,1	54,2	44,7	32,7	22,7
S8	17,9	18,5	19,3	21,8	27,2	38,3	52,7	53,7	54,9	42,3	31,3	27,6
S9	18,4	18,7	18,9	21,3	26,1	34,4	50,8	52,8	55,1	44,5	30,1	25,4
S10	18,5	18,9	19,3	23,5	31,1	40,1	56,4	58,2	60,1	51,2	43,4	28,7
S11	18,6	18,7	19,5	27,2	32,7	43,4	53,2	55,7	57,2	49,3	37,8	27,1
S12	18,4	18,6	19,0	24,4	33,6	42,7	50,8	53,7	56,8	47,4	33,7	24,2



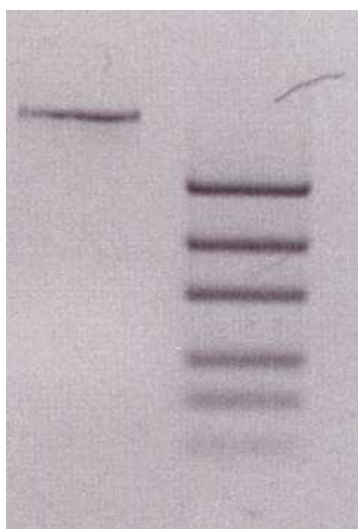
11 pav. Bakterinių kamienų kultivavimas EFA terpėj, pridėjus dokozano  
(drumstumo vidurkiai  $\pm 10$  DMV)

## 15. Bakterijų identifikavimas pagal 16 S RNR geno analizę

Identifikavimui buvo pasirinktas S7 bakterinis kamienas. Iš šios bakterijos buvo išskirta chromosominė DNR. Įvykdžius polimerazės grandininę reakciją, DNR buvo amplifikuota, nes atlikus elektroforezę gelyje matomas 1.5 kb porų fragmentas (12 pav.). Remiantis metodika, buvo išgryninta DNR tiesiai iš PGR mišinio. Nustatyta DNR koncentracija elektroforezės agarozės gelyje būdu (13 pav).



12 pav. Elektroforetinė PGR produkto analizė 1 % agarozės gelyje. Kairėje – molekulinų masių žymuo Gene Ruler™ Mix (dydis iš viršaus į apačią: 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 5000, 6000, 8000, 10000 bp), dešinėje – PGR produktas, 1,5 kb dydžio fragmentas.

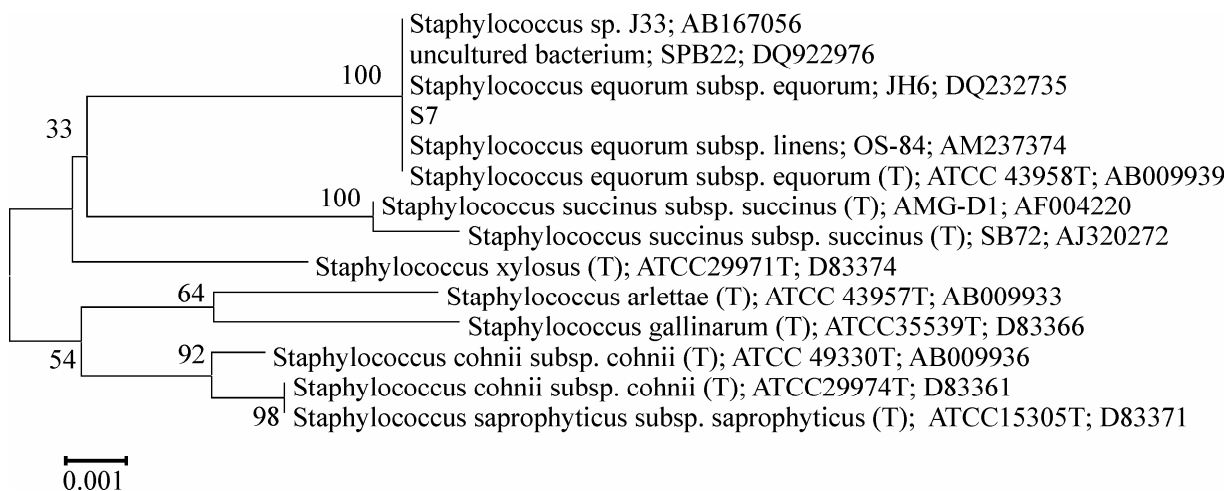


13 pav. Elektroforetinė DNR analizė 1 % agarozės gelyje. Kairėje – 1  $\mu$ l analizuojamo plazmidės tirpalo. Dešinėje – 10  $\mu$ l žymens koncentracijai nustyti MassRuller™ Express DNA LADDER, LR (DNR kiekis iš apačios į viršų: 10, 20, 30, 50, 70, 100 ng)

Biotechnologijos instituto Sekvenavimo centre buvo nustatytos nukleotidų sekos. Gauti rezultatai buvo sulyginami su duomenų baze. Remiantis nukleotidų sekos analize nustatyta, kad S7



bakterinis kamienas priklauso *Staphylococcus* genčiai ir su *Staphylococcus* sp., *Staphylococcus equorum* bei su nekultivuojamu bakteriniu kamieniu formuoja filogenetinio medžio šaką (14 pav.).



14 pav. Bakterinio kamieno S7 filogenetinis medis paremtas 16S rDNR nukleotidų sekomis. Analizė atlikta Neighbor-joining metodu.

Yra duomenų apie bakterijos *Staphylococcus equorum* išskyrimą iš pieno, kuris gautas iš karvių sergančių mastitu. *Staphylococcus* genties bakterijų maži kiekiai randami ant sūrių paviršių, žemoje temperatūroje jų vystymasis pristabdomas, tačiau atsidūrusios aukštesnėje temperatūroje jos gali sparčiai pradėti daugintis ir sukelti žmonių ir gyvūnų infekcijas. Nors šios bakterijos gali būti dalis normalios mikrofloros, tačiau dideli jų kiekiai gali sukelti žmonių ir gyvūnų infekcijas (Novakova ir kt., 2006).

## IŠVADOS

1. Išanalizavus 350 atrinktų bakterijų morfologinius požymius, buvo išskirta 12 bakterinių kamienų, kurie skyrėsi kolonijų dydžiu, forma, kraštu ir spalva.
2. Įvertinus augimo priklausomybę nuo temperatūros, galima teigti, kad bakteriniai kamieniai priklauso fakultatyviniams psichrofilams (psichrotrofams).
3. Įvertinus fiziologines savybes, nustatyta tai, kad visi 12 bakterinių kamienų yra Gram – teigiami, nejudrūs kokai, kurių katalazės testas rodė teigiamą rezultatą. Atlikus kitus fiziologinius testus, išsiskyrė S12 bakterinis kamienas. S12 kartu su S1 nehidrolizavo krakmolo ir jau po 2 parų hidrolizavo želatiną, S12, S11 ir S1 vykdė triptofano skaidymą iki indolo, taip pat S 12 ir S11 katalazės testas buvo neigiamas. Visų kitų bakterinių kamienų fiziologinių testų rezultatai buvo panašūs tarpusavyje.
4. Išanalizavus klasterinę analizę, kuri remiasi bakterijų morfologiniais požymiais ir biocheminių testų rezultatais, nustatytas 85 % panašumas tarp S4 ir S5, S6 ir S7 bakterinių kamienų. S12 panašumas su kitais bakteriniais kamienais siekia 58 %.
5. Įvertinus bakterinių kamienų sugebėjimą įsisavinti angliavandenilius nustatyta, kad tetradekanas ir heksadekanas lengvai įsisavinamos, nes yra skystos medžiagos. Dokošanas yra kieta medžiaga ir įsisavinama lėtai.
6. Atlikus S7 bakterinio kamieno identifikavimą pagal 16 S RNR geno analizę, buvo nustatyta, kad tiriamas bakterinis kamienas - *Staphylococcus* genties atstovas.

Darbą atliko: Alma Vaitkevičiūtė

Darbo vadovas: prof. dr. Donaldas Čitavičius

## SANTRAUKA

Darbo tikslas buvo išskirti, identifikuoti bakterijas, įvertinti jų gebėjimą įsisavinti medžiagas, sudarytas iš daug anglies (C) atomų turinčių grandinių. Iš sandėlio – šaldytuvo, nuo sūrių polietileninių paviršių buvo surinkti pavyzdžiai ir, remiantis morfologiniais požymiais buvo išskirta 12 bakterinių kamienų.

Įvertinus augimo priklausomybę nuo temperatūros, galima teigti, kad bakteriniai kamieniai priklauso psichrofilams. Buvo analizuojamos fiziologines savybės: ląstelės sienelės tipas, cukrų rauginimas, želatinos hidrolizė, krakmolo hidrolizė, kazeino hidrolizė, triptofano skaidymas, oksidazės ir katalazės testai. Remiantis šių testų rezultatais, atlikta klasterinė analizė, nustatytas bakterinių kamienų panašumas.

Kadangi bakterijos išskirtos nuo polietileninių paviršių, buvo įvertintas jų gebėjimas įsisavinti mažai anglies (C) atomų turinčius angliavandenilius (kaip polietileno fragmentus). Nustatyta, kad visi bakteriniai kamieniai įsisavina tetradekaną, heksadekaną ir dokozaną. Vadinasi, per ilgą laiko tarpą analizuojami bakteriniai kamieniai gali pradėti naudoti polietileną kaip anglies šaltinį.

Identifikavimui buvo pasirinktas S7 bakterinis kamienas. Atlikus S7 bakterinio kamieno identifikavimą pagal 16 S RNR geno analizę, buvo nustatyta, kad tiriamas bakterinis kamienas - *Staphylococcus* genties atstovas.

## SUMMARY

The aim of this work was to isolate and identify microorganisms, to estimate their ability to assimilate the substances with a lot of chains with any number of carbon (C) atoms.

There were collected the samples, from the surfaces of cheese polyethylene packing in the storeroom – fridge. In accordance with their morphology there were isolated 12 bacterial strains.

There was estimated the bacterial strains dependence on the temperature. I can propose, that the bacterial strains belongs to the facultative psychrophyles (psychrotrophs).

There were analyzed the physiological properties of the bacterial strain: the composition of the cell wall, sugar fermentation, gelatin hydrolysis, starch hydrolysis, casein hydrolysis, tryptophan degradation, oxidase and catalase tests. According to the results of these test, there was made the clusters analysis and was determined the similarity of the bacterial strains.

There was estimated the ability to assimilate hydrocarbons as the fragments of polyethylene, because the bacterial strains were isolated from the polyethylene surfaces. According to the results, there was determined that the bacterial strains assimilated the tetradecane, hexadecane and docosane. It means that after a long time these bacterial strains would start to assimilate the polyethylene as a sole carbon source.

There was chose up the S7 bacterial strain for the identification. According to the results of the 16 S RNA gene analysis, there was determined that the analysed bacterial strain belongs to the genus of *Staphylococcus*.

## **PADEKA**

Nuoširdžiai dėkoju Vilniaus universiteto Augalų fiziologijos ir mikrobiologijos katedros vedėjui prof., dr. D. Čitavičiui ir katedros kolektyvui už pagalbą rašant baigiamąjį darbą.

Nuoširdžiai dėkoju Biochemijos instituto Molekulinės mikrobiologijos ir biotechnologijos skyriaus vedėjui dr. R. Meškiui už galimybę atlikti tyrimus, doktorantei R. Gasparavičiūtei už pagalbą atliekant tyrimus ir už suteiktą informaciją.

Nuoširdžiai dėkoju „Žemaitijos pieno“ laboratorijos vedėjai G. Norkevičienei už galimybę atlikti tyrimus mikrobiologinėje laboratorijoje.

Be šių žmonių paramos ir pagalbos nebūčiau parengusi šio darbo, todėl esu jiems labai dėkinga.

## LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Atlas, R.M. Microbial Ecology: Fundamentals and Applications. 1993, 3rd Ed., p. 39 – 43.
2. Berekaa M. M., Steinbüchel A. *Microbial degradation of the Multiply Branched Alkane 2,6,10,15,19,23 – Hexamethyltetracosane (Squalane) by Mycobacterium fortuitum and Mycobacterium ratisbonense*. Applied and environmental microbiology, 2000 Vol. 66. No. 10, p. 4462 – 4467.
3. Bhomvik T., Marth E. H. *Role of Micrococcus and Pediococcus species in cheese ripening: a review*. Journal of dairy science, 1990, Vol. 73, No. 4, p. 859 – 865.
4. Bluzmanas P. Mikrobiologinė technika, Vilnius, 1970 m.
5. Buford Price P., Sowers T. *Temperature dependence of metabolic rates for microbial growth, maintenance, and survival*". January 22, 2004
6. Byungtae L., Pometto A. L. III, Fratzke A., Theodore B., Bailey JR. *Biodegradation of degradable plastic polyethylene by Phanerochaete and Streptomyces species*. Applied and environmental microbiology, 1999, Vol. 57, No. 3, p. 678 – 685.
7. Erikson M., Ka J. – O. , Mohn W. W., *Effects of low temperature and freeze – thaw cycles on hydrocarbon biodegradation in arctic tundra soil*. Applied and environmental microbiology, Nov. 2001, p. 5107 – 5112.
8. Fiechter, A. *Plastics from Bacteria and for Bacteria: Poly (B-Hydroxyalkanoates) as Natural, Biocompatible, and Biodegradable Polyesters*. 1990, p. 77 - 93.
9. Fritsche W., Hofrichter M. *Aerobic degradation by microorganisms*, p. 146 – 164.
10. Gasparavičiūtė R., Kruopa A., Meškys R. *A new Arthrobacter strain utilizing 4 – hydroxypyridine*. Biologija, 2006, Nr. 4, p. 41 – 45.
11. Gudonis A. Pieno ir pieno produktų tyrimai, Kaunas. 2000 m.
12. IUPAC Compendium of Chemical Terminology, 1997, 2nd Edition
13. Kumar S., Tamura K. and Nei M. *MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment*. Briefings in bioinformatics, 2004, 5:150-163.
14. Kuzmicka M., Wisniewska K., Rejs A. *Microflora of pressurized Edam cheese*. Pakistan journal of nutritional, 2007, Vol 6 (1), p. 28 – 32.
15. Madigan M.T., Martinko J.M., J. Parker The biology of microorganisms 1995 m.
16. Madigan M.T., Mairs B. L. *Extremophiles*. Scientific american, April 1997, p. 82 – 87.

17. Master E. R., Mohn W. W. *Psychrotolerant bacteria isolated from arctic soil that degrade polychlorinated biphenyls at low temperatures*. Applied and environmental microbiology, 1998, p. 4823 – 4829.
18. Morash B., Richnow H. H., Schink B., Vieth A. *Carbon and hydrogen stable isotope fractionation during aerobic bacterial degradation of aromatic hydrocarbons*. Applied and environmental microbiology, 2002, Vol. 68, No. 10, p. 5191 – 5194.
19. Morita R.Y. *Bacteria in oligotrophic Environments*. 1997.
20. Mrozik A., Piotrowska – Seget Z., Labužek S. *Bacterial degradation and bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons*. Polish journal of environmental studies, 2003, Vol. 12, No. 1, p. 15 – 25.
21. *Naturally occurring biodegradation as a remedial action option for soil contamination* . Wisconsin department of natural resources, 1994.
22. Novakova D., Sedlaček I., Pantuček R., Štetina V., Švec P., Petraš P. *Staphylococcus equorum and Staphylococcus succinus isolated from human clinical specimens*. Journal of medical microbiology, 2006, Vol. 55, p. 523 – 528.
23. Ojumu T. V., Yu J., Solomon B. O. *Production of polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymer*. African journal of biotechnology, 2004, Vol. 3(1) pp. 18 – 24.
24. Orhan Y., Hrenivic J., Büyükgüngör H. *Biodegradation of plastic compost bags under controled soil conditions*. Acta chim. slov., 2004, vol. 51, p. 579 – 589.
25. Pečiulis J. *Mikrobiologijos praktikos vadovas*, Vilnius, 1994m.
26. Seneviratne G., Tennakoon N. S., Weerasekara M. L. M. A. W., Nandasena K. A. *Polyethylene biodegradation by a developed Penicilium – Bacillus biofilm*. Current science, 2006, Vol. 90, No. 1, p. 20 – 21.
27. Solano – Serena F., Marchal R., Casaregola S., Vasner Ch., Lebeault J. – M., Vandecasteele J. – P. *A Mycobacterium strain with extended capacities for degradation of gasoline hydrocarbons*. Applied and environmental microbiology, June 2000, p. 2392 – 2399.
28. Stuart B. *Polymer analysis*, 2003, psl. 4 – 11.
29. Šalomskienė J., Mačionienė I. *Mikrobiologinės kontrolės instrukcija pieno perdirbimo įmonėms*. Kauno technologijos universiteto maisto institutas Kaunas. 2004 m.
30. Žemaitis A. *Polimerų fizika ir chemija*. 2001. p. 478 – 503.