

Verterende bodembacteriën?

-Aanwezigheid van amylase-producerende bacteriën in de bodem-

Inleiding

In de bodem leven bacteriën die het enzym amylase produceren. Amylase breekt zetmeelmoleculen (lange ketens van aan elkaar gekoppelde glucosemoleculen) af tot losse glucosemoleculen. In dit experiment gebruiken we grondmonsters om voedingsbodems met zetmeel te enten. Op deze voedingsbodems kunnen amylase producerende bacteriën zich voortplanten. Hierdoor neemt de hoeveelheid zetmeel af op de plaatsen waar de amylase producerende bacteriën zich bevinden. We gebruiken jood om zetmeelafbraak aan te tonen.

Doel

Het screenen van bodemmonsters op de aanwezigheid van amylase producerende bacteriën.

Theorie

Dode planten, dieren en micro-organismen blijven als organisch materiaal achter in de bodem. Dit organisch materiaal bestaat uit hoogmoleculaire stoffen, hetgeen betekent dat ze een hoge molecuulmassa hebben. Hierdoor bevatten ze veel energie en vormen een potentiële voedselbron voor andere organismen. Veel organismen kunnen de hoogmoleculaire stoffen echter niet direct opnemen. Hiervoor moeten ze eerst worden afgebroken tot laagmoleculaire stoffen. Ze worden als het ware verteerd tot kleinere moleculen die gemakkelijker opgenomen kunnen worden. Deze extracellulaire vertering wordt ook wel de *hydrolyse* van de moleculen genoemd.

Enzymen komen op verschillende manieren in de bodem terecht. Sommigen zijn betrokken bij de stofwisseling van bacteriën: zij komen vrij wanneer deze bacteriën sterven. Levende bodembacteriën kunnen ook enzymen uitscheiden om hun werk buiten de cel uit te voeren. Deze extra-cellulaire enzymen worden ook wel *exo-enzymen* genoemd. Normaalgesproken verliezen *exo-enzymen* hun werking vrij snel na uitscheiding doordat ze gedenatureerd of afgebroken worden door andere enzymen. Ze zijn dan niet meer in staat de hoogmoleculaire stoffen af te breken tot laagmoleculaire stoffen.

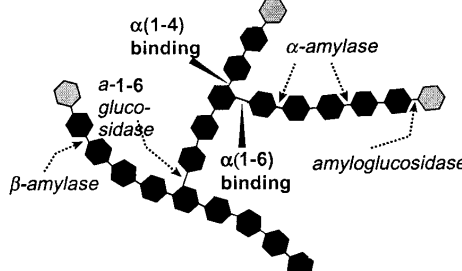
Amylase is een voorbeeld van een in de bodem voorkomend exo-enzym. Dit enzym breekt o.a. zetmeel af tot glucose. Glucose wordt gemakkelijk door bacteriën opgenomen als koolstof- en energiebron. In dit experiment testen we de amylase-productie van in de grond voorkomende organismen. Zetmeel bestaat uit een keten van aan elkaar gekoppelde glucosemoleculen. Een rechte zetmeelketen wordt amylose genoemd; een



Verterende bodembacteriën?

-Aanwezigheid van amylase-producerende bacteriën in de bodem-

vertakte polymeer amylopectine. Het exo-enzym amylase kan beide polymeren afbreken (Figuur 1). De structuurformules staan in tabel 67 van het Binas-tabellenboek.



The diagram shows a main chain of glucose units connected by $\alpha(1-4)$ glycosidic bonds. A side chain is attached to this main chain via $\alpha(1-6)$ glycosidic bonds. Various enzymes are shown with arrows indicating their specific binding and action sites: α -amylase acts on $\alpha(1-4)$ bonds within the main chain; β -amylase acts on $\alpha(1-4)$ bonds at the free ends of the chains; amyloglucosidase acts on $\alpha(1-4)$ bonds at the ends of the side chains; and $\alpha(1-6)$ glucosidase acts on the $\alpha(1-6)$ bonds connecting the side chains to the main chain.

Aangrijpingspunten enzymen

Amylose en amylopectine zijn aan elkaar gebonden door $\alpha(1-4)$ bindingen; de zijtakken in amylopectine zijn aan deze ketens gebonden door $\alpha(1-6)$ bindingen. De belangrijkste in de handel verkrijgbare amylases zijn:

α -amylase: hydrolyseert $\alpha(1-4)$ bindingen in polymeren van glucose binnen de ketens: dit leidt tot korte ketens (dextrinen). Op industriële schaal wordt het gewonnen uit bacteriën.

β -amylase: hydrolyseert $\alpha(1-4)$ bindingen in polymeren van glucose zodat aan het eind van een keten twee glucose moleculen (maltose) worden afgesplitst. Maltose kan $\alpha(1-6)$ bindingen niet passeren. In de industrie wordt het verkregen uit gerst en mout.

amyloglucosidase: breekt $\alpha(1-4)$ bindingen zodat glucose wordt afgesplitst aan de uiteinden van de ketens. Het kan $\alpha(1-6)$ bindingen niet passeren en wordt voornamelijk uit schimmels geïsoleerd.

$\alpha(1-6)$ glucosidase: hydrolyseert $\alpha(1-6)$ bindingen en wordt geproduceerd door verschillende soorten bacteriën.

Figuur 1: De afbraak van zetmeel door enzymen

Uitvoering

Dit experiment is een bewerking van het experiment 'Amylase uit bodembacteriën' van het Europees Initiatief voor Biotechnologische Educatie.

Materialen

- 1 gram luchtdroge grond, op 10 cm diepte verzameld
- steriele petrischalen met daarin 15 à 20 mL zetmeelvoedingsagar
- 15 mL steriel water in afgesloten flesje
- joodoplossing (in KI-oplossing)
- steriele wattenstaafjes
- markeerstift (om op petrischalen te schrijven)
- broedstov van 30 °C

Veiligheid

- Pas op met Joodoplossing! Het is een giftig mengsel, ook al wordt het veel gebruikt.



Verterende bodembacteriën?

-Aanwezigheid van amylase-producerende bacteriën in de bodem-

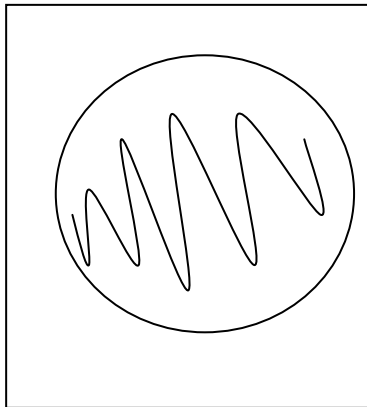
- Het is onverstandig cultures te kweken vanuit de (niet bekende) organismen op de platen.

Dit experiment dient altijd uitgevoerd te worden onder begeleiding van een docent of toa. Wageningen Universiteit aanvaardt geen enkele aansprakelijkheid voor schade die voortvloeit uit het verrichten van dit experiment buiten de campus van Wageningen Universiteit.

Beschrijving

Het bodemmonster

We gaan micro-organismen uit de bodem bekijken, dus hebben we grond nodig. Een theelepel is meer dan voldoende, want er leven heel veel micro-organismen in de grond. Om kwalitatief goede bacteriën te krijgen, kun je het beste eerst even beetje graven: 10 cm is voldoende.



Figuur 2: Een geënte petrischaal

De grond moet drogen om het overtollige vocht kwijt te raken. Zet de grond hiervoor een paar uur in de stoof (of exsiccator) of laat het een nacht in het lokaal staan. Weeg voor dit experiment 1 gram grond af.

Het suspenderen van het monster

Stop de afgewogen grond in de reageerbuis met 15 mL steriel, gedestilleerd water. Schud dit krachtig zodat de grond goed wordt gesuspenderd.

Het uitplaten

Schrijf met een marker duidelijk je naam op zowel het deksel als de bodem van de petrischaal. Vermeld ook de plaats waar het bodemmonster vandaan kwam. Neem een steriel wattenstaafje en doop deze in de zojuist gemaakte suspensie. Strijk met het vochtige wattenstaafje over de voedingsbodem. Maak hierbij een zigzagbeweging zoals aangegeven in Figuur 2. Open de petrischaal alleen in de buurt van een gasvlam.

Zet de petrischaal op zijn kop in de stoof gedurende 2 à 3 dagen bij 30 °C. De schaal moet omgedraaid zijn om te voorkomen dat eventuele condens de groeiende bacteriën laat uitvloeien.

Giet voorzichtig een klein beetje van de joodoplossing over de plaat zodat er ongeveer een laagje van 1 mm over de hele plaat vloeit. Wacht een minuut en giet dan het teveel aan joodoplossing af.

Opmerkingen

- Micro-organismen zijn overal: in de bodem, in de lucht en aan je handen. Bij dit experiment is het dus extra belangrijk om steriel te werken. Door verontreiniging zou



Verterende bodembacteriën?

-Aanwezigheid van amylase-producerende bacteriën in de bodem-

het kunnen lijken alsof er amylase in het onderzochte stukje bodem aanwezig is, terwijl dit niet het geval is.

- Er wordt met steriel water en een steriele petrischaal gewerkt. Het overplaatsen van de bacteriesuspensie naar een petrischaal moet dan ook op een steriele wijze gebeuren.

Resultaten

Beschrijf nauwkeurig wat je op de plaat ziet. Maak een tekening of een duidelijke foto.

Vragen

1. Hoe verklaar je de verschillende kleuren op de plaat?
2. Op welke plekken hebben de bacteriën de amylase afgebroken?
3. Waarom zien niet alle platen er hetzelfde uit?

Suggesties voor verder onderzoek

De module N°1: Inleiding Biotechnologie (1998) van het Europees Initiatief voor Biotechnologische Educatie bevat nog meer experimenten. Ze kunnen allemaal gebruikt worden in het kader van microbiologie en DNA technologie. De module staat op de website van het Europees Initiatief voor Biotechnologische Educatie:
<http://www.eibe.info/>.

Oriëntatie op vervolgonderwijs

Het thema van dit experiment komt aan de orde bij de volgende opleidingen van Wageningen Universiteit: Biologie, Levensmiddelentechnologie, Biotechnologie, Moleculaire Levenswetenschappen, Bodem Water en Atmosfeer en Milieukunde.

Kijk voor meer informatie op www.wageningenuniversiteit.nl.



Verterende bodembacteriën?

-Aanwezigheid van amylase-producerende bacteriën in de bodem-

