

VETYPEROKSIDI JA KATALAASI

Työ muokattu Pauliina Lankisen, Antti Savinin ja Sari Timosen työohjeen pohjalta (Vetyperoksidin hajottaminen katalaasientsyymillä, Helsingin yliopisto).

TAUSTAA

Katalaasi yleinen vetyperoksidia (H_2O_2) hajottava entsyymi, jota löytyy muun muassa mikrobeilta ja eläimiltä. Vetyperoksidia muodostuu vähäisiä määriä hapellisten eliöiden aineenvaihdunnassa. Se on myrkyllistä soluille, sillä se pystyy hapettamaan monia soluille tärkeitä yhdisteitä. Soluissa katalaasin tehtävänä on hajottaa muodostunut vetyperoksidi hapeksi ja vedeksi. Ihmisillä katalaasientsyymiä on etenkin maksassa ja munuaisissa.

Katalaasiaktiivisuuden perusteella voidaan myös luokitella. Katalaasitestin perusteella bakteerit jaetaan katalaasiposiitiviksi tai katalaasinegatiiviseksi. Katalaasinegatiivisia ovat etenkin hapettomissa elinympäristöissä kasvavat bakteerit, joiden aineenvaihdunnassa ei muodostu vetyperoksidia. Hapellisissa oloissa kasvavat maitohappobakteerit ovat myös katalaasinegatiivisia, mutta niillä vetyperoksidin hajottaminen tapahtuu peroksidaasientsyymien avulla. Peroksidaasi käyttää vetyperoksidin happea substraattina muiden yhdisteiden hapettamiseen.

Työssä on tarkoitus tutkia mikrobien kykyä hajottaa vetyperoksidia katalaasientsyymien avulla. Työssä kasvatetaan mikrobeja kiinteillä ravintoalustoilla (esim agar-malja). Muodostuneista pesäkkeistä kerätään mikrobimassaa objektilasille. Pesäkkeen päälle tiputetaan muutama pisara 3 % vetyperoksidia. Katalaasiposiitivisten mikrobien kohdalla pesäkkeestä vapautuva happi saa vetyperoksidin kuohumaan. Katalaasinegatiivisten kohdalla ei havaita reaktiota.

POHDITTAVAKSI ENNEN TYÖTÄ

- Miksi vetyperoksidi hajoaa katalaasientsyymien vaikutuksesta?
- Ovatko ihollasi kasvavat bakteerit katalaasiposiitivisia vai katalaasinegatiivisia bakteereja?
- Mistä voisit löytää katalaasinegatiivisia bakteereja? Entä miten voisit kasvattaa niitä?
- Miksi hapettomissa ympäristöissä kasvavat bakteerit eivät tarvitse katalaasia?



TARVIKKEET

- 3 % vetyperoksidi (säilytettävä jääkaapissa)
- Agarmaljoja (valmistusohje liitteessä 1)
- Pasteur-pipettejä
- Puutikkuja
- (Pumpulipuikkoja)
- Objektilasi tai vastaava alusta johon siirrostaa mikrobimassaa

TYÖOHJE

1. Viljele agarmaljoilla esimerkiksi sormistasi tai muualta elimistöstäsi otettuja bakteereja. Voit pyyhkäistä agarmaljan pintaa sormella ja sulkea sen nopeasti. Voit myös yskiä maljalle tai ottaa pumpulipuikolla näytteen valitsemasi kohteesta.
2. Kasvata bakteereja agarmaljoilla +37°C:ssa vähintään 18 tuntia tai +25 °C vähintään 3 päivää.
3. Siirrosta puutikulla mikrobimassaa yhdestä bakteeripesäkkeestä objektilasille tai vastaavalle alustalle.
4. Tiputa pisara vetyperoksidia mikrobimassan päälle. Positiivinen reaktio huomataan vetyperoksidin kuohumisena.

POHDITTAVAKSI TYÖN JÄLKEEN

- Olivatko bakteerit katalaasiposiitivisia vai –negatiivisia? Toteutuiko hypoteesisi?
- Mistä kohteista löytyi katalaasiposiitivisia bakteereja? Entä katalaasinegatiivisia?
- Oliko katalaasiposiitivisten mikrobien kohdalla eroja vetyperoksidin kuohumisessa?

Liite 1. Agarmaljojen valmistus

Tarvikkeet:

- Petrimaljoja (halkaisija 9–10 cm)
- Agar-jauhetta
- Lihalientä / vettä
- Kattila
- Liesi / keittolevy (pieniin valmistuseriin myös mikro käy)

Valmistus:

Valmistusohje on yhdelle maljalle. Jos tarvitset esim. 10 maljaa, kerro valmistusohje 10:llä. Jos käytät lihaliemen sijasta vettä, maljoilla kasvaa vähemmän bakteereja ja kasvu on hitaampaa. Voit käyttää lihaliemen sijasta myös hiivauutetta.

- Sekoita 25 ml lihalientä tai vettä ja 0,4 g agarjauhetta.
- Kuumenna seosta, kunnes agarjauhe on liuennut. Sekoita jatkuvasti kuumennuksen aikana. (Jos teet kuumennuksen mikrossa, sekoita tasaisin väliajoin ja varo liemen kiehumista yli.)
- Jäähdytä seosta, mutta älä niin paljon, että se jähmettyy (noin 50 °C on sopiva).
- Kaada seos petrimaljoille noin 0,5 cm korkuinen kerros.
- Jäähdytä maljoja kansi päällä.
- Säilytä maljat jääkaapissa pohja (agar) ylöspäin.