

Izolace, purifikace a identifikace sulfát redukujících bakterií

Úvod:

Obsah sulfátů jsme stanovovali metodou turbidimetrickou, při které se ionty síranu *usazují* s chloridem barnatým za vzniku síranu barnatého, při čemž vzniká bílá barva. Jako stabilizátor se používá glycerol.

Postup:

Příprava precipitačního roztoku

- Do odměrné baňky o objemu 500 ml jsme navážili 20 g chloridu barnatého
- Přidali jsme 300 ml destilované vody a 60 ml kyseliny chlorovodíkové v koncentraci 1 mol/l
- Po rozpuštění chloridu barnatého jsme objem roztoku upravili po značku menisku a promíchali
- Výsledný roztok jsme smíchali s glycerolem v poměru 1:1

Příprava kalibračních roztoků síranu sodného

- Do odměrné baňky o objemu 1000 ml jsme navážili 14,2 g bezvodého síranu sodného a rozpustili v destilované vodě. Objem jsme následně doplnili po meniskus
- Poté jsme do 100 ml odměrné baňky napipetovali 8 různých objemů tohoto roztoku (1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10 a 12 ml) a doplnili destilovanou vodou po rysku
- Po smíchání s precipitačním roztokem jsme změřili absorbanci při vlnové délce 520 nm
- Podle rovnice vycházející z kalibrační křivky jsme spočítali koncentraci sulfátů

Stanovení koncentrace sirovodíku

- Do 5 ml vodného roztoku octanu zinečnatého jsme napipetovali 0,5 ml vzorku
- Následně jsme přidali 1 ml p-aminodimethylanilinu a nechali jsme směs stát 5 minut při pokojové teplotě
- Poté jsme přidali 0,25 ml roztoku chloridu železitého a opět nechali 5 minut při pokojové teplotě
- Směs jsme centrifugovali 5000 g při 23 °C
- Při vlnové délce 665 nm jsme stanovili absorbanci centrifugovaného supernatantu pro měření sulfidových iontů
- Kalibrační roztoky jsme připravili v naředěním destilovanou vodou do koncentrací 6,25; 12,5; 25; 50 a 100 μM sulfidu sodného

Výpočty:

Tabulka 1: Závislost absorbance na koncentraci síranu sodného

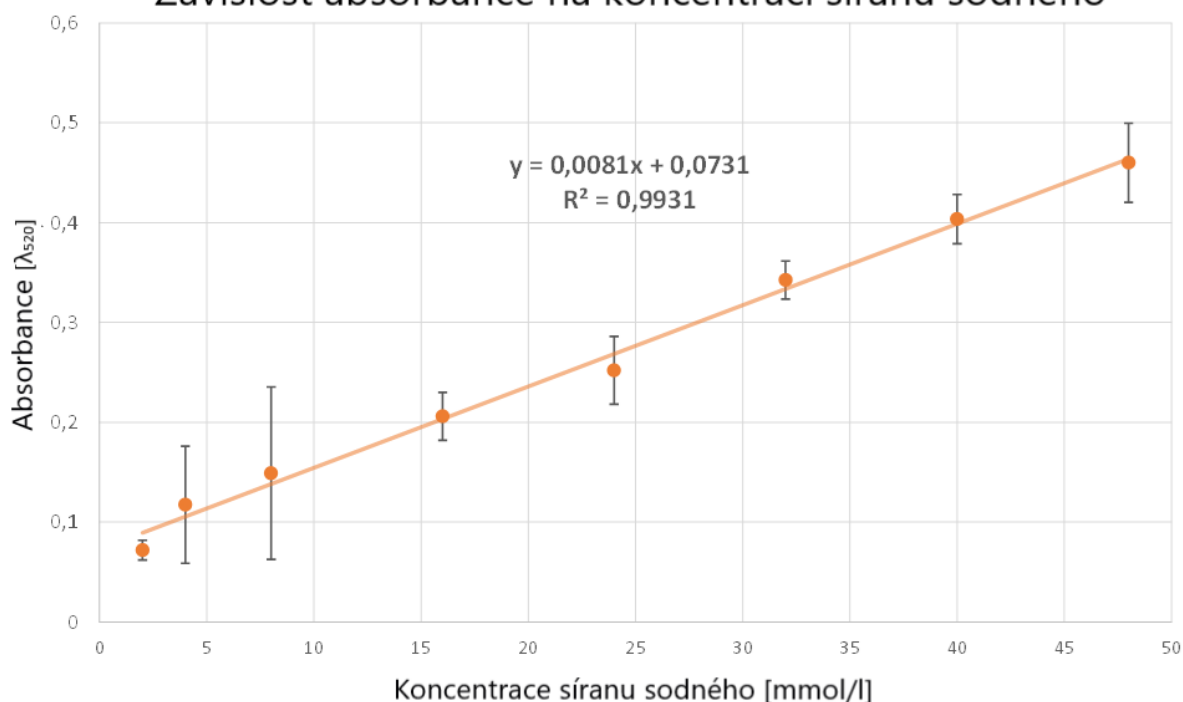
koncentrace síranu sodného [mmol/l]	E ₅₂₀ naše	E ₅₂₀ (skup. 2)	E ₅₂₀ průměr	SE
2	0,079	0,065	0,072	0,010
4	0,159	0,076	0,1175	0,059
8	0,21	0,088	0,149	0,086
16	0,223	0,189	0,206	0,024
24	0,276	0,228	0,252	0,034
32	0,329	0,356	0,3425	0,019
40	0,386	0,421	0,4035	0,025
48	0,432	0,488	0,46	0,040

Zákal (%)	Vs (mg)	V (mg)
90	13853,3	13841,3
80	14393,2	14381,3
70	13103,7	13092,0

<i>Bacillus subtilis</i>			
Zákal (%)	Hmotnost bakteriální sušiny (mg/ml) 1. skupina	Hmotnost bakteriální sušiny (mg/ml) 2. skupina	Hmotnost bakteriální sušiny (mg/ml) průměr
90	0,55	0,65	0,60
80	0,50	2,50	1,50
70	0,40	13,6	7,00

Graf 1: Závislost absorbance na koncentraci síranu sodného

Závislost absorbance na koncentraci síranu sodného



Na základě rovnice vycházející ze spojnice trendu kalibrační závislosti byla stanovena **praktická koncentrace SO_4^{2-}** v modifikovaném médiu před založením kultivace.

E_{520} média s SO_4^{2-}	přepočítaná koncentrace [mmol/l]
0,958	109,247

Teoretická koncentrace SO_4^{2-} v modifikovaném médiu před založením kultivace:

sloučenina	navážka [g]	v roztoku [l]	% molární zastoupení SO_4^{2-}	hmotnost SO_4^{2-} [g]
Na_2SO_4	3,0	1	68	2,029
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,2		73	0,145
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,1		39	0,039

Teoretická koncentrace byla přepočítána a vztažena na SO_4^{2-} . Rovná se **23,03 mmol/l**.

Zkumavka č.	Koncentrace albuminu ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbance (1. skupina)	Absorbance (2. skupina)	Absorbance (průměr)
1	0	0,000	0,000	0,000
2	200	0,188	0,151	0,1695
3	400	0,321	0,285	0,303
4	600	0,433	0,450	0,4415
5	800	0,585	0,495	0,540

6	1000	0,687	0,611	0,649
---	------	-------	-------	-------

Tabulka 2: Absorbance a koncentrace zredukovaných/nezredukovaných sulfátů v médiu různých vzorků po 7denní kultivaci

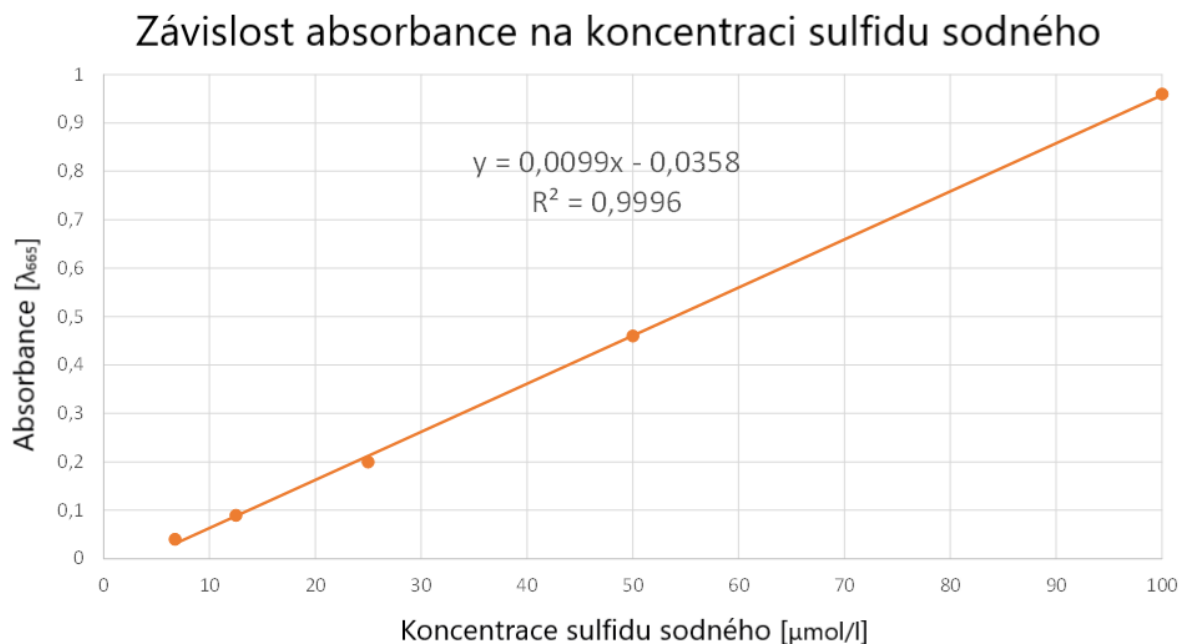
vzorek	E ₅₂₀	koncentrace nezredukovaného sulfátu [mmol/l]	koncentrace zredukovaného sulfátu [mmol/l]
TV1	0,552	59,123	50,123
TV2	0,776	86,778	22,469
TC3	0,652	71,469	37,778
644	0,705	78,012	31,235
TC4	0,747	83,198	26,049
S7	0,532	56,654	52,593
TC2	0,635	69,370	39,877
642	0,684	75,420	33,827

Tabulka 3: Závislost absorbance na koncentraci sulfidu sodného

Koncentrace sulfidu sodného [mmol/l]	OD ₆₆₅
6,75	0,04
12,5	0,09
25	0,2
50	0,46
100	0,96

<i>Bacillus subtilis</i>					
Zákal (%)	Absorbance 1. skupina	Absorbance 2. skupina	Koncentrace bílkovin (µg/ml) 1. skupina	Koncentrace bílkovin (µg/ml) 2. skupina	Koncentrace bílkovin (µg/ml) průměr
90	0,132	0,083	171,000	89,333	130,167
80	0,106	0,042	127,667	21,000	74,334
70	0,080	0,037	84,333	12,667	48,500

Graf 2: Závislost absorbance na koncentraci sulfidu sodného



Tabulka 4: Absorbance a koncentrace H₂S v médiu různých vzorků po 7 denní kultivaci

vzorek	E ₆₆₅	Koncentrace H ₂ S [μmol/l]	Koncentrace H ₂ S [mmol/l]
TV1	1,706	175,939	0,175939
TV2	0,42	46,040	0,04604
TC3	1,012	105,838	0,105838
644	0,05	8,667	0,008667
TC4	0,148	18,566	0,018566
S7	1,996	205,232	0,205232
TC2	0,208	24,626	0,024626
642	1,11	115,737	0,115737

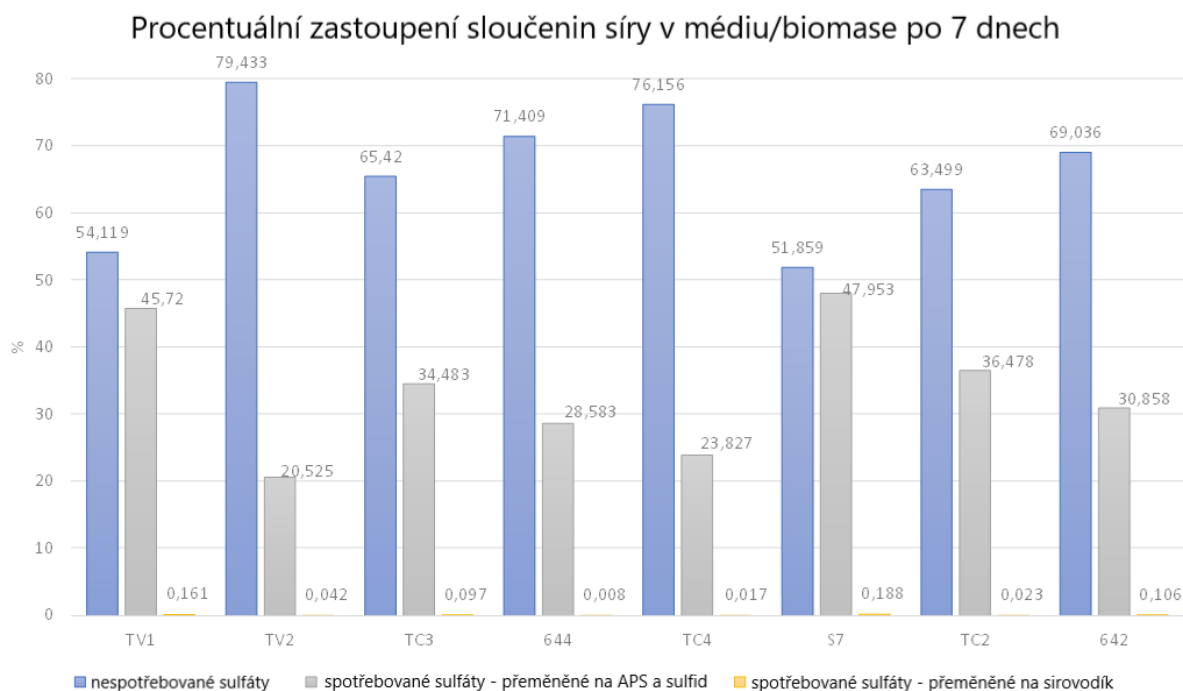
Tabulka 5: Procentuální zastoupení zredukovaného/nezredukovaného SO₄²⁻ v médiu v různých vzorcích po 7 denní kultivaci

	TV1	TV2	TC3	644	TC4	S7	TC2	642
nezredukované SO ₄ ²⁻ (%)	54,119	79,433	65,42	71,409	76,156	51,859	63,499	69,036
zredukované SO ₄ ²⁻ (%)	45,881	20,567	34,58	28,591	23,844	48,141	36,501	30,964

Tabulka 6: Procentuální zastoupení jednotlivých složek v médiu/biomase vzniklých zredukováním SO_4^{2-} (sulfit, sírovodík) různých vzorků po 7 dnech kultivace

		TV1	TV2	TC3	644	TC4	S7	TC2	642
zredukované SO_4^{2-} (%)	APS a SO_3^{2-}	45,72	20,53	34,48	28,58	23,83	47,95	36,48	30,86
	H_2S	0,16	0,04	0,10	0,01	0,02	0,19	0,023	0,11

Graf 3: Procentuální zastoupení jednotlivých složek v médiu/biomase vzniklých zredukováním SO_4^{2-} (sulfit, sírovodík) různých vzorků po 7 dnech kultivace



Závěr:

V tomto cvičení jsme se snažili o izolaci sulfát redukujících bakterií z různých vzorků z prostředí. Po týdenní kultivaci se kultivační médium zbarvilo do černa a byl z něj cítit zápach sírovodíku. Ve vzorcích, které nám byly ve cvičení přiděleny, bylo ověřeno, že sulfát redukující bakterie jsou schopny přeměnit disimilační cestou SO_4^{2-} na H_2S . Ve všech vzorcích došlo k úbytku sulfátu z média, největší úbytek byl zaznamenán u vzorků S7 a TV1. U vzorku S7 se zredukovalo 48,141 % SO_4^{2-} , u vzorku TV1 45,881 % SO_4^{2-} . U S7 se vyskytovalo 0,188 % ve formě konečného produktu disimilační redukce sulfátu – H_2S a 47,953 % ve formě meziproduktů – APS a SO_3^{2-} . Vzorek TV1 obsahoval 0,161 % H_2S a 45,72 % meziproduktů – APS a SO_3^{2-} . Pravděpodobně došlo k chybě při stanovení množství H_2S v médiu, jelikož zápach sírovodíku byl zřetelný. Praktická koncentrace SO_4^{2-} v médiu byla stanovena na 109,247 mmol/l, zatímco teoretická koncentrace v námi připraveném médiu byla 23,03 mmol/l.