Практичне заняття №3

Облік чисельності мікроорганізмів, Ідентифікація.

Обмін речовин у мікроор-в, Способи живлення, джерела енергії та принципи систематики.

Теоретичні відомості:

Обмін речовин (метаболізм) у мікр-в являє собою сукупність біохім-х перетворень, що забезпечують збереження стр-ри, ріст, розмнож-ня та адаптацію клітини до умов навколиш. середовища.

Метаболізм поділяють на (2) взаємозалежних процеси:

1) Конструктивний обмін (анаболізм, пластичний обмін) сукупність реакцій біосинтезу складних орган. сполук (білків, нуклеїнов. кислот, ліпідів, полісахаридів) із простіших молекул, що надходять у клітину. Реакції анаболізму протікають із витратою енергії АТФ та відновлюв-х еквівалентів (НАДФ-Н)

2) Енергетичний обмін (катаболізм) сукупність ферментативних реакцій, розщеплення та окиснення вихідних субстратів, що супроводжується акумуляцією хімічної енергії у формі макроергічних зв'язків АТФ та формі відновл-х коферментів (НАД-Н, ФАД-H_2)

Хім. склад бактер. клітини:

- вода становить 75-85% маси вегетат. клітини,

у сухій речовині органічні сполуки складають 90-95% (білки 50-80%, нуклеїнові кислоти - 10-20%, вуглеводи 10-15%, ліпіди - 5-10%), а мінерал. елементи (N, P, K, Mg, Ca, Fe, S) 5-10%

(*) Класифікація м-в за типами живлення та джерелами енергії:

Тип метабол	Джерело карбону	Джерело енергії	Приклади мікроор-в
Фотоліто-автотрофи	CO_2 неорганічне	Світло	ціанобактерії, пурпурові сірчобактерії
Фотоорганогетеротрофи	Органічні сполуки	Світло	Пурпурові несірчані бактерії
Хемоліто-автотрофи	CO_2 неорганічне	Окиснення неорган. сполук (NH_3, NO_2, H_2S, FE^{2+})	Нітрифікатори (Nitrosomonas) тіонові бактерії
Хемоорганогетеротрофи	Органічні сполуки	Окиснення орган. сполук (вуглев, білки)	більшість ґрунтових бактерій (Bacillus, Pseudomonas, Clostridium, гриби

Порядок виконання роботи:

(1) Проаналізуйте надані колекційні штами ґрунтових мікроорганізмів та заповніть порівняльну таблицю їхніх трофічних хар-к і біох. проц в дріжджах.

Вид мікроорг-му	Джерело Карбону	Джерело Нітрогену	Тип дихання	Агрономічна роль
Azotobacter chroococcum	Органічні сполуки (вуглеводи)	N_2 (азотфіксація) NH_4^+	Облігатний аероб	Неасимбіотична азотфіксація, збагачення ґрунту азотом
Rhizobium leguminosarum	Органічні сполуки (ексудати)	N_2 (у симбіозі) амінокислоти	Аероб / мікроаерофіл	Симбіотична азотфіксація з бобовими культурами
Nitrosomonas europaea	CO_2 (автотроф)	NH_3/NH_4^+ (окиснення)	Облігатний аероб	1 фаза нітрифікації (утворення нітритів)
Bacillus subtilis	Органічні (білки, крохмаль)	Органіч. N, NH_4^+, NO_3^-	Аероб / факультативний анаероб	Амоніфікація, мобілізація фосфатів, біозахист
Clostridium pasteurianum	Органічні (вуглеводи)	N_2 NH_4^+	Облігатний анаероб	Анаеробна азотфіксація у перезволожених ґрунтах

② Дослідження біохімічної та ферментативної активності досліджуваних культур

Біох. тест / Фермент	Субстрат / індикатор	Газолет №1 Bacillus	Газолет №2 E. coli
Каталазна активність	3% H_2O_2	+ (інтенсивне виділення O_2)	+ виділення O_2
Ферментація глюкози	Середовище Гісса з глюкозою	+ (кислота, без газу)	+ кислота і газ
Ферментація лактози	Середовище Гісса з лактозою	– (колір не змінюється)	+ кислота і газ
Утворення індолу	МПБ / реактив Ерліха	–	+ кільце кольору
Утворення сірководню (H_2S)	МПБ / папір з $(CH_3COO)_2Pb$	–	+ почорніння паперу
Гідроліз крохмалю (амілаза)	КАА / йодна настойка	+ (зона просвітлення)	–

③ Ідентифікацію проводять послідовно за морфологічними, тинкторіальними та фізіолого-біох. ознаками.

Етап	Ознака	Значення для ідентифікації
1	Забарвлення за Грамом	Визначає належність до грампозитивних або грамнегативних бактерій
2	Відношення до кисню	Визначає аеробність, анаеробність або факультативність
3	Спороутворення	Спороутворюючі (Bacillus, Clostridium) чи неспоротворні
4	Каталазна та оксидазна активність	Каталазопозитивні чи каталазонегативні
5	Біохімічні властивості	Уточнює родову належність (Газолет) з ключових груп Бергі

✱ Розрахункові задачі:

① Р-к коеф. ефт-ті живл-ня:

Дано: - концентр. глюкози $S = 10 г/л$
- отримана суха біомаса $X = 4,2 г/л$

Формула економ. коеф-та виходу біомаси:

$$Y = \frac{X}{S} \cdot 100\%$$

$$Y = \frac{4,2}{10} \cdot 100\% = 42\%$$

② Діагностика типів метаболізму за серед-ми:

1) Мінеральне серед-ще без органічного Карбону під джерелом освітлення

2) Мінеральне серед-ще з додаванням 0,5% амонію та сахарози в темряві;

Відповідь: 1) Мікроорг-ми, які ростуть за цих умов, можуть бути фотоавтотрофами, якщо використ. світло як джерело енергії, а CO_2 - як джерело Карбону.

2) За використ-м сахарози, як джерела Карбону й енергії мікроорг-ми належать до хемоорганогетеротрофів. Сахароза є орган. сполукою, яку вони використ-ть для отримання енергії та побудови клітинних компонентів.

③ В даній ситуації діє активний транспорт.

Глюкоза переміщується проти градієнту концентрації з витратою енергії.

Речовина накопичується всередині клітини проти градієнта концентрації. Процес потребує енергії. Пригнічення синтезу АТФ зупиняє транспорт.

✱ Контрольні запитання:

① У чому відмінність між конструктивним та енергетичним обміном?

- Конструктивний (анаболізм) - синтез речовин і побудова клітини з витратою енергії.
- Енергетичний обмін (катаболізм) - розщеплення речовин із вивільненням енергії.

②

- за Карбоном: автотрофи (CO_2)
  гетеротрофи (орган. речовини)
- за енергією: фототрофи (світло)
  хемотрофи (хім. реакції)
- за електронами: літотрофи (неорган. речовини),
  органотрофи (орган. реч-ни),

③ Хемолітоавтотрофи отримують енергію з неорган. реч-н і Карбон із CO_2.

Хемоорганогетеротрофи використ. орган. реч-ни. У ґрунті вони беруть участь у кругообігу поживних елемен-в)

④ Аміноавтотрофні - використ. неорган. сполуки Нітрогену

Аміногетеротрофні – органічні сполуки (амінокислоти та білки)

⑤ Основні мех-ми тран-ту пож. реч-н
- проста дифузія (перенесення за градієнтом концен)
- полегшена дифузія (перенесення за допом. білків)
- активний транспорт (перен-ня з витратою енергії)
- транслокація груп (перен. з одночасною хім-ю зміною речовини)

⑥ Транслокація груп - це транспорт речовин через мембрану з одночасною хімічною модифікацією. Характерний для перенесення вуглеводів (глюкози).

① Критерії у Визначнику Бергі:
- враховують форму клітин, забарвлення за Грамом, спороутворення, відношення до кисню, фізіологічні та біохімічні власт-ті, генет. ознаки,

⑧ Каталазна - визначає розщепл-ня пероксиду водню з виділенням кисню.

Уреазна - виявляє розщепл-ня сечовини з утвор-м амміаку

Сахаролітична - визначає здатність ферментувати вуглеводи з утворенням кислоти, іноді газу.

⑨ Azotobacter - вільно фіксує атмосфер. азот

Rhizobium - фіксує азот у симбіозі з бобовими рослинами

Bacillus - утворює спори та розкладає органічні речовини

Nitrosomonas - окиснює амоній до нітритів

⑩ Знання про метаболізм мікроор-в допомагають добирати умови вирощування мікроор-в для виробництва біодобрив, біопрепаратів захисту рослин, ферментів та інших корисних продуктів.