



Eksperiment

Undersøgelse af aktivitet af ektoenzym hos bakterie

For at kunne leve af komplekse stoffer som fx proteiner, stivelse eller cellulose, producerer visse bakterier enzymer som nedbryder disse højmolekylære stoffer til mindre molekyler, det vil sige til hhv. aminosyrer og glucose. Enzymerne kaldes ektoenzymer og sidder enten på bakteriernes overflade, eller diffunderer ud i det omgivende miljø. De mindre organiske molekyler kan bakterierne optage gennem cellemembranen.

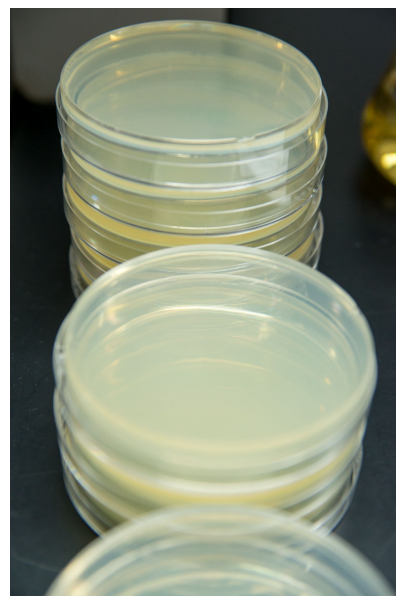
Det er muligt at undersøge hvilke ektoenzymer en bestemt bakterieart har. Fx kan der overføres bakterier til agarplader med vækstmedier med enten cellulose eller stivelse, og derefter undersøge om de er stand til at nedbryde enten det ene eller begge carbohydrater, se figur 1. Kan de nedbryde cellulose, udskiller de enzymet cellulase, mens de hvis de kan nedbryde stivelse, udskiller enzymet amylase.

Prøv med flere forskellige bakteriearter, f.eks. *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* og *Micrococcus luteus*. Alle disse bakterier kan købes via Københavns Universitet, Biologisk Institut, Afd. for Mikrobiologi. Link til bestillingsformular findes her:

[Mikroorganismer – Københavns Universitet \(ku.dk\)](https://www.ku.dk/biologi/mikrobiologi/forbrugere/mikroorganismer/)

Undersøgelsen kan evt. suppleres med læsning af artiklen Kulstof i havet – en tynd kop te:

https://aktuelnaturvidenskab.dk/fileadmin/Aktuel_Naturvidenskab/nr-5/AN5-2015havkulstof.pdf



Figur 1. Agarplader med vækstmedie.

Foto: SubstanceTproductions/Shutterstock.com

Formål

At undersøge amylase- og cellulaseaktivitet hos et antal bakteriearter.

Forarbejde

Undersøg de pågældende bakteriearters naturlige levesteder og brug denne viden til at opstille hypoteser om bakteriernes evne til at nedbryde stivelse og/eller cellulose.



Materialer til 10 grupper

- 40 sterile petriskåle
- 500 mL næringsmedium med cellulose og agar (0,5 % carboxymethylcellulose (opløselig cellulose), 0,1 % NaNO_3 , 0,1 % K_2HPO_4 , 0,1 % KCl , 0,05 % MgSO_4 , 0,05 % gærekstrakt, 0,1 % glucose, 1,7 % agar).
- 500 mL næringsmedium med stivelse og agar (som det andet medium på nær at cellulosen erstattes med en tilsvarende mængde opløselig stivelse).
- Sterilt vand
- Sterile reagensglas
- Sterile engangspipetter eller mikropipetter + sterile mikropipettespidser
- Kulturer af bakterier
- 5 mm propbor
- Ethanol
- Bunsenbrænder
- Congorød-opløsning (indikerer cellulose)
- 6 % NaCl -opløsning
- Jod-jodkalium-opløsning (indikerer stivelse)

Fremgangsmåde

1. Afvej ingredienserne til de to medier. Tilsæt derefter vand så vægt-volumenforholdet for ingredienserne passer. Autoklaver vækstmedierne.
2. Afkøl medierne til omkring 50 °C (håndlunken) inden de hver hældes op i 20 sterile petriskåle.
3. Flambér et propbor. Skær et hul i agaren i en petriskål og fjern agarproppen (evt. med en nål eller præparernål). Lav to huller i hver agarplade, husk at flambere propboret hver gang.
4. Opslæm 5-6 kolonier af hver bakteriekultur i 5 mL sterilt vand i et sterilt reagensglas. Overfør med steril pipette 0,2 mL sterilt vand til det ene hul på petriskålen og en tilsvarende mængde opslæmmet bakteriekultur til det andet hul. Hver gruppe laver fire agarplader således at hver bakteriekultur bliver podet på begge vækstmedier.
5. Inkubér pladerne i op til en uge.
6. Pladerne med cellulose dækkes med en congorødt-opløsning. Lad det stå i 15 min. Affarv derefter pladerne med saltopløsningen i 10-15 min. Områder hvor cellulosen er nedbrudt, vil være ufarvede.
7. Tilsvarende dækkes pladerne med stivelse med en jod-jodkalium-opløsning. Områder med stivelse vil farves blåsorte, mens områder hvor stivelsen er nedbrudt, vil være orange-gule.

Iagttagelser og resultater

Hvis der er en henholdsvis ufarvet eller orange-gul zone ved bakteriekulturerne, mål da diameteren af denne zone og notér den i et skema.



Diskussion

1. Udviser nogle af bakterierne enten cellulase- eller amylaseaktivitet?
2. Stemmer resultaterne overens med din hypotese?
3. Hvis ikke hvad kan forklaringen være på det?
4. Hvilke fejlkilder og usikkerheder kan der være ved fremgangsmåden?

Konklusion

Formulér en konklusion hvor der tages stilling til om eksperimentets formål er opfyldt.