ԵՐԵՎԱՆԻ ՊԵՏԱԿԱՆ ՀԱՄԱԼՍԱՐԱՆ

ԿԱՐԵՆ ԹՌՉՈՒՆՅԱՆ, ՀԵՂԻՆԵ ԳԵՎՈՐԳՅԱՆ,
ԼՈՒՍԻՆԵ ԿԱՐԱՊԵՏՅԱՆ

ՄԱՆՐԷՆԵՐԻ ԿԵՆՍԱՔԻՄԻԱ ԵՎ ԿԵՆՍԱՏԵԽՆՈԼՈԳԻԱ. ԼԱԲՈՐԱՏՈՐ ԱՇԽԱՏԱՆՔՆԵՐ

(ՈՒՍՈՒՄՆԱՄԵԹՈԴԱԿԱՆ ՁԵՌՆԱՐԿ)

ԵՐԵՎԱՆ
ԵՊՀ ՀՐԱՏԱՐԱԿՉՈՒԹՅՈՒՆ
2021

ՀՏԴ 579(07)
ԳՄԴ 28.4գ7
Թ 867

Հրատարակության է երաշխավորվել Երևանի պետական համալսարանի կենսաբանության ֆակուլտետի գիտական խորհրդի կողմից:

Խմբագիր՝ ՀՀ ԳԱԱ թղթակից անդամ, ՀՀ գիտության վաստակավոր գործիչ, կենսաբանական գիտությունների դոկտոր, պրոֆեսոր Արմեն Թոչունյան

Գրախոսներ՝ Կենսաբանական գիտությունների դոկտոր, պրոֆեսոր Աստղիկ Փեփոյան
Կենսաբանական գիտությունների թեկնածու, դոցենտ Աննա Փոլադյան

Թոչունյան Կ., Գևորգյան Հ., Կարապետյան Լ.
Թ 867 Մանրէների կենսաքիմիա և կենսատեխնոլոգիա. լաբորատոր աշխատանքներ / Կ. Թոչունյան, Հ. Գևորգյան, Լ. Կարապետյան: Եր., ԵՊՀ հրատ., 2021, 130 էջ:

Մանրէների կենսաքիմիայի և կենսատեխնոլոգիայի լաբորատոր աշխատանքների ուսումնամեթոդական ձեռնարկը հիմնականում ընդգրկում է մանրէներում տարբեր ֆերմենտների ակտիվության, ինչպես նաև խմորման ընթացքում տարբեր ելանյութերի ու համապատասխանաբար ածխածնի հավասարակշռության որոշման վերաբերյալ տեղեկատվություն:

Ձեռնարկում ներկայացված են լաբորատորիայում կենսաանվտանգության կանոնները, լաբորատոր սարքերով աշխատելու սկզբունքները, ֆակուլտատիվ անաերոբ և խիստ անաերոբ մանրէների աճման ֆիզիկաքիմիական պարամետրերի որոշումը, տարբեր նյութերի (շաքարներ, սպիրտներ, օրգանական թթուներ և գազեր) որոշումը քրոմատագրական մեթոդներով, սպիտակուցների ժել էլեկտրաֆորեզը, օրգանական թափոնների նախամշակման և մանրէների միջոցով նպատակային նյութերի ստացման եղանակները:

Ձեռնարկը նախատեսված է բուհերի՝ կենսաբանական և հարակից մասնագիտություններով մասնագիտացող ուսանողների, մագիստրանտների և ասպիրանտների համար:

ՀՏԴ 579(07)
ԳՄԴ 28.4գ7

ISBN 978-5-8084-2484-5
DOI: https://doi.org/10.46991/YSUPH/9785808424845

© ԵՊՀ հրատ., 2021
© Հեղ. խումբ, 2021

ՀԱՊԱՎՈՒՄՆԵՐ

ԿԱՄ	–	Կենսաանվտանգության մակարդակ
ՀՎԿԿ	–	Հիվանդությունների վերահսկման և կանխարգելման կենտրոն (CDC, Center of Disease Control and Prevention)
ԱԱԻ	–	Առողջապահության ազգային ինստիտուտ (NIH, National Institute of Health)
ՊՄԼ	–	Պիրոխաղողաթթումրջնաթթուլիազ
ՄՋԼ	–	Մրջնաթթուջրածինլիազ
ՖԷՊ	–	Ֆոսֆոէնոլպիրոխաղողաթթու
ՆԱԴ+/ՆԱԴՀ	–	Նիկոդինամիդադենինդինուկլեոտիդ
ՄԴՀ-Հ/FdhF	–	Մրջնաթթուդեհիդրոգենազ-Հ
ԱԵՖ	–	Ադենոզին-5՛-եռֆոսֆատ
ԱԿՖ	–	Ադենոզին-5՛-կրկնաֆոսֆատ
ՄՆԱ	–	Մասնիկների նստեցման արագություն(RPM, Revolutions per minute)
ՑՀՈՒ	–	Ցենտրիֆուգային հարաբերական ուժ (RCF, Relative centrifugal force)
ՕՎՊ	–	Օքսիդավերականգնողական պոտենցիալ
ԴՆԹ	–	Դեզօքսիռիբոնուկլեինաթթու
ՌՆԹ	–	Ռիբոնուկլեինաթթու
ՕԽ	–	Օպտիկական խտություն
ԲԿՀՔ	–	Բարձր կատարողականության հեղուկային քրոմա-տագրաֆիա (HPLC, High Performance Liquid Chromatography)
ԳՔ	–	Գազային քրոմատագրաֆիա (GC, Gas Chromatography)
ԱՓՈՒ	–	Ածխածնի փոխակերպման ունակություն (CCE, Carbon Conversion Effiency)
ՕԳԳ	–	Օգտակար գործողության գործակից

ՆՇԱՆԱԿՈՒՄՆԵՐ ԵՎ ԱՆՎԱՆՈՒՄՆԵՐ

Trk	–	Կալիումական իոնների տեղափոխիչ համակարգ
FhlA	–	ՄՋԼ համալիրի տրանսկրիպցիոն խթանիչ
FocAB	–	Թաղանթով մրջնաթթվի տեղափոխիչներ
pK_a	–	Թթուների դիսոցման հաստատունի (K_a) բացասական լոգարիթմական հիմք. որքան փոքր է արժեքը, այնքան ուժեղ է թթուն:
K_m	–	Սուբստրատի խտությունը, որի ֆերմենտային ռեակցիայի արագությունը $V_{առավ}/2$է:
ddH_2O	–	Կրկնակի թորած ջուր
pH	–	Լուծույթում ջրածնի իոնների ակտիվության բացասական լոգարիթմ. որքան ցածր է pH-ը, այնքան լուծույթը թթվային է:
GlpF	–	Ակվագլիցերապորին

ԲՈՎԱՆԴԱԿՈՒԹՅՈՒՆ

ՆԵՐԱԾՈՒԹՅՈՒՆ
ԾԱՆՈԹՈՒԹՅՈՒՆ ԼԱԲՈՐԱՏՈՐ ԱՇԽԱՏԱՆՔՆԵՐԻ ԿԱՆՈՆՆԵՐԻՆ ԵՎ ՏԵԽՆԻԿԱՅԻՆ 9
Լաբորատորիայում կենսաանվտանգության հիմնական կանոնները և նորմերը 9
Ախտահանում (մանրէազերծում) 16
Լաբորատոր հիմնական սարքեր 17
Ջրի մաքրման համակարգ 17
Շոգեախտահանիչ (ավտոկլավ) 19
Լաբորատոր չորանոց (չորացման վառարան) և չորացման դարակ 20
Ջերմակարգավորվող խցիկ (թերմոստատ) 21
Կշեռքներ 21
Մանրադիտակներ 21
Ցենտրիֆուգներ 24
Էլեկտրոդներ և իոնաչափիչ սարքեր 25
Կենսառեակտոր 28
Լամինար և կենսաանվտանգության պահարաններ 29
Անթթվածնային խցիկ 30
Սառնարաններ 30
Լաբորատոր ապակե և պլաստմասե տարաներ 32
Կաթոցիչներ (պիպետներ) 33
Օգտագործված գրականություն 35

ԱՇԽԱՏԱՆՔ 1. ԲԱԿՏԵՐԻԱՆԵՐԻ ԱՃԵՑՈՒՄԸ ԵՎ ՊԱՀՊԱՆՈՒՄԸ 36
Բակտերիաների աճը. աճման գործոններ 36
Բակտերիաների աճման փուլերը 38
Բակտերիաների պահպանումը 43
Լաբորատոր առաջադրանք 1. Ֆակուլտատիվ անաերոբ աղիքային ցուպիկի (*Escherichia coli*) աճեցում 43
Լաբորատոր առաջադրանք 2. Խիստ անաերոբ պայմաններում կլոստրիդիաների աճեցում 45
Լաբորատոր առաջադրանք 3. E. coli-ի աճման տեսակարար արագության որոշում 48
Օգտագործված գրականություն 49

ԱՇԽԱՏԱՆՔ 2. ԲԱԿՏԵՐԻԱՆԵՐԻ ԿՈՂՄԻՑ ՍՆՆԴԱՆՅՈՒԹԵՐԻ ՅՈՒՐԱՑՈՒՄԸ 50
Սննդանյութերի յուրացումը *Escherichia coli* բակտերիայի կողմից 51
Գլյուկոզի յուրացումը 51
Գլիցերոլի յուրացումը 53
Լակտոզի յուրացումը 53
Լաբորատոր առաջադրանք 1. E. coli բակտերիաների աճման ընթացքում ելանյութերի և խմորման հետևանքով առաջացող վերջնանյութերի որակական և քանակական որոշումը ԲԿՀՔ մեթոդով 54
Լաբորատոր առաջադրանք 2. Խմորման հավասարակշռության որոշում 60
Լաբորատոր առաջադրանք 3. Ածխածնի փոխակերպման ունակության որոշում 60
Լաբորատոր առաջադրանք 4. Խմորման ընթացքում ելանյութի յուրացման և վերջնանյութի առաջացման արագության որոշում 60
Լաբորատոր առաջադրանք 5. Խմորման վերջնանյութի ելքի որոշում 61
Օգտագործված գրականություն 64

ԱՇԽԱՏԱՆՔ 3. ԽՄՈՐՄԱՆԸ ՄԱՄՆԱԿՑՈՂ ՖԵՐՄԵՆՏՆԵՐԻ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅՈՒՆԸ 65
Լաբորատոր առաջադրանք 1. Հեքսակինազի ակտիվության որոշում 65
Լաբորատոր առաջադրանք 2. Ֆրուկտոզերկֆոսֆատալդոլազի (ալդոլազ) ակտիվության որոշում 67
Լաբորատոր առաջադրանք 3. Գլիցերալդեհիդ-3-ֆոսֆատդեհիդրոգենազի ակտիվության որոշում 69
Լաբորատոր առաջադրանք 4. Պիրոխաղողաթթուկինազի ակտիվության որոշում 72
Լաբորատոր առաջադրանք 5. Ֆոսֆոէնոլպիրոխաղողաթթուկարբոքսիլազի ակտիվության որոշում 74
Լաբորատոր առաջադրանք 6. Կաթնաթթուդեհիդրոգենազի ակտիվության որոշում 76
Լաբորատոր առաջադրանք 7. Ալկոհոլդեհիդրոգենազի ակտիվության որոշում 78
Լաբորատոր առաջադրանք 8. Քացախաթթուկինազի ակտիվության որոշում ... 80
Լաբորատոր առաջադրանք 9. Գլիցերոլկինազի ակտիվության որոշում 82
Լաբորատոր առաջադրանք 10. Բետա-գալակտոզիդազի ակտիվության որոշում 85
Օգտագործված գրականություն 87

ԱՇԽԱՏԱՆՔ 4. ՄՐՋՆԱԹՈՒՋՐԱԾԻՆԼԻԱԶ ՀԱՄԱԼԻՐ 88
E. coli-ի հիդրոգենազները 88
Լաբորատոր առաջադրանք 1. Մրջնաթթուդեհիդրոգենազի ակտիվության որոշում 94
Լաբորատոր առաջադրանք 2. Հիդրոգենազի ակտիվության որոշումը *in vitro* պայմաններում 97
Լաբորատոր առաջադրանք 3. Հիդրոգենազի ակտիվության որոշումը մեթիլեն կապույտով 100
Օգտագործված գրականություն 102

ԱՇԽԱՏԱՆՔ 5. ԲՆԱԿԱՆ ԺԵԼ ԷԼԵԿՏՐԱՖՈՐԵԶ: ՊՈԼԻԱԿՐԻԼԱՄԻԴԱՅԻՆ ԺԵԼ ԷԼԵԿՏՐԱՖՈՐԵԶ 103
Լաբորատոր առաջադրանք. Հիդրոգենազի ակտիվության որոշումը նատիվ ժելում 104
Օգտագործված գրականություն 108

ԱՇԽԱՏԱՆՔ 6. ՄՈԼԵԿՈՒԼԱՅԻՆ ՋՐԱԾՆԻ ԱՐՏԱԴՐՈՒԹՅՈՒՆԸ ՄԱՆՐԷՆԵՐՈՒՄ 109
Լաբորատոր առաջադրանք 1. Մոլեկուլային ջրածնի ելքի որոշումը էլեկտրաքիմիական եղանակով 109
Լաբորատոր առաջադրանք 2. Մոլեկուլային ջրածնի ելքի որոշումը ծավալային եղանակով 111
Լաբորատոր առաջադրանք 3. Մոլեկուլային ջրածնի ելքի որոշումը գազային քրոմատագրաֆիայի մեթոդով 112
Օգտագործված գրականություն 114

ԱՇԽԱՏԱՆՔ 7. ՆՅՈՒԹԱՓՈԽԱՆԱԿՈՒԹՅՈՒՆԸ ԽԻՍ ԱՆԱԵՐՈԲ ՊԱՅՄԱՆՆԵՐՈՒՄ 115
Նյութերի յուրացումը *Clostridium* ցեղի բակտերիաների կողմից 115
Բութանաթթվի առաջացումը 115
Կաթնաթթվի առաջացումը 117
Գլիցերոլի խմորումը 118
Ոչ բութանաթթվային խմորումը 118
Ացետոն-բութանոլ-էթանոլ (ԱԲԷ) խմորման ուղին 118
Լաբորատոր առաջադրանք 1. Բութանոլի որոշումը ԲԿՀՔ մեթոդով 119
Լաբորատոր առաջադրանք 2. Բութանոլի որոշումը ԳՔ մեթոդով 119
Օգտագործված գրականություն 120

ԱՇԽԱՏԱՆՔ 8. ՕՐԳԱՆԱԿԱՆ ԹԱՓՈՆՆԵՐԻ ՆԱԽԱՄՇԱԿՈՒՄԸ ԵՎ ԿԻՐԱՌՈՒՄԸ ԿԵՆՍԱԶԱՆԳՎԱԾԻ ԵՎ ԿԵՆՍԱԷՆԵՐԳԻԱՅԻ ՍՏԱՑՄԱՆ ՀԱՄԱՐ....121
Թափոնների վերամշակումը լաբորատոր պայմաններում....121
Լաբորատոր առաջադրանք 1. Սուրճի թափոնի վերամշակումը և դրանում *E. coli*-ի աճեցումը....123
Լաբորատոր առաջադրանք 2. Գարեջրի արտադրական թափոնի վերամշակումը և *E. coli*-ի միջոցով H_2-ի արտադրությունը....124
Լաբորատոր առաջադրանք 3. Թափոններում պարունակվող ածխաջրերի ընդհանուր քանակության որոշումը գունաչափական եղանակով....125
Օգտագործված գրականություն....126

Հավելված. Սպիտակուցների քանակաչափական որոշման եղանակներ....127

Լաբորատորիայում կենսաանվտանգության հիմնական կանոնները և նորմերը

Գոյություն ունեն ուսումնական, գիտահետազոտական, ախտորոշիչ և արտադրական մանրէաբանական լաբորատորիաներ: Բոլոր լաբորատորիաները պետք է ունենան օդափոխման համակարգ և բավարար լուսավորվածություն (> 110 լյուքս), ապահովված լինեն մշտական տաք և սառը ջրով, համապատասխան կահավորանքով, համալրված լինեն համապատասխան սարքավորումներով և նյութերով, հատակը և պատերը (հատակից 5 սմ բարձրությամբ)պետք է սալիկապատված լինեն: Լաբորատորիայում, բացի հիմնական աշխատանքային տարածքից, պետք է լինեն հատուկ առանձնացված տիրույթներ՝ ինչպես մանրէների պահպանման համար նախատեսված սառնարանների, այնպես էլ մանրէազերծման համար, որտեղ տեղակայվում են ավտոկլավները:

Ըստ կենսաանվտանգության մակարդակների (ԿԱՄ)՝ առանձնացվում են 4 կարգի լաբորատորիաներ: ԱՄՆ Հիվանդությունների վերահսկման և կանխարգելման կենտրոնը (ՀՎԿԿ) և Առողջապահության ազգային ինստիտուտը (ԱԱԻ) միասին մշակել են ստանդարտներ՝ ապահովելու լաբորատորիայում անվտանգությունը 4 մակարդակով: Այդ մակարդակները ստեղծվել են համապատասխան լաբորատորիայում պահվող ու ուսումնասիրվող մանրէների հետ կատարվող աշխատանքների անվտանգության և պոտենցիալ վտանգավոր գործոնների ազդեցության չեզոքացման համար:

ԿԱՄ-1-ը համապատասխանում է լաբորատոր այն աշխատանքներին, որոնք ներառում են լավ բնութագրված կենդանի օրգանիզմների հետ կատարվող գործընթացներ, որոնք չեն առաջացնում որևէ վտանգ մարդու

և շրջակա միջավայրի համար: ԿԱՄ-1-ը չի պահանջում լաբորատոր հատուկ կահավորանք և պայմաններ: Աշխատանքը ոչ ախտածին մանրէների հետ կարող է կատարվել բաց մակերևույթի վրա, օրինակ՝ *Bacillus subtilis-ի, Naegleria gruberi-ի, Escherichia coli-ի* և այլն:

ԿԱՄ-2-ում օգտագործվող մանրէները հիմնականում չեն տարածվում օդակաթիլային ճանապարհով, սակայն անհրաժեշտ է խուսափել աերոզոլների կամ ցայտքումների առաջացումից: Աղտոտվող հիմնական սարքավորումները, ինչպիսիք են, օրինակ, կենսաանվտանգության խցիկը և ցենտրիֆուգի ռոտորը, պետք է աշխատեցնել անհատական պաշտպանիչ համապատասխան հարմարանքներով (ձեռնոց, լաբորատոր խալաթ, պաշտպանիչ ակնոց և այլն): Իսկ միջավայրի աղտոտումը հասցվում է նվազագույնի՝ օգտագործելով լվացարաններ և ավտոկլավներ: ԿԱՄ-2 մակարդակում կիրառվող օբյեկտներն են՝ *Bacillus anthracis, Bordetella pertussis, Brucella spp., Cryptococcus neoformans, Clostridium botulinum, Clostridium tetani, Helicobacter pylori, Salmonella spp., Yersinia pestis, Mycobacterium leprae, Shigella spp.* և այլն:

ԿԱՄ-3-ում լաբորատոր անձնակազմը մասնագիտացված է աշխատելու ախտածին (պաթոգեն) ու մահացու օբյեկտների հետ և ղեկավարվում է այնպիսի գիտնականների կողմից, ովքեր ավելի փորձառու են նմանատիպ օբյեկտների հետ աշխատանքում: Այս գործոնները կարող են տարածվել օդակաթիլային ճանապարհով՝ առաջացնելով կյանքի համար վտանգ ներկայացնող հիվանդություններ: ԿԱՄ-3-ն առանձնանում է առաջնային և երկրորդային լրացուցիչ պատնեշներով՝ ռիսկերի նվազեցման համար, օրինակ՝ շնչառական ուղու պաշտպանություն, օդի ֆիլտրում, դեպի լաբորատորիա խստորեն կարգավորվող կրկնակի մուտք և այլն: ԿԱՄ-3 մակարդակում աշխատանքներ են տարվում այնպիսի մանրէների հետ, ինչպիսիք են՝ *Mycobacterium tuberculosis, Salmonella typhi, Vesicular Stomatitis վիրուս, դեղին տենդի վիրուս, Francisella tularensis, Coxiella burnetti* և այլն:

ԿԱՄ-4-ն առավելագույնս վարակման վտանգ և ռիսկեր պարունակող մակարդակն է: Այս մակարդակում աշխատում են ծաղկի (*Smallpox), էբոլայի, տենդի (Hemorrhagic fever) և այլ* վիրուսների հետ, որոնք տա-

բածվում են օդակաթիլային ճանապարհով, կարող են համաճարակների պատճառ դառնալ, և հիմնականում հայտնի չեն դրանց բուժման կամ դրանց դեմ պատվաստման եղանակները: ԿԱՄ-4-ում լաբորատորիան մեկուսացվում է, ունենում է գործառութային և, ըստ անհրաժեշտության, նաև կառուցվածքային ինքնուրույնություն: Լաբորատորիայում անձնակազմը կրում է հատուկ պաշտպանիչ հագուստ, իրականացվում է միջավայրի, օդի և առաջացած վերջնանյութերի մանրէազերծում:

Երևանի պետական համալսարանում գործող Մանրէաբանական կենսատեխնոլոգիաների և կենսավառելիքի նորարարական կենտրոնում գործում են կենսաանվտանգության հետևյալ նորմերը.

1. լաբորատորիա մտնելիս և դուրս գալիս ձեռքերը լվանալ օճառով կամ ախտահանել համապատասխան ախտահանիչով,
2. չուտել, չխմել, չծխել և ոչինչ չծամել լաբորատորիայում, ինչպես նաև բերանին չմոտեցնել գրիչ, մատիտ կամ որևէ այլ առարկա, բակտերիաների պահպանման համար նախատեսված սառնարաններում սնունդ չպահել,
3. աշխատանքի ընթացքում կրել լաբորատոր խալաթ, որը ծածկում է ձեռքերը մինչև դաստակներ, ձեռնոց, դնել պաշտպանիչ ակնոց, ականջները պաշտպանող միջոց, դիմակ, հավաքել մազերը մազակալով,
4. հագնել ոտնաթաթն ամբողջությամբ ծածկող կոշիկներ,
5. աշխատասեղանը պահել մաքուր և ազատ այլ կողմնակի իրերից (պայուսակ, դրամապանակ, վերնահագուստ և այլն),
6. աշխատանքային տիրույթներն աշխատանքից առաջ և հետո ախտահանել էթանոլի 70 %-անոց լուծույթով,
7. աշխատանքային տարաների, դարակների և առհասարակ ամեն ինչի վրա նշումներ անել կարճ, պարզ և հստակ,
8. մանրէաբանական ասեղի, ներարկիչների և այլ առարկաների մանրէազերծման համար օգտագործել սպիրտայրոց կամ բունսենի այրիչ՝ գազայրոց,
9. թթուների հետ աշխատելիս կրել ձեռնոց և դնել դիմակ, լինել զգույշ և պահպանել թթուն ջրին ավելացնելու կանոնը,

10. բոլոր մանրէներին վերաբերվել ինչպես պոտենցիալ ախտածիններին, դուրս չհանել լաբորատորիայի տարածքից և աշխատել խնամքով,

11. մանրէազերծել օգտագործվող տարածքը, սարքավորումները և նյութերը,

12. օգտագործել ավտոմատ կաթոցիչներ (պիպետներ), սակայն մեծ խտություն ունեցող թթուների հետ աշխատելու դեպքում կարելի է օգտագործել նաև ապակե կաթոցիչ և ռետինե տանձիկ,

13. հնացած կուլտուրաները, աղտոտված Պետրիի թասիկները, թափոնները ավտոկլավել, այնուհետև թափել,

14. ցանկացած պատահարի, միջադեպի մասին անմիջապես հաղորդել անմիջական ղեկավարին կամ որևէ այլ աշխատակցի:

Լաբորատորիայում աշխատող անձնակազմը և ուսանողները պետք է իրազեկ լինեն լաբորատորիայում օգտագործվող սարքավորումների աշխատանքի մեխանիզմներին, պահպանեն անվտանգության նորմերն ու կանոնները, ինչպես նաև կատարվող աշխատանքն ու հագուստն իրար համապատասխանեցնեն ըստ նշանների (*Նկ. 1*):

Ընդհանուր զգուշացում

Կենսաբանական վտանգ

Դյուրավառ նյութերի վտանգ

Պայթուցիկ նյութերի վտանգ

Հոսանքահարման վտանգ

Բարձրավոլտ հոսանքի վտանգ

Թունավոր նյութերի վտանգ

Իոնիզացվող ճառագայթման վտանգ

Ոչ իոնիզացվող ճառագայթման վտանգ

Ցածրջերմաստիճանային վտանգ

Տաք մակերեսների առկայության վտանգ

Ուլտրամանուշակագույն ճառագայթման վտանգ

Օքսիդացվող նյութերի վտանգ

Կորոզիա առաջացնող նյութերի վտանգ

Ապակեղենի կոտրման վտանգ

Քաղցկեղածին վտանգ

Նկ. 1. *Լաբորատոր անվտանգության նշաններ*

Հարկ է նշել, որ լաբորատորիայում օգտագործվող նյութերն ունեն կարևոր նշանակություն, և դրանց հետ աշխատող յուրաքանչյուր ոք պետք է տեղյակ լինի աշխատանքի կանոններին, դրանց պահպանմանն ու ներկայացրած վտանգին: Պահպանման ընթացքում նյութերը կարող են փոխազդել միմյանց հետ՝ հարուցելով կենսաբանական կամ քիմիական վտանգ, ինչից խուսափելու համար անհրաժեշտ է նույն խմբի նյութերը

պահել միասին, թթուները, հիմքերը կամ այլ հեղուկներ միմյանցից առանձնացնել և պահել տարբեր տարաներում՝ արտահոսքի հետևանքներից խուսափելու համար: Բացի այս՝ պետք է բոլոր նյութերի տարաների վրա նախապես նշումներ անել քառանկյան նշանի և թվերի տեսքով (*Նկ. 2*):

Կապույտ գունավորում – առողջության վտանգ
Կարմիր գունավորում – դյուրավառության վտանգ
Դեղին գունավորում – փոխազդման վտանգ
Սպիտակ գունավորու – այլ վտանգներ
0-4 միավոր, որտեղ **0** – վտանգ չկա, **4** – կա մեծ վտանգ

Նկ. 2. *Լաբորատոր նյութերի նույնականացման համակարգ*

Ըստ լաբորատորիայում օգտագործման, պահպանման նշանակության և իրենց բնույթի՝ առանձնացվում են նյութերի հետևյալ խմբերը՝ թթուներ, հիմքեր, այրվողներ, ինքնաբռնկվողներ, օքսիդացողներ, թունավոր նյութեր, պերօքսիդներ առաջացնող միացություններ, ջրի հետ փոխազդող և պայթյունավտանգ նյութեր: Այս նյութերից յուրաքանչյուրն ունի պահպանման ու օգտագործման յուրահատուկ կանոններ և տարբերակվում է՝ ըստ ստորև բերված նշանների (*Նկ. 3*):

Շնչառական ուղիներն ախտահարող, քաղցկեղածին նյութ

Ճնշման տակ գտնվող գազային նյութ

Օքսիդացող, ցնդող նյութ

Այրվող, ինքնաբռնկվող նյութ

Կոռոզիա առաջացնող նյութ

Ջրային թունավորում առաջացնող նյութ

Աչքերի, մաշկի, շնչուղիների և այլ օրգանների այտուց առաջացնող նյութ

Ինքնաբռնկվող, պայթյունավտանգ նյութ

Սուր թունավորում առաջացնող, մահացու վտանգավոր նյութ

Նկ. 3. *Լաբորատոր նյութերի տարբերակիչ նշաններ*

Գազի բալոններ օգտագործելիս ևս պետք է պահպանել անվտանգության կանոնները: Դրանք պետք է պահել ապահով վայրում՝ հեռու արևի անմիջական ճառագայթներից, շրջակայքում չօգտագործել կրակ կամ կայծ, ջերմաստիճանը տարածքումչպետք է բարձր լինի 50^{0}C-ից: Բալոն-

ները պետք է օգտագործել զգուշորեն, չթեքել և չգցել հատակին: Հարկ է նշել, որ յուրաքանչյուր սարք օգտագործելուց հետո անհրաժեշտ է գրանցում անել մատյանում կամ նոթատետրում:

Լաբորատորիայում փորձ իրականացնողն իր կատարած աշխատանքը, մեթոդը և ստացված արդյունքները պետք է գրանցի աշխատատետրում: Գրանցումները պետք է լինեն հստակ, ճիշտ և ներկայացնեն ամբողջ աշխատանքի պատկերը, իսկ ստացված արդյունքները պետք է ներկայացվեն աղյուսակների, գծապատկերների, նկարների տեսքով՝ հետագա քննարկումներն ու եզրահանգումներն ավելի մատչելի և ճշգրիտ դարձնելու համար:

Ախտահանում (մանրէազերծում)

Մանրէաբանական լաբորատորիայում անհրաժեշտ է պարբերաբար կատարել օդի, սարքավորումների, նյութերի և սննդամիջավայրերի, լաբորատոր սպասքի, կահույքի մակերևույթի ախտահանում մանրէազերծող նյութերով, ինչպիսիք են էթանոլի 70 %-անոց, սոդայի 2-3 %-անոց, ֆենոլի 3-5 %-անոց լուծույթները: Օդի մանրէազերծման համար օգտագործվում են ուլտրամանուշակագույն ճառագայթներ արձակող լամպեր, որոնց ազդեցությունը պետք է լինի երկարատև: Ուլտրամանուշակագույն ճառագայթներն ունակ են ոչնչացնելու ոչ միայն մանրէները, այլ նաև դրանց սպորները, սակայն ցածր թափանցելիության պատճառով ճառագայթահարումը պետք է կատարվի նվազագույնը 30-40 րոպե, և լամպը պետք է տեղադրված լինի մակերևույթին հնարավորինս մոտ: Այս ճառագայթները մարդու առողջության համար վտանգ են ներկայացնում, այդ իսկ պատճառով չի թույլատրվում աշխատել լամպերի անմիջական ազդեցության տակ: Սննդամիջավայրերի, գազերի, նյութերի մանրէազերծման համար օգտագործվում են ավտոկլավներ, ֆիլտրեր և այլն: Գոյություն ունեն ջերմային և ոչ ջերմային մանրէազերծումներ: Ջերմային մանրէազերծման տեսակներ են շիկացումը, գոլորշիով և ճնշմամբ մշակումը (ավտոկլավում), եռացնելը, կոտորակային մանրէազերծումը: Ոչ ջերմային մանրէազերծում են զտումը (ֆիլտրումը), գազային նյութերով,

ՈՒՄ կամ այլ տեսակի ճառագայթներով մշակումը: Մանրէազերծումն ավտոկլավման միջոցով ունի բարձր արդյունավետություն, քանի որ մթնոլորտային բարձր ճնշման տակ ջրային գոլորշիներով 15-20 րոպե տևողությամբ մշակմամբ հնարավոր է լինում ոչնչացնել գրեթե բոլոր մանրէների սպորները: Ավտոկլավները լինում են տարբեր չափի, ձևի, տեսքի, մեխանիկական, ավտոմատ, կիսաավտոմատ, հետևաբար ունեն աշխատանքի տարբեր մոտեցումներ: Այս ձեռնարկում կներկայացվեն կենտրոնում գործող ավտոկլավի կառուցվածքը և աշխատանքի մեխանիզմը: Այն նյութերը կամ սննդամիջավայրերը, որոնք պարունակում են հեշտ քայքայվող, ցնդող միացություններ (հակաբիոտիկներ, վիտամիններ, ամինաթթուներ և այլն), մանրէազերծվում են ստերիլ ֆիլտրերով: Ներկայումս տարբերում են գազերի և հեղուկների մանրէազերծման համար տարբեր տրամագծերի ծակոտիներ ունեցող ստերիլ և ոչ ստերիլ ֆիլտրեր՝ նիտրոցելյուլոզային, նեյլոնային, պոլիտետրաֆլյուորոէթիլենային (PTFE), պոլիվինիլդիներկֆլյուորիդային (PVDF), ցելյուլոզաացետատային (CA), պոլիպրոպիլենային, պոլիկարբոնատային: Անհրաժեշտ է նաև իմանալ, որ, ըստ ծակոտիների չափերի, ֆիլտրերն անվանվում են տարբերկերպ. EK ֆիլտրերի ծակոտիների տրամագիծը 1.5-1.8 մկմ է, EKS ֆիլտրերինը՝ 1.2-1.5 մկմ, EKS-1 ֆիլտրերինը՝ 1-1.2 մկմ, և EKP ֆիլտրերինը՝ 0.8-1 մկմ:

Լաբորատոր հիմնական սարքեր

Ջրի մաքրման համակարգ: Քիմիական և կենսաբանական լաբորատորիաներում օգտագործվում է թորած ջուր՝ լուծույթների պատրաստման, վերլուծությունների (անալիզների)կատարման, լաբորատոր ապակեղենը լվանալուց հետո դրա լիարժեք մաքրման և այլ նպատակներով: Եթե բացառապես բարձր մաքրությամբ ջուր է պահանջվում, օգտագործվում է երկթորած ջուր:

Ջրի մաքրման և թորման համար կիրառվում են հետևյալ սարքավորումները.

1. Ջրի թորման համակարգ: Թորումը ներառում է ջուրը եռացնելը 70-80^{0}C ջերմաստիճանում, այնուհետև գոլորշին մաքուր տարաներում խտացնելը՝ դուրս թողնելով պինդ նյութերը:

Թորման ապարատում մնում է սպիտակ կամ դեղնավուն հանքային զանգված, որը պահանջում է կանոնավոր մաքրում: Թորած ջուրը պետք է պահել ախտահանված տարաներում, որպեսզի բացառվի մանրէների առկայությունը: Բազմաթիվ գործընթացների և լաբորատոր փորձերի համար թորած ջրի փոխարեն օգտագործվում են տնտեսապես մատչելի այլընտրանքներ, ինչպիսին է դեիոնացված ջուրը: Կրկնակի թորած ջուրը (կրճատ՝ ddH_2O) ստացվում է նախապես թորած ջուրը դանդաղ եռացնելով:

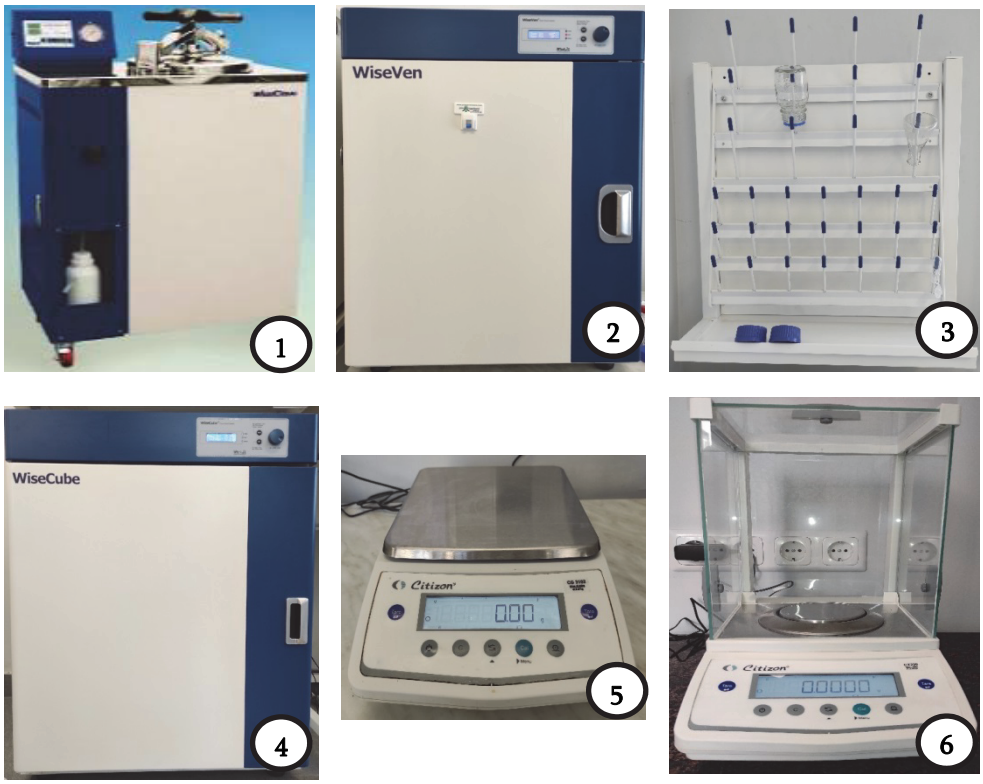
2. Ջրի մաքրման համակարգ (*Նկ. 4*): Այս սարքով ստացվում են մաքուր (Grade 2՝ 0.1 μS/սմ) և գերմաքուր (Grade 1՝ 0.055 μS/սմ) ջրեր: Մաքուր ջուրն օգտագործվում է լաբորատոր տարաները և սարքերը լվանալու, ավտոկլավ, քիմիական և կենսաքիմիական ռեագենտներ, բուֆերներ պատրաստելու և մանրէաբանական միջավայրեր ստանալու համար: Գերմաքուր ջուրը հիմնականում օգտագործվում է բարձր կատարողականությամբ հեղուկային քրոմատագրաֆիայի և մոլեկուլային կենսաբանությանն առնչվող տարբեր մեթոդներում:

Նկ. 4. *Գերմաքուր ջրի ստացման համակարգ*
1. Grade 1, 2. Grade 2, 3. կառավարվող վահանակ

3. Սարքի վահանակի վրա նշվում են ջրի որակը, փուլը, ֆիլտրի կյանքի տևողությունը, ջերմաստիճանը: Ներքևի հատվածում տրվում են սարքի վիճակը, ճնշումը, ծավալը և տարայում ջրի մակարդակը (*Tank Level*): Սարքը պետք է միացնել հետևյալ հաջորդականությամբ. բացել լաբորատորիայի ջրի փականը, սեղմել սարքի կարմիր կոճակը, վահանակի վրա սեղմել *Run*: Մաքուր ջուր վերցնել *Grade 2* տարայից (*Նկ. 4*): Արդեն գերմաքուր ջուրը վերցնելու համար բաժակը կամ տարան դնել սարքի ծորակի տակ և սեղմել *Dispense*: Երբ վահանակի վրա *Tank Level*-ը նշվում է *Full*, անջատել մաքրման համակարգը:

Սարքը երկար ժամանակ (օրինակ՝ ամբողջ գիշեր) չօգտագործելու դեպքում պետք է փակել ջրի աղբյուրը՝ ֆիլտրի կյանքի տևողությունը երկարացնելու համար: Պետք է ուշադիր լինել և ստուգել սարքի վիճակը և այլ պարամետրեր, խնդիրների դեպքում դիմել լաբորատորիայի աշխատակիցներին:

Շոգեախտահանիչ (ավտոկլավ): Ավտոկլավն օգտագործվում է մանրէազերծման այնպիսի աշխատանքների համար, որոնք պահանջում են բարձր ջերմաստիճան և ճնշում: Դրանք լայնորեն կիրառվում են մանրէաբանության, բժշկության և այլ ոլորտներում: Ավտոկլավը (*Նկ. 5*) օգտագործվում է լաբորատոր ապակեղենը, սննդամիջավայրերը և աշխատանքային այլ պարագաներ («ավտոկլավվող» մականշում ունեցող) բարձր ջերմաստիճանի և ճնշման պայմաններում շոգեախտահանելու համար: Սարքը միացնելուց առաջ պետք է ստուգել, որ թորած ջուրը լցված լինի այնքան, որ ծածկի տաքացվող մետաղյա խողովակները, այնուհետև սարքի վահանակի վրա նշել համապատասխան ջերմաստիճանը, ճնշումը, տևողությունը: Պետք է հետևել սարքի մաքրությանը, աշխատելիս կրել ջերմակայուն ձեռնոց, դնել դիմակ և ակնոց՝ խուսափելու այրվածքներից և թունավոր նյութերի հավանական ազդեցություններից:



Նկ. 5. 1. WiseClave WACS-1100 ավտոկլավ, 2. WiseVen WOF-155 չորացման վառարան, 3. չորացման դարակ, 4. WiseCube WIF-105 թերմոստատ, 5 և 6. կշեռքներ

Լաբորատոր չորանոց (չորացման վառարան) և չորացման դարակ: Չորացման վառարանները (*Նկ. 5*) կարող են օգտագործվել տարբեր լաբորատորիաներում կամ արդյունաբերության մեջ մի շարք գործընթացներում՝ գոլորշացում, մանրէազերծում, չորացում և այլն: Կան մինչև 250^{0}C, 300^{0}C և 350^{0}C առավելագույն ջերմաստիճան ունեցող չորացման վառարաններ: Չորացումը նուրբ գործընթաց է, քանի որ շատ արագ, շատ դանդաղ կամ անհավասարաչափ չորանալը կարող է փչացնել արդյունքը (թաց զանգվածների չորացում, բակտերիաների չոր քաշի որոշում և այլն): Չորացման վառարաններում կարելի է չորացնել լվացված ջերմակայուն լաբորատոր պարագաները: Ոչ ջերմակայուն պարագաները կարելի է չորացնել չորացման դարակների վրա: Չորանոցներ օգտագործելիս պետք է

կրել ջերմակայուն ձեռնոց, հետևել վահանակի վրա նշված ջերմաստիճանին, խաթարումների դեպքում դիմել լաբորատորիայի աշխատակիցներին:

Ջերմակարգավորվող խցիկ (թերմոստատ): Ջերմակարգավորվող խցիկը (*Նկ. 5*) հաստատուն է պահում նշված ցանկալի ջերմաստիճանը՝ միացնելով կամ անջատելով տաքացման ու սառեցման համակարգերը: Այն օգտագործվում է բակտերիաների աճման, ինչպես նաև տարբեր ֆերմենտային ռեակցիաների համար անհրաժեշտ հաստատուն ջերմաստիճան ապահովելու համար: Պետք է հետևել սարքի վահանակի վրա նշված ջերմաստիճանին:

Կշեռքներ: Կշեռքներն օգտագործվում են նյութերի և տարբեր նմուշների զանգվածները որոշելու համար: Լաբորատորիաներում նյութերի զանգվածը ճշգրիտ որոշելու համար կիրառվում են անալիտիկ կշեռքներ, որոնք չափում են նյութի զանգվածը միլիգրամի և ավելի փոքր տիրույթներում: Կշեռքները (*Նկ. 5*) պետք է ժամանակ առ ժամանակ կարգավորել՝ կատարելով դրանց ձեռնարկներում նշված համապատասխան քայլերը:

Մանրադիտակներ: Մանրադիտակը (*Նկ. 6*) մի սարք է, որն օգտագործվում է անզեն աչքով անտեսանելի մանր առարկաները խոշորացնելու համար: Մանրադիտակները լինում են օպտիկական, էլեկտրոնային, լուսաձորվող և այլն: Մանրէների ուսումնասիրության համար հիմնականում կիրառվում են օպտիկական և էլեկտրոնային մանրադիտակները: Օպտիկական մանրադիտակները, ըստ լույսի փոփոխության, լինում են.

1. ***Լուսային դաշտով***, երբ նմուշը ներկվում է և դիտվում լուսավորման ժամանակ: Սրանք կիրառելի են բակտերիաների, սնկերի, ջրիմուռների ձևաբանական հատկությունների կոպիտ դիտարկման համար:
2. ***Մթնային դաշտով***, երբ նմուշը կաթեցվում է հեղուկի վրա: Սրանք կիրառելի են մանրէների շարժունության կամ այնպիսի ձևաբանական բնութագրերի որոշման համար, ինչպիսիք են պարույր կամ կծիկ ձևերը:

3. ***Լուսածորվող (ֆլյուորեսցենտային)***, երբ նմուշը մշակված է ֆլյուորեսցենտային զոնդով, և լուսավորման ժամանակ այն երևում է:

4. ***Ֆազ-կոնտրաստային***, երբ հատուկ խտությամբ ոսպնյակները թույլ են տալիս դիտարկել կենդանի բջիջները և տարբերակել տարբեր խտություններով բջջային կառուցվածքները:

Նկ. 6. *Nikon մակնիշի ֆազ-կոնտրաստային մանրադիտակ*
1. ակնապակի, 2. փողակ, 3. օբյեկտիվներ, 4. ամրակալան, 5. առարկայական սեղանիկ, 6. դիաֆրագմա, 7. էլեկտրական լույսի աղբյուր, 8. առարկայական ապակին տեղաշարժող պտուտակ, 9. լույսի ուժգնությունը կարգավորող պտուտակ, 10. հոսանքի աղբյուրին միացման/անջատման կոճակ

Մանրադիտակով աշխատելու սկզբունքներն են.

1. Լույսի մակարդակը հարմարեցնել աչքին: Պարտադիր չէ, որ լույսը լինի ամենավառ մակարդակին:

2. Օբյեկտիվը բերել ճիշտ դիրքի: Աջ և ձախ ակնապակիները հարմարեցնել աչքերին:

3. Հեղուկ միջավայրում ստացված կենդանի պատրաստուկից 1-2 կաթիլ կաթեցնել առարկայակիր ապակու վրա, ապա ծածկապակին դնել կաթիլի վրա, ստանալ ճզմված կաթիլ: Պինդ միջավայրում ստացված կեն-

դանի պատրաստուկի ուսումնասիրման համար առարկայակիր ապակու վրա նախապես կաթեցնել մանրէազերծված ջուր և մանրէաբանական ասեղով մանրէների բջիջները տեղափոխել կաթիլի մեջ: Առարկայակիր ապակին ծածկել ծածկապակիով և դնել առարկայակիր սեղանիկի վրա:

4. Համոզվել, որ ակնապակին և լույսի աղբյուրը մաքուր են:

5. Առարկայակիր սեղանիկը պտուտակներով մոտեցնել օբյեկտիվին, համապատասխան պտուտակներով նմուշը հարմարեցնել դիտման համար:

6. Նմուշը դիտելուց հետո օբյեկտիվը մաքրել սպիրտով և լույսն անջատել:

Ֆիքսված պատրաստուկների ստացման համար հաջորդաբար կատարվում են հետևյալ քայլերը՝ քսուքի պատրաստում, չորացում, ֆիքսում և ներկում:

Քսուք պատրաստելու համար առարկայակիր ապակու վրա պետք է կաթեցնել մանրէազերծված ջուր և մանրէաբանական ասեղով մանրէները տեղափոխել կաթիլի մեջ, այնուհետև չորացնել պատրաստուկը սենյակային ջերմաստիճանում: Չորացումն ավելի արագ իրականացնելու համար կարելի է կիրառել հատուկ չորացնող սարքեր (օրինակ՝ սպիրտայրոցի բոցը), սակայն այդ դեպքում պետք է խուսափել մանրէների գերտաքացումից և ձևափոխությունից: Ֆիքսումն իրականացվում է հատուկ քիմիական նյութերով: Այս դեպքում կա՛մ ֆիքսող լուծույթը կաթեցվում է քսուքի վրա, կա՛մ քսուքն ընկղմվում է լուծույթի մեջ: Ներկումն իրականացվում է անիլինային ներկերով, որոնք լինում են թթվային և հիմնային: Հիմնականում մանրէների ներկման համար օգտագործվում են հիմնային ներկեր, որոնց նկատմամբ ավելի զգայուն են ԴՆԹ-ն և ՌՆԹ-ն: Բջիջների չափսերի և ձևի ուսումնասիրման համար կատարվում է պարզ ներկում, իսկ կառուցվածքային բաղադրիչների ուսումնասիրման համար՝ տարբերակիչ ներկում: Պարզ ներկման համար օգտագործվում են ֆուքսին, մեթիլենկապույտ և այլ գունանյութեր: Ներկման ժամանակ ներկանյութը չպետք է չորանա: Ներկումից հետո պատրաստուկը պետք է լվանալ ջրով և չորացնել ֆիլտրի թղթով:

Ֆիքսված պատրաստուկների համար պետք է կատարել հետևյալ քայլերը՝

1. կրկնել կենդանի պատրաստուկների ուսումնասիրման 1-ին և 2-րդ կետերը,

2. արդեն ֆիքսված և ներկված պատրաստուկի վրա կաթեցնել իմերսիոն յուղ,

3. կրկնել կենդանի պատրաստուկների ուսումնասիրման 4-րդ, 5-րդ և 6-րդ կետերը:

Ցենտրիֆուգներ: Ցենտրիֆուգը (*Նկ. 7*) կենտրոնախույս դաշտում հեղուկ դիսպերս համակարգերի և մասնիկների անջատումն իրականացնող սարք է: Ցենտրիֆուգի աշխատանքի հիմնական մասը կատարում է պտտվող ռոտորը, որտեղ ցենտրիֆուգի փորձանոթն ունի թեք տեղադրվածություն: Ցանկացած միացություն կամ բջջային բաղադրիչ ունի խիստ որոշակի ցենտրիֆուգային հարաբերական ուժ՝ RCF (արտահայտվում է ձգողականության միավորով՝ g-ով), որի ազդեցությամբ այն նստում է: Բազմաթիվ ցենտրիֆուգների կարգավորումներում նշվում է ոչ թե ցենտրիֆուգային հարաբերական ուժը, այլ մասնիկների նստեցման արագությունը՝ RPM (պտույտ/րոպե): Ուստի պահանջվում է բանաձև՝ փորձի ընթացքում ապահովելու համապատասխան կարգավորումները.

$$g = (1.118 \times 10^{-5})\ R \times S^2,$$

որտեղ g-ն ցենտրիֆուգային հարաբերական ուժն է, R-ը՝ ռոտորի շառավիղը սանտիմետրերով, S-ը՝ ցենտրիֆուգի պտույտների արագությունը մեկ րոպեում:

Ցենտրիֆուգի վահանակի վերին հատվածում նշվում է սարքի վիճակը, միջին հատվածում՝ կարգավորումները, իսկ ստորին հատվածում՝ կառավարումը: Ցենտրիֆուգի օգտագործման ժամկետը երկարացնելու համար պետք է ռոտորը պարբերաբար մաքրել հատուկ նյութերով:

Ցենտրիֆուգում իրականացնելիս նախապես անհրաժեշտ է՝

1. միացնել սարքը, ընտրել ցենտրիֆուգման նպատակին և նստեցվող ծավալին համապատասխան ռոտոր ու տեղադրել այն ցենտրիֆուգման սարքի մեջ,

2. վստահ լինել, որ ռոտորը կամ փորձանոթները թաց չեն,

3. հավասարակշռել ցենտրիֆուգի՝ հեղուկով լցված փորձանոթները, ամուր փակել կափարիչները և դրանք դեմ դիմաց դնել ռոտորի մեջ,

Նկ. 7. *1. Thermo Fisher Scientific Sorvall Lynx 6000 մակնիշի լաբորատոր ցենտրիֆուգ, 2. ռոտորներ, 3. կառավարվող վահանակ*

4. փակել ռոտորի, այնուհետև ցենտրիֆուգի կափարիչները,

5. սարքի վահանակի վրա ընտրել նստեցման համապատասխան կարգավորումները և սեղմել *Start*. սառեցվող ցենտրիֆուգում իրականացնելու դեպքում ջերմաստիճանը պետք է ընտրել նախապես՝ մոտավորապես 10-15 րոպե առաջ,

6. գործընթացն ավարտելուց հետո զգուշությամբ հանել փորձանոթները:

Խնդիրների առաջացման դեպքում պետք է դիմել լաբորատորիայի աշխատակիցներին:

Էլեկտրոդներ և իոնաչափիչ սարքեր: Իոնաչափիչ սարքերն օգտագործվում են լուծույթում հատուկ իոնների չափման համար՝ իոնային ընտրողական էլեկտրոդի օգտագործմամբ (*Նկ. 8*):

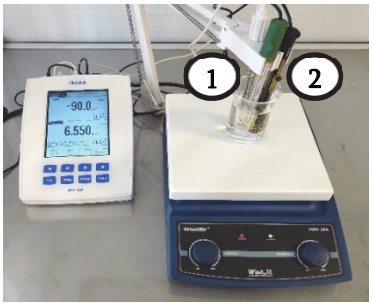
Էլեկտրոդներն օժտված են էլեկտրոնային հաղորդականությամբ և կապի մեջ են իոնային հաղորդչի՝ էլեկտրալիտի հետ: Առանձնացվում են.

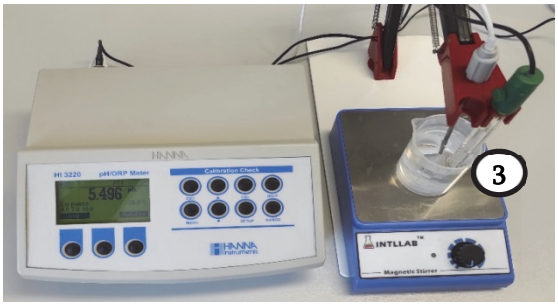
1. pH-էլեկտրոդներ, որոնք վերլուծական (անալիտիկ) սենսորներ են և որոշում են ջրածնի պոտենցիալը՝ լուծույթում ջրածնի իոնների ակտիվության բացասական լոգարիթմը (pH): Լուծույթի pH-ի արժեքն ուղղակիորեն կապված է ջրածնի իոնի [H^+] և հիդրոքսիլ իոնի [$(OH)^-$] խտությունների հարաբերակցության հետ:

2. Օքսիդավերականգնողական (ՕՎՊ) էլեկտրոդներ, որոնք անալիտիկ սենսորներ են՝ նախատեսված լուծույթի օքսիդավերականգնողական պոտենցիալը որոշելու համար: Դրանք չափում են լուծույթում օքսիդիչների և վերականգնիչների ակտիվությունը: ՕՎՊ զգայուն հատվածը կարող է պատրաստվել պլատինից: Այն քիմիապես իներտ է, այսինքն՝ չի կարող ինքնաօքսիդանալ կամ ինքնավերականգնվել: Պլատինի սենսորից ստացվող ազդանշանը փոխանցվում է էլեկտրոդի միջոցով, և համեմատական ազդանշանի հետ միասին որոշվում է ՕՎՊ արժեքը: Օգտագործումից առաջ անհրաժեշտ է որոշել էլեկտրոդների պոտենցիալը ստուգիչ լուծույթում, որը պարունակում է 0.049 Մ $K_3[Fe(CN)_6]$ և 0.05 Մ $K_4[Fe(CN)_6]\cdot 3H_2O$ (pH = 6.86): ՕՎՊ-ն այս լուծույթում 25^0C-ում քլորարծաթյա էլեկտրոդի համեմատ կազմում է 254±10 մՎ:

3. Ալկալիական մետաղների էլեկտրոդներ, որոնք կարող են որոշել Li^+, Na^+, K^+, Rb^+ կամ Cs^+ իոնների քանակությունը լուծույթում:

Էլեկտրոդների միջոցով չափումներ իրականացնելիս կարևոր է լուծույթի ջերմաստիճանը, քանի որ ջերմաստիճանից կախված՝ լուծույթի բնութագրիչները փոխվում են: Հետևաբար վերը նշված էլեկտրոդներով չափումներ իրականացնելիս իոնաչափիչ սարքին միացվում է նաև ջերմաչափիչ էլեկտրոդ:





Նկ. 8. *Իոնաչափիչ սարքեր (Hanna Instruments) և դրանց միացված՝ 1. ՕՎՊ (HI3131, Hanna Instruments), 2. կալիումի իոնների ընտրողական (HI4114, Hanna Instruments) և 3. pH (HI1131, Hanna Instruments) էլեկտրոդներ*

Էլեկտրոդներով աշխատելիս պետք է պահպանել հետևյալ կանոնները.

1. *Թույլ չտալ, որ էլեկտրոդը չորանա.* դա հանգեցնում է արժեքների շեղման, արձագանքի դանդաղեցման և սխալ չափումների:

2. *Լվանալ էլեկտրոդը, կոպտորեն չսրբել թղթով կամ անձեռոցիկով.* սրբելը կարող է հաստատուն լիցք առաջացնել, ինչը խանգարում է էլեկտրոդի ճշգրիտ գրանցմանը:

3. *Պահել հատուկ պահպանման լուծույթում.* դեիոնացված ջրում պահելու հետևանքով առաջանում է իոնների արտահոսք ապակե թաղանթից և էլեկտրալիտից, ինչը հանգեցնում է դանդաղ արձագանքի: Այդ պատճառով յուրաքանչյուր էլեկտրոդ պահվում է որոշակի լուծույթում, օրինակ՝ pH, ՕՎՊ էլեկտրոդները պահվում են KCl-ի հագեցած (3 Մ) լուծույթում:

4. *Պարբերաբար մաքրել.* օգտագործման ընթացքում էլեկտրոդի վրա կարող են առաջանալ նստվածքներ՝ ծածկելով զգայական ապակին, ինչը կարող է հանգեցնել սխալ գրանցումների:

5. *Հաճախակի կարգավորել.* էլեկտրոդների ճշգրտության համար անհրաժեշտ է հաճախակի կարգավորել դրանք՝ հետևելով այդ էլեկտրոդների ձեռնարկների հրահանգներին:

6. *Բացել կամ թուլացնել էլեկտրոդի անցքի կափարիչը.* էլեկտրոդի անցքի փակվելը կարող է հանգեցնել արժեքի կայունացման դանդաղեցմանը:

7. *Էլեկտրալիտի մակարդակը պահել նորմալ տիրույթում.* ժամանակի ընթացքում էլեկտրալիտը դուրս է հոսում: Էլեկտրալիտի ցածր մակարդակի պատճառով կարող են ստացվել ոչ ճշգրիտ տվյալներ:

8. *Ճիշտ ընկղմել էլեկտրոդը.* սենսորային ապակին և համեմատական հանգույցը պետք է ամբողջությամբ ընկղմված լինեն լուծույթի մեջ:

Կենսառեակտոր: *Կենսառեակտորների* (*Նկ. 9*) միջոցով հնարավոր է դառնում կարգավորել կենսագործընթացները՝ նպաստելով կենդանի օրգանիզմների աճին և նյութափոխանակության կարգավորմանը: Ջերմաստիճանի, սննդանյութերի պարունակության, pH-ի, թթվածնի և այլ գազերի ու տարբեր իոնների քանակությունների փոփոխությունները կարող են վերահսկվել կենսառեակտորներում հատուկ հրահանգներով: Լաբորատոր կենսառեակտորները, որպես կանոն, պատրաստվում են չժանգոտվող մետաղներից կամ ապակուց և սովորաբար ավտոկլավվում են: Սարքի վահանակի վրա կարելի է տեսնել սարքի վիճակը և փոփոխել այն:

Նկ. 9. *Eppendorf մակնիշի BioFlo 320 կենսառեակտոր*

Լամինար և կենսաանվտանգության պահարաններ: *Լամինար պահարանը* (*Նկ. 10*) փակ լաբորատոր աշխատանքային վայր է, որը նախատեսված է կենսաբանական նմուշների կամ զգայուն նյութերի վարակումը կանխելու համար: Այս պահարաններ օդն անցնում է *HEPA* ֆիլտրով և հոսում է դեպի օգտագործողը լամինար հոսքով: Օդի հոսքի ուղղության շնորհիվ նմուշը պաշտպանվում է օգտագործողից, բայց օգտագործողը չի պաշտպանվում նմուշից: Լամինար պահարանները կարող են ունենալ ուլտրամանուշակագույն ճառագայթային լամպ, որպեսզի նախքան օգտագործումը տարածքը ախտահանվի, և նմուշի վարակումը կանխվի: Ներքին միջավայրը ախտահանելու համար սովորաբար մանրէազերծող լամպերը միացված են պահվում 30-40 րոպե: Այդ ընթացքում պահարանը չի կարելի օգտագործել: Այն կարելի է օգտագործել միայն լամպն անջատելուց հետո, քանի որ ուլտրամանուշակագույն ճառագայթները կարող են առաջացնել քաղցկեղ և այլ հիվանդություններ:

Կենսաանվտանգության պահարանի առաջնային գործառույթը լաբորատորիայի աշխատակցին և շրջակա միջավայրը ախտածիններից պաշտպանելն է: Արտանետվող ամբողջ օդը *HEPA* ֆիլտրով զտվում է՝ մաքրվելով վնասակար մանրէներից:

Նկ. 10. *1. BIOAIR safeflow 1.2 կենսաանվտանգության պահարան, 2. BIOAIR aura HZ 72 լամինար պահարան*

Անթթվածնային խցիկ: Անթթվածնային խցիկները (*Նկ. 11*) նախատեսված են թթվածնի նկատմամբ զգայուն նյութերի, օրգանիզմների կամ առանձին ֆերմենտների հետ աշխատելիս ընդհանուր վերահսկման և մեկուսացման համար: Դրանք հետազոտողներին թույլ են տալիս հեշտությամբ մշակել և ուսումնասիրել նմուշները՝ առանց մթնոլորտային թթվածնի առկայության:

Անթթվածնային խցիկներում թթվածինը դուրս մղելու համար օգտագործվում են H_2/N_2 (5/95 %) կամ $N_2/CO_2/H_2$ (85/10/5 %) գազային խառնուրդներ: Նյութերը և լաբորատոր պարագաները անցկացվում են անթթվածնային խցիկ հատուկ փոքր խցիկով: Պահանջվում է հետևել վահանակի վրա նշված գազերի հարաբերակցությանը, իսկ խնդիրների դեպքում դիմել լաբորատորիայի աշխատակիցներին:

Նկ. 11. *COY մակնիշի անթթվածնային խցիկ*

Սառնարաններ: Սառնարանը կազմված է ջերմամեկուսացված խցիկից և ջերմային պոմպից (մեխանիկական, էլեկտրոնային կամ քիմիական), որը ջերմությունը սառնարանի ներսից դուրս է բերում արտաքին միջավայր, որպեսզի սառնարանում հաստատվի նախապես ընտրված ցածր ջերմաստիճանը: Ուսումնական և հետազոտական լաբորատորիաներում հիմնականում անհրաժեշտ են 3 տարբեր ջերմաստիճանների սառնարաններ՝ մինչև +8^{0}C, -20^{0}C և -80^{0}C (*Նկ. 12*): Մեծաքանակ լաբորատոր նյութեր, լուծույթներ, մանրէների աճման միջավայրեր, պարբերաբար օգտագործվող և փոխացանք արվող բակտերիաների շտամներ պահ-

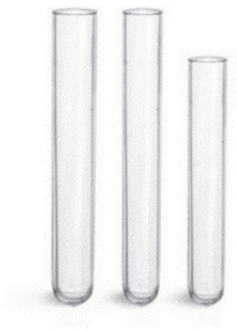
վում են +2-+8^{0}C ջերմաստիճանի սառնարանում: -20^{0}C ջերմաստիճանի սառնարանում պահվում են որոշ նյութեր և կենսաբանական այն նմուշ-ները, որոնք ստանալուց հետո կարճ ժամանակ ենթակա են օգտագործ-ման և այդ ընթացքում փոփոխություններ չեն կրի: Նյութերը ճիշտ ջեր-մաստիճանում պահելու համար պետք է ուշադիր լինել պիտակի նշմանը: Բակտերիաների շտամների, անջատված տարբեր սպիտակուցների, ԴՆԹ-ի տարբեր հատվածների երկարաժամկետ պահպանման համար օգտագործվում է -80^{0}C գերցածր ջերմաստիճանային տիրույթի սառնա-րանը:

Նկ. 12. *BIOBASE ապրանքանիշի սառնարաններ*
1. սառեցում +2-+8 ^{0}C, 2. սառեցում մինչև -86^{0}C

Լաբորատոր ապակե և պլաստմասե տարաներ: Ապակե տարաները լայնորեն օգտագործվում են լաբորատորիաներում և լինում են տարբեր ձևի ու չափերի: Չնայած վերջին տարիներին միտում կա ապակե անոթները փոխարինելու ավելի դիմացկուն և նվազ փխրուն պլաստիկ տարաներով, սակայն որոշ փորձերի համար դեռ պահանջվում են ապակետարաներ: Սրա պատճառները բազմաթիվ են: Նախ՝ ապակին համեմատաբար արդյունավետ է, քանի որ փոխազդեցության մեջ չի մտնում ներսում գտնվող քիմիական նյութերի հետ: Ապա՝ այն նաև թափանցիկ է, ինչը թույլ է տալիս հեշտությամբ կառավարել գործընթացը, և ջերմակայուն, ինչը թույլ է տալիս բարձր ջերմաստիճան պահանջող փորձեր իրականացնել: Փորձի ճշգրիտ արդյունքներ ստանալու համար անհրաժեշտ է ընտրել համապատասխան նյութից պատրաստված տարա:

Բաժակները լինում են տարբեր չափերի և օգտագործվում են հեղուկի ծավալը որոշելու ու նմուշներ պատրաստելու համար: Դրանցով կատարվող չափումներն առանձնապես ճշգրիտ չեն: Դրանց մի մասը նույնիսկ չունի ծավալային գծանշումներ: Բաժակի նշումները ճշգրիտ են ~10 %-ի սահմաններում:

Կոլբաներն օգտագործվում են լուծույթներ պահելու կամ եռացնելու, ավտոկլավելու համար: Դրանք կարող են ունենալ չափիչ նշումներ, որոնց շեղումը ~10 % է: Լուծույթները երկար պահելու դեպքում պետք է կոլբան փակել փայլաթիթեղով կամ պարաֆիլմով:



Փորձանոթներն օգտագործվում են փոքր նմուշներ հավաքելու և պահելու համար: Դրանք սովորաբար չեն օգտագործվում ծավալը ճշգրիտ որոշելու համար: Փորձանոթները, որոնք ավտոկլավվում են, երբեմն պատրաստվում են բորասիլիկատային ապակուց, բայց մյուսները պատրաստվում են նվազ ամուր ապակուց, երբեմն էլ՝ պլաստիկ նյութերից:

Չափիչ գլանները նման են բաժակներին, ունեն ծավալային գծանշումներ, ավելի երկար են ու նեղ, ինչը թույլ է տալիս ճիշտ որոշել հեղուկի ծավալը: Դրանք չի կարելի տաքացնել:

Անգույն լուծույթների ծավալը որոշվում է ստորին մենիսկով (գոգավորություն), իսկ մուգ լուծույթներինը՝ վերինով: Հեղուկի ծավալը ճիշտ որոշելու համար փորձանոթը կամ չափիչ գլանը պետք է դրված լինի հորիզոնական հարթության վրա, և հեղուկի մենիսկը՝ համապատասխանի աչքի մակարդակին:

Ձագարներն ունեն թեքված նեղ պարանոց, ինչը թույլ է տալիս հեղուկը հեշտությամբ լցնել նեղ բերան ունեցող անոթի մեջ:

Պետրիի թասիկները փոքր ափսեներ են, որոնք օգտագործվում են մանրէների կուլտիվացման համար:

Կաթոցիչներ (պիպետներ): Պիպետները լաբորատոր գործիքներ են, որոնք օգտագործվում են որոշակի ծավալով հեղուկ տեղափոխելու համար: Պիպետները տարբերակվում են ըստ ծավալի: Այն պիպետները, որոնք չափում են հեղուկի ծավալը 1-1000 մկլ-ի սահմաններում, միկրոպի-

պետներ են, իսկ ավելի մեծ քանակությամբ լուծույթի ծավալը չափողները՝ մակրոպիպետներ: Պիպետները լինում են նաև կարգավորվող և ստանդարտ:

Ստորև կներկայացվեն որոշ պիպետների նկարագրերը:

Ավտոմատ պիպետները շարժական պիպետներ են (*Աղ. 1*):

Էլեկտրական պիպետներով ճշգրիտ որոշվում է հեղուկի ծավալը:

Ապակե պիպետները մակրո- և միկրոպիպետներ են, որոնք բաղկացած են երկար խողովակից՝ մի շարք ծավալային գծանշումներով: Լինում են ծայրային և ոչ ծայրային: Դրանք նույնպես պահանջում են վակուումի աղբյուր, ինչը կարող է ապահովվել ռետինե տանձիկի և հասարակ կամ ավտոմատ այլ պրոպիպետներիօգնությամբ: Անվտանգության կանոնակարգում ներառված է հետևյալ հայտարարությունը. «Երբեք չքաշեք KCN, NH_3, ուժեղ թթուներ, հիմքեր, սնդիկի աղեր և այլ թունավոր նյութեր բերանով»:

Աղյուսակ 1. Ավտոմատ պիպետների տեսակները և բնութագրիչները

Ավտոմատ պիպետներ	Ծավալը (մլ)	Ծայրակալի գույնը
P10	0.5-10	սպիտակ
P20	2-20	դեղին
P200	20-200	դեղին
P1000	100-1000	կապույտ
P5000	1000-5000	սպիտակ

Ռետինե տանձիկով աշխատելիս պետք է կատարել հետևյալ քայլերը. A մասը սեղմելով՝ օդը հանել տանձիկից, ապակե պիպետը հետին մասով ամրացնել տանձիկին, S մասը սեղմելով՝ հեղուկը բարձրացնել մինչև անհրաժեշտմակարդակը, E մասով դատարկել հեղուկը պիպետից:

Տեղափոխող պիպետը պատրաստվում է պլաստիկ նյութից: Դրա հիմքը կարող է լինել հեղուկը պահող խորշ:

Օգտագործված գրականություն

1. **Թոչունյան Ա.**, Կենսաէներգետիկա, Եր., ԵՊՀ հրատ., 2019, 292 էջ:
2. **Թոչունյան Ա. Հ., Փանոսյան Հ. Հ., Բազուկյան Ի. Լ., Մարգարյան Ա. Ա., Պոպով Յու. Գ.**, Մանրէաբանության լաբորատոր աշխատանքներ, Եր., ԵՊՀ հրատ., 2014, 316 էջ:
3. **Nölting B.**, Methods in Modern Biophysics, 3rd ed., 2010, Springer, 2010, 289 p.
4. **Pingoud A., Urbanke C., Hoggett J., Jeltsch A.**, Biochemical Methods: A Concise Guide for Students and Researchers, Wiley, 2002, 374 p.
5. **Reddy C. A., Beveridge T. J., Breznak J. A., Marzluf G.**, Methods for General and Molecular Microbiology, Third Edition, ASM Press, 2007, 1069 p.
6. **Scungio D., Gile T. J.**, Complete guide to laboratory safety, HCPro a division of BLR; Fourth edition, 2014, 376 p.

ԱՇԽԱՏԱՆՔ 1
ԲԱԿՏԵՐԻԱՆԵՐԻ ԱՃԵՑՈՒՄԸ ԵՎ ՊԱՀՊԱՆՈՒՄԸ

Բակտերիաների աճը. աճման գործոններ

Բակտերիաները, ինչպես բոլոր կենդանի օրգանիզմները, պահանջում են արտաքին միջավայրի այնպիսի պայմաններ, որոնք առավել նպաստավոր են իրենց աճի համար: Դա կապված է աճը խթանող որոշակի գործոնների հետ: Այդպիսի գործոններ են թթվածինը, միջավայրի pH-ը, ածխածնի աղբյուրները, ջերմաստիճանը և լույսը, որոնց նկատմամբ տարբեր բակտերիաների պահանջը տարբեր է:

Ըստ թթվածնի նկատմամբ պահանջի կամ կայունության մակարդակների՝ բակտերիաները լինում են.

1. Խիստ աերոբներ, որոնք չեն կարող գոյատևել առանց թթվածնի, որը էլեկտրոնների վերջնական ակցեպտոր է: Թթվածնից կախումը պայմանավորված է շնչառության ժամանակ թթվածնի՝ էներգիայի ձևափոխմամբ:

2. Խիստ անաերոբներ, որոնք խիստ աերոբների հակապատկերն են, չնչին քանակությամբ թթվածնի առկայության դեպքում չեն կարող գոյատևել, և նրանց էներգաառաջացման նյութափոխանակային գործընթացները խաթարվում են թթվածնի առկայության պայմաններում: Այս դեպքում էլեկտրոնների վերջնական ակցեպտորներ կարող են լինել տարբեր միացություններ:

3. Ֆակուլտատիվ անաերոբներ, որոնք կարող են աճել թթվածնի և՛ առկայության, և՛ բացակայության դեպքում: Եթե չկա թթվածին, էներգաառաջացման համար մանրէները յուրացնում են նյութերը կա՛մ խմորման, կա՛մ անաերոբ շնչառության միջոցով: Այս դեպքում էլեկտրոնների վերջնական ակցեպտորներ կարող են լինել տարբեր միացություններ:

4. Աերոտոլերանտ անաերոբներ, որոնք զգայուն չեն թթվածնի նկատմամբ, և նյութերի յուրացումն իրականանում է անաերոբ նյութափոխանակությամբ (խմորում)։

5. Միկրոաերոֆիլներ, որոնց աճի համար անհրաժեշտ է միջավայրում չնչին քանակությամբ թթվածին։

Մեկ այլ կարևոր գործոն է ***միջավայրի pH-ը***։ Թթվային միջավայրերի pH-ը փոքր է 7-ից, չեզոք միջավայրերինը 7 կամ մոտավորապես 7 է, իսկ հիմնային միջավայրերինը մեծ է 7-ից։ *Ացիդոֆիլ (թթվասեր)* բակտերիաներն աճում ենայնպիսի միջավայրերում, որոնց pH-ը փոքր է 5-ից, ընդ որում հիմնականում բարենպաստ է այն միջավայրը, որի pH = 3։ Այսպիսի բակտերիաներ կարելի է հանդիպել կաթնասունների օրգանիզմում, որտեղ միջավայրը թթվային է, կամ տաք աղբյուրներում։

Բակտերիաների մեծ մասը *նեյտրոֆիլ* է։ *Helicobacter pilori*-ն այդպիսի բակտերիայի օրինակ է, որն ապրում է կաթնասունների ստամոքսում։ Թթվային միջավայրում գոյատևելու համար այն իր շուրջն արտադրում է մի ֆերմենտ, որը չեզոքացնում է ստամոքսահյութը։

Ալկալոֆիլ (հիմնասեր) բակտերիաների աճման համար բարենպաստ են այն միջավայրերը, որոնց pH = 8-10։ Այս բակտերիաները հանդիպում են հիմնային միջավայրերում՝ հիմնային կամ աղային լճերում։

Ըստ ջերմաստիճանի նկատմամբ պահանջի՝ տարբերակվում են բակտերիաների հետևյալ տեսակները՝

1. *փսիխրոֆիլներ*, որոնք աճում են 4-25^{0}C ջերմաստիճանում,
2. *ծայրահեղ փսիխրոֆիլներ*, որոնք աճում են 0^{0}C և ավելի ցածր ջերմաստիճաններում,
3. *մեզոֆիլներ*, որոնք աճում են 0-45^{0}C ջերմաստիճանում ,
4. *թերմոֆիլներ*, որոնք աճում են 50-80^{0}C ջերմաստիճանում,
5. *հիպերթերմոֆիլներ*, որոնք աճում են 80-110^{0}C ջերմաստիճանում։

Որոշ բակտերիաների աճի համար անհրաժեշտ է ***լույս***։ Դրանք ունեն լույսը թիրախավորող գունանյութեր, որոնք ունակ են որոշակի երկարությամբ լույսի էներգիան կուտակելու և ձևափոխելու քիմիական էներգիայի։ *Ցիանաբակտերիաները* ֆոտոտրոֆներ են, պահանջում են լույս՝ ֆոտոսինթեզի իրականացման համար։ Դրանք պարունակում են քլորոֆիլ

պիգմենտ, որը կլանում է լույս, և ֆոտոսինթեզի շնորհիվ սինթեզում են թթվածին: Ցիանաբակտերիաներ հանդիպում են և՛ ցամաքային, և՛ ջրային միջավայրերում և կարող են հանդես գալ որպես ֆիտոպլանկտոններ՝ համակեցության մեջ մտնելով սնկերի, նախակենդանիների և բույսերի հետ:

Այլ օրինակ: *Ծիրանագույն* և *կանաչ բակտերիաները* չեն սինթեզում թթվածին և յուրացնում են սուլֆիդները կամ ծծումբը՝ ֆոտոսինթեզի իրականացման համար: Դրանք պարունակում են բակտերիաքլորոֆիլ պիգմենտ, որն ունակ է ավելի կարճալիք տիրույթի լույս կլանելու, քան քլորոֆիլը: Ապրում են ջրային խոր գոտիներում:

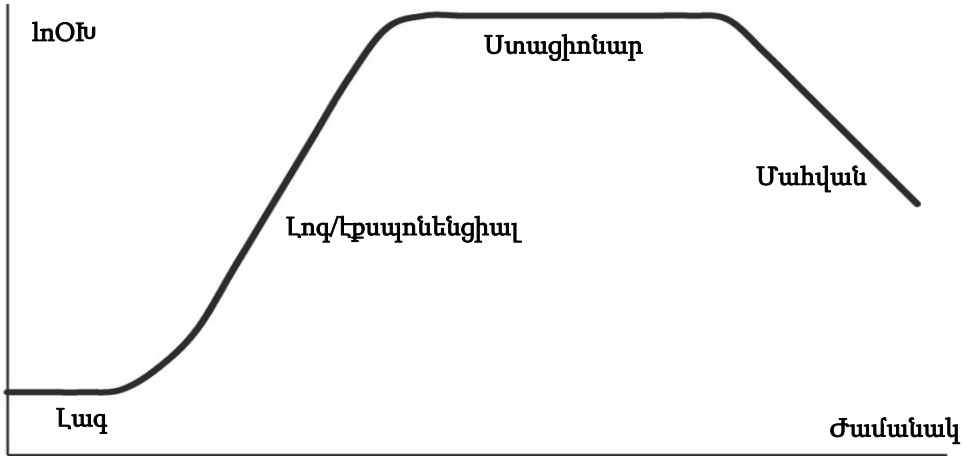
Բակտերիաների աճման փուլերը

Բակտերիաները միաբջիջ օրգանիզմներ են, որոնք բազմանում են հիմնականում անսեռ եղանակով կիսմամբ: Բարենպաստ պայմաններում մանրէները բազմանում են էքսպոնենցիալ արագությամբ: Եվ երբ դրանք որևէ սննդամիջավայրում աճում են, հնարավոր է դառնում ստանալ աճի ենթադրյալ պատկերը: Պարբերական կուլտիվացման ժամանակ այն կարող է վերածվել գրաֆիկական կամ, այսպես կոչված, բակտերիաների աճի կորի՝ ցույց տալով բակտերիաների բջիջների քանակության փոփոխությունը ժամանակի ընթացքում: Աճի կորում աճը ներկայացվում է հետևյալ փուլերով՝ *լաг, էքսպոնենցիալ (լոգ), ստացիոնար* և *մահվան* (*Նկ. 13*):

Բակտերիաների պոպուլյացիայի առաջացումը բնութագրվում է դրա կրկնապատկման ժամանակով, որը տարբեր բակտերիաների դեպքում տարբեր է և կախված է նրանից, թե որքանով են միջավայրի պայմանները բավարար լավ աճի համար:

Բնության մեջ գոյություն չունի այնպիսի արտաքին միջավայր, որի պայմանները կատարյալ են բակտերիաների աճի համար: Որպես կանոն, շրջակա միջավայրում ապրող կենդանի օրգանիզմների տեսակները ժամանակի ընթացքում փոխում են միջավայրի կազմը: Սակայն լաբորատոր պայմաններում հնարավոր է ստեղծել բակտերիաների աճի համար բա-

բենպաստ պայմաններ, որոնց հիման վրա էլ ներկայացվում են աճի կորերը: Բակտերիաների աճի կորը ներկայացնում է մի շարք կենդանի բջիջների քանակությունը որոշակի ժամանակահատվածում:



Նկ. 13. *Բակտերիաների աճի դասական կորը և դրա փուլերը պարբերական կուլտիվացման ժամանակ*

Լաг փուլ: Այս սկզբնական փուլը բնութագրվում է բջիջների ակտիվությամբ, բայց ոչ վերարտադրմամբ: Բակտերիաների՝ փոքր քանակությամբ բջիջներ տեղափոխվում են հարուստ սննդամիջավայր, որը դրանց թույլ է տալիս սինթեզել սպիտակուցներ և այլ մոլեկուլներ, որոնք անհրաժեշտ են ԴՆԹ-ի կրկնապատկման գործընթացների համար: Այս փուլում բջիջները մեծանում են չափերով, սակայն չեն բաժանվում:

Էքսպոնենցիալ փուլ: Լաг փուլից հետո սկսվում է բակտերիաների բջիջների աճի էքսպոնենցիալ կամ լոգ փուլը: Սա այն ժամանակահատվածն է, որի ընթացքում բջիջներն ակտիվորեն կիսվում են, և դրանց քանակը կրկնապատկվում է յուրաքանչյուր վերարտադրումից հետո: Բջիջների նյութափոխանակային ակտիվությունը բարձր է, երբ կիսման համար սինթեզվում են ԴՆԹ, ՌՆԹ, բջջապատի բաղադրիչներ և աճի համար կարևոր այլ միացություններ: Աճման այս փուլում հակաբիոտիկների ու ախտահանիչների ազդեցությունն առավել արդյունավետ է, քանի որ այդ նյութերը սովորաբար թիրախավորում են բջջապատերը կամ ԴՆԹ-ի

տրանսկրիպցիոն և ՌՆԹ-ի տրանսլյացիոն սպիտակուցների սինթեզի գործընթացները:

Ստացիոնար փուլ: Լոգ փուլից հետո բջիջների թիվը կրճատվում է, քանի որ եղած սննդանյութերն սպառվում են, և միջավայրում սկսում են կուտակվել վերջնանյութերը: Բակտերիաների բջիջների աճը հասնում է իր առավելագույն կետին կամ ստացիոնար փուլին, երբ կիսվող և մահացող բջիջները թվով հավասար են: Սա չի հանգեցնում ընդհանուր պոպուլյացիայի փոփոխության: Պակաս նպաստավոր պայմաններում բջիջները սկսում են պայքարել սննդանյութերի համար և նվազեցնում են իրենց նյութափոխանակային ակտիվությունը: Սպոր առաջացնող տեսակներն սկսում են գոյացնել էնդոսպորներ, իսկ ախտածինները՝ որոշակի միացություններ (ախտածնության գործոններ), որոնք օգնում են նրանց գոյատևելու անբարենպաստ պայմաններում և հետևաբար առաջացնելու հիվանդություններ:

Մահվան փուլ: Երբ սննդանյութերը դառնում են քիչ հասանելի, և վերջնանյութերի քանակը ավելանում է, մահացող բջիջների թիվը ևս աճում է: Այս փուլում աճող բջիջների թիվը կրճատվում է էքսպոնենցիալ արագությամբ, և պոպուլյացիայի աճը կտրուկ նվազում է: Մահացող բջիջները ենթարկվում են լիզիսի, կամ բջջահյութն անցնում է արտաքին միջավայր բջջապատի որևէ հատվածի կամ հատվածների վնասմանհետևանքով, և առկա սննդանյութերը դառնում են հասանելի այլ բջիջների համար: Սա օգնում է սպոր առաջացնող բակտերիաներին գոյատևելու սպորառաջացման գործընթացում: Սպորներն ունակ են գոյատևելու մահվան փուլի անբարենպաստ պայմաններում և դառնում են աճող բջիջներ՝ հայտնվելով այնպիսի միջավայրում, որը նպաստում է բջիջների աճին:

Բակտերիաների աճման հետազոտությունների արդյունքները կարելի է արտահայտել բակտերիաների քանակի լոգարիթմի (lnN)՝ ժամանակից կախման գրաֆիկով չափելով բակտերիական կախույթի օպտիկական խտությունը (ՕԽ): Էքսպոնենցիալ փուլում այդ կախումը գծային է, և բակտերիաների աճը բնութագրելու համար կարևոր է որոշել էքսպոնենցիալ փուլի *աճման տեսակարար արագության հաստատունը* ($k_{աճ}$ կամ μ),

որը լոգարիթմական առավելագույն (lnN_2) և նվազագույն (lnN_1) արժեքների տարբերությունն է՝ հաշվված միավոր ժամանակում (t, ժ): Այն կարելի է ներկայացնել հետևյալ բանաձևերով՝

$$\mu = \frac{ln_{N_2} - ln_{N_1}}{t_2 - t_1} \quad (1) \qquad \text{կամ} \qquad \mu = \frac{log_{N_2} - log_{N_1}}{2.303\,(t_2 - t_1)} \quad (2),$$

որոնցում t_2 և t_1 ժամանակահատվածներում գրանցվել են համապատասխանաբար lnN_2 և lnN_1 արժեքները: Օրինակ՝ *E. coli* բակտերիաներն աճեցվել են 6 ժամվա ընթացքում 2 գ/լ$^{-1}$ խտությամբ գլյուկոզի առկայությամբ պեպտոնային միջավայրում, որի pH = 7.5, և յուրաքանչյուր կես ժամը մեկ չափվել է բակտերիական կախույթի օպտիկական խտությունը սպեկտրալուսաչափիչ մեթոդով 600 նմ երկարությամբ ալիքի տակ: Ստացվել են հետևյալ արժեքները:

ժամ	0	0.5	1	1.5	2	2.5	3	3.5	4	4.5	5
ՕԽ	0.0286	0.0386	0.0576	0.1621	0.3380	0.5211	0.6984	0.8690	1.0120	1.0680	1.0846

Գրաֆիկում տեղադրելով ժամանակից կախված լոգարիթմական արժեքները՝ ստացվում է բակտերիաների աճի կորը՝ ընդգրկելով մինչև ստացիոնար փուլը: Վերցնելով էքսպոնենցիալ փուլի նվազագույն և առավելագույն արժեքները համապատասխանաբար 1-ին և 4-րդ ժամերում և տեղադրելով վերը նշված բանաձևում՝ կստացվի μ-ն.

$$\mu = \frac{\ln(1.012) - \ln(0.0576)}{4-1},$$

$$\mu = 0.95\ ժ^{-1}:$$

Աղյուսակում ներկայացված տվյալներով հնարավոր է նաև հաշվել աճի ցանկացած փուլում բակտերիաների աճման արագության լոգարիթմական արժեքը, ինչպես նաև գտնել *աճման տեսակարար առավելագույն արագությունը*՝ $\mu_{առ}$, տվյալ մանրէների և տվյալ ածխածնի աղբյուրի առկայությամբ: Այս դեպքում աճի կորերը կառուցվում են ածխածնի աղբյուրի աճող խտություններով, և μ-ն հաշվարկվում է խտության յուրաքանչյուր արժեքի համար.

$$\mu = \frac{\mu_{առ} * S}{K_S + S},$$

որտեղ K_s-ը ածխածնի աղբյուրի հագեցման հաստատունն է, որն ածխածնի աղբյուրի խտության այն մասն է, որի դեպքում աճման տեսակարար արագությունը հավասար է $\mu_{առ}$-ի կեսին՝ $\mu = ½\mu_{առ}$:

Հնարավոր է օգտագործել նաև աճման այլ պարամետրեր, ինչպիսիք են պոպուլյացիայի կրկնապատկման համար պահանջվող ժամանակը կամ *պոպուլյացիայի առաջացման ժամանակը* (g):

$$g = 0.693/\mu:$$

Պոպուլյացիայի առաջացման ժամանակի հակադարձ մեծությունը կոչվում է *աճման արագություն* (K):

$$K = 1/g:$$

Ստացիոնար փուլի համար կարելի է տարբերակել երկու հետաքրքիր պարամետրեր՝ *առավելագույն կենսազանգվածը* (M) և *ելքի գործակիցը* (Y):

M-ը կարելի է հաշվել հետևյալ հավասարմամբ՝

$$M = M_t - M_0,$$

որտեղ M_t-ն կենսազանգվածն է ժամանակի t պահին (այն հաշվարկվում է ստացիոնար փուլում, երբ բջիջների թիվն առավելագույնն է), իսկ M_0-ն՝ նախնական միջավայր ներմուծված կենսազանգվածը: Արդյունքներն արտահայտվում են գրամներով, միլիգրամներով, բջիջ/մլ-ով և այլ չափման միավորներով:

Առավելագույն ելքի գործակիցը կենսազանգվածի այն մասն է, որն առաջանում է միավոր ածխածնի աղբյուրի սպառման հետևանքով և արտահայտվում է հետևյալ բանաձևով՝

$$Y = \frac{\text{Առաջացած կենսազանգված}}{\text{Սպառված ածխածնի աղբյուր}} = \frac{M_t - M_0}{S_0 - S_t},$$

որտեղ S_0-ն միջավայրում առկա ածխածնի նախնական քանակությունն է, իսկ S_t-ն՝ ածխածնի քանակությունը ժամանակի այն t պահին, երբ բջիջների թիվն առավելագույնն է: Արդյունքներն արտահայտվում են հետևյալ միավորներով՝ բջիջներ, գ/ածխածին, գ կամ N^0 բջիջներ/ածխածին, գ:

Բակտերիաների պահպանումը

Բակտերիաների ֆիզիոլոգիական և կենսաքիմիական հայտնի առանձնահատկություններով օժտված շտամների հետ աշխատելու համար կարևոր է դրանց անփոփոխ պահպանումը: Լաբորատորիայում բակտերիաները սովորաբար պահվում են երկար կամ կարճ ժամկետներով: Կարճատև պահպանման համար կարող է օգտագործվել թորած ջուր կամ NaCl-ի 1 %-անոց լուծույթ: Երկարատև պահպանման համար անհրաժեշտ է ապահովել ցածր և գերցածր ջերմաստիճանային պայմաններ, կիրառվում են պարբերական փոխանցանքերը, հանքային յուղերը, լիոֆիլացումը: Սովորաբա, բակտերիական կախույթի վրա կաթեցվում է մանրէազերծ գլիցերոլ, և այդպես այն պահվում է սառցախցիկում -80^{0}C ջերմաստիճանում (*տե՛ս Նկ. 12*): Սառցախցիկի թանգարանից բակտերիայի որևէ շտամ կամ շտամներ վերցնելու դեպքում մանրէազերծ պիպետի ծայրով կրակի շուրջ վերցվում է որոշակի քանակությամբ կախույթ սառը վիճակում և տեղափոխվում պատրաստի պինդ սննդամիջավայր: Որոշակի ժամանակ անց (1-2 օր) առաջացած տեսանելի գաղութներից արվում է փոխացանք, և աճելուց հետո բակտերիաներն օգտագործվում են:

Լաբորատոր առաջադրանք 1

Ֆակուլտատիվ անաերոբ աղիքային ցուպիկի (Escherichia coli) աճեցում

Անհրաժեշտ սարքեր և նյութեր.

1. Թերմոստատ, պիպետներ, կոլբաներ, չափագլան, մագնիսական խառնիչ, կշեռք:
2. Նյութեր՝ *ըստ Աղյուսակ 2*-ի:

Աշխատանքի ընթացքը

Լաբորատոր պայմաններում բակտերիաների աճեցման համար օգտագործվում են տարբեր սննդամիջավայրեր, որոնք, *ըստ կայունության*, լինում են հեղուկ և պինդ: Պինդ միջավայր ստեղծելու համար հեղուկին ավելացնում են 1.5-1.7 % *ագար*, որը ծովային ջրիմուռներից ստացված

պոլիշաքար է: Բակտերիաները պինդ սննդամիջավայրից հեղուկ կամ մեկ այլ պինդ սննդամիջավայր տեղափոխելիս օգտագործում են մանրէաբանական ասեղ (օղակ), որն օգտագործելուց անմիջապես առաջ կրակի վրա մոտ 20-30 վայրկյան շիկացվում է և պինդ սննդամիջավայրում սառեցվում:

Ըստ քիմիական կազմի ՝ առանձնացվում են հայտնի և անհայտ կազմերով սննդամիջավայրեր: Սահմանված կամ հայտնի սննդամիջավայրերի ամբողջ քիմիական կազմը հայտնի է, ինչպիսիք են, օրինակ, M9 նվազագույն աղային, ընտրողական (սելեկտիվ), դիֆերենցիալ կամ ինդիկատոր միջավայրերը, որոնց ստացման ժամանակ օգտագործվում են մաքուր քիմիական միացություններ, և որպես ածխածնի աղբյուր հիմնականում ավելացվում է գլյուկոզ, իսկ որպես ազոտի աղբյուր՝ ամոնիումի աղեր կամ նիտրատներ:

Աղյուսակ 2

Նվազագույն աղային և պեպտոնային միջավայրերի կազմը

Նվազագույն աղային միջավայր	
Նյութի անվանումը	**Քանակությունը**
Na_2HPO_4	6 գ
KH_2PO_4	3 գ
NH_4Cl	1 գ
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$[1]	2 մլ
NaCl	0.5 գ
գլյուկոզ	4 գ
թորած ջուր	1000 մլ

Պեպտոնային միջավայր	
Նյութի անվանումը	**Քանակությունը**
պեպտոն	20 գ
K_2HPO_4	2 գ
NaCl	5 գ
թորած ջուր	1000 մլ

Մայրական լուծույթներ, գ/թորած ջուր, մլ

[1]$MgSO_4$*$7H_2O$ 6.16 գ/ 25 մլ

Անհայտ կազմով սննդամիջավայրի կազմում առկա են համալիր միացություններ, ինչպիսիք են խմորասնկային խտամզվածքը, պեպտոնը, տրիպտոնը և կազեին հիդրոլիզատը, որոնք բազմաթիվ քիմիական միացությունների խառնուրդ են՝ անհայտ չափաբաժիններով: *E. coli*-ն հիմնա-

կանում աճեցվում է նվազագույն աղային և պեպտոնային միջավայրերում: Դրանց կազմը ներկայացված է *Աղյուսակ 2*-ում:

Լուծույթները պատրաստելուց և pH-ը կարգավորելուց հետո միջավայրերը շոգեախտահանվում են 15 րոպե տևողությամբ 121^{0}C ջերմաստիճանում, և, բերելով սենյակային ջերմաստիճանի, անհրաժեշտության դեպքում ավելացվում են ստերիլ ոչ ջերմակայուն նյութերի լուծույթներ: Մանրէազերծ պատրաստի սննդամիջավայրը բակտերիաների ներմուծումից հետո պահվում է թերմոստատում 37^{0}C ջերմաստիճանում:

Լաբորատոր առաջադրանք 2

Խիստ անաերոբ պայմաններում կլոստրիդիաների աճեցում

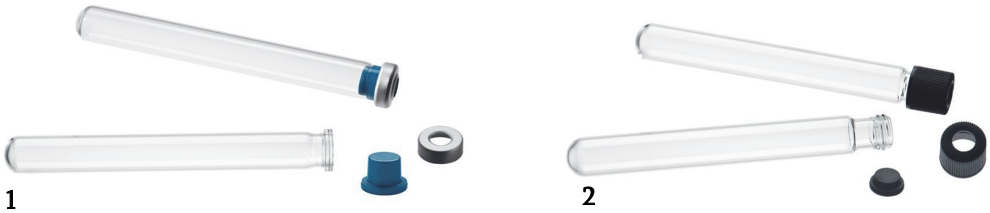
Անհրաժեշտ սարքեր և նյութեր.

1. Թերմոստատ, վակուումային պոմպ, ազոտի գեներատոր:
2. Պիպետներ, կոլբաներ, չափագլան, ներարկիչներ, մագնիսական խառնիչ, կշեռք:
3. Հանգեյթի ամաններ, բութիլային ռետիններ և ալյումինե կաղապարներ:
4. Նյութեր՝ ըստ *Աղյուսակ 3*-ի:

Աշխատանքի ընթացքը

Խիստ անաերոբ բակտերիաներն աճում են ցածր ռեդոքս պոտենցիալ ունեցող միջավայրերում, և դա չի կարող միայն թթվածնի դուրսբերմամբ պայմանավորված լինել, այդ իսկ պատճառով միջավայրին ավելացվում են վերականգնիչներ: Անհրաժեշտ են մանրէազերծ ներարկիչներ, հատուկ տարաներ (Հանգեյթի ամաններ (Hungate tubes) կամ Բալչ տիպի ամաններ (Balch type tubes)) (*Նկ. 14*), որոնք հնարավոր կլինի փակել բութիլային ռետինով և ալյումինե կամ պլաստմասե կաղապարով: Բութիլային ռետինի մեջ գազերի թափանցելիությունը շատ փոքր է: Ներարկիչներն անհրաժեշտ են պատրաստի մանրէազերծ միջավայր լուծույթներ ավելացնելու համար: Միջավայրից թթվածնի դուրսբերման համար հաճախ օգտագործվող գազերն են ազոտը, արգոնը, ջրածինը, ածխածնի երկօքսի-

դը կամ դրանց խառնուրդը: Անաերոբ միջավայր ստանալու համար անհրաժեշտ է փորձառու մասնագետի հսկողությունը: Սկզբում թորած ջրում լուծելով բոլոր նյութերը՝ բացառությամբ ոչ ջերմակայունների (վիտամիններ, օրինակ՝ բիոտին), նստվածք առաջացնող նյութերի (երկկարբոնատներ) և վերականգնիչների (սուլֆիդներ, ցիստեին հիդրոքլորիդ), կարգավորելով pH-ը՝ լուծույթը լցնում են վերջնական տարաների մեջ (10 մլ լուծույթ 20 մլ տարայում):



Նկ. 14. 1. Բալչ տիպի ամաններ, 2. Հանգեյթի ամաններ

Նկ. 15. *Weathon ապրանքանիշի ձեռքի ալյումինե կաղապարների փակող և բացող հարմարանքներ*

Տարաները փակվում են բութիլային ռետինով և ամրացվում ալյումինե կաղապարները փակող հատուկ հարմարանքով (*Նկ. 15*): Վակուումային պոմպով 7-10 րոպե օդը դուրս է մղվում և 2-3 րոպե հագեցվում ազոտով: Այս գործընթացը կրկնվում է 3-5 անգամ: Պատրաստի լուծույթները շոգեախտահանվում են 25 րոպե 121^{0}C ջերմաստիճանում, որի ընթացքում մնացորդային թթվածինը ևս դուրս է գալիս լուծույթից: Եթե pH-ը փոխվել է շոգեախտահանման կամ որևէ ռեագենտի ավելացման հետևանքով, հետագայում անհրաժեշտ է այն կարգավորել:

Ռեսազուրինը կապույտ գունանյութ է, որը միջավայրի օքսիդավերականգնման պոտենցիալի ազդարար է: Վերականգնման դեպքում կապույտ գույնը վերածվում է վարդագույնի, այնուհետև ռեսազուրինը գունազրկվում է -110 մՎ և ավելի ցածր արժեքների դեպքում:

Աղյուսակ 3

Կլոստրիդիաների աճման սննդամիջավայրի կազմը

Նյութի անվանումը	Քանակությունը
K_2HPO_4	1.5 գ
KH_2PO_4	1.5 գ
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$[1]	2 մլ (492 մգ)
L-ցիստեինհիդրոքլորիդ[2*]	0.4 մլ (100 մգ)
$MnSO_4 \cdot H_2O$[3]	0.4 մլ (15 մգ)
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$[4]	0.4 մլ (20 մգ)
ռեսազուրին[5]	1 մլ (1 մգ)
պարաամինաբենզոյաթթու[6]	0.4 մլ (2 մգ)
թիամին-HCl[7*]	մլ (2 մգ)
բիոտին[8*]	2 մլ (0.4 մգ)
խմորասնկային խտամզվածք	0.5 գ
թորած ջուր	1000 մլ

Մայրական լուծույթներ / թորած ջուր

[1]$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	6.16 գ/25 մլ
[2]L-ցիստեինհիդրոքլորիդ	2.5 գ/10 մլ
[3]$MnSO_4 \cdot H_2O$	1.875 գ/50 մլ
[4]$FeSO_4 \cdot 7H_2O$**	0.025 գ/0.5 մլ
[5]ռեսազուրին	0.01 գ/10 մլ
[6]պարաամինաբենզոյաթթու	0.25 գ/50 մլ
[7]թիամին-HCL	4 մգ/4 մլ
[8]բիոտին	0.01 գ/50 մլ

* Պահվում են մանրէազերծ, անթթվածին թորած ջրում, ավելացվում են մանրէազերծ սննդամիջավայրերին:

** Պետք է պատրաստել փորձից անմիջապես առաջ:

Շոգեախտահանումից հետո, բերելով սենյակային ջերմաստիճանի, լուծույթներին ավելացվում են հավելանյութերը և վերականգնիչները, որոնք նախապես պետք է լինեն անաերոբ և մանրէազերծ: Այս նյութերն ավելացնելու համար տարայի վերին հատվածը պետք է մշակվի կրակի մոտ 70 %-անոց սպիրտով, այնուհետև ստերիլ ներարկիչներով է նյութերը տեղափոխվում են: Ցանկացած նյութ ավելացնելու դեպքում տարաները պետք է 180^0-ով շրջել, որպեսզի նյութերը խառնվեն:

Երբ ներարկիչները փակ են, առաջարկվում է օդ պարունակող հատվածը ևս ազոտով հագեցնել օդը դուրս մղելու համար: Առաջնահերթ ուշադրություն է դարձվում ռեսազուրինի գունային փոփոխությանը. և՛ վարդագույն գունավորման դեպքում, և՛ գունազրկված վիճակում ավելացվում է վերականգնիչը՝ L-ցիստեինհիդրոքլորիդը:

Հարկավոր է չափել միջավայրի pH-ը: Փոփոխության դեպքում անհրաժեշտ է այն կարգավորել: Վերջում բակտերիական կախույթը մանրէազերծ ներարկիչներով տեղափոխվում է պատրաստի սննդամիջավայր: Սովորաբար նորմալ կենսազանգված ստանալու համար խիստ անաերոբ բակտերիաներն աճեցվում են 2-5 օր մութ պայմաններում:

Լաբորատոր առաջադրանք 3

E. coli-ի աճման տեսակարար արագության որոշում

Անհրաժեշտ սարքեր և նյութեր.

1. Սպիրտայրոց, ավտոմատ պիպետ, պիպետի ստերիլ ծայրակալներ:
2. Կյուվետներ, սպեկտրալուսաչափ:
3. Բակտերիաների համար պատրաստի մանրէազերծ հեղուկ սննդամիջավայրեր 50 մլ կոլբաներում:
4. 22-24 ժ աճեցված բակտերիական կախույթ:

Աշխատանքի ընթացքը

0.75 մլ բակտերիական կախույթը մանրէազերծումից հետո պիպետի օգնությամբ տեղափոխել 50 մլ պատրաստի հեղուկ սննդամիջավայր, ծածկել կոլբան և լավ խառնել: Նույն պահին որոշակի քանակությամբ լուծույթ լցնել կյուվետի մեջ, փակել կոլբան և դնել թերմոստատի մեջ 37^{0}C-ում: Միացնել սպեկտրալուսաչափը, բացել *Simple reads* ֆայլը և, 600 նմ ալիքի տակ զրոյացնելով ստուգիչ լուծույթը, չափել նմուշը: Որպես ստուգիչ օգտագործել հեղուկ սննդամիջավայրը՝ առանց սուբստրատի: Դատարկել կյուվետը, լավ լվանալ թորած ջրով և դնել թերմոստատի մեջ, որպեսզի չորանա: 30 րոպե անց կրկին կատարել նմուշառում և չափել:

Չափումներն իրականացնել այնքան ժամանակ, մինչև գրաֆիկով հստակ կերևա աճի ստացիոնար փուլը:

Տվյալներն անցկացնել գրանցամատյան, ընտրել աճի էքսպոնենցիալ փուլը և հաշվել աճի տեսակարար արագությունը՝ կիրառելով վերոնշյալ (1) բանաձևը (*տե՛ս Աշխատանք 1*):

Օգտագործված գրականություն

1. **Թոչունյան Ա. Հ., Փանոսյան Հ. Հ., Բազուկյան Ի. Լ., Մարգարյան Ա. Ա., Պոպով Յու. Գ.**, Մանրէաբանության լաբորատոր աշխատանքներ, Եր., ԵՊՀ հրատ., 2014, 316 էջ:
2. **Atlas R. M.**, Handbook of Microbiological Media, Fourth Edition, CRC Press Inc, 2010, 2040 p.
3. **Neidhart F. C., Ingraham J. L. and Schaechter M.,** Prokaryotic physiology in perspective: Physiology of the Bacterial Cell: A Molecular Approach Sunderland, Sinauer Associates, 1990, 506 p.
4. **Reddy C. A., Beveridge T. J., Breznak J. A., Marzluf G.**, Methods for General and Molecular Microbiology, Third Edition, ASM Press, 2007, 1069 p.
5. **Towner K. J., Cockayne A.**, Molecular Methods for Microbial Identification and Typing, Springer Netherlands, 1993, 208 p.

ԱՇԽԱՏԱՆՔ 2
ԲԱԿՏԵՐԻԱՆԵՐԻ ԿՈՂՄԻՑ ՍՆՆԴԱՆՅՈՒԹԵՐԻ ՅՈՒՐԱՑՈՒՄԸ

Բջիջներում ածխաջրերի (օրինակ՝ գլյուկոզ) ճեղքումն իրականանում է խմորման կամ շնչառության միջոցով: Խմորումը և շնչառությունը ճեղքման գործընթացներ են, որոնց հիմնական գործառույթը էներգիայի անջատումն է ԱԵՖ-ի տեսքով:

Խմորումն էլեկտրոնների արտաքին ակցեպտորների բացակայության պայմաններում օրգանական միացությունների օքսիդացման գործընթացն է: Խմորման հիմնական գործառույթը ՆԱԴՀ-ը վերածումն է կոֆերմենտ ՆԱԴ$^+$-ի, որը կրկին կարող է օգտագործվել գլիկոլիզի ընթացքում և հանգեցնել էներգիայի անջատմանն ԱԵՖ-ի մոլեկուլի տեսքով: Շաքարների խմորումը կարող է ընթանալ երեք եղանակով՝ հոմոֆերմենտային (առաջանում են միայն օրգանական թթուներ), հետերոֆերմենտային (առաջանում են օրգանական թթուներ և սպիրտներ) և խառը (առաջանում են օրգանական թթուներ, սպիրտներ և գազեր): Կախված առաջացող վերջնանյութի տեսակից՝ խմորումը կարող է լինել կաթնաթթվային, մրջնաթթվային, քացախաթթվային, սպիրտային և այլն:

Շնչառությունը կենսաքիմիական ռեակցիաների շարք է, որի ընթացքում սննդանյութերն ամբողջությամբ օքսիդանում են էլեկտրոնների արտաքին ակցեպտորների մասնակցությամբ, և տեղի է ունենում էներգիայի անջատում: Շնչառությունն էներգիայի արտադրման գործընթացներից ամենից արդյունավետն ու առաջնայինն է: Հայտնի է բջջային շնչառության երկու տեսակ՝ աերոբ և անաերոբ: Աերոբ շնչառությունն ավելի արդյունավետ է և իրականանում է թթվածնի առկայության դեպքում, մինչդեռ անաերոբ շնչառության համար թթվածին չի պահանջվում: Աերոբ շնչառությունն իրականանում է չորս փուլերով՝ գլիկոլիզ, պիրոխաղողաթթվի օքսիդային դեկարբոքսիլացում, լիմոնաթթվային ցիկլ և օքսի-

դային ֆոսֆորիլացում: Ի տարբերություն աերոբ շնչառության, որի դեպքում էլեկտրոնների վերջնական ակցեպտորը թթվածինն է, անաերոբ շնչառության ժամանակ օգտագործվում են ավելի քիչ օքսիդացնող միացություններ, ինչպիսիք են նիտրատը (NO_3^-), ֆումարատը, սուլֆատը (SO_4^{2-}), ծծումբը (S): Այսպիսի էլեկտրոնների ակցեպտորներն ունեն ավելի քիչ վերականգնողական համարժեքներ, քան թթվածինը, հետևաբար ավելի քիչ էներգիա է անջատվում յուրաքանչյուր օքսիդացող մոլեկուլից (*Աղ. 4*):

Աղյուսակ 4

Որոշ գործընթացների օքսիդավերականգնողական պոտենցիալների արժեքները

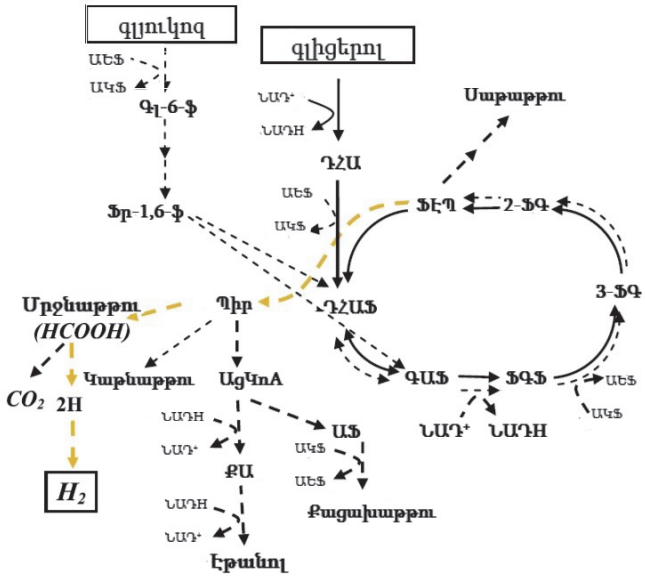
Գործընթացը	Էլեկտրոնի ակցեպտորը	Վերջնանյութը	ՕՎՊ, մՎ
Աերոբ շնչառություն	O_2	H_2O, CO_2	+820
Երկաթի վերականգնում	Fe^{3+}	Fe^{2+}	+750
Նիտրատի վերականգնում՝ դենիտրիֆիկացում	NO^{3-}	N_2	+400
Ֆումարատային շնչառություն	ֆումարատ	սուկցինատ	+30
Սուլֆատային շնչառություն	SO_4^{2-}	HS^-	-220
Ծծմբի վերականգնում	S^0	HS^-	-270

Մննդանյութերի յուրացումը *Escherichia coli* բակտերիայի կողմից

Գլյուկոզի յուրացումը: *E. coli*-ն գրամ-բացասական ֆակուլտատիվ անաերոբ բակտերիա է, կարող է յուրացնել ածխածնի տարբեր աղբյուրներ ածխածին տարբեր աղբյուրներից և իրականացնել խառը խմորում: Գլյուկոզը բջիջ անցնելիս միաժամանակ ֆոսֆորիլացվում է ֆոսֆոտրանսֆերազային համակարգով և առաջացնում գլյուկոզ-6-ֆոսֆատ: Վերջինս գլիկոլիզի հետևանքով ճեղքվում է պիրոխաղողաթթվի երկու մոլեկուլների, ինչն ուղեկցվում է երկու մոլեկուլ ԱԵՖ-ի և երկու մոլեկուլ ՆԱԴՀ-ի առաջացմամբ:

Թթվածնի առկայության դեպքում պիրոխաղողաթթուն ճեղքվում է ացետիլ-ԿոԱ-ի և ածխածնի երկօքսիդի՝ պիրոխաղողաթթուդեհիդրոգենազային համալիրով, այնուհետև ացետիլ-ԿոԱ-ն անցնում է լիմոնաթթվային

ցիկլ: Դա հնարավորություն է տալիս սինթեզելու ավելի շատ ԱԵՖ-ի մոլեկուլներ և վերականգնողական համարժեքներ:



Նկ. 16. *E. coli*-ում գլյուկոզի և գլիցերոլի խմորման գծապատկերը
2-ՖԳ – 2-ֆոսֆոգլիցերինաթթու, 3-ՖԳ – 3-ֆոսֆոգլիցերինաթթու, ԱցԿՈԱ – ացետիլ-կոֆերմենտԱ, ԱԿՖ – ադենոզինկրկնաֆոսֆորաթթու, ԱԵՖ – ադենոզինեռֆոսֆորաթթու, ԴՀԱ – դիհիդրօքսիացետոն, ԴՀԱՖ – դիհիդրօքսիացետոնֆոսֆորաթթու, ԳԱՖ – գլիցերալդեհիդ-3-ֆոսֆորաթթու, ՆԱԴՀ – դիհիդրոդիֆոսֆոպիրիդիննուկլեոտիդ, ՆԱԴ+ – դիֆոսֆոպիրիդիննուկլեոտիդ, ՖԳՖ – 1.3-դիֆոսֆոգլիցերինաթթու, Գլ-6-Ֆ – գլյուկոզ-6-ֆոսֆորաթթու, Ֆր-1.6-Ֆ – ֆրուկտոզ-1.6-դիֆոսֆորաթթու, ԱՖ – ացետիլֆոսֆորաթթու:

Թթվածնի բացակայության դեպքում տեղի է ունենում խմորում: 1 մոլեկուլ գլյուկոզից առաջանում են (*տե՛ս Նկ. 16*)՝

1. 2 մոլեկուլ էթանոլ, ինչի համար ծախսվում է 2 մոլեկուլ ՆԱԴՀ + H^+,

2. 2 մոլեկուլ սաթաթթու, ինչի համար ծախսվում է 4 մոլեկուլ ՆԱԴՀ + H^+ (ֆոսֆոենոլպիրոխաղողաթթվից պիրոխաղողաթթու անցում տեղի չի ունենում, հետևաբար 1 մոլեկուլ ԱԵՖ չի սինթեզվում),

3. 2 մոլեկուլ կաթնաթթու, ինչի համար ծախսվում է 2 մոլեկուլ ՆԱԴՀ + H^+,

4. 2 մոլեկուլ քացախաթթու, ինչի հետևանքով սինթեզվում են 2 մոլեկուլ ԱԵՖ և 2 մոլեկուլ ՆԱԴH + H^+,

մրջնաթթու, որը կարող է դուրս բերվել բջջից կամ մասամբ ճեղքվել H_2-ի և CO_2-ի:

Գլիցերոլի յուրացումը: Գլիցերոլի մուտքը բջիջ իրականանում է GlpF ակվագլիցերապորինով: Այն բարձր ընտրողականությամբ անցքուղի է և իրականացնում է գլիցերոլի տրանսթաղանթային դիֆուզիան:

Գլիցերոլի խմորումն իրականանում է երկու ուղիով: Առաջինի դեպքում գլիցերոլը վերածվում է երկհիդրօքսիացետոնֆոսֆատի, որը մասնակցում է գլիկոլիզի ռեակցիաներին, այսինքն՝ գլիցերոլի խմորման ուղիները և գլիկոլիզը փոխկապակցված: Բայց, ի տարբերություն գլիկոլիտիկ ուղիների, գլիցերոլի խմորման ուղիներն ունեն եզակի ռեակցիաներ ֆոսֆոէնոլպիրոխաղողաթթվից պիրոխաղողաթթվի առաջացման փուլում, որն առաջանում է ցիկլի ուղիով: Գլիցերոլի խմորման ժամանակ առաջանում են հիմնականում նույն վերջնանյութերը, ինչ գլյուկոզի յուրացման դեպքում, սակայն տարբեր հարաբերակցությամբ՝ կախված միջավայրի արտաքին պայմաններից (*տե՛ս Նկ. 16*):

Գլիցերոլի անթթվածին խմորման մյուս ուղին 1,2-պրոպանդիոլայինն է: Գլիցերոլի բարձր վերականգնողական ունակությունը կարևոր է խմորման ժամանակ օքսիդավերականգնողական գործընթացներում:

Լակտոզի յուրացումը: Լակտոզի մուտքը բջիջ իրականանում է լակտոզպերմեազ ֆերմենտի միջոցով: Լակտոզը բջջում β-գալակտոզիդազ ֆերմենտի միջոցով ճեղքվում է գլյուկոզի և գալակտոզի: Վերջինը վերածվում է գլյուկոզի, և տեղի են ունենում գլիկոլիտիկ հաջորդական ռեակցիաները:

E. coli-ի գենոմում կոդավորված են տարբեր դեհիդրոգենազներ և ծայրային (ծայրամասային) ռեդուկտազներ՝ անաերոբ շնչառության համար: Այսպիսի ֆերմենտների սինթեզն ընթանում է թթվածնի բացակայության պայմաններում, և պահանջվում են համապատասխան սուբստրատներ: Անկախայն բանից, թե որ ֆերմենտներն են գործում, էլեկտրոն տեղափոխող շղթան առաջացնում է պրոտոնաշարժ ուժ, որն օգտագործվում է ԱԵՖ-ի սինթեզի և էներգիայի ծախս պահանջող գործընթացների համար: *E. coli*-ի կազմում կան առնվազն հինգ միացություններ, որոնք անաերոբ

պայմաններում կարող են գործել որպես էլեկտրոնների ակցեպտորներ: Դրանք են՝ նիտրատ, նիտրիդ, եռմեթիլամին-N-օքսիդ, երկմեթիլսուլֆօքսիդ և ֆումարատ:

Լաբորատոր առաջադրանք 1
E. coli բակտերիաների աճման ընթացքում ելանյութերի և խմորման հետևանքով առաջացող վերջնանյութերի որակական և քանակական որոշումը ԲԿՀՔ մեթոդով

Քրոմատագրաֆիան լաբորատոր վերլուծական մեթոդներից է, որը հիմնականում օգտագործվում է նյութերի խառնուրդում առկա առանձին բաղադրիչների բաժանման համար: Գոյություն ունեն քրոմատագրաֆիայի տարբեր ձևեր՝ հեղուկային, գազային, իոնափոխանակային և աֆինային, որոնք գործում են նույն սկզբունքներով:

Քրոմատագրաֆիան լինում է նախապատրաստական և վերլուծական: Նախապատրաստական քրոմատագրաֆիայի նպատակն է առանձնացնել խառնուրդի բաղադրիչները հետագա օգտագործման համար: Վերլուծական քրոմատագրաֆիան ենթադրում է փոքր քանակությամբ նյութերի հայտնաբերում կամ խառնուրդում նյութերի հարաբերական քանակության չափում:

Քրոմատագրաֆիայում կիրառվող հիմնական եզրույթներն են.

Շարժուն փուլ (ֆազ) կամ կրիչ (*Mobile phase, Carrier*) – այն ֆազն է, որը շարժվում է մեկ ուղղությամբ: Այն կարող է լինել հեղուկ կամ գազ: Շարժուն ֆազը բաղկացած է լուծիչից և աշտարակում դրա հետ շարժվող նմուշից:

Կայուն ֆազ կամ ադսորբենտ – նյութ, որը կովալենտ կապով կապված է այլ հենքային մասնիկների կամ աշտարակի պատի ներքին մակերևույթին:

Նյութ (*Analyte*) – քրոմատագրաֆիայի հետևանքով առանձնացվող նյութ:

Քրոմատագիր կամ քրոմատագրամ (*Chromatogram*) – քրոմատագրաֆիայի տեսանելի արդյունք: Լավագույն բաժանման դեպքում տարբեր գա-

գագաթներ (*Peaks*) համապատասխանում են խառնուրդում տարբեր բաղադրիչների: Աբսցիսների առանցքի վրա պատկերվում է պահման ժամանակը (*Retention time*), իսկ օրդինատների առանցքի վրա՝ ազդանշանը (*Signal*), որը ստացվել է սպեկտրալուսաչափի կամ այլ դետեկտորների միջոցով: Յուրաքանչյուր ազդանշան համամասնական է առանձին նյութերի քանակներին:

Էլյուատ (***Eluate***) – աշտարակից դուրս եկող շարժուն ֆազ:

Էլյուենտ (***Eluent***) – լուծիչ, որում գտնվում է նյութը:

Նմուշ (***Sample***) – քրոմատագրաֆիայում հետազոտվող նյութ: Այն կարող է լինել առանձին բաղադրիչ կամ բաղադրիչների խառնուրդ:

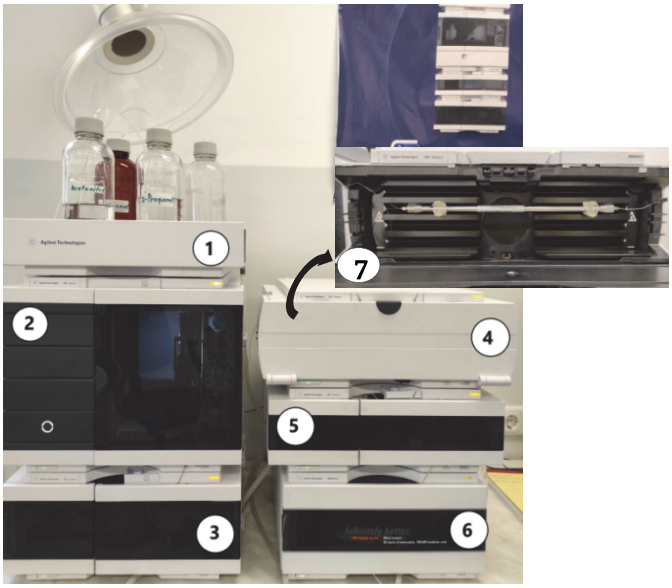
Դետեկտոր (***Detector***) – սարք, որն օգտագործվում է տարանջատումից հետո նյութերի որակական և քանակական հայտնաբերման համար:

Հեղուկային քրոմատագրաֆիան (ՀՔ, *Liquid chromatography, LC*) խառնուրդից նյութերի անջատման եղանակ է, որում շարժուն ֆազը հեղուկ է: Ներկայումս հեղուկային քրոմատագրաֆիան, որը բաժանում է շատ փոքր մասնիկներ հարաբերականորեն բարձր ճնշման պայմաններում, անվանում են *բարձր կատարողականության հեղուկային քրոմատագրաֆիա* (ԲԿՀՔ, *High-performance liquid chromatography, HPLC*): ԲԿՀՔ-ի դեպքում նմուշը հեղուկի (շարժուն ֆազի) բարձր ճնշման ազդեցությամբ անցնում է աշտարակի երկայնքով, որը լցված է կայուն ֆազով: Վերջինս բաղկացած է գնդաձև կամ անկանոն մակերևույթով մասնիկներից, ծակոտկեն միաձույլ շերտից կամ թաղանթից: Ըստ շարժուն և կայուն ֆազերի բևեռականության՝ տարբերում են հեղուկային քրոմատագրաֆիա, որի դեպքում կայուն ֆազն է ավելի բևեռային, և հակադարձ ֆազի հեղուկային քրոմատագրաֆիա, որի դեպքում էլ շարժուն ֆազն է ավելի բևեռային:

Agilent 1260 Infinity HPLC քրոմատագիր (*Նկ. 17*): Հիմնական կառուցվածքային մասերն են՝

- ***լուծիչների պահոց*** (***Solvent cabinet***), որտեղ պահվում են 4 տարաներ՝ լցված հեղուկներով և կապված ԲԿՀՔ համակարգին լուծիչների խողովակներով,

- ***ինքնանմուշառիչ*** (***Autosampler***), որն ապահովում է նմուշների հերթական ներարկումը,
- ***քառակի պոմպ*** (***Quaternary pump***), որն առաջացնում է գրադիենտ ցածր ճնշման միջոցով՝ խառնելով 4 տարբեր լուծիչներ,
- ***աշտարակ, ջերմակարգավորվող խցիկ*** (***Thermostated column compartment***), որն օգտագործվում է տաքացման կամ սառեցման համար, որպեսզի բարելավվեն պահման ժամանակիպայմանները,
- ***դետեկտոր*** (**դիոդ համախմբող** (***Diode array detector, DAD***) **և բեկման ցուցիչ** (***Refractive index detector, RID***)), որի միջոցով լույսի սպեկտրի կլանման կամ բեկման հետևանքով առաջացած ազդանշանները նմուշառվում են, ապա վերածվում էլեկտրական ազդանշանների, որպեսզի ցուցադրվեն համակարգչային ծրագրում:



Նկ. 17. *Բարձր կատարողականության հեղուկային քրոմատագրամ*

1. *լուծիչների պահոց,*
2. *ինքնանմուշառիչ*
3. *քառակի պոմպ,*
4. *ջերմակարգավորվող խցիկ,*
5. *դետեկտոր (դիոդ համախմբող, DAD),*
6. *դետեկտոր (բեկման ցուցիչ, RID),*
7. *աշտարակ*

Սարքը պետք է օգտագործել հետևյալ կերպ. միացնել համակարգիչը, ապա՝ ԲԿՀՔ բոլոր բաղադրիչները և համակարգչային *online* ծրագիրը, որում առանձնացված են ԲԿՀՔ առանձին բաղադրիչները կարգավորող պատուհաններ: Տալ մեթոդին համապատասխան կարգավորումները: Ներարկվող նմուշների հաջորդականությունը սահմանելու համար բացել *Sequence*, ապա՝ *Sequence Table* պատուհանը: Համապատասխան գործիքների կիրառմամբ սահմանել նմուշների հաջորդականությունը և սեղմել *OK*: Փորձն սկսել միայն այնդեպքում, երբ աշտարակը հագենում է շարժուն ֆազով, նսարքը պատրաստ է լինում:

Գազային քրոմատագրաֆիան (ԳՔ, *Gas Chromatography, GC*)՝ որպես քրոմատագրաֆիայի տեսակ, օգտագործվում է գազերի և այն նյութերի տարանջատման համար, որոնք ցնդում են բարձր (300^{0}C և ավել) ջերմաստիճանում՝ առանց տարրալուծման: ԳՔ-ում շարժուն ֆազը կրիչ գազն է, որը սովորաբար լինում է իներտ, օրինակ՝ հելիում, կամ ոչ ռեակցիոնունակ, օրինակ՝ ազոտ:

ԳՔ-ի 3 հաջորդական փուլերն են՝

1. նմուշի *ներարկում (Injecting)* ԳՔ-ի մեջ,
2. նմուշի *առանձնացում (Separating)* առանձին բաղադրիչների, որը տեղի է ունենում աշտարակում,
3. նմուշում առանձնացված նյութերի *հայտնաբերում (Detecting)* դետեկտորի միջոցով:

Agilent 7820A քրոմատաչափի (Gas Chromatography, GC քրոմատաչափ, *Նկ. 18*) հիմնական կառուցվածքային մասերն են.

- ***Ներարկման տեղամասեր (Inlets)***, որոնց մեջ նմուշը ներարկվում է հատուկ ներարկիչի միջոցով (ձեռքով կամ ավտոմատ ներարկիչ): *Agilent 7820A* տեսակի քրոմատաչափում կան ներարկման 2 տեղամասեր՝ առջևի (*Front*) և հետևի (*Back*):
- ***Աշտարակ (Column)*** և ***վառարան (Oven)***: Աշտարակը գտնվում է ջերմաստիճանը կառավարող վառարանում:: Տարբերում են աշտարակների երկու հիմնական տեսակներ՝ բաց գլանաձև աշտարակներ (*Open tubular columns*), որոնք հայտնի են նաև որպես մազանոթային աշտարակներ, և փաթեթավորված աշտարակներ (*Packed column*): Վերջինները պա-

ռունակում են իներտ, մանր մասերի բաժանված պինդ օժանդակող նյութեր (հիմնականում դիատոմային մնացորդ), որոնք պատված են հեղուկ կայուն ֆազով: Փաթեթավորված աշտարակները սովորաբար ունենում են 1.5-30 մետր երկարություն և 2-4 մմ ներքին տրամագիծ, իսկ մազանոթային աշտարակների երկարությունը կարող է հասնել մի քանի տասնյակի: Մազանոթային աշտարակները լինում են երկու տիպի. առաջինը *Wall-coated open tubular* (*WCOT*) աշտարակն է, իսկ երկրորդը՝ *Support-coated open tubular*-ը (*SCOT*): WCOT աշտարակներն ամբողջ երկայնքով պատված են հեղուկ կայուն ֆազի բարակ շերտով, իսկ SCOT աշտարակի պատերը հիմնականում պատված են մոտավորապես 30 մկմ հաստությամբ ադսորբենտով, որի հիմնական բաղադրիչներն են դիատոմային ջրիմուռների կամ ծովային բույսերի մնացորդները, և որի վրա էլ ադսորբվում է կայուն ֆազը: WCOT աշտարակներն ավելի արդյունավետ են, քան SCOT աշտարակները: Ընդհանուր առմամբ մազանոթային աշտարակների երկու տեսակներն էլ առավել արդյունավետ են, քան փաթեթավորված աշտարակները: Վառարանի միջոցով աշտարակում ապահովվում է հաստատուն ջերմաստիճան:

- ***Դետեկտորներ (Detectors)***, որոնք նույնականացնում են աշտարակ ներարկված միացությունները: Երբ միացությունը հայտնվում է դետեկտորի մեջ, ստեղծվում է նրա քանակությանը համապատասխան էլեկտրական ազդանշան, որը տեղափոխվում է տվյալների վերլուծության համակարգ (Agilent ChemStation) և քրոմատագրամում գրանցվում է կորերի տեսքով: Առավելագույնը կարող է լինել երկու դետեկտոր՝ առջևի (*Front*) և հետևի (*Back*): Այս տիպի քրոմատագրամում կարող են օգտագործվել բազմաթիվ դետեկտորներ՝ բոց-իոնացման (Flame-ionization, FID), ջերմահաղորդականության (Thermal Conductivity, TCD), ազոտ-ֆոսֆորային (Nitrogen Phosphorous, NPD), բոց-ֆոտոչափ (Flame Photometric, FPD), միկրոէլեկտրոն կապող (Micro-Electron Capture, μECD) և տարրընտրողական (Mass Selective, MSD): Կախված առաջադրված խնդրի պահանջներից՝ ընտրվում են համապատասխան դետեկտորները: Կան նաև այլ դետեկտորներ, ինչպիսիք են՝ ատոմառաջացման (Atomic Emmision, AED), ֆոտոիոնացման (Photoionization, PID) և այլն (Աղ. 5):

Աղյուսակ 5

Քրոմատաչափի որոշ դետեկտորների բնութագրերը

Դետեկտորի տեսակը	**Կիրառվող նմուշները**	**Որոշման սահմանը, պկգ**
MSD	Կարգավորվող է ցանկացած նմուշի համար	0.25-100
FID	Ածխաջրածիններ	1
TCD	Ունիվերսալ	500
ECD	Հալոգենացված ածխաջրածիններ	5
AED	Ընտրողական տարրի նկատմամբ	1
PID	Գոլորշի և գազային միացություններ	0.002-0.02

- ***Գործառնական վահանակ***, որը կազմված է էկրանից (ցույց է տալիս սարքի՝ տվյալ պահի վիճակը), կարգավիճակի լույսերից (*Run* և *Not ready*) և ստեղնաշարից (*Stop, Prep run, Start*, սլաքներ):

Նկ. 18. *Գազային քրոմատագրամ*
1. ներարկման տեղամասեր,
2. աշտարակ և վառարան, 3. գործառնական վահանակ

Լաբորատոր առաջադրանք 2
Խմորման հավասարակշռության որոշում

Խմորման հավասարակշռությունը խմորման հիմնական բնութագրիչներից է: Ածխածնի հավասարակշռությունը որոշելու համար ընտրվում են երկու տարբեր ժամեր (A և B, որտեղ A < B) և հաշվվում ածխածնի քանակությունը (C, մՄ): Հավասարակշռությունը՝ արտահայտվում է %-ով, որտեղ 100 %-ը համարվում է A ժամում ածխածնի ընդհանուր քանակը:

Ածխածնի հավասարակշռության որոշումը մանրէների ֆիզիոլոգիայի ուսումնասիրության հիմքն է և նախադրյալ՝ կիրառական տեսանկյունից հասնելու արտադրանքի բարձր ելքի:

Լաբորատոր առաջադրանք 3
Ածխածնի փոխակերպման ունակության որոշում

ԲԿՀՔ-ի միջոցով ստացված տվյալներն օգտագործվում են նյութափոխանակային մի շարք գործընթացներ նկարագրելու և կարգավորելու համար: Դրանցից է ածխածնի փոխակերպման ունակությունը (ԱՓՈԻ, Carbon Conversion Efficiency, CCE): Այն որոշվում է հետևյալ բանաձևով՝

$$\text{ԱՓՈ}_{\text{ւ}} = \frac{\Delta C_2}{\Delta C_1} \text{ x } 100\%,$$

որտեղ ΔC_1-ը աճման տվյալ ժամանակահատվածում սուբստրատի ածխածնի խտությունների տարբերությունն է (մՄ), իսկ ΔC_2-ը՝ աճման նույն ժամանակահատվածում խմորման արգասիքի ածխածնի խտությունների տարբերությունը (մՄ):

Լաբորատոր առաջադրանք 4
Խմորման ընթացքում ելանյութի յուրացման և վերջնանյութի առաջացման արագության որոշում

Նյութափոխանակության կարևոր բնութագրիչներից են նաև ելանյութի յուրացման արագությունը ($R_{\text{յուր}}$) և վերջնանյութի առաջացման ($R_{\text{արտ}}$ –

արտադրման արագությունը) արագությունը: Դրանք հաշվվում են հետևյալ բանաձևերով՝

$$R_{\text{յուր}} = \frac{C_1 - C_2}{t_2 - t_1} \quad \text{և} \quad R_{\text{արտ}} = \frac{C_2 - C_1}{t_2 - t_1},$$

որտեղ C_1-ը գործընթացի սկզբում ելանյութի կամ վերջնանյութի խտությունն է (մմոլ), C_2-ը՝ պրոցեսի վերջում ելանյութի կամ վերջնանյութի խտությունը (մմոլ), t_1-ը ելանյութի յուրացման կամ վերջնանյութի առաջացման սկիզբն է (ժ), իսկ t_2-ը՝ ելանյութի սպառման կամ վերջնանյութի առաջացման ավարտը (ժ):

Լաբորատոր առաջադրանք 5
Խմորման վերջնանյութի ելքի որոշում

Վերջնանյութերի ելքը որոշվում է հետևյալ բանաձևով՝

$$Y = \frac{C_1}{C_2} \text{ x } 100\ \%,$$

որտեղ C_1-ը վերջնանյութի քանակությունն է (մՄ), իսկ C_2-ը՝ յուրացված ելանյութի (մՄ): Վերջնանյութերի ելքը 1 մոլ ելանյութից ստացված վերջնանյութի քանակությունն է: Վերջնանյութի առաջացման ՕԳԳ-ն հաշվվում է Y-ի և տեսականորեն ստացվող վերջնէանյութի քանակությանհարաբերությամբ:

Անհրաժեշտ սարքեր և նյութեր.

1. Սարքեր և նյութեր՝ նախատեսված բակտերիաների աճեցման համար:
2. Լամինար պահարան, թերմոստատ, կշեռք, ցենտրիֆուգ:
3. Մանրէազերծ պիպետներ, մանրէաբանական ասեղ, սրվակներ, փորձանոթներ, բաժակներ, էպենդորֆներ, ստերիլ ֆիլտրեր (0.2 մկմ):
4. ԲԿՀՔ, C18 աշտարակ, RI և DA դետեկտոր:
5. Տրամաչափման համար անհրաժեշտ նյութերի (գլյուկոզ, մրջնաթթու, սաթաթթու, քացախաթթու, կաթնաթթու, էթանոլ և այլն) 1 մՄ, 5 մՄ, 10 մՄ խտությամբ լուծույթներ՝ լուծված մեթոդին համապատասխան շարժուն ֆազի լուծիչում, խիտ H_2SO_4 և 0.005 Մ H_2SO_4՝ լուծված երկթորած ջրում, ացետոնիտրիլ:

Աշխատանքի ընթացքը

***E. coli*-ի աճեցման ընթացքում նմուշառում և նախապատրաստում**

Նախապես աճեցված *E. coli* բակտերիաների գիշերային լուծույթից 1.5 % բակտերիական կախույթը տեղափոխել անաերոբ սննդային միջավայր: 1 մլ նմուշ տեղափոխել էպենդորֆի մեջ: Բակտերիաներն աճեցնել 37^{0}C ջերմաստիճանում, իսկ վերցված նմուշները պահել սառնարանում՝ -20^{0}C ջերմաստիճանում, եթե չափումն իրականացվելու է ավելի ուշ: Նմուշառումը կատարել պարբերաբար՝ կախված առաջադրված խնդրի պայմաններից:

Հավաքված նմուշները ցենտրիֆուգել 3000 g արագացմամբ, նստվածքը ֆիլտրել 0.22 մկմ ոչ ստերիլ թաղանթային ֆիլտրով՝ բակտերիաների առկայությունը բացառելու համար: Յուրաքանչյուր նմուշում ավելացնել 0.005 Մ վերջնական խտությամբ H_2SO_4 (նմուշները պետք է լուծված լինեն շարժուն ֆազի միջավայրում):

Նյութերի որակական և քանակական որոշում ԲԿՀՔ մեթոդով

Բաղադրիչ նյութերը առանձնացվում են աճման միջավայրի խառնուրդից C18 աշտարակի միջոցով: Աշտարակը նախապես լվանալ ացետոնիտրիլի և երկթորած ջրի լուծույթով՝ 80/20 հարաբերությամբ, 60^{0}C ջերմաստիճանում, այնուհետև հագեցնել փորձի շարժուն ֆազով (0.005 Մ H_2SO_4) 1-1.5 ժամ 1 մլ/ր հոսքի արագությամբ: Ածխաջրերը և սպիրտները որոշվում են RI դետեկտորով՝ դրված դրական բևեռականության վրա 55^{0}C ջերմաստիճանում, իսկ օրգանական թթուները որոշվում են RI և/կամ DA դետեկտորներով 210 նմ երկարությամբ ալիքի տակ:

10 մկլ ծավալով նմուշը ներարկվում է աշտարակ ինքնանմուշառիչի միջոցով: Աշտարակի ջերմաստիճանը՝ 60^{0}C, պահպանվում է ջերմակարգավորվող խցիկի միջոցով: Նյութերը հոսում են 0.005 Մ H_2SO_4-ով 0.4 մլ/ր հոսքի արագությամբ 20 ր (ստանդարտ նմուշների դեպքում)[1] կամ 42 ր (փորձնական նմուշների դեպքում):

[1] Տրամաչափումն իրականացնել այնքան, մինչև ստացված տվյալներով կառուցված կորի $R^2 \geq 0.95$:

Ստացված քրոմատագրամները վերլուծվում են Agilent OpenLAB CDS համակարգչային ծրագրով: Նյութերի որակական և քանակական որոշումն իրականացվում է նախապես որոշված ստանդարտ նմուշների պահման ժամանակին և կորի արեային համապատասխան:

E. coli BW 25113 բակտերիաներն աճեցվել են բարձր բուֆերային պեպտոնային միջավայրում, որի pH = 7.5, և որպես ածխածնի աղբյուր ավելացվել է միայն գլյուկոզ՝ 11.1 մՄ վերջնական խտությամբ: Աճեցման ընթացքում պարբերաբար վերցվել են նմուշներ, որոնցում որոշվել է ելանյութի՝ գլյուկոզի և վերջնանյութերի՝ քացախաթթվի, կաթնաթթվի, մրջնաթթվի, սաթաթթվի և էթանոլի քանակությունը (*Աղ. 6*):

Աղյուսակ 6

E. coli BW 25113 բակտերիաների աճեցման ընթացքում ելանյութի և վերջնանյութերի քանակությունն ըստ կուլտիվացման ժամերի:

Ժամ	Գլյուկոզ (մՄ)	Քացախաթթու (մՄ)	Կաթնաթթու (մՄ)	Մրջնաթթու (մՄ)	Սաթաթթու (մՄ)	Էթանոլ (մՄ)
0	10.882	3.193	1.429	0.419	1.067	6.316
1	7.599	2.665	1.319	0.900	1.729	3.913
2	7.527	3.101	1.413	0.705	1.928	4.352
3	6.808	3.753	1.425	1.112	2.174	4.656
4	4.310	5.705	1.274	3.621	2.343	6.015
5	2.100	8.801	1.531	7.623	2.909	9.775
6	0.076	8.597	1.407	9.239	3.046	10.594
7	0.064	9.332	1.386	10.197	3.105	11.282
8	0.054	10.026	1.446	9.546	3.147	12.306
24	0.040	8.514	0.854	7.640	2.919	11.120
48	0	8.745	0.450	6.792	2.860	11.478
72	0	9.105	0.151	6.531	3.118	10.395

1. Հաշվել խմորման հավասարակշռությունը 24 ժամ անց՝ ***ըստ առաջադրանք 1.1-ի***:

2. Որոշել գլյուկոզի՝ քացախաթթվի, կաթնաթթվի, մրջնաթթվի, սաթաթթվի և էթանոլի փոխակերպման ունակությունը՝ ***ըստ առաջադրանք 1.2-ի***: Բացատրել տարբեր վերջնանյութերի դեպքում գլյուկոզի փոխակերպման ունակության դրսևորման տարբերությունները:

3. Որոշել գլյուկոզի յուրացման և վերջնանյութերի առաջացման ա-րագությունները՝ ***ըստ առաջադրանք 1.3-ի***: Բացատրել վերջնանյութերի առաջացման արագությունների տարբերությունները:

4. Որոշել վերջնանյութերի ելքը՝ ***ըստ առաջադրանք 1.4-ի***:

Օգտագործված գրականություն

1. Agilent 1260 Infinity Quaternary LC, System Manual and Quick Reference, Agilent Technologies Hewlett-Packard-Strasse 8 76337 Waldbronn, Printed in Germany 06/2010, Manual Part Number G1311-90300.
2. Agilent 7820A Gas Chromatograph, Operating Guide, Agilent Technologies, Inc. 412 Ying Lun Road Waigoaqiao Freed Trade Zone Shanghai 200131 P.R.China, Third edition, June 2011, Manual Part Number G4350-90012.
3. **Berenjian A.**, Essentials in fermentation technology, Springer, 2020, 313 p.
4. **El-Manis E. M. T., Nielsen J., Mousdale D., Carlson R. P.**, Fermentation Microbiology and Biotechnology, CRC Press; 4th edition, 2019, 440 p.
5. **Fanali S., Haddad P. R., Poole C., Riekkola M. L.**, Liquid chromatography, Elsevier 2nd edition, 2017, 808 p.
6. **McNair H. M., Miller J. M., Snow N. H.**, Basic gas chromatography, John Wiley & Sons, 2009, 233 p.
7. **Snyder L. R., Kirkladn J. J.**, Introduction to modern liquid chromatography, John Wiley & Sons 3rd edition, 2009, 960 p.

ԱՇԽԱՏԱՆՔ 3
ԽՄՈՐՄԱՆԸ ՄԱՍՆԱԿՑՈՂ ՖԵՐՄԵՆՏՆԵՐԻ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅՈՒՆԸ

Խմորման ռեակցիաներին մասնակցում են տարբեր ֆերմենտներ: Յուրաքանչյուր ֆերմենտ ունի ֆերմենտների դասակարգման համար (Enzyme Commission number, EC number), որը որոշվում է ըստ դրա կողմից կատալիզվող ռեակցիայի տիպի:

Լաբորատոր առաջադրանք 1
Հեքսակինազի ակտիվության որոշում

Հեքսակինազը (EC համար՝ 2.7.1.1, ՀԿ) կատալիզում է հետևյալ ռեակցիան՝

D-հեքսոզ + ԱԵՖ <==> D-հեքսոզ-6-ֆոսֆատ + ԱԿՖ:

Ունի մի քանի իզոֆերմենտներ: Ակտիվության բարենպաստ pH-ը 7.5-9 է: Ակտիվությունն արգելակվում է այն միացություններով, որոնք կարող են կապվել –SH խմբերի հետ: Այն խթանվում է Mg^{2+} իոններով:

Հեքսակինազի ակտիվության որոշման փորձը հիմնված է $ՆԱԴ^+$-ի վերականգնման վրա, ինչը զուգորդվում է գլյուկոզ-6-ֆոսֆատդեհիդրոգենազ (Գ-6-ՖԴՀ) ռեակցիայի հետ և չափվում է սպեկտրալուսաչափիչ մեթոդով՝ ցույց տալով կլանման փոփոխությունը 340 նմ երկարությամբ ալիքի ներքո:

$$\text{D-գլյուկոզ} + \text{ԱԵՖ} \xrightarrow{\text{ՀԿ}} \text{գլյուկոզ-6-ֆոսֆատ} + \text{ԱԿՖ},$$

$$\text{գլյուկոզ-6-ֆոսֆատ} + ՆԱԴ^+ \xrightarrow{\text{Գ-6-ՖԴՀ}} \text{գլյուկոնատ-6-ֆոսֆատ} + ՆԱԴH + H^+:$$

Ակտիվության միավորն է 1 մկմոլ $ՆԱԴ^+$-ի վերականգնումը 1 րոպեում 30^0C-ում pH = 8.0-ի դեպքում:

Անհրաժեշտ սարքեր և նյութեր.

1. Սարքեր և նյութեր՝ նախատեսված բակտերիաների աճեցման և կենսազանգվածի ստացման համար:

2. Ջերմակարգավորվող խցիկ, լամինար պահարան, ցենտրիֆուգներ, իոնաչափիչ սարք, սպեկտրալուսաչափ, կյուվետներ, սիլիկոնե խցաններ, ավտոմատ պիպետներ:

3. 0.05 Մ տրիս-HCl բուֆեր (pH = 8), որում լուծված է 13.3 մՄ $MgCl_2$, 0.67 Մ, 16.5 մՄ ԱԵՖ և 6.8 մՄ $ՆԱԴ^+$՝ լուծված վերը նշված տրիս-$MgCl_2$ -բուֆերում:

$ՆԱԴ^+$-ը կարող է լինել աղի տեսքով կամ տարբեր աստիճանների հիդրատացված: Պետք է ուշադիր լինել զանգվածը ճիշտ որոշելու համար:

Բջջային լուծամզվածքը լուծել տրիս-$MgCl_2$ բուֆերում (pH = 8):

Աշխատանքի ընթացքը

Պատրաստել սննդամիջավայր, ավտոկլավել այն և կուլտիվացնել բակտերիաների բջիջները 22-24 ժամ 37^0Cջերմաստիճանում:

Ցենտրիֆուգել կախույթը 10 րոպե 3000-5000 g արագացմամբ և պոկել թորած ջրով: Նորից ցենտրիֆուգել 10 րոպե 3000-5000 g արագացմամբ և, կախված քանակությունից, պոկել 300-500 մկլ տրիս-$MgCl_2$ բուֆերով, ստանալ խիտ բակտերիական կախույթ, լցնել էպենդորֆի մեջ ու կատարվելիք փորձի ողջ ընթացքում թողնել սառույցի մեջ:

Բակտերիաների բջիջները կոտրել *BRANSON* ապրանքանիշի ուլտրաձայնային դեզինտեգրատորով՝ ըստ հետևյալ բնութագրիչների՝ *Pulse*; J 0.0005վրկ (*on*) – 0.0005 վրկ (*off*); 15 W, *Total (on)* – 2-4 րոպե (*Նկ. 20*):

Որոշել բջջային լուծամզվածքում պարունակվող սպիտակուցի քանակությունը Լոուրիի կամ Բրեդֆորդի մեթոդներով (մգ/մլ) (տե՛ս Հավելված 1): Օպտիկական խտության ստացված արժեքը տեղադրել ալբումինի տրամաչափիչ կորից ստացված բանաձևի մեջ:

Միացնել և կարգավորել սպեկտրալուսաչափը (ալիքի երկարությունը՝ 340 նմ) 30^0C-ում: Կյուվետի մեջ հաջորդաբար լցնել ստորև նշված նյութերը:

Նյութի անվանումը	Քանակությունը
Տրիս-$MgCl_2$ բուֆեր	2.28 մլ
Գլյուկոզ, 0.67 Մ	0.50 մլ
ԱԵՖ, 16.5 մՄ	0.10 մլ
$ՆԱԴ^+$, 6.8 մՄ	0.10 մլ
Գ-6-ՖԴՀ	0.01 մլ

Կյուվետի ամբողջ պարունակությունը ինկուբացնել սպեկտրալուսաչափում 30^0C-ում 6-8 րոպե՝ մինչև ջերմաստիճանի հաստատումը: Կուլտիվացման սկզբում ավելացնել 0.1 մլ հեքսակինազ պարունակող բակտերիական կախույթը և խառնել: Գրանցել աճը 340 նմ երկարությամբ ալիքի ներքո 3-4 րոպե: Որոշել ΔA/րոպե-ն կորի սկզբնական գծային մասից: Հեքսակինազի ակտիվությունը որոշել հետևյալ բանաձևով՝

$$As\left[\frac{Ս}{մգ}\right] = \frac{\Delta A_{340}/\text{րոպե}}{6.22^* \, C_{\text{սպիտ.}}/V_{\text{ռխ.}}},$$

որտեղ As-ը ֆերմենտի մենաահատուկ ակտիվությունն է, ΔA_{340}/րոպե-ն՝ կորի թեքության միջին արժեքը (Slope), Cսպիտ.-ը՝ սպիտակուցի քանակությունը ուսումնասիրվող նմուշում (մգ/մլ), 6.22-ը՝ ß-ՆԱԴH-ի էքստինկցիայի գործակիցը 340 նմ երկարությամբ ալիքի ներքո, Vռխ.-ն՝ կյուվետում ռեակցիոն խառնուրդի ծավալը (մլ):

Լաբորատոր առաջադրանք 2
Ֆրուկտոզերկֆոսֆատալդոլազի (ալդոլազ) ակտիվության որոշում

Ալդոլազը (EC համար՝ 4.1.2.13) կատալիզում է հետևյալ ռեակցիան՝

D-ֆրուկտոզ-1.6-երկֆոսֆատ <=> դիհիդրօքսիացետոնֆոսֆատ + D-գլիցերալդեհիդ-3-ֆոսֆատ:

Ունի բարձր խնամակցություն իր սուբստրատների, ինչպես նաև D-ֆրուկտոզի նկատմամբ: Ակտիվության բարենպաստ pH-ը 6.9-8.8 է: Ակտիվությունն արգելակվում է ծանր մետաղներով, մասնավորապես՝

Cu^{2+}, Zn^{2+} և Ag^{+} իոններով, ինչպես նաև ֆոսֆորիլացված արոմատիկ միացություններով, ֆոսֆատներով, ադենինային նուկլեոտիդներով և այլն:

Ալդոլազի ակտիվության որոշման մեթոդը հիմնված է Բոյերի առաջարկած հիդրազինի փորձի փոփոխման վրա, երբ 3-ֆոսֆոգլիցերալդեհիդը փոխազդում է հիդրազինի հետ, առաջացնում հիդրազոն: Վերջինիս կլանումը տեղի է ունենում 240 նմ երկարությամբ ալիքի ներքո: Այս համակարգի առավելությունը իր պարզությունն է ու սպեցիֆիկությունը: Ֆերմենտի ակտիվության միավորն արտահայտում է կլանման փոփոխությունը մեկ րոպեում 25^0C-ում pH = 7.5-ի դեպքում:

Անհրաժեշտ սարքեր և նյութեր.

1. Սարքեր և նյութեր՝ նախատեսված բակտերիաների աճեցման և կենսազանգվածի ստացման համար:

2. Ջերմակարգավորվող խցիկ, լամինար պահարան, ցենտրիֆուգներ, իոնաչափիչ սարք, սպեկտրալուսաչափ, կյուվետներ:

3. 0.0001 Մ ԷԴՏԱ (pH = 7.5), որը պարունակում է 0.0035 Մ հիդրազինսուլֆատ, սուբստրատ՝ 0.012 Մ ֆրուկտոզ-1,6-երկֆոսֆատ (pH = 7.5):

Բջջային լուծամզվածքը լուծել թորած ջրում: Պատրաստել օգտագործելուց անմիջապես առաջ:

Աշխատանքի ընթացքը

Պատրաստել սննդամիջավայր, ավտոկլավել այն, կուլտիվացնել բակտերիաների բջիջները 22-24 ժամ 37^0Cջերմաստիճանում:

Ցենտրիֆուգել կախույթը 10 րոպե 3000-5000 g արագացմամբ և պոկել թորած ջրով: Նորից ցենտրիֆուգել 10 րոպե 3000-5000 g արագացմամբ և, կախված քանակությունից, պոկել 300-500 մկլ թորած ջրով, ստանալ խիտ բակտերիական կախույթ, լցնել էպենդորֆի մեջ ու կատարվելիք փորձի ողջ ընթացքում թողնել սառույցի մեջ:

Բակտերիաների բջիջները կոտրել *BRANSON* ապրանքանիշի ուլտրաձայնային դեզինտեգրատորով՝ ըստ հետևյալ բնութագրիչների՝ *Pulse*; J 0.0005 վրկ (*on*) – 0.0005 վրկ (*off*); 15 W, *Total (on)* – 2-4 րոպե (*Նկ. 20*):

Որոշել բջջային լուծամզվածքում պարունակվող սպիտակուցի քանակությունը Լոուրիի կամ Բրեդֆորդի մեթոդներով (մգ/մլ) (տե՛ս Հավելված 1): Օպտիկական խտության ստացված արժեքը տեղադրել ալբումինի տրամաչափիչ կորից ստացված բանաձևի մեջ:

Միացնել և կարգավորել սպեկտրալուսաչափը (ալիքի երկարությունը՝ 240 նմ) 25^{0}C ջերմաստիճանում: Կյուվետի մեջ հաջորդաբար լցնել հետևյալ նյութերը:

Նյութի անվանումը	**Քանակությունը**	
	Ստուգիչ	**Փորձ**
Ֆրուկտոզ-1.6-երկֆոսֆատ	1.0 մլ	1.0 մլ
Հիդրազինսուլֆատ	2.0 մլ	2.0 մլ
Թորած ջուր	0.1 մլ	–

Գրանցել ΔA_{240}-ը 10 րոպե:

Բջջային լուծամզվածք	–	0.1 մլ

Գրանցել ΔA_{240}-ը 10 րոպե:

Հաշվել ստուգիչի ΔA_{240}/րոպե-ի և փորձի ΔA_{240}/րոպե-ի արժեքների տարբերությունը: Ֆերմենտի ակտիվությունը որոշել հետևյալ բանաձևով՝

$$As\left[\frac{U}{մգ}\right] = \frac{\Delta A_{240}/\text{րոպե}}{C_{\text{սպիտ.}}/V_{\text{ռխ.}}},$$

որտեղ As-ը ֆերմենտի մենահատուկ ակտիվությունն է, ΔA_{240}/րոպե-ն՝ կորի թեքության միջին արժեքը (Slope), Cսպիտ.-ը՝ սպիտակուցի քանակությունը ուսումնասիրվող նմուշում (մգ/մլ), Vռխ.-ն՝ կյուվետում ռեակցիոն խառնուրդի ծավալը (մլ):

Լաբորատոր առաջադրանք 3

Գլիցերալդեհիդ-3-ֆոսֆատդեհիդրոգենազի ակտիվության որոշում

Գլիցերալդեհիդ-3-ֆոսֆատդեհիդրոգենազը (EC համար՝ 1.2.1.12, ԳԱՖԴ) կատալիզում է հետևյալ ռեակցիան՝

գլիցերալդեհիդ-3-ֆոսֆատ + ՆԱԴ$^+$ + Ֆ$_{անօրգ}$ <==> 1.3-երկֆոսֆոգլիցերոլաթթու + ՆԱԴH + H$^+$:

ԳԱՖԴ-ն միջանկյալ ռեակցիաների ֆերմենտ է, որը կատալիզում է ալդեհիդների ֆոսֆորիլացումը և օքսիդացումը մինչև ացիլֆոսֆատների առաջացումը: Խթանիչներն են ԷԴՏԱ-ն և ցիստեինը: ՆԱԴ$^+$-ի կապումը հանգեցնում է ալոստերիկ փոփոխությունների: ԳԱՖԴ-ի ակտիվությունն արգելակվում է –SH խմբերին կապվող միացություններով, ծանր մետաղների իոններով, ԱԵՖ-ով, ց-ԱՄՖ-ով և ադենին պարունակող այլ միացություններով:

Սկզբնական ռեակցիայի արագությունը որոշվում է ՆԱԴ$^+$-ի վերականգնմամբ՝ 340 նմ երկարությամբ ալիքի ներքո կլանման աճով: Ֆերմենտի ակտիվության միավորն արտահայտվում է 1 մկմոլ ՆԱԴ$^+$-ի վերականգնման սկզբնական արագությամբ 1 րոպեում 25^{0}C-ում և pH = 8.5-ի դեպքում:

Անհրաժեշտ սարքեր և նյութեր.

1. Սարքեր և նյութեր՝ նախատեսված բակտերիաների աճեցման և կենսազանգվածի ստացման համար:

2. Ջերմակարգավորվող խցիկ, լամինար պահարան, ցենտրիֆուգներ, իոնաչափիչ սարք, սպեկտրալուսաչափ, կյուվետներ:

3. 0.015 Մ նատրիումի պիրոֆոսֆատի բուֆեր (pH = 8.5), որը պարունակում է 0.03 Մ նատրիումի արսենատ, 7.5 մՄ ՆԱԴ$^+$, 0.015 Մ DL-գլիցերալդեհիդ-3-ֆոսֆատ (7.5 մՄ D-գլիցերալդեհիդ-3-ֆոսֆատ), 0.1 Մ երկթիոթրեիտոլ:

Բջջային լուծամզվածքը լուծել պիրոֆոսֆոտ/արսենատ բուֆերում:

Աշխատանքի ընթացքը

Պատրաստել սննդամիջավայր, ավտոկլավել այն, կուլտիվացնել բակտերիաների բջիջները 22-24 ժամ 37^{0}Cջերմաստիճանում:

Ցենտրիֆուգել կախույթը 10 րոպե 3000-5000 g արագացմամբ և պոկել թորած ջրով: Նորից ցենտրիֆուգել 10 րոպե 3000-5000 g արագացմամբ և, կախված քանակությունից, պոկել 300-500 մկլ պիրոֆոսֆոտ/արսենատ

բուֆերով, ստանալ խիտ բակտերիական կախույթ, լցնել էպենդորֆի մեջ ու կատարվելիք փորձի ողջ ընթացքում թողնել սառույցի մեջ:

Բակտերիաների բջիջները կոտրել *BRANSON* ապրանքանիշի ուլտրաձայնային դեզինտեգրատորով՝ ըստ հետևյալ բնութագրիչների՝ *Pulse*; J 0.0005վրկ (*on*) – 0.0005 վրկ (*off*); 15 W, *Total (on)* – 2-4 րոպե (*Նկ. 20*):

Որոշել բջջային լուծամզվածքում պարունակվող սպիտակուցի քանակությունը Լոուրիի կամ Բրեդֆորդի մեթոդներով (մգ/մլ) (տե՛ս Հավելված 1): Օպտիկական խտության ստացված արժեքը տեղադրել ալբումինի տրամաչափիչ կորից ստացված բանաձևի մեջ:

Միացնել և կարգավորել սպեկտրալուսաչափը (ալիքի երկարությունը՝ 340 նմ) 25^{0}Cջերմաստիճանում: Կյուվետի մեջ հաջորդաբար լցնել հետևյալ նյութերը:

Նյութի անվանումը	**Քանակությունը**
Պիրոֆոսֆատ/արսենատ բուֆեր	2.6 մլ
ՆԱԴ$^+$, 7.5 մՄ	0.1 մլ
Երկթիոթրեիտոլ, 0.1 Մ	0.1 մլ
Բջջային լուծամզվածք	0.1 մլ

Կյուվետի պարունակությունն ինկուբացնել սպեկտրալուսաչափում 25^{0}C-ում 3-5 րոպե մինչև ջերմաստիճանի հաստատուն դառնալը: Կուլտիվացիայի սկզբում ավելացնել 0.1 մլ 0.015 Մ DL-գլիցերալդեհիդ-3-ֆոսֆատ և գրանցել A_{340}-ը 3-5 րոպե: Հաշվել ΔA_{340}/րոպե-ն կորի սկզբնական գծային մասից: ԳԱՖԴ-ի ակտիվությունը որոշել հետևյալ բանաձևով՝

$$As\left[\frac{Մ}{մգ}\right] = \frac{\Delta A_{340}/\text{րոպե}}{6.22^* \, C_{\text{սպիտ.}}/V_{\text{ռխ.}}},$$

որտեղ As-ը ֆերմենտի մենաահատուկ ակտիվությունն է, ΔA_{340}/րոպե-ն՝ կորի թեքության միջին արժեքը (Slope), Cսպիտ.-ը՝ սպիտակուցի քանակությունը ուսումնասիրվող նմուշում (մգ/մլ), 6.22-ը՝ ß-ՆԱԴH-ի միլիմոլային մարման գործակիցը 340 նմ երկարությամբ ալիքի ներքո, Vռխ.-ն՝ կյուվետում ռեակցիոն խառնուրդի ծավալը (մլ):

Լաբորատոր առաջադրանք 4.
Պիրոխաղողաթթուկինազի ակտիվության որոշում

Պիրոխաղողաթթուկինազը (EC համար՝ 2.7.1.40 ՊԽԿ) կատալիզում է հետևյալ ռեակցիան՝

ֆոսֆոէնոլպիրոխաղողաթթու + ԱԿՖ <==> պիրոխաղողաթթու + ԱԵՖ:

Ունի բարձր խնամակցություն նուկլեոտիդային միացությունների նկատմամբ: Ակտիվության բարենպաստ pH-ը 7.5 է: Ակտիվությունն արգելակվում է Ca^{2+}-ով, ֆլյուորոֆոսֆատով, ԱԵՖ-ով և այլն:

Ռեակցիայի արագությունը որոշվում է կաթնաթթուդեհիդրոգենազային ռեակցիայի հետ զուգորդմամբ՝ չափելով ՆԱԴH-ի օքսիդացումը կլանման փոփոխությամբ 340 նմ երկարությամբ ալիքի ներքո:

Պիրոխաղողաթթու + ՆԱԴH + H^+ $\longrightarrow$ կաթնաթթու + ՆԱԴ$^+$:

Ֆերմենտի ակտիվության մեծությունն արտահայտում է 1 մկմոլ ՆԱԴH-ի օքսիդացումը մեկ րոպեում 25^0C-ում և pH = 7.6-ի դեպքում:

Անհրաժեշտ սարքեր և նյութեր.

1. Սարքեր և նյութեր՝ նախատեսված բակտերիաների աճեցման և կենսազանգվածի ստացման համար:
2. Ջերմակարգավորվող խցիկ, լամինար պահարան, ցենտրիֆուգներ, իոնաչափիչ սարք, սպեկտրալուսաչափ, կյուվետներ:
3. 0.05 Մ իմիդազոլ-HCl բուֆեր՝ (pH = 7.6), որը պարունակում է 0.12 Մ KCl և 0.062 Մ $MgSO_4$, 45 մՄ ԱԿՖ, 45 մՄ ֆոսֆոէնոլպիրոխաղողաթթու, 6.6 մՄ ՆԱԴH, կաթնաթթուդեհիդրոգենազ՝ լուծված վերը նշված իմիդազոլային բուֆերում 1300-1400 միավոր/մլ խտությամբ (պահել սառնարանում մինչև օգտագործելը):

Աշխատանքի ընթացքը

Պատրաստել սննդամիջավայր, ավտոկլավել այն, կուլտիվացնել բակտերիաների բջիջները 22-24 ժամ 37^0C ջերմաստիճանում:

Ցենտրիֆուգել կախույթը 10 րոպե 3000-5000 g արագացմամբ և պոկել թորած ջրով: Նորից ցենտրիֆուգել 10 րոպե 3000-5000 g արագացմամբ և, կախված քանակությունից, պոկել 300-500 մկլ 0.05 Մ իմիդազոլ-HCl pH = 7.6 բուֆերով, ստանալ խիտ բակտերիական կախույթ, լցնել էպենդորֆի մեջ ու կատարվելիք փորձի ողջ ընթացքում թողնել սառույցի մեջ:

Բակտերիաների բջիջները կոտրել *BRANSON* ապրանքանիշի ուլտրաձայնային դեզինտեգրատորով՝ ըստ հետևյալ բնութագրիչների՝ *Pulse*; J 0.0005վրկ (*on*) – 0.0005 վրկ (*off*); 15 W, *Total (on)* – 2-4 րոպե (*Նկ. 20*):

Որոշել բջջային խտամզվածքում պարունակվող սպիտակուցի քանակությունը Լոուրիի կամ Բրեդֆորդի մեթոդներով (մգ/մլ) (տե՛ս Հավելված 1): Օպտիկական խտության ստացված արժեքը տեղադրել ալբումինի տրամաչափիչ կորից ստացված բանաձևի մեջ:

Միացնել և կարգավորել սպեկտրալուսաչափը (ալիքի երկարությունը՝ 340 նմ) 25^{0}C ջերմաստիճանում: Կյուվետի մեջ հաջորդաբար լցնել հետևյալ նյութերը»

Նյութի անվանումը	**Քանակությունը**
Իմիդազոլ-HCl բուֆեր, 0.05 Մ, pH = 7.6	2.7 մլ
ԱԿՖ, 45 մՄ	0.1 մլ
ՆԱԴՀ, 6.6 մՄ	0.1 մլ
Ֆոսֆոէնոլպիրոխաղողաթթու, 45 մՄ	0.1 մլ
Կաթնաթթուդեհիդրոգենազ	0.01 մլ

Կյուվետի պարունակությունը խառնել և ինկուբացնել սպեկտրալուսաչափում 25^{0}C-ում 4-5 րոպե մինչև ջերմաստիճանի հաստատուն դառնալը: Կուլտիվացիայի սկզբում ավելացնել 0.01 մլ բջջային լուծամզվածք և գրանցել A_{340}-ի նվազումը 4-5 րոպե: Հաշվել ΔA_{340}/րոպե-ն կորի սկզբնական գծային մասից: (Սկզբնական կլանումը 340 նմ երկարությամբ ալիքի ներքո պետք է լինի 1.4±0.1, հակառակ դեպքում ՆԱԴՀ-ը մաքուր չի եղել կամ սխալ է պատրաստվել): ՊԽԿ-ի ակտիվությունը որոշել հետևյալ բանաձևով՝

$$As\left[\frac{Մ}{մգ}\right] = \frac{\Delta A_{340}/\text{րոպե}}{6.22^* \, C_{\text{սպիտ.}}/V_{\text{ռխ.}}},$$

որտեղ As-ը ֆերմենտի մենաահատուկ ակտիվությունն է, ΔA_{340}/րոպե-ն՝ կորի թեքության միջին արժեքը (Slope), Cսպիտ.-ը՝ սպիտակուցի քանակությունը ուսումնասիրվող նմուշում (մգ/մլ), 6.22-ը՝ ß-ՆԱԴH-ի միլիմոլային մարման գործակիցը 340 նմ երկարությամբ ալիքի ներքո, $V_{ռխ.}$-ն՝ կյուվետում ռեակցիոն խառնուրդի ծավալը (մլ):

Լաբորատոր առաջադրանք 5

Ֆոսֆոէնոլպիրոխաղողաթթուկարբոքսիլազի ակտիվության որոշում

Ֆոսֆոէնոլպիրոխաղողաթթուկարբոքսիլազը (EC համար՝ 4.1.1.31, ՖԷՊԿ) կատալիզում է հետևյալ ռեակցիան՝

ֆոսֆոէնոլպիրոխաղողաթթու + CO_2 + H_2O <==> օքսալաքացախաթթու + Ֆանօրգ.:

ՖԷՊԿ-ն ունի խնամակցություն միայն ֆոսֆոէնոլպիրոխաղողաթթվի և CO_2-ի նկատմամբ: Ակտիվության բարենպաստ pH-ը 8-9 է: Ակտիվությունը խթանվում է ացետիլ ԿոA-ով, ֆրուկտոզ-1.6-երկֆոսֆատով, լաբորատոր խթանիչներից է դիոքսանը: Արգելակվում է L-ասպարագինաթթվով, ֆումարաթթվով և L-խնձորաթթվով:

ՖԷՊԿ-ի ակտիվությունը որոշվում է սպեկտրալուսաչափիչ մեթոդով խնձորաթթուդեհիդրոգենազի ռեակցիայի հետ զուգորդմամբ: Ռեակցիայի արագությունը որոշվում է ՆԱԴH-ի օքսիդացմամբ A_{340}-ում կլանման նվազմամբ: Ֆերմենտի ակտիվության մեծությունն արտահայտում է 1 մկմոլ ՆԱԴH-ի օքսիդացումը մեկ րոպեում 25^0C-ում և pH = 8.5-ի դեպքում:

Անհրաժեշտ սարքեր և նյութեր.

1. Սարքեր և նյութեր՝ նախատեսված բակտերիաների աճեցման և կենսազանգվածի ստացման համար:

2. Ջերմակարգավորվող խցիկ, լամինար պահարան, ցենտրիֆուգներ, իոնաչափիչ սարք, սպեկտրալուսաչափ, կյուվետներ:

3. 0.11 Մ տրիս-սուլֆատային բուֆեր (pH = 8.5), որը պարունակում է 0.3 Մ $MgSO_4$, 6.0 մՄ ՆԱԴH, 0.1 Մ նատրիումի երկկարբոնատ, 0.03 Մ ֆոս-

ֆոէնոլպիրոխաղողաթթու (ՖԷՊ), կալիումի կամ ցիկլոհեքսիլամոնիումի աղ, դիօքսանի թարմ լուծույթ, 0.3 Մ երկթիոթրեիտոլ և խնձորաթթուդեհիդրոգենազ՝ լուծված 600 միավոր/մլ խտությամբ,:

Բջջային լուծամզվածքը լուծել 0.11 Մ տրիս-սուլֆատային բուֆերում (pH = 8.5), որը պարունակում է 0.005 Մ $MgSO_4$:

Աշխատանքի ընթացքը

Պատրաստել սննդամիջավայր, ավտոկլավել այն, կուլտիվացնել բակտերիաների բջիջները 22-24 ժամ 37^{0}Cջերմաստիճանում:

Ցենտրիֆուգել կախույթը 10 րոպե 3000-5000 g արագացմամբ և պոկել թորած ջրով: Նորից ցենտրիֆուգել 10 րոպե 3000-5000 g արագացմամբ և, կախված քանակությունից, պոկել 300-500 մկլ 0.11 Մ տրիս-սուլֆատային բուֆերով (pH = 8.5), որը պարունակում է 0.005 Մ $MgSO_4$, ստանալ խիտ բակտերիական կախույթ, լցնել էպենդորֆի մեջ ու կատարվելիք ողջ փորձի ընթացքում թողնել սառույցի մեջ:

Բակտերիաների բջիջները կոտրել *BRANSON* ապրանքանիշի ուլտրաձայնային դեզինտեգրատորով՝ ըստ հետևյալ բնութագրիչների՝ *Pulse*; J 0.0005 վրկ (*on*) – 0.0005 վրկ (*off*); 15 W, *Total (on)* – 2-4 րոպե (*Նկ. 20*):

Որոշել բջջային լուծամզվածքում պարունակվող սպիտակուցի քանակությունը Լոուրիի կամ Բրեդֆորդի մեթոդներով (մգ/մլ) (տե՛ս Հավելված 1): Օպտիկական խտության ստացված արժեքը տեղադրել ալբումինի տրամաչափիչ կորից ստացված բանաձևի մեջ:

Միացնել և կարգավորել սպեկտրալուսաչափը (340 նմ) 25^{0}C ջերմաստիճանում: Կյուվետի մեջ հաջորդաբար լցնել հետևյալ նյութերը:

Նյութի անվանումը	**Քանակությունը**
Տրիս-սուլֆատային բուֆեր, 0.11 Մ, pH = 8.5	1.8 մլ
ՆԱԴՀ, 6.0 մՄ	0.1 մլ
$MgSO_4$, 0.3 Մ	0.1 մլ
Երկթիոթրեիտոլ, 0.3 Մ	0.1 մլ
$NaHCO_3$, 0.1 Մ	0.3 մլ
Դիօքսան	0.3 մլ

Կյուվետի պարունակությունն ինկուբացնել սպեկտրալուսաչափում 25^0C-ում 4-5 րոպե մինչև ջերմաստիճանի հաստատուն դառնալը: Կուլտիվացիայի սկզբում ավելացնել 0.01 մլ բջջային լուծամզվածք և 0.01 մլ խնձորաթթուդեհիդրոգենազ, գրանցել A_{340}-ի նվազումը՝ որպես ստուգիչ, ավելացնել 0.1 մլ ՖԷՊ, գրանցել A_{340}-ի նվազումը՝ որպես փորձ:

ՖԷՊԿ-ի ակտիվությունը որոշել հետևյալ բանաձևով՝

$$As\left[\frac{Ս}{մգ}\right] = \frac{\Delta A_{340}/\text{ռոպե (փորձ)} - \Delta A_{340}/\text{ռոպե (ստուգիչ)}}{6.22 * C_{\text{սպիտ.}}/V_{\text{ռխ.}}},$$

որտեղ As-ը ֆերմենտի մենահատուկ ակտիվությունն է, ΔA_{340}/ռոպե-ն՝ կորի թեքության միջին արժեքը (Slope), Cսպիտ.-ը՝ սպիտակուցի քանակությունը ուսումնասիրվող նմուշում (մգ/մլ), 6.22-ը՝ ß-ՆԱԴH-ի միլիմոլային մարման գործակիցը 340 նմ երկարությամբ ալիքի ներքո, Vռխ.-ն՝ կյուվետում ռեակցիոն խառնուրդի ծավալը (մլ):

Լաբորատոր առաջադրանք 6
Կաթնաթթուդեհիդրոգենազի ակտիվության որոշում

Կաթնաթթուդեհիդրոգենազը (EC համար՝ 1.1.1.27, ԿԴՀ) կատալիզում է հետևյալ ռեակցիան՝

պիրոխաղողաթթու + ՆԱԴH + H^+ <==> կաթնաթթու + ՆԱԴ$^+$:

Ունի խնամակցություն L(+) կաթնաթթվի նկատմամբ: ԿԴՀ-ն համեմատաբար կայուն ֆերմենտ է, ապաակտիվանում է յոդիդներով: Կան միացություններ, որոնք կայունացնում են ֆերմենտը, օրինակ՝ երկմեթիլսուլֆօքսիդը, էթանոլը և մեթանոլը:

ԿԴՀ-ի ռեակցիայի արագությունը որոշվում է 340 նմ երկարությամբ ալիքի ներքո կլանման նվազմամբ, ինչը պայմանավորված է ՆԱԴH-ի օքսիդացմամբ: Ֆերմենտի ակտիվության մեծությունն արտահայտում է 1 մկմոլ ՆԱԴH-ի օքսիդացումը մեկ րոպեում 25^0C-ում և pH = 7.3-ի դեպքում:

Անհրաժեշտ սարքեր և նյութեր.

1. Սարքեր և նյութեր՝ նախատեսված բակտերիաների աճեցման և կենսազանգվածի ստացման համար:

2. Ջերմակարգավորվող խցիկ, լամինար պահարան, ցենտրիֆուգներ, իոնաչափիչ սարք, սպեկտրալուսաչափ, կյուվետներ:

3. 0.2 Մ տրիս-HCl (pH = 7.3), որը պարունակում է 6.6 մՄ ՆԱԴH և 30 մՄ պիրոխաղողաթթվի նատրիումական աղ:

Բջջային լուծամզվածքը լուծել 0.2 Մ տրիս-HCl բուֆերում և պահել սառնարանում:

Աշխատանքի ընթացքը

Պատրաստել սննդամիջավայր, ավտոկլավել այն, կուլտիվացնել բակտերիաների բջիջները 22-24 ժամ 37^{0}C ջերմաստիճանում:

Ցենտրիֆուգել կախույթը 10 րոպե 3000-5000 g արագացմամբ և պոկել թորած ջրով: Նորից ցենտրիֆուգել 10 րոպե 3000-5000 g արագացմամբ և, կախված քանակությունից, պոկել 300-500 մկլ 0.2 Մ տրիս-HCl բուֆերով, ստանալ խիտ բակտերիական կախույթ, լցնել էպենդորֆի մեջ ու կատարվելիք փորձի ողջ ընթացքում թողնել սառույցի մեջ:

Բակտերիաների բջիջները կոտրել *BRANSON* ապրանքանիշի ուլտրաձայնային դեզինտեգրատորով՝ ըստ հետևյալ բնութագրիչների՝ *Pulse*; J 0.0005 վրկ (*on*) – 0.0005 վրկ (*off*); 15 W, *Total (on)* – 2-4 րոպե (*Նկ. 20*):

Որոշել բջջային լուծամզվածքում պարունակվող սպիտակուցի քանակությունը Լոուրիի կամ Բրեդֆորդի մեթոդներով (մգ/մլ) (տե՛ս Հավելված 1): Օպտիկական խտության ստացված արժեքը տեղադրել ալբումինի տրամաչափիչ կորից ստացված բանաձևի մեջ:

Միացնել և կարգավորել սպեկտրալուսաչափը (340 նմ) 25^{0}C ջերմաստիճանում: Կյուվետի մեջ հաջորդաբար լցնել հետևյալ նյութերը:

Նյութի անվանումը	**Քանակությունը**
Տրիս-HCl, 0.2 Մ, pH = 7.3	2.8 մլ
ՆԱԴH, 6.6 մՄ	0.1 մլ
Պիրոխաղողաթթվի նատրիումական աղ, 30 մՄ	0.1 մլ

Կյուվետի պարունակությունն ինկուբացնել սպեկտրալուսաչափում 25^{0}C-ում 4-5 րոպե մինչև ջերմաստիճանի հաստատուն դառնալը: Ավե-

լացնել 0.1 մլ բջջային լուծամզվածք և գրանցել ΔA_{340}/րոպե-ն կորի սկզբնական գծային մասից:

ԿԴՀ-ի ակտիվությունը որոշել հետևյալ բանաձևով՝

$$As\left[\frac{U}{մգ}\right] = \frac{\Delta A_{340}/\text{րոպե}}{6.22 * C_{\text{սպիտ.}}/V_{\text{ռխ.}}},$$

որտեղ As-ը ֆերմենտի մենաահատուկ ակտիվությունն է, ΔA_{340}/րոպե-ն՝ կորի թեքության միջին արժեքը (Slope), Cսպիտ.-ը՝ սպիտակուցի քանակությունը ուսումնասիրվող նմուշում (մգ/մլ), 6.22-ը՝ ß-ՆԱԴH-ի միլիմոլային մարման գործակիցը 340 նմ երկարությամբ ալիքի ներքո, Vռխ.-ն՝ կյուվետում ռեակցիոն խառնուրդի ծավալը (մլ):

Լաբորատոր առաջադրանք 7
Ալկոհոլդեհիդրոգենազի ակտիվության որոշում

Ալկոհոլդեհիդրոգենազը (EC համար՝ 1.1.1.1, ԱԴՀ) կատալիզում է ալկոհոլների օքսիդացումը՝ որպես էլեկտրոնների ակցեպոր օգտագործելով ՆԱԴ$^+$-ը կամ ՆԱԴՖ$^+$-ը.

էթանոլ + ՆԱԴ$^+$ <==> քացախալդեհիդ + ՆԱԴH + H$^+$:

Ակտիվության բարենպաստ pH-ը 5.4 է: Խթանիչներից են սուլֆհիդրիլային ակտիվացնող միացությունները, երկթիոթրեիտոլը, ցիստեինը և ծանր մետաղներով խելատներ առաջացնող նյութերը: Ֆերմենտի ակտիվությունն արգելակվում է ծանր մետաղներով, պուրինային և պիրիմիդինային ածանցյալներով և այլն:

ԱԴՀ-ային ռեակցիայի արագությունը որոշվում է ՆԱԴ$^+$-ի վերականգնմամբ, որը չափվում է 340 նմ երկարությամբ ալիքի ներքո: Ֆերմենտի ակտիվության մեծությունն արտահայտվում է 1 մկմոլ ՆԱԴ$^+$-ի վերականգնմամբ մեկ րոպեում 25^{0}C-ում:

Անհրաժեշտ սարքեր և նյութեր.

1. Սարքեր և նյութեր՝ նախատեսված բակտերիաների աճեցման և կենսազանգվածի ստացման համար:

2. Ջերմակարգավորվող խցիկ, լամինար պահարան, ցենտրիֆուգներ, իոնաչափիչ սարք, սպեկտրալուսաչափ, կյուվետներ:

3. 0.1 Մ նատրիումի պիրոֆոսֆատային բուֆեր (pH = 9.2), 2 Մ էթանոլ (լուծել 12.12 մլ 95 % էթանոլ 100 մլ թորած ջրում), 0.025 Մ ՆԱԴ$^+$, 0.1 Մ ֆոսֆատային բուֆեր (pH = 7.5), 0.1 % ալբումին (BSA):

Բջջային լուծամզվածքը լուծել 0.1 Մ ֆոսֆատային բուֆերում (pH = 7.5):

Աշխատանքի ընթացքը

Պատրաստել սննդամիջավայր, ավտոկլավել այն, կուլտիվացնել բակտերիաների բջիջները 22-24 ժամ 37^{0}Cջերմաստիճանում:

Ցենտրիֆուգել կախույթը 10 րոպե 3000-5000 g արագացմամբ և պոկել թորած ջրով: Նորից ցենտրիֆուգել 10 րոպե 3000-5000 g արագացմամբ և, կախված քանակությունից, պոկել 300-500 մկլ 0.1 Մ ֆոսֆատային բուֆերով, ստանալ խիտ բակտերիական կախույթ, լցնել էպենդորֆի մեջ ու կատարվելիք փորձի ողջ ընթացքում թողնել սառույցի մեջ:

Բակտերիաների բջիջները կոտրել *BRANSON* ապրանքանիշի ուլտրաձայնային դեզինտեգրատորով՝ ըստ հետևյալ բնութագրիչների՝ *Pulse*; J 0.0005 վրկ (*on*) – 0.0005 վրկ (*off*); 15 W, *Total (on)* – 2-4 րոպե (*Նկ. 20*):

Որոշել բջջային լուծամզվածքում պարունակվող սպիտակուցի քանակությունը Լոուրիի կամ Բրեդֆորդի մեթոդներով (մգ/մլ) (տե՛ս Հավելված 1): Օպտիկական խտության ստացված արժեքը տեղադրել ալբումինի տրամաչափիչ կորից ստացված բանաձևի մեջ:

Միացնել և կարգավորել սպեկտրալուսաչափը (340 նմ) 25^{0}C ջերմաստիճանում: Կյուվետի մեջ հաջորդաբար լցնել հետևյալ նյութերը:

Նյութի անվանումը	**Քանակությունը**
Պիրոֆոսֆատային բուֆեր, 0.1 Մ	1.5 մլ
Էթանոլ, 2.0 Մ	0.5 մլ
ՆԱԴ$^+$, 25 մՄ	1.0 մլ

Կյուվետի պարունակությունն ինկուբացնել սպեկտրալուսաչափում 25^{0}C-ում 3-4 րոպե մինչև ջերմաստիճանի հաստատուն դառնալը: Կուլ-

տիվացիայի սկզբում ավելացնել 0.1 մլ բջջային լուծամզվածք և գրանցել A_{340}-ը 3-4 րոպե: Հաշվել ΔA_{340}/րոպե-ն կորի սկզբնական գծային մասից: ԱԴՀ-ի ակտիվությունը որոշել հետևյալ բանաձևով՝

$$As\left[\frac{Ս}{մգ}\right] = \frac{\Delta A_{340}/\text{րոպե}}{6.22 * C_{\text{սպիտ.}}/V_{\text{ռխ.}}},$$

որտեղ As-ը ֆերմենտի մենաահատուկ ակտիվությունն է, ΔA_{340}/րոպե-ն՝ կորի թեքության միջին արժեքը (Slope), $C_{\text{սպիտ.}}$-ը՝ սպիտակուցի քանակությունը ուսումնասիրվող նմուշում (մգ/մլ), 6.22-ը՝ ß-ՆԱԴH-ի միլիմոլային մարման գործակիցը 340 նմ երկարությամբ ալիքի ներքո, $V_{\text{ռխ.}}$-ն՝ կյուվետում ռեակցիոն խառնուրդի ծավալը (մլ):

Լաբորատոր առաջադրանք 8
Քացախաթթուկինազի ակտիվության որոշում

Քացախաթթուկինազը (EC համար՝ 2.7.2.1, ՔՅԿ) կատալիզում է ացետիլֆոսֆատի առաջացումը քացախաթթվից: Այն կատալիզում է նաև հակադարձ ռեակցիան: Ակտիվությունը խթանվում է նուկլեոտիդներով և մետաղների իոններով՝ Mg^{2+}, Mn^{2+}, Co^{2+}:

Քացախաթթու + ԱԵՖ $\xrightarrow{\text{ՔՅԿ}}$ ացետիլֆոսֆատ + ԱԿՖ:

ԱԿՖ + ֆոսֆոէնոլպիրոխաղողաթթու $\xrightarrow{\text{ՊԽԿ}}$ ԱԵՖ + պիրոխաղողաթթու:

Պիրոխաղողաթթու + ß-ՆԱԴH + H^+ $\xrightarrow{\text{ԼԴՀ}}$ կաթնաթթու + ß-ՆԱԴ$^+$:

Անհրաժեշտ սարքեր և նյութեր.

1. Սարքեր և նյութեր՝ նախատեսված բակտերիաների աճեցման և կենսազանգվածի ստացման համար:

2. Ջերմակարգավորվող խցիկ, լամինար պահարան, ցենտրիֆուգներ, իոնաչափիչ սարք, սպեկտրալուսաչափ, կյուվետներ:

3. 100 մՄ եռէթանոլամինային բուֆեր (եռէթանոլամին հիդրոքլորիդ) (pH = 7.6)՝ պատրաստված 50 մլ դեիոնիզացված ջրում, 1 Մ քացախաթթվի նատրիումական աղ ՝ 10 մլ թարմ լուծույթ, 91 մՄ ԱԵՖ՝ 3 մլ թարմ լուծույթ, 56 մՄ ֆոսֆոէնոլպիրոխաղողաթթու՝ 1.5 մլ թարմ լուծույթ, 200 մՄ $MgCl_2$՝ 5 մլ, 6.4 մՄ β-ՆԱԴH-ի թարմ լուծույթ, ՊԽԿ/ԿԴՀ ֆերմենտների

սուսպենզիա, միոկինազի թարմ լուծույթ՝ 2000-3000 միավոր/մլ՝ լուծված սառը դեիոնիզացված ջրում:

Աշխատանքի ընթացքը

Պատրաստել սննդամիջավայր, ավտոկլավել այն, կուլտիվացնել բակտերիաների բջիջները 22-24 ժամ 37^{0}C ջերմաստիճանում:

Ցենտրիֆուգել կախույթը 10 րոպե 3000-5000 g արագացմամբ և պոկել թորած ջրով: Նորից ցենտրիֆուգել 10 րոպե 3000-5000 g արագացմամբ և, կախված քանակությունից, պոկել 300-500 մկլ 100 մՄ եռէթանոլամինային բուֆերով, ստանալ խիտ բակտերիական կախույթ, լցնել էպենդորֆի մեջ ու կատարվելիք փորձի ողջ ընթացքում թողնել սառույցի մեջ:

Բակտերիաների բջիջները կոտրել *BRANSON* ապրանքանիշի ուլտրաձայնային դեզինտեգրատորով՝ ըստ հետևյալ բնութագրիչների՝ *Pulse*; J 0.0005 վրկ (*on*) – 0.0005 վրկ (*off*); 15 W, *Total (on)* – 2-4 րոպե:

Որոշել բջջային լուծամզվածքում պարունակվող սպիտակուցի քանակությունը Լոուրիի կամ Բրեդֆորդի մեթոդներով (մգ/մլ) (տե՛ս Հավելված 1): Օպտիկական խտության ստացված արժեքը տեղադրել ալբումինի տրամաչափիչ կորից ստացված բանաձևի մեջ:

Պատրաստել ռեակցիոն խառնուրդը:

Նյութի անվանումը	Քանակությունը
Եռէթանոլամինային բուֆեր	17.8 մլ
Քացախաթթվի նատրիումական աղ	6.0 մլ
$MgCl_2$	1.0 մլ
β-ՆԱԴԻ	0.5 մլ

Խառնել նյութերը և կարգավորել pH-ը 25^{0}C-ում 0.1 Մ HCl-ով կամ 0.1 Մ NaOH-ով՝ դարձնելով 7.6:

Կյուվետների մեջ լցնել հետևյալ նյութերը.

Նյութի անվանումը	Քանակությունը	
	Ստուգիչ	Փորձ
Ռեակցիոն խառնուրդ	2.53 մլ	2.53 մլ
ՊԽԿ/ԿԴՀ ֆերմենտների սուսպենզիա	0.05 մլ	0.05 մլ
Միոկինազ	0.02 մլ	0.02 մլ

Շրջելով կյուվետները՝ խառնել պարունակությունը, կարգավորել ջերմաստիճանը՝ դարձնելով 25^{0}C, գրանցելA_{340}-ը:

ԱԵՖ	0.2 մլ	0.2 մլ
ՖԷՊ	0.1 մլ	0.1 մլ
Բուֆեր	0.1 մլ	–
Բջջային լուծամզվածք	–	0.1 մլ

Շրջելով կյուվետները՝ խառնել պարունակությունը, գրանցել A_{340}-ի նվազումը 5 րոպե: Հաշվել ΔA_{340}/րոպե-ն կորի սկզբնական գծային մասից: Քացախաթթուկինազի ակտիվությունը որոշել հետևյալ բանաձևով՝

$$As\left[\frac{U}{մլ}\right] = \frac{\Delta A_{340}/\text{րոպե (փորձ)} - \Delta A_{340}/\text{րոպե (ստուգիչ)}(3.0)(df)}{6.22 * 0.1},$$

որտեղ As-ը ֆերմենտի մենահատուկ ակտիվությունն է, ΔA_{340}/րոպե-ն՝ կորի թեքության միջին արժեքը (Slope), 3.0-ն՝ փորձի ընդհանուր ծավալը, df-ը՝ լուծման գործոնը, 6.22-ը՝ ß-ՆԱԴH-ի միլիմոլային մարման գործակիցը 340 նմ երկարությամբ ալիքի ներքո, 0.1-ը՝ օգտագործված բջջային լուծամզվածքի ծավալը (մլ):

Լաբորատոր առաջադրանք 9
Գլիցերոլկինազի ակտիվության որոշում

Գլիցերոլկինազը (EC համար՝ 2.7.1.30, ԱԵՖ:գլիցերոլ-3-ֆոսֆոտրանսֆերազ, ԳԿ) կատալիզում է հետևյալ ռեակցիան՝

գլիցերոլ + ԱԵՖ $\xrightarrow{Mg^{2+}}$ L-գլիցերոլ-1.3-ֆոսֆատ + ԱԿՖ:

Այն մանրէները, որոնք պարունակում են այս ֆերմենտը, ունակ են յուրացնելու գլիցերոլը՝ որպես ածխածնի աղբյուր: Դրանով նաև հնարավոր է որոշել գլիցերալդեհիդը և երկհիդրոքսիացետոնը, որոնք հավասար քանակությամբ վերականգնվում են գլիցերոլի և նատրիումի բորահիդրիդի հետ: Բարենպաստ pH-ը 9.0-9.8 է:

Գլիցերոլկինազը գլիցերոլը ֆոսֆորիլացնում է՝ փոխարկելով բացառապես L-գլիցերոլ-1.3-ֆոսֆատի: Ռեակցիայի համար անհրաժեշտ է Mg^{2+}: ԱԵՖ-ն օգտագործվում է որպես ֆոսֆատի աղբյուր:

Ռեակցիայի արագությունը որոշվում է ՊԽԿ-ի և ԿԴՀ-ի զուգակցված համակարգով: Ֆերմենտի ակտիվության չափման միավորն է 1 մկմոլ օքսիդացած ՆԱԴՀ-ի քանակությունը միավոր ժամանակում (րոպե) 25^0C ջերմաստիճանում pH = 8.9-ի և 340 նմ երկարությամբ ալիքի պայմաններում:

Գլիցերոլ + ԱԵՖ ^{ԳԿ} ⟷ գլիցերոլֆոսֆատ + ԱԿՖ:

ԱԿՖ + ֆոսֆոէնոլպիրոխաղողաթթու ^{ՊԽԿ} ⟷ ԱԵՖ + պիրոխաղողաթթու:

Պիրոխաղողաթթու + ՆԱԴՀ + H^+ ^{ԿԴՀ} ⟷ կաթնաթթու + $ՆԱԴ^+$:

Անհրաժեշտ սարքեր և նյութեր.

1. Սարքեր և նյութեր՝ նախատեսված բակտերիաների աճեցման և կենսազանգվածի ստացման համար:
2. Ջերմակարգավորվող խցիկ, լամինար պահարան, ցենտրիֆուգներ, իոնաչափիչ սարք, սպեկտրալուսաչափ, կյուվետներ:
3. Ռեագենտ, որը պարունակում է ստորև նշված նյութերը:

Նյութի անվանումը	Քանակությունը
ԱԵՖ	8.5 մՄ
ՆԱԴՀ	8.22 մՄ
ՖԷՊ	2 մՄ
ԼԴՀ	15.3 u/ml
ՊԽԿ	7.0 u/ml
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	28 մՄ
Վերականգնված գլուտատիոն	26 մՄ

4. 0.4 Մ գլիցին, 0.45 մՄ K_2CO_3 (pH = 8.9):
5. 0.1 Մ եռէթանոլամին-HCl բուֆեր (pH = 7.4):
6. 0.1 Մ գլիցերոլ:

Բջջային լուծամզվածքը լուծել 0.1 Մ եռէթանոլամին-HCl բուֆերում (pH = 7.4):

Աշխատանքի ընթացքը

Պատրաստել սննդամիջավայր, ավտոկլավել այն, կուլտիվացնել բակտերիաների բջիջները 22-24 ժամ 37^{0}Cջերմաստիճանում:

Ցենտրիֆուգել կախույթը 10 րոպե 3000-5000 g արագացմամբ և պոկել թորած ջրով: Նորից ցենտրիֆուգել 10 րոպե 3000-5000 g արագացմամբ և, կախված քանակությունից, պոկել 300-500 մկլ 0.1 Մ եռէթանոլամին-HCl բուֆերով, ստանալ խիտ բակտերիական կախույթ, լցնել էպենդորֆի մեջ ու կատարվելիք փորձի ողջ ընթացքում թողնել սառույցի մեջ:

Բակտերիաների բջիջները կոտրել *BRANSON* ապրանքանիշի ուլտրաձայնային դեզինտեգրատորով՝ ըստ հետևյալ բնութագրիչների՝ *Pulse*; J 0.,0005 վրկ (*on*) – 0.0005 վրկ (*off*); 15 W, *Total (on)* – 2-4 րոպե:

Որոշել բջջային լուծամզվածքում պարունակվող սպիտակուցի քանակությունը Լոուրիի կամ Բրեդֆորդի մեթոդներով (մգ/մլ) (տե՛ս Հավելված 1): Օպտիկական խտության ստացված արժեքը տեղադրել ալբումինի տրամաչափիչ կորից ստացված բանաձևի մեջ:

Կյուվետի մեջ հաջորդաբար լցնել 2.1 մլ գլիցին-կարբոնատային բուֆեր, 0.7 մլ ռեագենտ, 0.1 մլ 0.1 Մ գլիցերոլ: 3-4 րոպե ինկուբացնել ստացված խառնուրդը՝ հասնելու ցանկալի ջերմաստիճանի հաստատմանը: Այնուհետև ավելացնել 0.1 մլ բջջային լուծամզվածքը և գրանցել ΔA_{340}-ը 6-8 րոպե: Որոշել կորի գծային հատվածի ΔA_{340}/րոպե-ն:

Գլիցերոլկինազի ակտիվությունը որոշել հետևյալ բանաձևով՝

$$As\left[\frac{U}{մգ}\right] = \frac{\Delta A_{340}/\text{րոպե}}{6.22 * C_{\text{սպիտ.}}/V_{\text{ռխ.}}},$$

որտեղ As-ը ֆերմենտի մենաահատուկ ակտիվությունն է, ΔA_{340}/րոպե-ն՝ կորի թեքության միջին արժեքը (Slope), Cսպիտ.-ը՝ սպիտակուցի քանակությունը ուսումնասիրվող նմուշում (մգ/մլ), 6.22-ը՝ ß-ՆԱԴH-ի միլիմոլային մարման գործակիցը 340 նմ երկարությամբ ալիքի ներքո, Vռխ.-ն՝ կյուվետում ռեակցիոն խառնուրդի ծավալը (մլ):

Լաբորատոր առաջադրանք 10

Բետա-գալակտոզիդազի ակտիվության որոշում

Բետա-գալակտոզիդազը (բետա-D-գալակտոզիդ գալակտոհիդրոլազ, լակտազ, EC համար՝ 3.2.1.23 β-Գալ) կատալիզում է հետևյալ հիդրոլիզը/հիդրոլիզի ռեակցիան՝

β-D-գալակտոզիդ + H_2O ⟶ գալակտոզ + ալկոհոլ:

Այն ունի լայն տարածվածություն մանրէներում, կենդանիների օրգանիզմներում և բույսերում: Նպաստավոր pH-ը 6-8 է:

Ֆերմենտի ակտիվության չափման միավորն է 1 մկմոլ օ-նիտրոֆենիլ-բետա-D-գալակտոպիրանոզիդի հիդրոլիզը միավոր ժամանակում (րոպե) 25^0C ջերմաստիճանում pH = 7.5-ի և 405 նմ երկարությամբ ալիքի պայմաններում:

Անհրաժեշտ սարքեր և նյութեր.

1. Սարքեր և նյութեր՝ նախատեսված բակտերիաների աճեցման և կենսազանգվածի ստացման համար:

2. Ջերմակարգավորվող խցիկ, լամինար պահարան, ցենտրիֆուգներ, իոնաչափիչ սարք, սպեկտրալուսաչափ, կյուվետներ:

3. 0.3 Մ Na_3PO_4, 0.003 Մ $MgCl_2$ բուֆեր (pH = 7.5), սուբստրատի լուծիչ՝ 0.01 Մ տրիս-քացախաթթու, 0.01 Մ $MgCl_2$ (pH = 7.5), ֆերմենտի լուծիչ՝ 0.01 Մ տրիս-HCl, 0.01 Մ $MgCl_2$, 0.01 Մ մերկապտոէթանոլ, 0.01 Մ NaCl (pH = 7.5), 0.1 Մ Na_3PO_4/K_3PO_4 բուֆեր (pH = 7), 0.1 Մ մերկապտոէթանոլ, 0.014 Մ օ-նիտրոֆենիլ-բետա-D-գալակտոպիրանոզիդ (ՕՆԳՊ) սուբստրատի լուծիչում, որը պետք է պատրաստել յուրաքանչյուր փորձից առաջ:

Բջջային լուծամզվածքը լուծել 0.1 Մ Na_3PO_4/K_3PO_4 (pH = 7) բուֆերում:

Աշխատանքի ընթացքը

Պատրաստել սննդամիջավայր, ավտոկլավել այն, կուլտիվացնել բակտերիաների բջիջները 22-24 ժամ 37^0Cջերմաստիճանում:

Ցենտրիֆուգել կախույթը 10 րոպե 3000-5000 g արագացմամբ և պոկել թորած ջրով: Նորից ցենտրիֆուգել 10 րոպե 3000-5000 g արագացմամբ և, կախված քանակությունից, պոկել 300-500 մկլ 0.1 Մ Na_3PO_4/K_3PO_4 (pH = 7) բուֆերով, ստանալ խիտ բակտերիական կախույթ, լցնել էպենդորֆի մեջ ու կատարվելիք փորձի ողջ ընթացքում թողնել սառույցի մեջ:

Բակտերիաների բջիջները կոտրել *BRANSON* ապրանքանիշի ուլտրաձայնային դեզինտեգրատորով՝ ըստ հետևյալ բնութագրիչների՝ *Pulse*; J 0.0005 վրկ (*on*) – 0.0005 վրկ (*off*); 15 W, *Total (on)* – 2-4 րոպե:

Որոշել բջջային լուծամզվածքում պարունակվող սպիտակուցի քանակությունը Լոուրիի կամ Բրեդֆորդի մեթոդներով (մգ/մլ) (տե՛ս Հավելված 1): Օպտիկական խտության ստացված արժեքը տեղադրել ալբումինի տրամաչափիչ կորից ստացված բանաձևի մեջ:

Կյուվետի մեջ հաջորդաբար լցնել 1 մլ 0.3 Մ Na_3PO_4 բուֆեր, 0.3 մլ 1 Մ մերկապտոէթանոլ, 1.1 մլ 0.014 Մ ՕՆԳՊ,: Ինկուբացնել ստացված խառնուրդը 3-5 րոպե մինչև ցանկալի ջերմաստիճանի հաստատումը, ավելացնել բջջային լուծամզվածք, գրանցել ΔA_{405}-ը 4-5 րոպե: Որոշել կորի գծային հատվածի ΔA_{405}/րոպե-ն: Բետա-գալակտոզիդազի ակտիվությունը որոշել հետևյալ բանաձևով՝

$$As\left[\frac{Մ}{մգ}\right] = \frac{\Delta A_{405}/\text{րոպե}}{3.1 * C_{\text{սպիտ.}}/V_{\text{ռխ.}}},$$

որտեղ As-ը ֆերմենտի մենահատուկ ակտիվությունն է, ΔA_{405}/րոպե-ն՝ կորի թեքության միջին արժեքը (Slope), $C_{\text{սպիտ.}}$-ը՝ սպիտակուցի քանակությունը ուսումնասիրվող նմուշում (մգ/մլ), 3.1-ը՝ o-նիտրոֆենիլ-բետա-D-գալակտոպիրանոզիդի միլիմոլային մարման գործակիցը 405 նմ երկարությամբ ալիքի ներքո, $V_{\text{ռխ.}}$-ն՝ կյուվետում ռեակցիոն խառնուրդի ծավալը (մլ):

Օգտագործված գրականություն

1. https://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/learning-center/assay-library.html.
2. **Nelson D. L., Cox M.**, Lehninger Principles of Biochemsitry, Macmillan learning 7th edition, 2017, 1308 p.
3. **Thatoi H., Mohapatra Das P. K., Mohapatra S., Mondal K. C.**, Microbial Fermentation and Enzyme Technology, CRC Press, 2020, 342 p.
4. **Worthington K. and Worthington V.**, Worthington Enzyme Manual, Worthington Biochemical Corporation, 1993, 280 p.

ԱՇԽԱՏԱՆՔ 4
ՄՐՋՆԱԹԹՈՒՋՐԱԾԻՆԼԻԱԶ ՀԱՄԱԼԻՐ

Մրջնաթթուջրածինլիազ (ՄՋԼ) համալիրը թաղանթակապ է և բաղկացած է մրջնաթթուդեհիդրոգենազ-H (ՄԴՀ-H) և հիդրոգենազ սպիտակուցներից: ՄԴՀ-H-ը հիդրոգենազ-3-ի (կոդավորված *hyc* օպերոնով) հետ կազմում է ՄՋԼ-1 համալիրը, իսկ հիդրոգենազ-4-ի (կոդավորված *hyf* օպերոնով) հետ՝ ՄՋԼ-2 համալիրը: Այն կատալիզում է մրջնաթթվի օքսիդացումը մինչև ածխածնի երկօքսիդի և մոլեկուլային ջրածնի: ՄՋԼ համալիրը հիմնականում պատասխանատու է H_2-ի արտադրության համար, ինչը տեղի է ունենում ածխածնի տարբեր աղբյուրների խմորման ընթացքում:

E. coli-ի հիդրոգենազները

Հիդրոգենազները (այսուհետ՝ նաև Հիդ) ֆերմենտներ են, որոնք կատալիզում են մոլեկուլային ջրածնի (H_2) դարձելի օքսիդացումը: Այս ֆերմենտները լայն տարածում ունեն և բաժանվում են 3 խմբի՝ [Ni-Fe]-, [Fe]- և [Fe-Fe]-հիդրոգենազներ: *E. coli*-ն ունակ է սինթեզելու 4 թաղանթակապ հիդրոգենազ ֆերմենտներ, որոնցից յուրաքանչյուրն ունի իր դերը բջջային նյութափոխանակության մեջ: [Ni-Fe]-հիդրոգենազներում առանցքային տեղ են զբաղեցնում մեծ և փոքր ենթամիավորները, որոնցից մեծ ենթամիավորը հարում է ակտիվ կենտրոնին, իսկ փոքրը պարունակում է [Fe–S] կլաստերներ:

Հիդ-1 ֆերմենտը կոդավորվում է 6 գեներից կազմված օպերոնով՝ *hyaABCDEF*, որի տրանսկրիպցիան կարգավորվում է անթթվածնային նյութափոխանակության միջոցով: Չնայած որ H_2-ի օքսիդացման ռեդօքս պոտենցիալը -420 մՎ է, *E. coli*-ն նիտրատի առկայության դեպքում ընտրում է *hya* օպերոնի տրանսկրիպցիայի ամբողջական ճնշումը: Սա հավանաբար կապված է մրջնաթթվի՝ որպես շնչառական շղթայում էլեկտ-

ռոնի դոնորի հանդես գալու հետ: Բացի այդ՝ բակտերիայի կողմից մրջնաթթվի օքսիդացման փոխարինումը նիտրատային վերականգնմամբ կհանգեցներ H_2-ի արտադրության նվազման, և հետևաբար հիդրոգենազների սինթեզը կլիներ անիմաստ այդ պայմաններում: *Hya* օպերոնի սեկվենավորմամբ պարզվել է, որ հիդ-1-ի առանցքային բաղադրիչը HyaA-ի և HyaB-ի համալիրն է, որի հետերոդիմերային ձևը հայտնի է բենզիլվիոլոգենի հետ կապված՝ որպես էլեկտրոնի դոնոր: Իսկ HyaC ենթամիավորի և հեմային խմբերի վերադրումը հաստատում է այն ենթադրությունը, որ հիդ-1-ն առաջացնում է պրոտոնային էլեկտրաքիմիական գրադիենտ օքսիդավերականգնողական շղթայական մեխանիզմով: Հիդ-1-ը, լինելով թթվածնի նկատմամբ ոչ զգայուն, ունակ է օքսիդացնելու H_2-ը և էլեկտրոն տեղափոխող կոֆակտորների շղթայով էլեկտրոններ տեղափոխելու քինոնային պուլ: Հիդ-1-ի կողմից H_2-ի օքսիդացման մեխանիզմի ներկայիս վարկածն այն է, որ Ni–Fe–CO–2CN$^-$ կոֆակտորն ազդում է արգինին պարունակող շղթայի հատվածի վրա, ինչը թույլ է տալիս H_2-ի մոլեկուլին ճեղքվել պրոտոնի և հիդրիդ իոնի:

E. coli-ում հայտնաբերված **Հիդ-2**-ը հայտնի է որպես H_2 կլանող հիդրոգենազ: Հիդ-2-ի առավելագույն սինթեզ դիտվում է անաերոբ շնչառությանժամանակ, հատկապես էքսպոնենցիալ աճի փուլում գլիցերոլի՝ որպես էլեկտրոնի դոնորի և ֆումարաթթվի՝ որպես վերջնական էլեկտրոնի ակցեպտորի առկայության պայմաններում: Այս հիդրոգենազը կոդավորվում է *hybOABCDEFG* օպերոնով, որի տրանսկրիպցիան կարգավորվում է IscR և NarL սպիտակուցների կողմից և, ինչպես հիդ-1-ի դեպքում, այս դեպքում ևս ճնշվում է արտաքին նիտրատի առկայությամբ: Այս ֆերմենտի առանցքային ենթամիավորներն են HybO-ն և HybC-ն, որոնցից HybO-ն փոքր ենթամիավորն է և պարունակում է երեք (Fe–S) կլաստերներ, , իսկ ակտիվ կենտրոնին մոտ հատվածում գտնվում է չորրորդ (Fe–S) կլաստերը, զգայուն է թթվածնի նկատմամբ: HybC-ն մեծ ենթամիավորն է, որը պարունակում է [NiFe] ակտիվ կենտրոնը: 2010 թվականին հիդ-2-ի մեկուսացումը թույլ է տվել բացահայտել դրա սպեկտրոսկոպիկ և էլեկտրաքիմիական բնութագիրը: Այսպիսով՝ հնարավոր է եղել հաշվել H_2-ի հետ կապման K_m-ը, որը կազմել է 17 մկՄ էլեկտրոդի -175 մՎ օքսիդա-

վերականգնողական պոտենցիալի դեպքում: Դեռ ավելին՝ մաքրված հիդ-2-ը ակտիվ է համեմատաբար ցածր պոտենցիալային արժեքներում և ապաակտիվանում է -80 մՎ արժեքի դեպքում: Մյուս կարևոր հանգամանքն այն է, որ այս ֆերմենտը *in vitro* պայմաններում ամբողջությամբ դարձելի է, ինչն ավելի է մեծացնում դրա նկատմամբ հետաքրքրությունը՝ որպես անաերոբ պայմաններում *in vivo* ջրածնի արտադրիչի : Ամբողջական բջիջներում H_2-ի օքսիդացումը հիդ-2-ի կողմից կարող է կապված լինել մենաքինոն-կախյալ ֆերմենտների հետ, ինչպիսին է ֆումարաթթու-ռեդուկտազը: Սակայն միայն հիդ-2 պարունակող մուտանտը կարող է արտադրել H_2 գազ՝ ինկուբացվելով գլիցերոլի խմորման պայմաններում: Այս ակտիվությունը կախված է *HybA* գենից, և ուսումնասիրությունները ցույց են տվել, որ տեղի է ունենում էլեկտրոնի դարձելի տեղափոխություն հիդ-2-ի միջոցով, և իզոֆերմենտը գործում է որպես վերօքս ճնշում առաջացնող փական՝ օքսիդացնելով H_2-ը համապատասխան էլեկտրոնի ակցեպտորների առկայությամբ և պրոտոններից առաջացնելով H_2 քինոնային պուլի ընթացքում: Սա ցույց է տալիս, որ հիդ-2-ը սերտորեն կապված է պրոտոնաշարժ ուժի ձևավորման հետ, և հետևաբար հակադարձ ռեակցիան պետք է տեղի ունենա վերջինիս միջոցով:

Հիդ-3-ը հայտնի է խմորման պայմաններում իր գործունեությամբ: Այն կոդավորվում է *hycABCDEFGHI* օպերոնով, որի արտահայտումը կարգավորվում է FhlA սպիտակուցի միջոցով: Այն մրջնաթթվային պատասխանի տրանսկրիպցիոն կարգավորիչ է: *E. coli*-ն մրջնաթթու արտադրում է անաերոբ պայմաններում, ինչն էլ պիրոխաղողաթթումրջնաթթուլիազի (ՊԽՄԼ) համար ակտիվացման պայմանն է: ՊԽՄԼ-ն, ֆիզիկապես փոխազդելով մրջնաթթվային անցուղիներից FocA-ի հետ, անմիջապես իրականացնում է մրջնաթթվի դուրսբերումը բջջից դրա սինթեզից հետո: Շնչառության ժամանակ առաջացած մրջնաթթուն պերիպլազմում ենթարկվում է օքսիդացման, սակայն խմորման պայմաններում այն դուրս է բերվում բջջից: Քանի որ մրջնաթթվի pK_a-ն 3.75 է, հետևաբար արտաբջջային pH-ի բարձրացման դեպքում FocA-ն իրականացնում է իոնների դեպի ներս անցումը: Ընդհանուր առմամբ գենետիկական կարգավորումը հավասարակշռված է, և H_2-ի արտադրության արտաքին գործոններն են

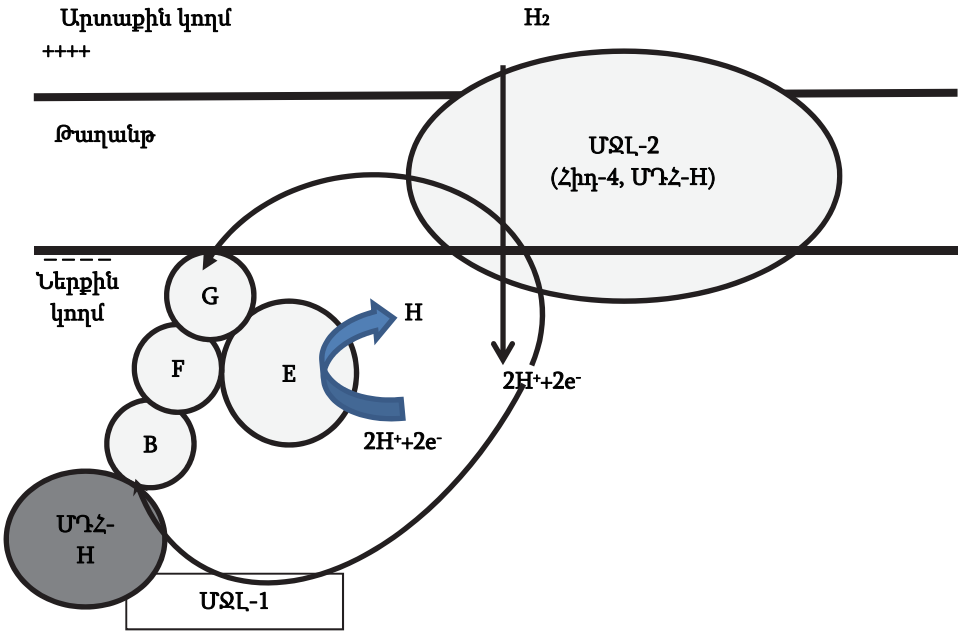
ցածր pH-ը և մրջնաթթվի բարձր խտությունը: Հիդ-3-ի կատալիտիկ ակտիվ կենտրոնը կոդավորվում է *HycE* գենով, իսկ HycG-ն փոքր ենթամիավորն է, որը պարունակում է մեկ (Fe–S) կլաստեր: *HycE, HycG* գեներով կոդավորվող սպիտակուցները, կապված լինելով HycB-ին և HycF-ին, իրենց են միացնում մոլիբդենկախյալ մրջնաթթուդեհիդրոգենազ-H-ը (ՄԴՀ-H)՝ առաջացնելով մրջնաթթուջրածինլիազ համալիրը (ՄՋԼ-1) (*Նկ. 19*): Հինգ ենթամիավորից բաղկացած ՄԴՀ-H-HycBEFG դոմենը նախատեսված է էլեկտրոնների տեղափոխման փակ համակարգի ստեղծման համար՝ անմիջականորեն իրար կապելով մրջնաթթվի օքսիդացման և պրոտոնների վերականգնման գործընթացները: Հարկ է նշել, որ այս թերմոդինամիկորեն նախընտրելի ակտիվությունը կարող է հանգեցնել պրոտոնների կամ այլ իոնների տեղափոխության և հետևաբար նաև էներգիայի պահպանման:

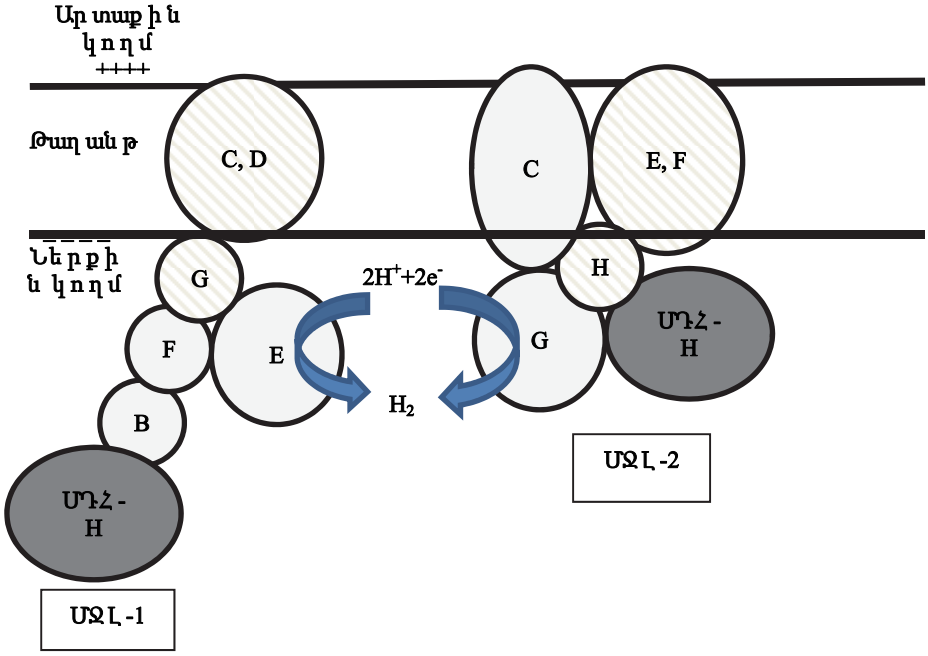
Հայտնի է նաև **Հիդ-4**-ը, որը կոդավորվում է *hyfABCDEFGHIJRfocB* օպերոնով և սերտորեն կապված է հիդ-3-ի հետ: *E. coli*-ում *hyf* օպերոնն ամբողջությամբ ուսումնասիրված չէ, հետևաբար հնարավոր չէ չափել հիդրոգենազային ակտիվությունը: Ինչպես հիդ-3-ը կոդավորող օպերոնի, այնպես էլ *hyf*-ի տեղամասում չկա այլ գեն, որը կարող էր կոդավորել մրջնաթթուդեհիդրոգենազը և ուղղակիորեն այս ֆերմենտը դարձնել ՄՋԼ-2-ի բաղադրիչ: Սակայն ներկայումս HyfA ենթամիավորի գեների, ենթադրյալ մրջնաթթվային անցուղու FocB և դրա կարգավորումն իրականացնող սպիտակուցի՝ HyfR գեների կոդավորումը, ինչպես նաև Թոչունյանի խմբի ստացած փորձարարական տվյալները թույլ են տալիս ենթադրել, որ հիդ-4-ը մաս է կազմում ՄՋԼ-2 համալիրի: Այնուամենայնիվ, ՄՋԼ-2 համալիրն ամբողջությամբ և ակտիվ վիճակով չի հաջողվել անջատել: Հիդ-4-ի գոյության այլընտրանքային ապացույց է նաև այն, որ դրա կողմից H_2-ի արտադրման ակտիվությունը կարող է պայմանավորված լինել իոնային տրանսթաղանթային գրադիենտի առաջացմամբ:

Հիդ-4-ի ֆիզիոլոգիական դերը դեռևս պետք է ուսումնասիրվի, սակայն, ըստ առաջ քաշված տեսության, այն H_2-ի արտադրման ժամանակ հանդես է գալիս որպես պրոտոնային պոմպ և, կախված պայմաններից (արտաքին pH, սուբստրատի տեսակ և խտություն), պրոտոնաշարժ ուժի

հավասարակշռման համար կարող է թաղանթով պրոտոններ տեղափոխել՝ արտադրելով H_2, կամ էլ օգտագործել պրոտոնաշարժ ուժը՝ H_2-ի օքսիդացման համար։

Խմորման ընթացքում պրոտոնների տեղափոխման և պրոտոնաշարժ ուժի առաջացման համար պահանջվում են ԱԵՖազի բարձր ակտիվություն, H^+-ի և K^+-ի հոսք և հիդրոգենազ ֆերմենտների ակտիվություն։ Գլյուկոզի խմորման ընթացքում F_oF_1-ԱԵՖազը փոխազդում է կալիումական տեղափոխիչ Trk համակարգի հետ, և ԱԵՖ-ի հիդրոլիզի հետևանքով տեղափոխված H^+-ը, որն անցնում է հիդրոգենազային համակարգ, սինթեզում է H_2։ Այնուհետև հիդրոգենազային համակարգի միջոցով H_2-ը մտնում է ցիկլի մեջ՝ պրոտոններ ուղարկելով $ՆԱԴ^+$-ին և վերականգնելով այն մինչև ՆԱԴH։ Վերջինս օքսիդանալով պրոտոնները փոխանցում է F_oF_1-ԱԵՖազին։ Բացի այդ՝ H^+ դեպի թաղանթակապ կարող են տեղափոխվել նաև այլ ֆերմենտներ։ $ՆԱԴ^+$-ը նույնպես կարող է փոխազդել Trk համակարգի հետ, և ենթադրյալ F_oF_1-ԱԵՖազ-Trk համալիրը կարող է իրականացնել H^+/K^+ հակատեղափոխություն։ Այսպիսի փոխազդեցությունն ազդում է պրոտոնաշարժ ուժի առաջացման վրա։ Գլիցերոլի խմորման ընթացքում ևս ենթադրվում է, որ F_oF_1-ԱԵՖազը փոխազդում է հիդրոգենազային համակարգի հետ, երբ վերջինս կրկին ձևավորում է ջրածնային ցիկլ ուղղակիորեն կամ թիոլային խմբերի միջոցով և, փոխազդելով F_oF_1-ԱԵՖազի հետ, խթանում է պրոտոնաշարժ ուժի առաջացումը։





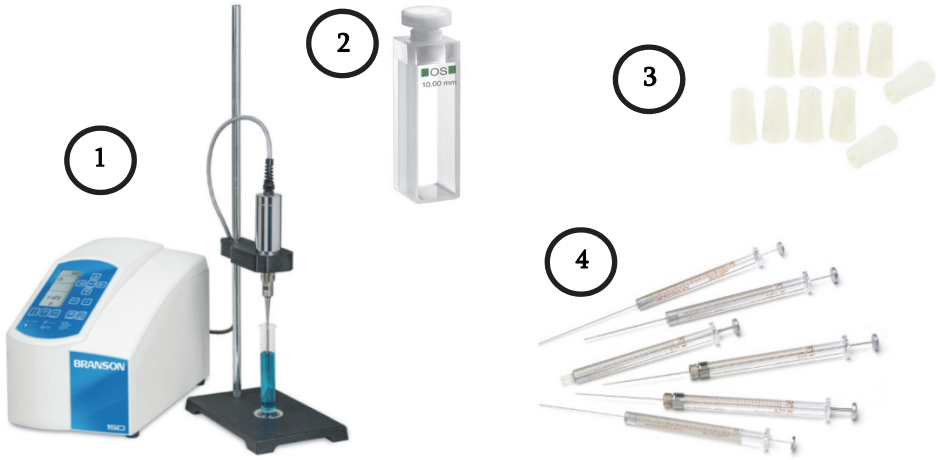
Նկ. 19. Մրջնաթթուջրածինլիազ համալիր

Անհրաժեշտ սարքեր և նյութեր.

1. Սարքեր և նյութեր՝ նախատեսված բակտերիաների աճեցման և կենսազանգվածի ստացման համար:

2. Թերմոստատ, լամինար պահարան, ցենտրիֆուգներ, իոնաչափիչ սարք, սպեկտրալուսաչափ, ներարկիչներ, խտացուցիչ, գազերի գեներատոր, ուլտրաձայնային դեզինտեգրատոր, կյուվետներ, սիլիկոնե խցաններ, *HAMILTON* ապրանքանիշի ներարկիչ՝ 5-10 մկլ ծավալով, վակուումային պոմպ (*Նկ. 20*):

3. Սառույց, 50 մՄ MOPS բուֆեր (pH = 7.5. կարգավորել NaOH-ի լուծույթով), որը պարունակում է 4 մՄ բենզիլվիոլոգենի լուծույթ և 20 մկգ նատրիումի դիթիոնիտի լուծույթ, 25 մՄ մրջնաթթվի նատրիումական աղի լուծույթ:



Նկ. 20. *Աշխատանքի համար անհրաժեշտ սարք և պարագաներ*
1. BRANSON SFX150 ուլտրաձայնային դեզինտեգրատոր, 2, կյուվետ, 3. սիլիկոնե խցաններ, 4. HAMILTON ապրանքանիշի ներարկիչներ

Աշխատանքի ընթացքը

Պատրաստել սննդամիջավայր, այնուհետև ավտոկլավել այն, կուլտիվացնել բակտերիաների բջիջները 22-24 ժամ 37^{0}C ջերմաստիճանում:

Բակտերիական կենսազանգված ստանալու համար կախույթը ցենտրիֆուգել 10 րոպե 3000-5000 g արագացմամբ և պոկել թորած ջրով: Նորից ցենտրիֆուգել 10 րոպե 3000-5000 g արագացմամբ և, կախված քանակությունից, պոկել 300-500 մկլ 50 մՄ MOPS բուֆերով: Ստանալ խիտ բակտերիական կախույթ և լցնել էպենդորֆի մեջ՝ կատարվելիք փորձի ողջ ընթացքում թողնելով սառույցի մեջ:

Բակտերիաների բջիջները կոտրել *BRANSON* ապրանքանիշի ուլտրաձայնային դեզինտեգրատորով՝ ըստ հետևյալ բնութագրիչների՝ *Pulse*; J 0.0005 վրկ (*on*) – 0.0005 վրկ (*off*); 15 W, *Total (on)* – 2-4 րոպե:

Որոշել բջջային մզվածքում պարունակվող սպիտակուցի քանակությունը Լոուրիի կամ Բրեդֆորդի մեթոդներով (մկգ/մկլ) (տե՛ս Հավելված 1): Օպտիկական խտության ստացված արժեքը տեղադրել ալբումինի տրամաչափիչ կորից ստացված բանաձևի մեջ:

Այնուհետև կյուվետների մեջ ավելացնել 800 մկլ 4 մՄ բենզիլվիոլոգենի լուծույթ և պատրաստել նատրիումի դիթիոնիտի լուծույթ՝ ~500 մկլ: Կյուվետները փակել սիլիկոնե խցաններով և վակուումային պոմպով հանել կյուվետում պարունակվող օդը ~ 10 րոպե: Մինչ օդը դուրս կգա կյուվետից, միացնել օդի ճնշակը (կոմպրեսոր), ապա՝ ազոտի գեներատորը և սպասել էկրանին 4.0 արժեքի հաստատմանը: Այնուհետև արդեն վակուումի պոմպից ազատված կյուվետի մեջ ազոտ փչելու համար անհրաժեշտ է սիլիկոնե խցանի մեջ մտցնել լրացուցիչ երկրորդ ասեղը, որը կապահովի կյուվետում պարունակվող թթվածնի արտահոսքը: Ապա խցանի մեջ մտցնել ազոտի հոսքն ապահովող ասեղը: Լրացուցիչ երկրորդ ասեղը չօգտագործելու դեպքում կամ սիլիկոնե խցանի մեջ այն ամբողջությամբ չմտցնելու հետևանքով ազոտի՝ դեպի կյուվետ հոսքի պատճառով կյուվետը կպայթի: Այդ իսկ պատճառով պետք է խստագույնս պահպանել կանոնները և զգույշ լինել: Այսպիսով՝ կյուվետ ազոտ ներփչելու քայլերի հաջորդականությունը հետևյալն է. խցանի մեջ նախ մտցնել լրացուցիչ երկրորդ ասեղը, այնուհետև՝ ազոտի հոսքն ապահովող ասեղը և

ազոտ ներփչել 5 րոպե: Վերջում ասեղները խցանից հանել միաժամանակ և դադարեցնել ազոտի ներհոսքը:

Հաջորդիվ յուրաքանչյուր կյուվետի մեջ *HAMILTON* ապրանքանիշի ներարկիչով ավելացնել նատրիումի դիթիոնիտի լուծույթ մինչև թույլ կապույտ գունավորման առաջացումը և միացնել համակարգիչն ու սպեկտրալուսաչափը՝ հաջորդաբար կատարելով հետևյալ քայլերը՝ Cary WinUV, Kinetics, Setup, Cary, Wavelength 600 nm, Y Mode Abs, Y Max 5, X Mode Min, Stop (min) 4:

Այնուհետև յուրաքանչյուր կյուվետի մեջ *HAMILTON* ապրանքանիշի ներարկիչով 4 Մ մրջնաթթվի նատրիումական աղի մայրական լուծույթից ավելացնել 5 մկլ՝ կյուվետում 25 մՄ վերջնական խտությամբ կախույթ ստանալու համար, և սկսել չափումները:

Չափումը սկսելուց անմիջապես առաջ սեղմել *Start* կոճակը և կյուվետ ներարկել 5 մկլ բջջային լուծամզվածք, թափահարել կյուվետը և միանգամից սկսել չափումը: Հարկ է նշել, որ ներարկումը և թափահարումը պետք է տևեն վայրկյաններ:

Չափումից հետո ընտրել *Cursor Modes, Ruler-Point to point*, այնուհետև հաստատել OK հրամանով: Ընտրել կորի միջին թեքության արժեքը (Slope) և համեմատել այն մի քանի հատվածներում: Վերջնական արժեքը գրանցելուց առաջ համեմատել կորի տարբեր հատվածների թեքության արժեքները (Slope), և եթե բոլորը նույն տիրույթում են, ապա գրանցել արժեքը:

Մրջնաթթուդեհիդրոգենազային ակտիվությունը որոշել հետևյալ բանաձևով՝

$$As\left[\frac{Ս}{մկգ}\right] = \frac{A*(B+L+K)}{è*E_m*D*C_{սպիտ.}},$$

որտեղ As-ը ֆերմենտի մենահատուկ ակտիվությունն է, A-ն՝ կորի թեքության միջին արժեքը (*Slope*), B-ն՝ բենզիլվիոլոգենի օգտագործված մասը (մկլ), L-ը՝ ավելացված նմուշի քանակությունը (մկլ), K-ն՝ ավելացված մրջնաթթվի նատրիումական աղի քանակությունը (մկլ), E_m-ը՝ մոլյար կլանողականությունը (բենզիլվիոլոգենի համար այն 7.4 $Ս^{-1}$ $սմ^{-1}$ է), Cսպիտ.-ը՝ սպիտակուցի քանակությունը ուսումնասիրվող նմուշում (մկգ/մկլ), è-ն՝ էլեկտրոնների թիվը 2, D = 5 մկլ:

Որոշել մրջնաթթուդեհիդրոգենազի ակտիվությունը՝ ըստ մեթոդում նշված բանաձևի, եթե կինետիկ կորից ստացված թեքության արժեքը 2.1567 ՕԽ է:

Լաբորատոր առաջադրանք 2
Հիդրոգենազի ակտիվության որոշումը in vitro պայմաններում

E. coli-ն ունակ է սինթեզելու երեք թաղանթակապ մրջնաթթուդեհիդրոգենազներ և չորս [NiFe]-հիդրոգենազներ: Վերջինները, տեղակայված լինելով պերիպլազմում, օքսիդացնում ենջրածինը, իսկ մրջնաթթուդեհիդրոգենազներից երկուսը՝ ՄԴՀ-N և ՄԴՀ-O, օքսիդացնում են նաև մրջնաթթուն՝ մասնակցելով բջջում տեղի ունեցող էներգիական նյութափոխանակությանը: Անաերոբ մանրէների համար ջրածինը և մրջնաթթուն էլեկտրոնի դոնոր են, և հիդրոգենազների կողմից *in vitro* պայմաններում H_2-ի դարձելի օքսիդացման շնորհիվ *E. coli*-ում հայտնաբերված բոլոր հիդրոգենազները կարելի է ուսումնասիրել՝ որպես էլեկտրոնների արհեստական ակցեպտոր օգտագործելով բենզիլվիոլոգենը: Բենզիլվիոլոգենը նատրիումի դիթիոնիտի հետ օքսիդավերականգնողական ռեակցիայի շնորհիվ ենթարկվում է գունային փոփոխության, որում E° = -350 մՎ, ինչը բենզիլվիոլոգենը դարձնում է հասանելի H_2-ի օքսիդացումից առաջացած էլեկտրոնների համար:

Անհրաժեշտ սարքեր և նյութեր.

1. Սարքեր և նյութեր՝ նախատեսված բակտերիաների աճեցման և կենսազանգվածի ստացման համար:

2. Ջերմակարգավորվող խցիկ, լամինար պահարան, ցենտրիֆուգներ, իոնաչափիչ սարք, սպեկտրալուսաչափ, ներարկիչներ, խտացուցիչ, գազերի գեներատոր, ուլտրաձայնային դեզինտեգրատոր, կյուվետներ, սիլիկոնե խցաններ, *HAMILTON* ապրանքանիշի ներարկիչ՝ 5-10 մկլ ծավալով, վակուումային պոմպ (*Նկ. 20*):

3. Սառույց, 50 մՄ MOPS բուֆեր (pH = 7.5. կարգավորել NaOH-ի լուծույթով), որը պարունակում է 4 մՄ բենզիլվիոլոգենի լուծույթ, և 20 մկգ նատրիումի դիթիոնիտի լուծույթ:

Աշխատանքի ընթացքը

Պատրաստել սննդամիջավայր, այնուհետև ավտոկլավել այն, կուլտիվացնել բակտերիաների բջիջները 22-24 ժամ 37^{0}C ջերմաստիճանում:

Բակտերիական կենսազանգված ստանալու համար կախույթը ցենտրիֆուգել 10 րոպե 3000-5000 g արագացմամբ և լուծել թորած ջրով: Նորից ցենտրիֆուգել 10 րոպե 3000-5000 g արագացմամբ և, կախված քանակությունից, պոկել 300-500 մկլ 50 մՄ MOPS բուֆերով: Ստանալ խիտ բակտերիական կախույթ և լցնել էպենդորֆի մեջ՝ կատարվելիք փորձի ողջ ընթացքում թողնելով սառույցի մեջ:

Բակտերիաների բջիջները կոտրել *BRANSON* ապրանքանիշի ուլտրաձայնային դեզինտեգրատորով՝ ըստ հետևյալ բնութագրիչների՝ *Pulse*; J 0.0005 վրկ (*on*) – 0.0005 վրկ (*off*); 15 W, *Total (on)* – 2-4 րոպե:

Որոշել բջջային մզվածքում պարունակվող սպիտակուցի քանակությունը Լոուրիի կամ Բրեդֆորդի մեթոդներով (մկգ/մկլ) (տե՛ս Հավելված 1): Ստացված ՕԽ արժեքը տեղադրել ալբումինի տրամաչափիչ կորից ստացված բանաձևի մեջ:

Այնուհետև կյուվետների մեջ ավելացնել 800 մկլ 4 մՄ բենզիլվիոլոգենի լուծույթ և պատրաստել նատրիումի դիթիոնիտի լուծույթ՝ ~500 մկլ: Կյուվետները փակել սիլիկոնե խցաններով և վակուումային պոմպով հանել կյուվետում պարունակվող օդը ~10 րոպե:

Մինչօդը դուրս կգա կյուվետից, միացնել օդի ճնշակը (կոմպրեսոր), ապա՝ ազոտի գեներատորը և սպասել էկրանին 4.0 արժեքի հաստատմանը: Այնուհետև արդեն վակուումի պոմպից ազատված կյուվետի մեջ ազոտ փչելու համար անհրաժեշտ է սիլիկոնե խցանի մեջ մտցնել լրացուցիչ երկրորդ ասեղը, որը կապահովի կյուվետում պարունակվող թթվածնի արտահոսքը: Ապա խցանի մեջ մտցնել ազոտի հոսքն ապահովող ասեղը: Լրացուցիչ երկրորդ ասեղը չօգտագործելու դեպքում կամ սիլիկոնե խցանի մեջ ամբողջությամբ չմտցնելու հետևանքով ազոտի՝ դեպի կյու-

վետ հոսքի պատճառով կյուվետը կպայթի: Այդ իսկ պատճառով պետք է խստագույնս պահպանել կանոնները և զգույշ լինել: Այսպիսով՝ կյուվետ ազոտ ներփչելու քայլերի հաջորդականությունը հետևյալն է. խցանի մեջ նախ մտցնել լրացուցիչ երկրորդ ասեղը, այնուհետև՝ ազոտի հոսքն ապահովող ասեղը և ազոտ ներփչել 5 րոպե: Վերջում ասեղները խցանից հանել միաժամանակ և դադարեցնել ազոտի ներհոսքը: Այդ ընթացքում միացնել ջրածնի գեներատորը և վահանակին 4.0 արժեքի հաստատման դեպքում կյուվետի մեջ փչել ջրածին 30-60 վրկ, իսկ գազի ցածր հոսքի դեպքում թույլատրվում է փչել նույնիսկ ավելի: Այս դեպքում ևս օգտագործել լրացուցիչ երկրորդ ասեղ և խցանից ասեղները հանել միաժամանակ:

Այնուհետև յուրաքանչյուր կյուվետի մեջ *HAMILTON* ապրանքանիշի ներարկիչով ավելացնել նատրիումի դիթիոնիտի լուծույթ մինչև թույլ կապույտ գունավորման առաջացումը և միացնել համակարգիչն ու սպեկտրալուսաչափը՝ հաջորդաբար կատարելով հետևյալ քայլերը՝ Cary WinUV, Kinetics, Setup, Cary, Wavelength 600 nm, Y Mode Abs, Y Max 5, X Mode Min, Stop (min) 4:

Չափումը սկսելուց անմիջապես առաջ սեղմել *Start* կոճակը և կյուվետ ներարկել 5 մկլ բջջային լուծամզվածք, թափահարել կյուվետը և միանգամիցսկսել չափումը: Հարկ է նշել, որ ներարկումը և թափահարումը պետք է տևեն վայրկյաններ:

Չափումից հետո ընտրել *Cursor Modes, Ruler-Point to point*, այնուհետև հաստատել OK հրամանով: Ընտրել կորի միջին հատվածի թեքության արժեքը (Slope) և համեմատել այն մի քանի հատվածներում: Վերջնական արժեքը գրանցելուց առաջ համեմատել կորի տարբեր հատվածների թեքության արժեքները (Slope), և եթե բոլորը նույն տիրույթում են, ապա գրանցել արժեքը:

Հիդրոգենազային ակտիվությունը որոշել հետևյալ բանաձևով՝

$$\text{As}\left[\frac{\text{Ս}}{\text{մկգ}}\right] = \frac{\text{A}*(\text{B}+\text{L})}{\text{è}*\text{E}_{\text{m}}*\text{D}*\text{C}_{\text{սպիտ.}}} * 1000,$$

որտեղ As-ը ֆերմենտի մենահատուկ ակտիվությունն է, A-ն՝ կորի թեքության միջին արժեքը (*Slope*), B-ն՝ բենզիլվիոլոգենի օգտագործված մասը

(մկլ), L-ը՝ ավելացված նմուշի քանակությունը (մկլ), E_m-ը՝ մոլյար կլանողականությունը (բենզիլվիոլոգենի համար այն 7.4 $Մ^{-1}$ $սմ^{-1}$ է), Cսպիտ.-ը՝ սպիտակուցի քանակությունը ուսումնասիրվող նմուշում (մկգ/մկլ), è-ն՝ էլեկտրոններիթիվը 2, D = 5 մկլ:

Հաշվել հիդրոգենազային ակտիվությունը՝ ըստ մեթոդում նշված բանաձևի, եթե կինետիկ կորից ստացված թեքության արժեքը 3.0215 ՕԽ է:

Լաբորատոր առաջադրանք 3
Հիդրոգենազի ակտիվության որոշումը մեթիլեն կապույտով

Հիդրոգենազ ֆերմենտները կարելի է ուսումնասիրել նաև օգտագործելով մեթիլեն կապույտ, որը ծառայում է որպես էլեկտրոնների արհեստական ակցեպտոր: Ֆերմենտի ակտիվության չափման դեպքում H_2-ի օքսիդացման հետևանքով էլեկտրոնները փոխանցվում են մեթիլեն կապույտին՝ վերականգնելով այն, ինչի հետևանքով դիտվում է գունազրկում:

Անհրաժեշտ սարքեր և նյութեր.

1. Սարքեր և նյութեր՝ նախատեսված բակտերիաների աճեցման և կենսազանգվածի ստացման համար:

2. Թերմոստատ, լամինար պահարան, ցենտրիֆուգներ, իոնաչափիչ սարք, սպեկտրալուսաչափ, ներարկիչներ, խտացուցիչ, գազերի գեներատոր, ուլտրաձայնային դեզինտեգրատոր, կյուվետներ, սիլիկոնե խցաններ, *HAMILTON* ապրանքանիշի ներարկիչ՝ 5-10 մկլ ծավալով, վակուումային պոմպ (*Նկ. 20*);

3. Սառույց, 50 մՄ կալիումֆոսֆատային բուֆեր (pH = 7.0), որը պարունակում է 4.67 գ/լ K_2HPO_4 և 3.15 գ/լ KH_2PO_4, 50 մՄ մեթիլեն կապույտ՝ լուծված 96 %-անոց էթանոլում կամ թորած ջրում (կախված հետազոտական խնդրից):

Աշխատանքի ընթացքը

Պատրաստել սննդամիջավայր, այնուհետև ավտոկլավել այն, կուլտիվացնել բակտերիաների բջիջները 22-24 ժամ 37^0Cջերմաստիճանում:

Բակտերիական կենսազանգված ստանալու համար կախույթը ցենտրիֆուգել 10 րոպե 3000-5000 g արագացմամբ և լուծել թորած ջրով: Նորից ցենտրիֆուգել 10 րոպե 3000-5000 g արագացմամբ և, կախված քանակությունից, լուծել 300-500 մկլ 50 մՄ կալիումֆոսֆատային բուֆերում (pH = 7.0): Խիտ բակտերիական կախույթը լցնել էպենդորֆի մեջ և կատարվելիք փորձի ողջ ընթացքում թողնել սառույցի մեջ:

Ըստ անհրաժեշտության՝ բակտերիաների բջիջները կոտրել *BRANSON* ապրանքանիշի ուլտրաձայնային դեզինտեգրատորով՝ ըստ հետևյալ բնութագրիչների՝ *Pulse*; J 0.0005 վրկ (*on*) – 0.0005 վրկ (*off*); 15 W, *Total (on)* – 2-4 րոպե:

Որոշել բջջային մզվածքում պարունակվող սպիտակուցի քանակությունը Լոուրիի կամ Բրեդֆորդի մեթոդներով (մկգ/մկլ) (տե՛ս Հավելված 1): Ստացված ՕԽ արժեքը տեղադրել ալբումինի տրամաչափիչ կորից ստացված բանաձևի մեջ:

Այնուհետև կյուվետների մեջ ավելացնել 1.9 մլ 50 մՄ կալիումֆոսֆատային բուֆեր (pH = 7.0) և *HAMILTON* ապրանքանիշի ներարկիչով ավելացնել 3 մկլ 50 մՄ մեթիլեն կապույտ: Կյուվետները փակել սիլիկոնե խցաններով և վակուումային պոմպով հանել կյուվետում պարունակվող օդը ~10 րոպե:

Մինչ օդը դուրս կգա կյուվետից, միացնել ջրածնի գեներատորը և վահանակին 4.0 արժեքի հաստատման դեպքում կյուվետի մեջ փչել ջրածին 2-3 րոպե՝ ասեղներն ընկղմելով հեղուկի մեջ: Գազի ցածր հոսքի դեպքում թույլատրվում է փչել նույնիսկ ավելի: Կյուվետ ջրածին ներփչելու քայլերի հաջորդականությունը հետևյալն է. խցանի մեջ նախ մտցնել լրացուցիչ երկրորդ ասեղը, այնուհետև՝ ջրածնի հոսքն ապահովող ասեղը և ներփչել ջրածինը: Վերջում ասեղները խցանից հանել միաժամանակ և դադարեցնել ջրածնի ներհոսքը:

Հաջորդիվ միացնել համակարգիչն ու սպեկտրալուսաչափը՝ հաջորդաբար կատարելով հետևյալ քայլերը՝ Cary WinUV, Enzyme Kinetics, Setup, Cary, Wavelength 570 nm, Stop (min) 15:

Չափումը սկսելուց անմիջապես առաջ սեղմել *Start* կոճակը և կյուվետ ներարկել 5-10 մկլ բջջային լուծամզվածք, թափահարել կյուվետը և

միանգամից սկսել չափումը: Հարկ է նշել, որ ներարկումը և թափահարումը պետք է տևեն վայրկյաններ, իսկ չափման ընթացքում ջերմաստիճանը պետք է պահել հաստատուն՝ 37^{0}C:

Չափումից հետո ընտրել *Cursor Modes, Ruler-Point to point*, այնուհետև հաստատել OK հրամանով: Ընտրել կորի միջին թեքության արժեքը (Slope) մի քանի հատվածներում: Վերջնական արժեքը գրանցելուց առաջ համեմատել կորի տարբեր հատվածների թեքության արժեքները (Slope), և եթե բոլորը նույն տիրույթում են, ապա գրանցել արժեքը:

Հիդրոգենազային ակտիվությունը որոշել հետևյալ բանաձևով՝

$$As\left[\frac{U}{մգ}\right] = \frac{\Delta E * B}{\varepsilon * C_{սպիտ.}},$$

որտեղ As-ը ֆերմենտի մենահատուկ ակտիվությունն է, ΔE-ն՝ կորի թեքության միջին արժեքը (*Slope*), B-ն՝ կյուվետում պարունակվող խառնուրդի ծավալը (~2 մլ), ε-ն՝ մոլյար կլանողականությունը (մեթիլեն կապույտի համար այն 13.1 U^{-1} $սմ^{-1}$ է), $C_{սպիտ.}$-ը՝ սպիտակուցի քանակությունը ուսումնասիրվող նմուշում (մգ/մլ):

Հաշվել հիդրոգենազային ակտիվությունը՝ ըստ մեթոդում նշված բանաձևի, եթե կինետիկ կորից ստացված թեքության արժեքը 4.271 ՕԽ է:

Օգտագործված գրականություն

1. **Lenz O., Lauterbach L., Frielingsdorf S.**, O_2-tolerant [NiFe]-hydrogenases of Ralstonia eutropha H16: Physiology, molecular biology, purification, and biochemical analysis, Methods in Enzymology Chapter Five, 2018, 613:117-151.
2. **McDowall J. S., Murphy B. J., Haumann M., Palmer T., Armstrong F. A., Sargent F.**, Bacterial formate hydrogenlyase complex. PNAS, 2014, 111:3948-3956.
3. **Sawers R. G., Ballantine S. P., Boxer D. H.**, Differential expression of hydrogenase isoenzymes in *Escherichia coli* K-12: evidence for a third isoenzyme. Journal of Bacteriology, 1985, 164:1324-1331.
4. **Soboh B., Pinske C., Kuhns M., Waclawek M., Ihling C., Trchounian K., Trchounian A., Sinz A., Sawers G.**, The respiratory molybdo-selenoprotein formate dehydrogenases of *Escherichia coli* have hydrogen: benzyl viologen oxidoreductase activity. BMC Microbiology, 2011:11.

ԱՇԽԱՏԱՆՔ 5
ԲՆԱԿԱՆ ԺԵԼ ԷԼԵԿՏՐԱՖՈՐԵԶ: ՊՈԼԻԱԿՐԻԼԱՄԻԴԱՅԻՆ ԺԵԼ ԷԼԵԿՏՐԱՖՈՐԵԶ

Ժել էլեկտրաֆորեզ մեթոդի շնորհիվ իրականացվում է մակրոմոլեկուլների (ԴՆԹ, ՌՆԹ, սպիտակուցներ,) ու դրանց հատվածների բաժանում և ուսումնասիրություն՝ հիմնված վերջինների չափերի և լիցքերի վրա: Էլեկտրաֆորեզում օգտագործվում են ագարոզային կամ պոլիակրիլամիդային ժելեր, և, ըստ բնույթի, տարբերակվում են բնափոխող կամ չբնափոխող էլեկտրաֆորեզներ: Ժելը պոլիմեր է, որի կազմությունը և ծակոտկենությունն ընտրվում են ըստ ուսումնասիրվող մոլեկուլների զանգվածի և բնույթի: Սպիտակուցների կամ փոքր նուկլեինաթթուների բաժանման համար օգտագործվում են տարբեր խտությամբ ակրիլամիդներ և պոլիմերիզացնող նյութեր (*cross-linker*): Ակրիլամիդը, ի տարբերություն պոլիակրիլամիդի, թունավոր է, և աշխատելիս անհրաժեշտ է պահպանել անվտանգության կանոնները:

Բնական ժելերը օգտագործվում են չբնափոխող պայմանների դեպքում, ինչի հետևանքով պահպանվում է նմուշի բնական կառուցվածքը: Սա թույլ է տալիս բաժանել տարբեր չափեր և տարածաչափություն ունեցող կենսամոլեկուլներ՝ բաժանումից հետո թողնելով դրանք այն վիճակում, ինչպես եղել են բջջում: Ի տարբերություն սպիտակուցի բաժանման համար նախատեսված մեթոդների՝ բնական ժել էլեկտրաֆորեզի ընթացքում չեն օգտագործվում բնափոխիչներ, և մոլեկուլները բաժանվում են ոչ միայն ըստ իրենց մոլեկուլային զանգվածի և լիցքի, այլ նաև ըստ ժելում հատվածավոր տարածքի (*band*) դասավորման: Սպիտակուցների բաժանման համար բնական ժել էլեկտրաֆորեզը թույլ է տալիս օգտագործել ոչ միայն ընդհանուր բաժանիչ ներկանյութ, այլ նաև մենահատուկ ֆերմենտակապ ներկանյութեր:

Նմուշները կարող են վերցված լինել ցանկացած նյութից, սակայն անջատված այնպես, որ պարունակեն սպիտակուց կամ նուկլեինաթթու: Սովորաբար իրականացվում է բջիջների թաղանթի կոտրում ուլտրաձայ-

նային դեզինտեգրատրով, բլենդերով կամ հոմոգենիզատրով: Էլեկտրաֆորեզին հետևելու և նմուշին ավելի մեծ շարժունակություն հաղորդելու համար ավելացվում է բրոմֆենոլ կապույտ գունանյութը: Էլեկտրաֆորեզի ընթացքում օգտագործվող ժելերը պարունակում են բիսակրիլամիդ և բուֆեր: Կիրառվում են կուտակող (*stacking*) և բաժանող (*resolving*) ժելեր: Կուտակող ժելն ունի բարձր ծակոտկենություն, ինչը մոլեկուլներին թույլ է տալիս տեղաշարժվել, իսկ բաժանիչ ժելը դանդաղեցնում է մոլեկուլների շարժը, քանի որ ունի ավելի ցածր ծակոտկենություն: Փորձի ընթացքում ընտրված բուֆերը պետք է լինի ոչ ռեակցիոնունակ և էլեկտրաֆորեզի ընթացքում հաստատուն պահի pH-ը: Որպես ազատ ռադիկալների աղբյուր և կայունացուցիչ՝ ավելացվում են ամոնիումի պերսուլֆատ և TEMED: Բիսակրիլամիդի ցածր խտությամբ ժելերով հնարավոր է բաժանել մեծ մոլեկուլային զանգված ունեցող մոլեկուլներ, իսկ բարձր խտության դեպքում՝ փոքր մոլեկուլներ: Ժելերը սովորաբար պոլիմերիզացվում են երկու ապակյա մակերևույթների միջև, օգտագործվում է նաև էլեկտրաֆորեզի համար նախատեսված սանր՝ ձևավորելու նմուշների ավելացման համար նախատեսված գրպանիկներ:

Օգտագործելով էլեկտրական դաշտը՝ մոլեկուլներն անցնում են ժելի միջով, որտեղ բացասական լիցքը՝ հրում, իսկ դրական լիցքը ձգում է մոլեկուլներին ժելի միջով: Այսպես մոլեկուլները բաշխվում են ժելի երկարությամբ: Երբ էլեկտրաֆորետիկ խցիկում գտնվող ժելի վրա ազդում է էլեկտրական հոսանքը, մեծ մոլեկուլները շարժվում են ավելի դանդաղ, քան փոքրերը, ինչի հետևանքով տարբեր չափեր ունեցող մոլեկուլները ժելում ձևավորում են գծեր (*Նկ. 22*):

Լաբորատոր առաջադրանք

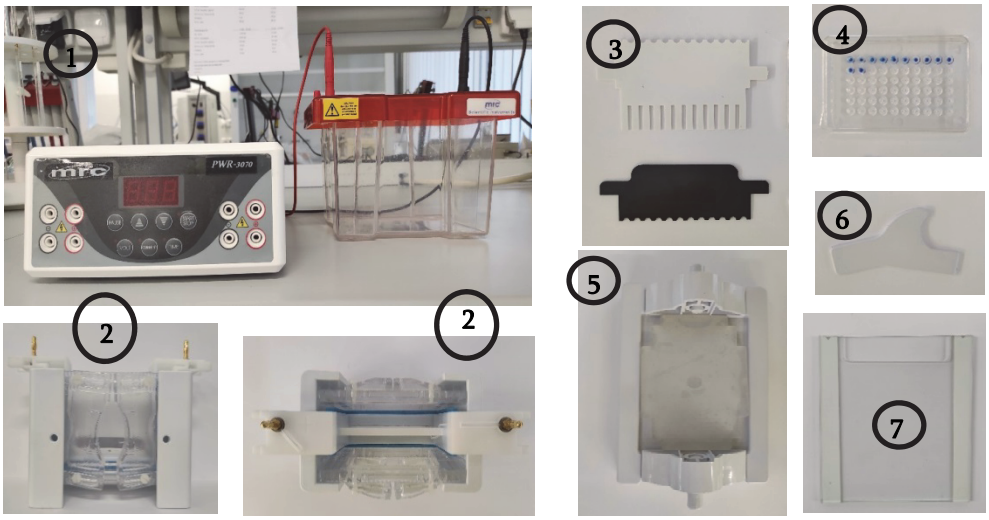
Հիդրոգենազի ակտիվության որոշումը նատիվ ժելում

Անհրաժեշտ սարքեր և նյութեր.

1. Սարքեր և նյութեր՝ նախատեսված բակտերիաների աճեցման, կենսազանգվածի ստացման, բջիջների թաղանթի կոտրման և սպիտակուցի քանակության որոշման համար:

2. Էլեկտրաֆորեզի համար նախատեսված սարք, սանր, ապակիներ, կաղապար, էլեկտրաֆորեզի իրականացման համար նախատեսված խցիկ, կտրիչ, սիլիկոնե ամրակալ, միկրոտարա, *HAMILTON* ապրանքանիշի ներարկիչ՝ 5-10 մկլ ծավալով, գեներատոր, հերմետիկ փակվող տարա, ներարկիչներ (*Նկ. 21*):

3. Երկթորած ջուր (ddH$_2$O), 40 %-անոց բիսակրիլամիդ (bis-Acrylamid), 2.5 Մ տրիս-HCl (pH = 8.5), 20 %-անոց (v/v) տրիտոն (Triton-X 100), TEMED, 10 %-անոց ամոնիումի պերսուլֆատ (APS), գունանյութ (*loading dye*) (սախարոզի 20 %-անոց լուծույթում լուծված բրոմֆենոլկապույտ), բուֆեր, 50 մՄ MOPS բուֆեր, 2.3.5-եռֆենիլտետրազոլիումի քլորիդ (TTC), H$_2$ գազ:



Նկ. 21. *Աշխատանքի համար անհրաժեշտ սարք և պարագաներ*
1. MRC PWR-3070 էլեկտրաֆորեզի սարք և խցիկ, 2ա և 2բ. կաղապար, 3. սանրեր, 4. միկրոտարա, 5. Սիլիկոնե ամրակալ, 6. կտրիչ, 7. ապակիներ

Աշխատանքի ընթացքը

Էլեկտրաֆորեզի իրականացման համար անհրաժեշտ է պատրաստել ժելերը. ընտրել մաքուր, հարթ, առանց ճաքերի ու կոտրվածքների ապակիներ, դնել կաղապարի մեջ այնպես, որ ապակիների հատակները նույն հարթության մեջ լինեն, այնուհետև փակել փականներով, ամրացնել սիլիկոնե մակերևույթին, անշարժացնել ամբողջ համակարգը: Այնուհետև

պատրաստել բաժանող (*Resolving*) ժելը (7.5 %)՝ միախառնելով հետևյալ բաղադրիչները (նշված քանակությունները հաշվարկված են 1 ժելի պատրաստման համար).

երկթորած ջուր (ddH_2O)	4.275 մլ
40 %-անոց բիսակրիլամիդ	1.125 մլ
2.5 Մ տրիս-HCl (pH = 8.5)	0.6 մլ
20 %-անոց (ծավալային) տրիտոն (Triton-X 100)	30 մկլ
TEMED	5 մկլ
10 %-անոց ամոնիումի պերսուլֆատ (APS)	40 մկլ

Նախապես լավ խառնել բոլոր բաղադրիչները՝ բացի ամոնիումի պերսուլֆատից: 10 %-անոց ամոնիումի պերսուլֆատն ավելացնել վերջում, ապա արագ խառնել և ավտոմատ պիպետով արագ լցնել պոլիմերիզացման համար նախատեսված երկու ապակիների միջև՝ ընդհանուր ծավալը հասցնելով բացվածքից 1-1.5 սմ ներքև: Այնուհետև ավելացնել թորած ջուր և սպասել մոտավորապես 40 րոպե: Պոլիմերիզացման ավարտից հետո հեռացնել թորած ջուրը:

Նախքան պոլիմերիզացման ավարտը պատրաստել կուտակող (*stacking*) ժել (5 %)՝ միախառնելով հետևյալ բաղադրիչները (նշված քանակությունները հաշվարկված են 1 ժելի պատրաստման համար).

երկթորած ջուր (ddH_2O)	1.55 մլ
40 %-անոց բիսակրիլամիդ	0.25 մլ
2.5 Մ տրիս-HCl (pH = 8.5)	2.5 մլ
20 %-անոց (ծավալային) տՏրիտոն (Triton-X 100)	10 մկլ
TEMED	2 մկլ
10 %-անոց ամոնիումի պերսուլֆատ (APS)	15 մկլ

Այս դեպքում ևս նախապես լավ խառնել բոլոր բաղադրիչները՝ բացի ամոնիումի պերսուլֆատից: 10 %-անոց ամոնիումի պերսուլֆատն ավելացնել վերջում, արագ խառնել և պիպետով արագ լցնել ապակիների միջև՝ պոլիմերիզացված բաժանող (*resolving*) ժելի (7.5 %) վրա: Դնել էլեկտրաֆորեզի համար նախատեսված սանրը և սպասել մոտավորապես 30 րոպե: Այսպիսով՝ ամբողջական պոլիմերիզացված ժելը պատ-

բաստ է: Ըստ անհրաժեշտության՝ ժելերը կարելի է նաև պահել սառնարանում +4-ից +20^{0}C ջերմաստիճանային պայմաններում, խոնավեցրած և ոչ ավելի քան մեկ շաբաթ:

Հաջորդիվ պատրաստել նմուշները. յուրաքանչյուր նմուշի համար հատուկ, մեկանգամյա օգտագործման միկրոտարայի գրպանիկում խառնել 5 մկլ 20 %-անոց տրիտոն (Triton-X 100), 5 մկլ գունանյութ (*loading dye*) (20 % սախարոզի 20 %-անոց լուծույթում լուծված բրոմֆենոլկապույտ) և 1 մկլ բջջային լուծամզվածք կամ սպիտակուց:

Բուն էլեկտրաֆորեզն սկսելու համար ժելերը դնել էլեկտրաֆորեզի համար նախատեսված խցիկի մեջ այնպես, որ տարայի վրա +-ով և --ով նշված հատվածները համապատասխանեն ամրացված ժելերի կաղապարի վրա + և - նշաններին:

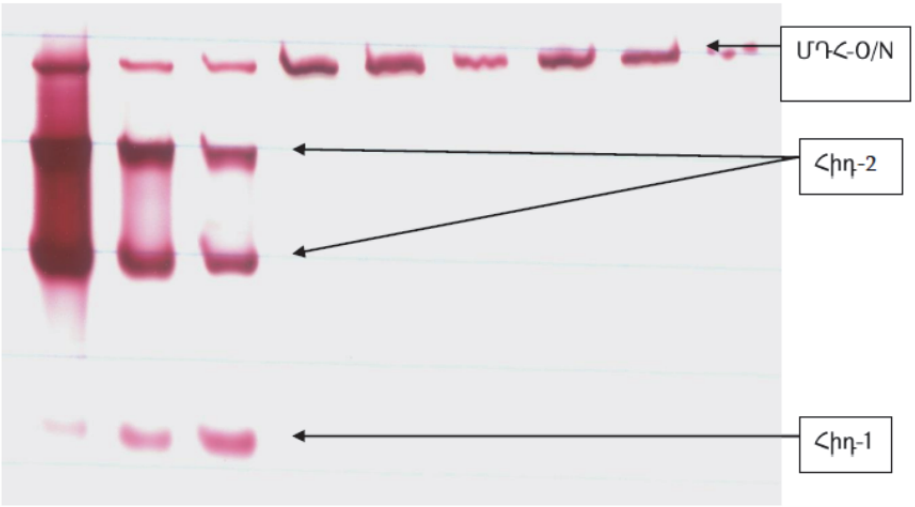
Նախապես պատրաստել մայրական բուֆեր (*running buffer*) (1 Մ գլիցին, 1 Մ տրիս-HCL, pH-ը չկարգավորել) և նոսրացնել 10 անգամ: Ստացված լուծույթը լցնել էլեկտրաֆորեզի իրականացման համար նախատեսված խցիկի մեջ, հանել սանրերը: Արդեն ձևավորված ժելի գրպանիկներում *HAMILTON* ապրանքանիշի ներարկիչով կամ պիպետով ավելացնել նախապես պատրաստված նմուշները՝ 5 մկլ քանակությամբ, և փակել տարան՝ կատոդն ու անոդը համապատասխանեցնելով + և - նշաններին: Էլեկտրաֆորեզն սկսելու համար սարքը միացնել հոսանքի աղբյուրին և ապահովել 80-90 մԱ:

Էլեկտրաֆորեզը տևում է մոտ 2 ժամ, որի ավարտից հետո հիդրոգենազային ակտիվությունը որոշելու համար ժելը պետք է առանձնացնել ապակու մակերևույթից (նշանադրել ըստ անհրաժեշտության) և տեղավորել հերմետիկ փակվող տարայի մեջ: Փոխազդեցության համար անհրաժեշտ է յուրաքանչյուր ժելի վրա ավելացնել 50 մլ 50 մՄ MOPS բուֆեր (pH = 7.5), 10 մգ բենզիլվիոլոգեն ու 17 մգ 2.3.5-եռֆենիլտետրազոլիումի քլորիդ (TTC) և պարբերաբար թափահարել:

Մինչ այդ միացնել ջրածնի գեներատորը և էկրանին 4.0 արժեքի հաստատման դեպքում տարայի մեջ փչել ջրածին առնվազն 3-4 անգամ, իսկ ցածր հոսքի դեպքում՝ նույնիսկ ավելի շատ: Անհրաժեշտ է օգտագործել

լրացուցիչ երկրորդ ասեղ և պահպանել աշխատանքի անվտանգության բոլոր կանոնները՝ ասեղները հանելով միաժամանակ:

Այնուհետև ժելով լի տարան թողնել սենյակային ջերմաստիճանում առնվազն 4-5 ժամ և ապա բացել այն, ժելը տեղավորել ֆիլտրի թղթի վրա ու նկարել (*Նկ. 22*): Ստացված նկարը պահել որևէ կրիչի վրա, իսկ ժելը չորացնել և պահել:



Նկ. 22. *Նատիվ ժելում հիդ-երի և ՄԴՀ-ների ակտիվությունը: Հիդ-3-ի և հիդ-4-ի ակտիվությունը չի կարող հայտնաբերվել այս մեթոդով, քանի որ դրանք օժտված չենէլեկտրաֆորետիկ կայունությամբ:*

Օգտագործված գրականություն

1. **Ballantine S. P., Boxer D. H.**, Nickel-containing hydrogenase isoenzymes from anaerobically grown *Escherichia coli* K-12. Journal of Bacteriology, 1985, 163:454-459.
2. **Trchounian K., Pinske C., Sawers R. G.**, Trchounian A., Dependence on the F_0F_1-ATP synthase for the activities of the hydrogen-oxidizing hydrogenases 1 and 2 during glucose and glycerol fermentation at high and low pH in *Escherichia coli*. Journal of Bioenergetics and Biomembranes, 2011, 43:645-650.

ԱՇԽԱՏԱՆՔ 6
ՄՈԼԵԿՈՒԼԱՅԻՆ ՋՐԱԾՆԻ ԱՐՏԱԴՐՈՒՄԸ ՄԱՆՐԷՆԵՐՈՒՄ

Մանրէների կենսագործունեության հետևանքով միջավայրում դիտվում է օքսիդավերականգնողական պոտենցիալի անկում, որի հիմքում ընկած է տարբեր մոլեկուլների կամ իոնների միջև էլեկտրոնների տեղաշարժը, ինչի հետևանքով փոխվում է դրանց լիցքը: Բոլոր օքսիդավերականգնողական համակարգերը բնորոշվում են նյութերի որոշակի օքսիդիչ և վերականգնիչ համարժեքների ակտիվության հարաբերությամբ: Էլեկտրոդը, որը պատրաստված է քիմիապես չեզոք նյութից (պլատին, ոսկի և այլն), լուծույթի մեջ ընկղմելու դեպքում կարող է տեղի ունենալ միայն տվյալ լուծույթից էլեկտրոնների անցում դեպի էլեկտրոս, ինչի հետևանքով այն ձեռք կբերի համապատասխանաբար դրական (էլեկտրոնի կորուստ) կամ բացասական (էլեկտրոնի ընդունում) պոտենցիալ, ինչն էլ հենց կոչվում է օքսիդավերականգնողական պոտենցիալ (ՕՎՊ):

Բակտերիաներում H_2-ի առաջացումը որոշվում է միջավայրի օքսիդավերականգնողական պոտենցիալի մեծության փոփոխությամբ լուծույթ սուբստրատի (գլյուկոզ, գլիցերին, սաթաթթու և այլն) ներմուծման պայմաններում: ՕՎՊ-ի չափման համար, բացի պլատինե էլեկտրոդից, օգտագործվում են տիտան-սիլիկատային էլեկտրոդներ, որոնք O_2-ի և H_2-ի նկատմամբ զգայուն չեն, օժտված են քիմիական բարձր կայունությամբ, ինչը թույլ է տալիս դրանք օգտագործել pH-ի և ջերմաստիճանային լայն տիրույթում:

Լաբորատոր առաջադրանք 1

Մոլեկուլային ջրածնի ելքի որոշումը էլեկտրաքիմիական եղանակով

Անհրաժեշտ սարքեր և նյութեր.

1. Սարքեր և նյութեր՝ նախատեսված բակտերիաների աճեցման, կենսազանգվածի ստացման և միջավայրի ՕՎՊ-ի՝ պոտենցիաչափիչ եղանակով որոշման համար, պլատինե և համեմատական էլեկտրոդներ:

2. Բաժակներ, ավտոմատ պիպետներ:

3. Փորձարարական լուծույթ, ֆերիցիանիդի 0.3 Մ-անոց լուծույթ, գլյուկոզի 40 %-անոց լուծույթ:

Աշխատանքի ընթացքը

Պատրաստել սննդամիջավայր, այնուհետև ավտոկլավել այն, կուլտիվացնել բակտերիաների բջիջները 22-24 ժամ 37^{0}Cջերմաստիճանում:

Պատրաստել փորձարարական լուծույթ (pH = 7.8), որից 2.8 մլ լցնել բաժակի մեջ և էլեկտրոդներն ընկղմել դրա մեջ՝ միացած պոտենցիաչափիչին: Մի քանի անգամ ավելացնել 0.1 մլ թարմ պատրաստված ֆերիցիանիդի 0.3 Մ-անոց լուծույթ (մինչև լուծույթի վերջնական ծտությունը դառնա 0.01 Մ): Չափումն իրականացնել 25^{0}C ջերմաստիճանում՝ կրկնելով 3 անգամ: Բակտերիական կենսազանգված ստանալու համար կախույթը ցենտրիֆուգել 10 րոպե 3000-5000 g արագացմամբ և լուծել թորած ջրով: Նորից ցենտրիֆուգել 10 րոպե 3000-5000 g արագացմամբ և, կախված քանակությունից, պոկել 300-500 մկլ փորձարարական լուծույթով: Ստանալ խիտ բակտերիական կախույթ:

Նախապես պատրաստված փորձարարական լուծույթից 9.5 մլ լցնել ապակե բաժակի մեջ, ավելացնել համապատասխան խտությամբ ածխածնի աղբյուր և էլեկտրոդներն ընկղմել դրա մեջ:

Չափումները կատարել 37^{0}C ջերմաստիճանում: Բաժակի մեջ ավելացնել 0.5 մլ բակտերիական խիտ կախույթ և գրանցել ժամանակի ընթացքում ՕՎՊ-ի փոփոխությունը:

Աղյուսակ 7

Բակտերիաներում ՕՎՊ-ի անկման և H_2-ի ելքի միջև կապը ըստ Պիսկարևի և համահեղինակների

ՕՎՊ, մՎ	H_2-ի ելքը, մմոլ/լ	ՕՎՊ, մՎ	H_2-ի ելքը, մմոլ/լ
-400	0.73	-610	5.16
-405	0.74	-700	6.44
-410	0.75	-715	8.00
-500	1.45	-720	8.05
-550	2.20	-750	9.15
-580	3.62	-790	9.67
-600	5.07	-800	9.80

Փորձի ավարտից հետո որոշել բակտերիաների չոր քաշը, ինչի համար անհրաժեշտ է նախապես կշռել հախճապակե թասիկները: Այնուհետև հետազոտվող խառնուրդը լցնել թասիկների մեջ և թողնել, որ չորանա 60^{0}C ջերմաստիճանում: Հետևողականորեն չորացնել խառնուրդը, զուգահեռաբար չորացնել նաև փորձարարական լուծույթը: Բակտերիաների բացարձակ չոր քաշը հաշվելու համար որոշել բակտերիա պարունակող և չպարունակող փորձարարական լուծույթներից ստացված չոր քաշերի տարբերությունը: Ըստ էլեկտրոդների ցուցմունքների նվազման տարբերության (ΔPt, ΔTi) որոշել H_2-ի արտադրման արագությունը ($V_{(H2)}$; մՎ ՕՎՊ $р^{-1}$ (մգ չոր քաշ)$^{-1}$) հետևյալ բանաձևով՝

$$V_{(H_2)} = \frac{\Delta Pt - \Delta Ti}{\text{բոպե} \times \text{չոր քաշ}}:$$

Պլատինե էլեկտրոդի գրանցած ՕՎՊ-ի անկման կայունացումից հետո կարելի է որոշել H_2-ի ելքը: Այն հաշվվում է դրական արժեքներից մինչև բացասականները ՕՎՊ-ի անկման մեծությամբ՝ ըստ Պիսկարևի (*տե՛ս Աղ. 7*), և արտահայտվում մմոլ/լ խտությամբ:

Լաբորատոր առաջադրանք 2

Մոլեկուլային ջրածնի ելքի որոշումը ծավալային եղանակով

Բակտերիաներում H_2-ի ելքի որոշման քանակական եղանակներից է ծավալային որոշման եղանակը, որն ի տարբերություն արտաքին միջավայրի ՕՎՊ-ի որոշման մեթոդի, թույլ է տալիս ուղղակիորեն չափել անջատված մոլեկուլային ջրածնի ծավալը:

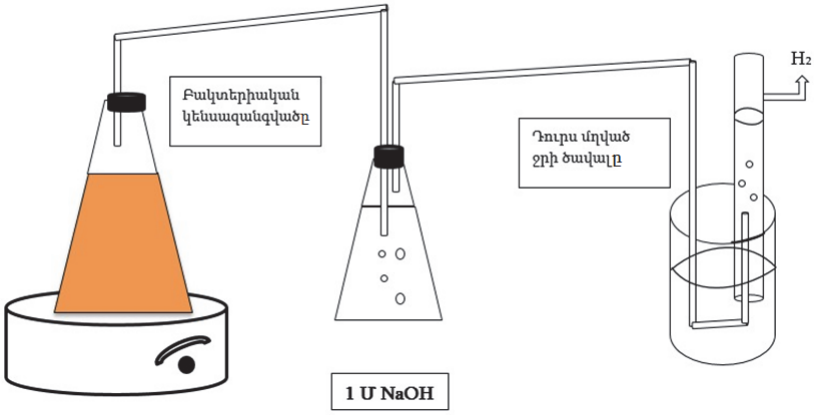
Անհրաժեշտ սարքեր և նյութեր.

1. Սարքեր և նյութեր՝ նախատեսված բակտերիաների աճեցման և կենսազանգվածի ստացման համար:
2. Բաժակներ, ավտոմատ պիպետներ, չափագլան, փորձանոթներ:
3. NaOH-ի 1 Մ-անոց լուծույթ:

NaOH-ի 1 Մ-անոց լուծույթ պարունակող փորձանոթից երկու խողովակներ տանել այնպես, որ դրանցից մեկը միանա անաերոբ պայմաննե-

ռում աճեցվող բակտերիական կենսազանգված պարունակող փորձանոթին, իսկ մյուսն ընկղմվի շրջված չափագլանի մեջ, որը տեղավորված է ջրով լցված բաժակում: Արտադրված գազերը, այդ թվում՝ մոլեկուլային ջրածինը, խողովակով անցնում են դեպի NaOH-ով լի փորձանոթ, ինչը թույլ է տալիս ամբողջ գազային խառնուրդից հեռացնել CO_2-ը: Այնուհետև արտադրված H_2-ն անցնում է չափագլան՝ դուրս մղելով ջուրը (*Նկ. 23*), ընդ որում, արտադրված մոլեկուլային ջրածնի ծավալը համարժեք է չափագլանից դուրս մղված ջրի ծավալին:

Նախապես պատրաստել NaOH-ի 1 Մ-անոց լուծույթ և լցնել համապատասխան փորձանոթի մեջ:



Նկ. 23. *Մոլեկուլային ջրածնի ելքի որոշում ծավալային եղանակով*

Լաբորատոր առաջադրանք 3

Մոլեկուլային ջրածնի ելքի որոշումը գազային քրոմատագրաֆիայի մեթոդով

Մոլեկուլային ջրածնի ելքի որոշման գազային քրոմատագրաֆիական մեթոդը թույլ է տալիս ուղղակիորեն չափել անջատված մոլեկուլային ջրածնի ծավալը քանակապես և բարձր ճշգրտությամբ՝ ի տարբերություն ջրածնի ելքի որոշման այլ մեթոդների:

Անհրաժեշտ սարքեր և նյութեր.

1. Խտացուցիչ (*Compressor*), ազոտի և ջրածնի գեներատորներ,

2. ԳՔ ներարկիչ, սովորական մանրէազերծ ներարկիչ:

3. Բակտերիաների աճեցման մանրէազերծ միջավայր Հանգեյթի կամ բալչ տիպի սրվակներում՝ օդի և լուծույթի 1/2 հարաբերությամբ (*տե՛ս Նկ. 14, 15*):

Աշխատանքի ընթացքը

Հաջորդաբար միացնել խտացուցիչը, ազոտի և ջրածնի գեներատորները, այնուհետև՝ ԳՔ-ն և համակարգիչը: Աշտարակը մաքրելու համար տալ հետևյալ հրահանգները՝ ներարկման առջևի տեղամաս՝ 250^{0}C, առջևի աշտարակ՝ 2 մլ/ր հոսքի արագություն, վառարան՝ 50^{0}C, TCD (*front*)՝ 250^{0}C: Այս պայմաններում սպասել 20-30 ր մինչև համակարգը պատրաստ (*Ready*) լինի աշխատանքին:

Նմուշը ներարկելուց առաջ փոխել հետևյալ պարամետրերը՝ ներարկման առջևի տեղամաս՝ 150^{0}C, առջևի աշտարակ՝ 1 մլ/ր հոսքի արագություն, պահման ժամանակ՝ 4 րոպե, հոսքից հետո (*Post run*)՝ 1 րոպե 100^0°C-ում: Հաջորդաբար հոսքեր իրականացնելու դեպքում ընտրել *Sequence* հրահանգը՝ նշելով նմուշների քանակը և անունը: Սպասել մինչև համակարգը պատրաստ լինի աշխատանքին:

Տրամաչափման համար նախապես անօդ հերմետիկ փակ անոթը հագեցնել ջրածնով: Ներարկիչով վերցնել 100 մկլ ջրածին և ներարկել ու սկսել հոսքը: Հաջորդականություն սահմանելու դեպքում պատրաստ ունենալ ներարկվող նմուշը և համատեղել ինքնաբերաբար սկսվող հաջորդ հոսքի ժամանակահատվածի հետ: Նույն կերպ տրամաչափումն իրականացնել 200, 300, 500 մկլ ջրածնի համար[2]: Ստացված գազաթներով կառուցված կորերի մակերեսների ինտեգրալները համապատասխանեցնել ջրածնի ծավալին:

Նմուշում ջրածնի որոշման համար 18-20 ժամ *E. coli*-ի աճման միջավայրից կախույթը 1.5 % ծավալային խտությամբ սովորական ներարկիչով լցնել մանրէազերծ անաերոբ Հանգեյթի սրվակի մեջ, խառնել և ԳՔ ներարկիչով 200 մկլ գազային ֆազից վերցնել նմուշ, ապա ներարկել: Նմու-

[2] Տրամաչափումն իրականացնել այնքան, մինչև ստացված տվյալներով կառուցված կորի $R^2 \geq 0.95$:

շառումը կատարել պարբերաբար՝ կախված առաջադրված խնդրի պայմաններից: Ստացված կորերի ինտեգրալները համապատասխանեցնել տրամաչափիչ կորի ինտեգրալին:

Օգտագործված գրականություն

1. **Lukey M. J., Parkin A., Roessler M. M., Murphy B. J., Harmer J., Palmer T., et al.**, How *Escherichia coli* is equipped to oxidize hydrogen under different redox conditions. The Journal of Biological Chemistry, 2010, 285: 3928-3938.
2. **Nicholls D**., Bioenergetics, 4th Edition, Elsevier Ltd, 2013, 434 p.
3. **Reddy C. A., Beveridge T. J., Breznak J. A., Marzluf G. A., Schmidt T. M., Snyder L. R.**, Methods for General and Molecular Microbiology, Third Edition, ASM Press, 2007, 1069 p.
4. **Robert K. Poole**, Advances in Microbial Physiology, Volume 68, Elsevier Ltd, 2016, 580 p.

ԱՇԽԱՏԱՆՔ 7
ՆՅՈՒԹԱՓՈԽԱՆԱԿՈՒԹՅՈՒՆԸ ԽԻՍՏ ԱՆԱԵՐՈԲ ՊԱՅՄԱՆՆԵՐՈՒՄ

ՆՅՈՒԹԵՐԻ ՅՈՒՐԱՅՈՒՄԸ *CLOSTRIDIUM* ՑԵՂԻ ԲԱԿՏԵՐԻԱՆԵՐԻ ԿՈՂՄԻՑ

Սպորառաջացնող անաերոբ գրամ-դրական բակտերիաներն առանց սուլֆատի վերականգնման ունակությամբ դասակարգվում են *Clostridium* ցեղում: Դրանք բաժանվում են սախարոլիտիկ և պրոտեոլիտիկ կլոստրիդիաների՝ ըստ իրենց նախընտրած էլեկտրոնի դոնորի: Սախարոլիտիկ կլոստրիդիաները խմորում են ածխաջրերը մինչև բութանաթթվի և քացախաթթվի առաջացումը, իսկ սպիտակուցային միացությունները խմորվում են պրոտեոլիտիկների կողմից: Կլոստրիդիաների խմորումն ունի խմորման ուղու բնորոշ ճյուղավորում: Ավելին՝ *Butyrivibrio, Eubacterium* և *Fusobacterium* ցեղի ներկայացուցիչները ևս ունակ են բութանաթթու արտադրելու, և բոլորը խիստ անաերոբներ են:

Բութանաթթվի առաջացումը: *Clostridium butyricum*-ը գլյուկոզը տեղափոխում է մի շարք փոխադրիչներով, քանի դեռ այն չի վերափոխվել պիրոխաղողաթթվի: Պիրոխաղողաթթուն օքսիդանում է պիրոխաղողաթթու-ֆերրեդոքսինօքսիդառեդուկտազ ֆերմենտի շնորհիվ՝ փոխարկվելով ացետիլ-ԿոԱ-ի. ռեակցիան հայտնի է որպես ֆոսֆորակլաստիկ ռեակցիա: Հիդրոգենազը կարող է օքսիդացնել վերականգնված ֆերրեդոքսինը և առաջացնել H_2.

ֆերրեդոքսինH_2 $\xrightarrow{\text{հիդ.}}$ ֆերրեդոքսին + H_2:

Բոլոր երեք խմբերի հիդրոգենազները՝ [FeFe], [NiFe] և [Fe], հայտնաբերված են կլոստրիդիաներում:

Պիրոխաղողաթթու-ֆերրեդոքսինօքսիդառեդուկտազը պարունակում է թիամինպիրոֆոսֆատ (ԹՊՖ) պրոսթետիկ խումբը, ինչպես պիրոխաղողաթթուդեհիդրոգենազը, և կատալիզում է հետևյալ ռեակցիաները՝

$$CH_3\text{-}CO\text{-}COOH + \text{ԹՊՖ-E} \rightleftharpoons CH_3\text{-}CHOH\text{-ԹՊՖ-E} + CO_2,$$

$$CH_3\text{-}CHOH\text{-ԹՊՖ-E} + \text{ֆերրեդոքսին} + \text{ԿոA-SH} \rightleftharpoons \text{ԹՊՖ-E} + CH_3\text{-}CO\text{-}CoA + \text{ֆերրեդոքսինH}_2:$$

Ռեակցիայում օգտագործված ֆերրեդոքսինն ունի ացետիլ-ԿոA + CO_2/պիրոխաղողաթթու կիսառեակցիայի ռեդոքս արժեքին նման ռեդոքս արժեք, մինչդեռ պիրիդինային նուկլեոտիդները (ՆԱԴ$^+$/ՆԱԴH + H$^+$) ունեն ավելի բարձր ռեդոքս արժեքներ:

$2H^+/H_2$	-410 մՎ
ՖԴ (օքսիդացած/վերականգնված)	-410 մՎ
ՆԱԴ$^+$/ՆԱԴH + H$^+$	-320 մՎ
ացետիլ-ԿոA + CO_2/պիրոխաղողաթթու	-420 մՎ

Քանի որ ֆերրոդոքսինն ունի $2H^+/H_2$ զույգի ռեդոքս արժեքին նման ռեդոքս արժեք, վերականգնված ֆերրեդոքսինի օքսիդացման հիդրոգենազային ակտիվությունը կախված է H_2-ի մասնակի (պարցիալ) ճնշումից և հետևաբար իրականացնում է ֆոսֆորակլաստիկ ռեակցիան: Ֆերրեդոքսինը (Fe–S) սպիտակուց է:

ՆԱԴH-ֆերրեդոքսինօքսիդառեդուկտազը կապում է ՆԱԴH-ի օքսիդացումը ֆերրեդոքսինի վերականգնմանը, և ացետիլ-ԿոA-ն անհրաժեշտ չէ որպես էլեկտրոնի ակցեպտոր: Այն փոխակերպվում է ացետիլֆոսֆատի, որի միջոցով քացախաթթուկինազը կատալիզում է ԱԵՖ-ի սինթեզի ռեակցիան:

$$\text{ՆԱԴH} + H^+ \xrightarrow{\text{ՆԱԴH:ֆերրեդոքսին օքսիդառեդուկտազ}} \text{ՖԴH}_2 \xrightarrow{\text{Հիդ}} H_2:$$

Ռեակցիայի նորմալ ընթացքի դեպքում 100 մոլ գլյուկոզից առաջանում են 76 մոլ բութանաթթու և 42 մոլ քացախաթթու: Սակայն երբ H_2-ը շարունակաբար հեռացվում է թափահարման հետևանքով, ռեակցիայի հավասարակշռության ուղղությունը տեղափոխվում է դեպի աջ, իսկ բու-

թանաթթու/քացախաթթու հարաբերությունը դառնում է 1: Քանի դեռ կինազները ացետիլֆոսֆատից և բութիրիլֆոսֆատից սինթեզում են ԱԵՖ, 4 մոլեկուլ ԱԵՖ սինթեզվում է գլյուկոզից քացախաթթվի և 3 մոլեկուլ բութանաթթվի առաջացման հետևանքով:

Կաթնաթթվի առաջացումը: Միջավայրում առկա կաթնաթթուն և քացախաթթուն կարող են վերածվել բութանաթթվի *Clostridium butyricum*-ի և *Clostridium tyrobutyricum*-ի միջոցով: Դրանք միայն կաթնաթթուն չեն խմորում: Ինչպես հայտնի է, 65 մմոլ բութանաթթու և 59 մմոլ H_2 առաջանում են 100 մմոլ կաթնաթթվից և 32 մմոլ քացախաթթվից: Ստորև բերված ռեակցիայում կաթնաթթուն ու քացախաթթուն յուրացվում են 1:1 հարաբերությամբ, և հնարավոր չէ ԱԵՖ-ի լրացուցիչ սինթեզ.

2կաթնաթթու + ԱԿՖ → բութանաթթու + ԱԵՖ + 4H,
2կաթնաթթու + ԱԵՖ + 4H → բութանաթթու + ԱԿՖ,
2կաթնաթթու + 2քացախաթթու → 2բութանաթթու:

ԱԵՖ-ի լրացուցիչ սինթեզ հնարավոր է այն դեպքում, երբ կաթնաթթուն ավելի շատ յուրացվի, քան քացախաթթուն: Պիրոխաղողաթթվի օքսիդացման և ֆերրեդոքսինի վերականգնման ռեակցիայի որոշ էլեկտրոններ օգտագործվում են H_2-ի առաջացման համար: Խմորման հավասարակշռությունից երևում է, որ միայն կաթնաթթվից առաջանում է 59/2 մմոլ բութանաթթու, իսկ 100 մմոլ կաթնաթթվից՝ 59/2 մմոլ ԱԵՖ, քանի որ չորս էլեկտրոններ կարող են առաջանալ կաթնաթթվից բութանաթթվի առաջացման հետևանքով: Կաթնաթթու-քացախաթթվի խմորումը ներկայացվում է ստորև.

քացախաթթու + 3 կաթնաթթու + ԱԿՖ + $Ֆ_{անօրգ}$ → 2բութանաթթու + $2H_2$ + ԱԵՖ:

Նույն կերպ *Clostridium kluyveri*-ն խմորում է էթանոլը քացախաթթվի առկայությամբ՝ առաջացնելով բութանաթթու և կապրոնաթթու.

6էթանոլ + 3կաթնաթթու → 3բութանաթթու + կապրոնաթթու + $2H_2$ + $4H_2O$ + H^+:

Գլիցերոլի խմորումը: *C. butyricum*-ն ունակ է անհամաչափորեն խմորել գլիցերոլը՝ փոխարկելով այն քացախաթթվի և բութանաթթվի: Առաջացած էլեկտրոնները մասնակցում են մնացած գլիցերոլի՝ մինչև 1.3-պրոպանոլ վերականգնմանը:

Ոչ բութանաթթվային խմորումը: Ոչ բոլոր սախարոլիտիկ կլոստրիդիաներն են սինթեզում բութանաթթու: Որոշ անաերոբներ ունակ են խմորելու ածխաջրերը՝ առաջացնելով քացախաթթու, էթանոլ, կաթնաթթու, CO_2 և H_2: Այդ բակտերիաներից են սախարոլիտիկ *Clostridium sphenoides*-ը, ցելյուլոլիտիկ *Clostridium thermocellum*-ը, *Clostridium cellulolyticum*-ը, *Clostridium josui*-ն և *Clostridium cellulovorans*-ը:

Ացետոն-բութանոլ-էթանոլ (ԱԲԷ) խմորման ուղին: Բութանաթթու սինթեզող սախարոլիտիկ շատ կլոստրիդիաներ առաջացնում են նաև փոքր քանակությամբ բութանոլ, և որոշ շտամներ, ինչպիսիք են *Clostridium acetobutylicum*-ը, *Clostridium beijerinckii*-ն, *Clostridium saccharobutylicum*-ը և *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*-ը, արտադրում են բութանոլ մեծ քանակությամբ ացետոնի (կամ իզոպրոպանոլ) և էթանոլի հետ միասին: Խմորման սկզբնական փուլերում առաջանում են բութանաթթու ու քացախաթթու, և առաջացած մեծաթիվ էլեկտրոնները վերականգնում են H^+-երը՝ առաջացնելով H_2: Միայն *C. acetobutylicum*-ը կաթնաթթուն ունակ չէ խմորելու, բայց ունակ է խմորելու ածխաջրերի առկայությամբ՝ մեծացնելով բութանաթթվի և բութանոլի արտադրությունը և նվազեցնելով ացետոնի արտադրությունը: Կաթնաթթվի օքսիդացումը պիրոխաղողաթթվի (-0.19 Վ) կապված է կրոտոնիլ-ԿոA-ի՝ բութիրիլ-ԿոA-ի վերականգնման հետ (+0.19 Վ):

C. acetobutylicum-ի գենոմում բացակայում են լիմոնաթթվային ցիկլի հոմոլոգ ֆերմենտները, այդ թվում՝ լիմոնաթթուսինթազը, 2-կետոգլուտարաթթուդեհիդրոգենազ, սուկցինիլ-ԿոAսինթետազը և ֆումարաթթուռեդուկտազ/սաթաթթուդեհիդրոգենազը: Սակայն լիմոնաթթվային ցիկլի բոլոր միջնորդանյութերը գլյուկոզի խմորման դեպքում հայտնաբերված են:

Լաբորատոր առաջադրանք 1
Բութանոլի որոշումը ԲԿՀՔ մեթոդով

Անհրաժեշտ սարքեր և նյութեր.

1. ԲԿՀՔ, C18 աշտարակ, ցենտրիֆուգ (MiniSpin) (*տե՛ս Նկ. 17*):
2. Մանրէազերծ ներարկիչներ, էպենդորֆներ, ԲԿՀՔ-ի սրվակներ, միկրոպիպետ:
3. Խիտ H_2SO_4 , ddH_2O:
4. Աճեցված կլոստրիդիաներ:

Աշխատանքի ընթացքը

Նախապես աճեցված կլոստրիդիաների հեղուկ կախույթից մանրէազերծ պայմաններում ներարկիչով վերցնել 1 մլ ծավալով նմուշ և տեղափոխել էպենդորֆներ, ցենտրիֆուգել այն 5000 g արագացմամբ 5 րոպե: 700 մկլ նստվածքը տեղափոխել սրվակներ և ավելացնել 0.2 մկլ (5 mM) H_2SO_4: Հետագա քայլերն իրականացնել *Աշխատանք 2-ի 1-ին լաբորատոր առաջադրանք*ում նշված պարամետրերով:

Լաբորատոր առաջադրանք 2
Բութանոլի որոշումը ԳՔ մեթոդով

Անհրաժեշտ սարքեր և նյութեր.

1. ԳՔ, FID, Agilent Techn, 19091J-413 կապիլյար աշտարակ (30 մ x 0.32 մմ x 0.25 միկրոն), խտացուցիչ (*տե՛ս Նկ. 18*):
2. *HAMILTON* ապրանքանիշի ներարկիչներ, ազոտի գեներատոր:
3. 60 գ/լ HPLC-grade բութանոլ, 6 գ/լ իզոպրոպանոլ՝ որպես ներքին ստանդարտ:
4. Աճեցված կլոստրիդիաներ:

Աշխատանքի ընթացքը

Նախապես աճեցված կլոստրիդիաների հեղուկ կախույթից մանրէազերծ պայմաններում ներարկիչով վերցնել 1 մլ ծավալով նմուշ և տեղափոխել էպենդորֆներ, ցենտրիֆուգել այն 5000 g արագացմամբ 5 րոպե:

Փորձնական նմուշը ներարկել 1 մկլ ծավալով ԳՔ-ի մեջ, հոսքի արագությունը սահմանել 2 մլ/ր: Վառարանի ջերմաստիճանը 20^{0}C/ր արագությամբ 70^{0}C-ից (պահել 0.5 ր) բարձրացնել 190^{0}C ներարկման պահից: Հետևի ներարկման տեղամասի (*Back Inlet*) և դետեկտորի ջերմաստիճանները սահմանել համապատասխանաբար 180^{0}C և 220^{0}C: Կրիչ գազը ազոտն է:

Փորձնականորեն ներարկել 6 գ/լ իզոպրոպանոլը ԳՔ-ի մեջ՝ համոզվելու համար, որ նյութի պահման ժամանակի և որոշման համար խնդիրներ չկան: Այնուհետև ներարկել փորձնական նմուշը:

ԳՔ-ով աշխատանքի այլ պարամետրերի համար (միացում, աշխատանքային վիճակի բերում, անջատում) տե՛ս *Աշխատանք 4, Լաբորատոր առաջադրանք 7*:

Տվյալներն անցկացնել գրանցամատյան, կատարել անհրաժեշտ հաշվարկներ և եզրակացություններ:

Օգտագործված գրականություն

1. **Byung Hong Kim, Geoffrey Michael Gadd**, Prokaryotic Metabolism and Physiology, Cambridge University Press, 2019, 504 p.
2. **Lin X., Fan J., Wen Q., Li R., Jin X., Wu J., Qian W., Liu D., Xie J., Bai J., Ying H.**, Optimization and validation of a GC–FID method for the determination of acetone-butanol-ethanol fermentation products. Journal of Chromatographic Science, 2014, 52:264-270.

ԱՇԽԱՏԱՆՔ 8
ՕՐԳԱՆԱԿԱՆ ԹԱՓՈՆՆԵՐԻ ՆԱԽԱՄՇԱԿՈՒՄԸ ԵՎ ԿԻՐԱՌՈՒՄԸ ԿԵՆՍԱԶԱՆԳՎԱԾԻ ԵՎ ԿԵՆՍԱԷՆԵՐԳԻԱՅԻ ՍՏԱՑՄԱՆ ՀԱՄԱՐ

Օրգանական կամ կենսաքայքայվող թափոնները բնական աղբի տեսակ են, որոնք առաջանում են բույսերից կամ կենդանիներից: Կենսաքայքայվող թափոնները պարունակում են օրգանական միացություններ (օրինակ՝ շաքարներ), որոնք կարող են ճեղքվել՝ առաջացնելով ածխածնի երկօքսիդ, մեթան կամ պարզ օրգանական մոլեկուլներ: Օրգանական թափոնները լինում են կենսաքայքայվող պլաստիկներ, սննդային, կանաչ, թղթի, գոմաղբի, լանդշաֆտային, մարդածին, բույսերի հատման, այդ թվում՝ բերքի և փայտի : Դրանք հանդիպում են քաղաքային և արտադրական պինդ թափոններում, գյուղատնտեսական թափոններում և կեղտաջրերում:

Բուսական ծագման թափոնները պարունակում են լիգնոցելյուլոզից, որը կազմված է ցելյուլոզից, հեմիցելյուլոզից և լիգնինից: Դրանք կարող են կիրառվել՝ արտադրելու վառելիք, քիմիական միացություններ, ֆերմենտներ, սնունդ և այլն:

Թափոնների վերամշակումը լաբորատոր պայմաններում

Ներկայումս հսկայական քանակությամբ օրգանական թափոնների առկայությունը և ցածր գինը տեխնոլոգիական նոր ուղիներ են բացում դրանք մշակելու և դրանց օգտագործմամբ արժեքավոր նյութեր ստանալու համար: Մշակված են օրգանական թափոնների մշակման ֆիզիկական, քիմիական և ֆերմենտատիվ մեթոդներ: Ֆիզիկական մեթոդը ներառում էմեխանիկական, սառեցման, ուլտրաձայնային, կարճալիքային և ջերմային/ջրաջերմային մշակումը: Ֆիզիկական մեթոդի գործառույթը անլուծելի զանգվածի կառուցվածքային փոփոխություններ իրականա-

ցնելն է՝ դարձնելով այն լուծելի և ենթարկելով հիդրոլիզի։ Ի տարբերություն ֆիզիկական և կենսաբանական մեթոդների՝ քիմիական մեթոդն ավելի մեծ կիրառություն ունի՝ պայմանավորված գործադրման հեշտությամբ և ակնհայտ արդյունքով։ Ֆիզիկական մշակման ժամանակ ուշադրություն է դարձվում մասնիկների չափերին և լուծելիությանը, մինչդեռ քիմիական մշակումը կենտրոնանում է հիդրոլիզի փուլերի վրա։ Ֆերմենտատիվ մշակումը, ի տարբերություն մյուս երկուսի, կարող է առաջացնել անլուծելի զանգված և բարձրամոլեկուլային օրգանական միացությունները վերածել միաշաքարների ու ազատ ամինների։ Այն ունի հիդրոլիզի բարձր արագություն և ամենաբարձր արդյունավետությունը, չի հանգեցնում երկրորդային աղտոտման, սակայն ֆերմենտների կիրառումը հետազոտական գործընթացներում ֆինանսապես մատչելի չէ։

Նկ. 24. *Որոշ օրգանական թափոններ և դրանց հիդրոլիզված, մշակված լուծույթները լաբորատոր պայմաններում*

Օրգանական թափոնները, ինչպիսիք են խմելու սև սուրճի նստվածքը, գարեջրի և օղու արտադրական թափոնները (*տե՛ս Նկ. 24*), լաբորատոր պայմաններում 121^{0}C ջերմաստիճանում շատ հեշտ ենթարկվում են թթվային (H_2SO_4, HCl, HCOOH) և հիմնային (NaOH, KOH) հիդրոլիզի (*Աղ. 8*)։

Աղյուսակ 8

Որոշ օրգանական թափոնների նախամշակման բարենպաստ պայմանները

Թափոնի անվանումը	Գարեջրի արտադրական թափոններ	Օղու արտադրական թափոններ	Խմելու սուրճի նստվածք
Թափոնի քանակությունը (չոր զանգված)	4-6 գ	10 գ	4 գ
H_2SO_4, 98 %	1.53 մլ (1.5 %)	1.53 մլ (1.5 %)	0.41 մլ (0.4 %)
Թորած ջուր	100 մլ	100 մլ	100 մլ
Հիդրոլիզի տևողությունը 121^{0}C-ում	20 րոպե	20 րոպե	45 րոպե

Լաբորատոր առաջադրանք 1

Սուրճի թափոնի վերամշակումը և դրանում E. coli-ի աճեցումը

Անհրաժեշտ սարքեր և նյութեր.

1. Իոնաչափներ, pH, ՕՎՊ էլեկտրոդներ, սպեկտրաֆոտոչափ:
2. Անհրաժեշտ պարագաներ՝ լուծույթ պատրաստելու համար:
3. H_2SO_4 (խիտ), խմելու սուրճի թափոն, K_2HPO_4:

Աշխատանքի ընթացքը

Խմելու սուրճի՝ 4 % խտությամբ կախույթը մշակել 0.4 % վերջնական խտությամբ H_2SO_4-ով՝ ըստ վերոբերյալ աղյուսակի հիդրոլիզի պայմանների: Ստացված հիդրոլիզատը բերել սենյակային ջերմաստիճանի, այնուհետև ֆիլտրել թանզիֆի և բամբակի օգնությամբ: Թթվային հիդրոլիզի հետևանքով լուծույթի pH-ն ընկնում է, և հարկավոր է այն կարգավորել K_2HPO_4-ով՝ հասցնելով մինչև 7 ԷՎ-ի, որը նպաստավոր է բակտերիայի աճի համար: Այնուհետև լուծույթը եռացնել 20 րոպե՝ կիսով չափ փակելով տարան ջրի կորստից խուսափելու համար, ապա բերել սենյակային ջերմաստիճանի և ցենտրիֆուգել (> 7500 g): Նստվածքն առանձնացնել և նոսրացնել 2 անգամ: Թափոնի լուծույթները շոգեախտահանել 15 րոպե 121^{0}C ջերմաստիճանում, այնուհետև բերել սենյակային ջերմաստիճանի, ավելացնել *E. coli*-ի կախույթ և սկզբնական պահին, 3-րդ, 6-րդ, 24-րդ և

48-րդ ժամերին չափել բակտերիական կախույթի ՕԽ-ն (600 նմ), pH-ը և ՕՎՊ-ն:

Տվյալներն անցկացնել գրանցամատյան, անել եզրակացություններ:

Լաբորատոր առաջադրանք 2
Գարեջրի արտադրական թափոնի վերամշակումը և E. coli-ի միջոցով H_2-ի արտադրումը

Անհրաժեշտ սարքեր և նյութեր.

1. Իոնաչափներ, pH, ՕՎՊ էլեկտրոդներ, սպեկտրաֆոտոչափ:
2. Անհրաժեշտ պարագաներ՝ լուծույթ պատրաստելու համար:
3. H_2SO_4 (խիտ), գարեջրի թափոն, KOH:

Աշխատանքի ընթացքը

Գարեջրի՝ 4 % խտությամբ թափոնը մշակել 1.5 % վերջնական խտությամբ H_2SO_4-ով՝ ըստ վերոբերյալ աղյուսակի հիդրոլիզի պայմանների: Ստացված հիդրոլիզատը բերել սենյակային ջերմաստիճանի, այնուհետև ֆիլտրել թանզիֆի և բամբակի օգնությամբ: Թթվային հիդրոլիզի հետևանքով լուծույթի pH-ն ընկնում է, և հարկավոր է այն կարգավորել KOH-ով՝ հասցնելով մինչև 7 էՎ-ի, որը նպաստավոր է բակտերիայի աճի համար: Այնուհետև լուծույթը եռացնել 20 րոպե՝ կիսով չափ փակելով տարան ջրի կորստից խուսափելու համար, ապա բերել սենյակային ջերմաստիճանի և ցենտրիֆուգել (> 7500 g): Նստվածքն առանձնացնել: Թափոնի լուծույթները շոգեախտահանել 15 րոպե 121^0C ջերմաստիճանում, այնուհետև բերել սենյակային ջերմաստիճանի, ավելացնել *E. coli*-ի կախույթ և որոշել դրանում ջրածնի ելքը ծավալային եղանակով (*տե՛ս Աշխատանք 4, Լաբորատոր առաջադրանք 5*):

Տվյալներն անցկացնել գրանցամատյան, անել եզրակացություններ:

Լաբորատոր առաջադրանք 3
Թափոններում պարունակվող ածխաջրերի ընդհանուր քանակության որոշումը գունաչափական եղանակով

Տարբեր տեսակի և արտադրության տարբեր փուլերում առաջացած օրգանական թափոններ պարունակում են բազմապիսի օրգանական ածխածնային միացություններ, ինչպիսիք են ածխաջրերը: Օրգանական այդ թափոնների կիրառման հնարավորությունները գնահատելու համար կարևոր է որոշել դրանցում ածխաջրերի ընդհանուր քանակությունը: Այն կարող է որոշվել հայտնի կալորիաչափական եղանակով, որը կիրառելի է նաև տարբեր օրգանական խառնուրդներում ածխաջրերի որոշման համար:

Անհրաժեշտ սարքեր և նյութեր.

1. Սպեկտրալուսաչափ, ցենտրիֆուգ, տաքացման սալիկ:
2. Փորձանոթներ, պիպետներ:
3. Օրգանական թափոն, 1 մգ/մլ գլյուկոզ:
4. Օրգանական թափոն, որում աճեցված է *E. coli* :
5. 5 % ֆենոլ, խիտ H_2SO_4:

Աշխատանքի ընթացքը:

Օրգանական թափոնի միջավայրում *E. coli*-ի աճման ընթացում սկզբնական և անհրաժեշտ ժամերին վերցնել 5-ական մլ ծավալով նմուշ (պահել -20^{0}C սառցարանում հետագա օգտագործման դեպքում): Ցենտրիֆուգել նմուշը 3000 g 10 րոպե և նստվածքն առանձնացնել: Պատրաստել ֆենոլը՝ լուծելով դրա 1 գրամը 20 մլ թորած ջրում:

2 մլ ածխաջրային խառնուրդին ավելացնել 1 մլ ֆենոլ և 5 մլ խիտ H_2SO_4: Սպասել 10 րոպե, այնուհետև խառնել և տեղափոխել 25-30^{0}C ջերմաստիճանային բաղնիք 10-20 րոպե: Հեքսոզների համար կլանումը 490 նմ է, իսկ պենտոզների համար՝ 480 նմ: Ստուգիչը պարունակում է 2 մլ թորած ջուր, 1 մլ ֆենոլ և 5 մլ խիտ H_2SO_4:

Տրամաչափիչ կորի կառուցման համար պատրաստել գլյուկոզի՝ 1 մգ/մլ խտությամբ մայրական լուծույթ: Այն նոսրացնելով՝ պատրաստել գլյուկոզի՝ 2 մլ վերջնական ծավալով ստանդարտ լուծույթներ:

Գլյուկոզ, 1 մգ/մլ	0	0.03	0.05	0.07	0.1	0.2
Թորած ջուր, մլ	2	1.97	1.95	1.93	1.9	1.8
Գլյուկոզի քանակությունը, մկգ/մլ	0	15	25	35	50	100

Պատրաստված լուծույթներով իրականացնել ֆենոլ-ծծմբական թթվի ռեակցիան վերը նշված ձևով:

Տվյալներն անցկացնել գրանցամատյան և տրամաչափիչ կորի միջոցով որոշել ածխաջրի քանակությունը (մգ/մլ):

Օգտագործված գրականություն

1. **Khalil H. P. S. A., Alwani M. S., Omar A. K. M.**, Chemical composition, anatomy, lignin distribution, and cell wall structure of malaysian plant waste fibers. BioResources, 2016, 1:220-232.
2. **Kiyasudeen S. K., Ibrahim M. H., Quaik S., Ismail S. A.**, Prospects of Organic Waste Management and the Significance of Earthworms, Springer International Publishing, 2016, 259 p.
3. **Oliveira L., Costa M., Sousa de H. A., Blum J., Silva da G., Abreu M., Maia D.**, Characterization of Organic Wastes and Effects of Their Application on the Soil. Journal of Agricultural Science, 2018, 10:291.

Հավելված

Սպիտակուցների քանակաչափական որոշման եղանակներ

Սպիտակուցների քանակաչափական որոշումը Լոուրիի մեթոդով

Լոուրիի և համահեղինակների կողմից առաջարկված սպիտակուցի քանակաչափական մեթոդի հիմքում ընկած են բիուրետային (պեպտիդային կապեր) և Ֆոլինի (թիրոզին, տրիպտոֆան) ռեակցիաները:

Անհրաժեշտ սարքեր և նյութեր.

1. Սպեկտրալուսաչափ:
2. Ռեակտիվ Ա՝ Na_2CO_3-ի 2 %-անոց լուծույթ NaOH-ի 0.1 Մ-անոց լուծույթում:
3. Ռեակտիվ Բ՝ 0.5 % $CuSO_4$ և 0.1 Մ լիմոնաթթվի նատրիումական աղ:
4. Ռեակտիվ Գ՝ պատրաստված փորձից առաջ ռեակտիվ Ա-ի և Բ-ի 50:1 հարաբերությամբ:
5. Ֆոլին-Չոկալտեի ռեակտիվ՝ 0.1 Ն:
6. Ալբումինի լուծույթ՝ 0.25 մգ/մլ խտությամբ:
7. Na-դեզօքսիխոլատ (ԴՕԽ)՝ 1 %:

3.9 մլ ԴՕԽ-ի մեջ լուծել 0.01 մլ սպիտակուցի նմուշ, ավելացնել սենյակային ջերմաստիճանի 2 մլ ռեակտիվ Գ-ն և սպասել 10 րոպե: Այնուհետև ավելացնել 0.2 մլ Ֆոլինի ռեակտիվը, և 30-40 րոպե անց լուծույթի կլանումը չափել սպեկտրաֆոտոչափով 750 նմ երկարությամբ ալիքի տակ:

Տրամաչափիչ կորի կառուցման համար փորձանոթների մեջ ավելացնել թորած ջուր և ալբումինի լուծույթ՝ համապատասխան քանակությամբ:

ալբումին, 0.25 մգ/մլ	0	0.04	0.08	0.16	0.24	0.32	0.4
թորած ջուր, մլ	0.4	0.36	0.32	0.24	0.16	0.08	0
ալբումինի քանակությունը, մգ	0	0.01	0.02	0.04	0.06	0.08	0.1

Վերը նշված քայլերով նմուշների վրա ավելացնել ռեակտիվները և լուծույթի կլանումը չափել սպեկտրաֆոտոչափով: Ստացված ՕԽ արժեքները տեղադրել գրաֆիկում և ստանալ ՕԽ արժեքների գծային կախումը սպիտակուցի քանակությունից (մկգ):

Օգտվելով տրամաչափիչ կորից՝ որոշում են 0.01 մլ լուծույթում սպիտակուցի քանակությունը:

Սպիտակուցների քանակաչափական որոշումը Բրեդֆորդի մեթոդով

Բրեդֆորդի մեթոդը սպիտակուցների խտության որոշման ամենատարածված մեթոդներից է: Սպիտակուցները գունավորվում են եռֆենիլմեթանային ներկով (triphenylmethane dye acid blue 83/Coomassie Brilliant Blue R250): Ներկը փոխազդում է սպիտակուցների կողմնային շղթաներում գտնվող արոմատիկ ամինաթթուների հետ:

Բրեդֆորդի լուծույթի պատրաստում: Չափիչ բաժակի մեջ խառնել հետևյալ նյութերը:

Serva Blue G 250 (Coomassie Brilliant Blue G 250)	100 մգ (0.01 %)
էթանոլ, 100 %	47.5 մլ (4.75 %)
H_3PO_4, 85 %	100 մլ (8.5 %)
թորած ջուր	1000 մլ

Ստացված լուծույթը ցելյուլոզային ֆիլտրով ֆիլտրել 3 անգամ, պահել 4^0C-ում և օգտագործել 3 օր անց: Օգտագործելուց առաջ բաժակը շրջելով խառնել Բրեդֆորդի լուծույթը 20 անգամ, բաժակի մեջ առանձնացնել անհրաժեշտ քանակությամբ լուծույթ և բերել սենյակային ջերմաստիճանի՝ թողնելով մոտ 1 ժամ:

Տրամաչափիչ կորի կառուցման համար էպենդորֆների մեջ խառնել ալբումինի լուծույթ և թորած ջուր: Ալբումինի մայրական լուծույթը (300 մկգ/մլ) պատրաստել 1 լ չափիչ գլանում (300 մգ ալբումին + 1000 մլ թորած ջուր):

N	Ալբումինի լուծույթ, մկլ	H_2O	մկգ/մլ
1	0	100	0
2	10	90	30
3	20	80	60
4	30	70	90
5	40	60	120
6	50	50	150

Ե՛վ ստուգիչի, և՛ փորձի դեպքում (100 մկլ նմուշ) էպենդորֆների մեջ ավելացնել 1000 մկլ Բրեդֆորդի ռեագենտ:

Ինկուբացնել լուծույթը սենյակային ջերմաստիճանում մոտ 10 րոպե, չափել կլանումը սպեկտրալուսաչափով օդի դիմաց՝ 595 նմ երկարությամբ ալիքի ներքո:

Օգտագործված գրականություն

1. **Bradford M. M.**, A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Analytical Biochemistry, 1976, 72:248-254.
2. **Lowry O. H., Rosebrogh N. J., Farr A. L., Randall R. J.**, Protein measurement with the Folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry, 1953, 193:265-275.

ԵՐԵՎԱՆԻ ՊԵՏԱԿԱՆ ՀԱՄԱԼՍԱՐԱՆ

ԿԱՐԵՆ ԹՌՉՈՒՆՅԱՆ, ՀԵՂԻՆԵ ԳԵՎՈՐԳՅԱՆ,
ԼՈՒՍԻՆԵ ԿԱՐԱՊԵՏՅԱՆ

ՄԱՆՐԷՆԵՐԻ ԿԵՆՍԱՔԻՄԻԱ ԵՎ ԿԵՆՍԱՏԵԽՆՈԼՈԳԻԱ. ԼԱԲՈՐԱՏՈՐ ԱՇԽԱՏԱՆՔՆԵՐ

(ՈՒՍՈՒՄՆԱՄԵԹՈԴԱԿԱՆ ՁԵՌՆԱՐԿ)

Համակարգչային ձևավորումը՝ Կ. Չալաբյանի
Կազմի ձևավորումը՝ Ա. Պատվականյանի
Հրատ. սրբագրումը՝ Մ. Կեսոյանի

Տպագրված է «ՎԱՌՄ» ՍՊԸ-ում:
Ք. Երևան, Տիգրան Մեծի 48, բն. 43

Ստորագրված է տպագրության՝ 15.02.2020:
Չափսը՝ 60x84 1/16: Տպ. մամուլը՝ 8.125:
Տպաքանակը՝ 100:

ԵՊՀ հրատարակչություն
ք. Երևան, 0025, Ալեք Մանուկյան 1
www.publishing.am