

Лабораторне заняття № 5-6

ТЕМА: « Дихальний ланцюг і фосфорилування (синтез АТФ) при перенесенні електронів »

МЕТА: знати визначення і види фосфорилування, утворення АТФ при субстратном і електронтранспортну фосфорилування, особливості аеробного дихання у бактерій, компоненти і принцип функціонування дихального ланцюга у прокаріотів і еукаріотів; вміти розраховувати енергетичний вихід при окисленні 1 молекули глюкози у бактерій і еукаріот; знати і використовувати в практичній діяльності культивування мікроорганізмів-аеробів.

ПИТАННЯ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЮ:

1. Способи отримання енергії у мікроорганізмів
2. Окисно-відновні ферменти мікроорганізмів
3. Фосфорилування: визначення, види, особливості
4. Визначення аеробного дихання, анаеробного дихання, бродіння
5. Реакції фосфорилування при гліколізі, пентозофосфатному шляху, КДФГ і при розщепленні через глюконат
6. Реакції утворення ацетил-КоА
7. Цикл трикарбонових кислот, його роль в метаболізмі мікроорганізмів
8. Компоненти дихального ланцюга
9. Функціонування дихального ланцюга у дріжджів
10. Функціонування дихального ланцюга у прокаріотів

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА:

Вивчення і використання аеробних мікроорганізмів засноване на посіві культур на поверхні щільних поживних середовищ або в рідкому поживному середовищі при доступі кисню і аерація.

Посів на щільну живильне середовище виробляють легким втиранням матеріалу в поверхню середовища, не пошкоджуючи її. При посіві на скошену поверхню агару в пробірці петлю з посівним матеріалом вносять в конденсаційну воду і легкими рухами розтирають його штрихом ретельно від низу до верху, направляючи штрих від однієї стінки до іншої.

При посіві в стовпчик середовища в пробірці голкою з посівним матеріалом проколюють стовпчик по центру.

Після посіву петлю або голку виймають з пробірки, обпалюють шийку пробірки і пробку в полум'я пальника і закривають пробірку. При посіві в рідку живильне середовище петлю занурюють в середу або матеріал розтирають на стінці посудини, а потім змивають рідким середовищем, струшуючи злегка пробірки. Решта на петлі після пересіву клітини

мікроорганізмів спалюють, для чого петлю вносять в полум'я газового пальника і стерилізують.

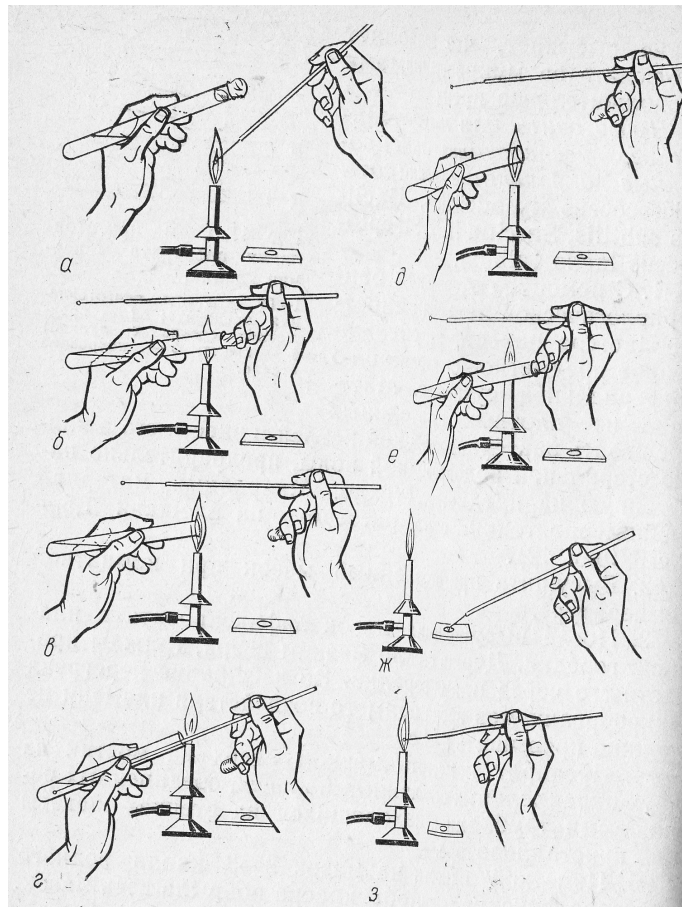


Рис. 1 – Схема пересіву мікроорганізмів з однієї пробірки в іншу:

а - прокалювання (стерилізація) петлі в полум'я пальника до посіву; б - прокалювання країв пробірки; в - взяття мікробних клітин петлею; г - посів мікробних клітин на скошену поверхню середовища; д - закривання одночасно двох пробірок в полум'я пальника; е - прокалювання петлі після посіву.

Таким же чином проводять посів на поверхню середовища в чашках Петрі (рис. 2). Петлею захоплюють мікробний матеріал, і невелика кількість втирають в поверхню живильного середовища біля краю чашки. В процесі посіву чашку тримають в лівій руці, підтримуючи її дно середнім і безіменним пальцями. Кришку фіксують великим і вказівним пальцями і відкривають її в сторону газового пальника на стільки, щоб в щілину можна було ввести петлю. Внесений матеріал розтирають петлею по середовищі штрихами.

Для того щоб отримати велику кількість мікроорганізмів, справляють суцільний посів газом за допомогою шпателя. Для цього посівний матеріал наносять також за допомогою петлі або піпетки на поверхню живильного середовища біля краю чашки Петрі або в центрі її і потім стерильним

шпателем розтирають його по всій поверхні живильного середовища.

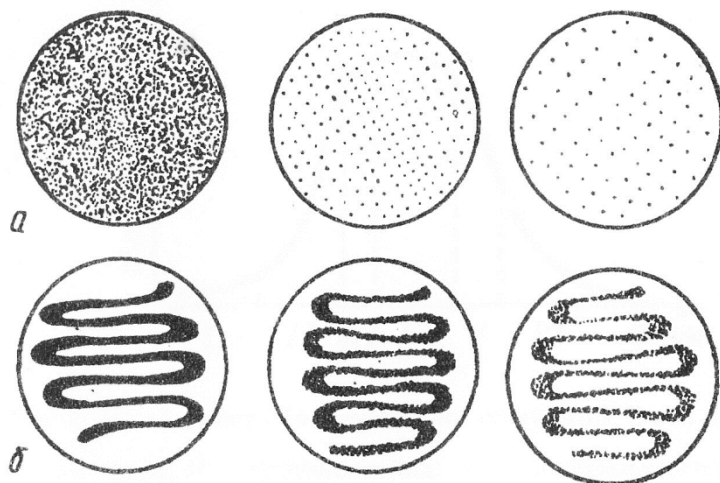


Рис. 2 – Зростання мікроорганізмів на поверхні щільного поживного середовища:

а - після розсівання шпателем; б - після розсівання бактеріологічною петлею.

Пересів з рідкого середовища в рідке можна робити стерильною градуйованою піпеткою. При цьому її звільняють від обгортки і правою рукою проводять піпетку через полум'я пальника і опускають в пробірку з культурою мікроорганізмів і набирають певну кількість матеріалу. Потім закривають отвір в піпетці вказівним пальцем, переносять її в пробірку з живильним середовищем і вміст піпетки випускають. Використані піпетки поміщають у дезінфікуючий розчин.

Способи культивування аеробних мікроорганізмів

Для облігатних аеробних культур, які ростуть на щільних середовищах, кисню достатньо. У рідких середовищах великого обсягу при глибинному культивуванні аеробні бактерії можуть жити тільки на поверхні, так як з віддаленням від поверхні умови наближаються до анаеробних. Для нормального росту аеробів в глибоких шарах необхідна аерація.

Мікроорганізми здатні використовувати розчинений кисень, але його розчинність низька, тому використовують технологічні прийоми для підвищення його швидкості розчинення - збільшення поверхні розділу газової і рідкої фаз, збільшення тиску кисню в газовій фазі. Це здійснюють:

- Культивуванням в тонкому шарі на поверхні щільних і рідких середовищ;
- Перемішування рідини струшуванням;
- Обертанням судини, в якому відбувається вирощування;
- Пропусканням повітря крізь рідину (барботери, колби Клуйвер);
- Механічне перемішування.

Найбільш простий і широко використовуваний в лабораторній практиці спосіб глибинного культивування - вирощування на гойдалках (приспособлення для механічного струшування), що забезпечують струшування або обертання колб або пробірок зі швидкістю 100-200 об / хв

(рис.1). Збільшити аерацію можна, застосовуючи на качалка колби з відбійниками (вдавлення всередину у вигляді 4-8 відростків 2-3 см завдовжки) (рис. 2).



Рис. 3 – Качалка мікробіологічна колбами

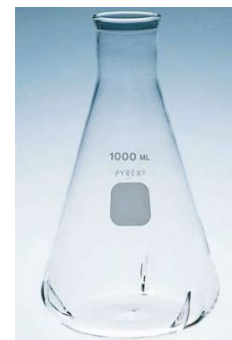


Рис. 4 – Колба з відбійниками

Крім перемішування, аерувати культуру мікроорганізмів можна продуванням крізь товщу середовища стерильного повітря. Цей спосіб часто використовується в лабораторних дослідженнях, але особливо широке застосування він знайшов у промисловій мікробіології. У лабораторних умовах повітря стерилізується шляхом проходження через активоване деревне вугілля, скляну вату, просочену антисептиком, або спеціальні тканини з полімерів; коли обсяг і швидкість надходження повітря невеликі, використовують заздалегідь простерилізовані ватні фільтри. Для максимально сильного розпилення повітря пропускають через дрібнопористі пластинки - барбатера; в лабораторних дослідах з цією метою застосовують скляні фільтри.

Для аерації культур мікроорганізмів, як правило, використовують звичайне повітря. Продування середовищ киснем не рекомендується, так як надмірне насичення середовища киснем (до 40 мг/л) може привести до пригнічення росту мікроорганізмів. У ферментерах (рис. 3) примусову аерацію зазвичай поєднують з механічним перемішуванням середовища мішалками, швидкість обертання яких може досягати сотень і навіть тисяч обертів на хвилину.

ПРАКТИЧНА ЧАСТИНА:

Завдання №1. Здійснити виділення чистої культури бактерій-аеробів згідно зі схемою виділення.

1 день:

- а) мікроскопія мазка з матеріалу (для орієнтовного судження про склад мікрофлори);
- б) посів матеріалу на МПА в чашці виснажують штрихом (для отримання ізольованих колоній);
- в) інкубування в термостаті (37° С)

2 день:

- а) вивчення і вибір ізольованих колоній;
- б) мікроскопія мазків з ізольованих колоній для судження про однотипності мікробів в колонії;

в) пересівши залишку колонії на скошений поживний агар (для отримання чистої культури);

г) інкубування в термостаті (37° C).

3 день:

а) мікроскопія мазків з чистої культури на скошеному МПА (для контролю чистоти переглядають не менше 40 полів зору);

б) вивчення інших властивостей виділеної чистої культури.

Завдання №2. Вивчити організацію компонентів дихального ланцюга у еукаріот на прикладі дріжджів. Розрахувати енергетичний вихід при окисненні 1 молекули глюкози у дріжджів.

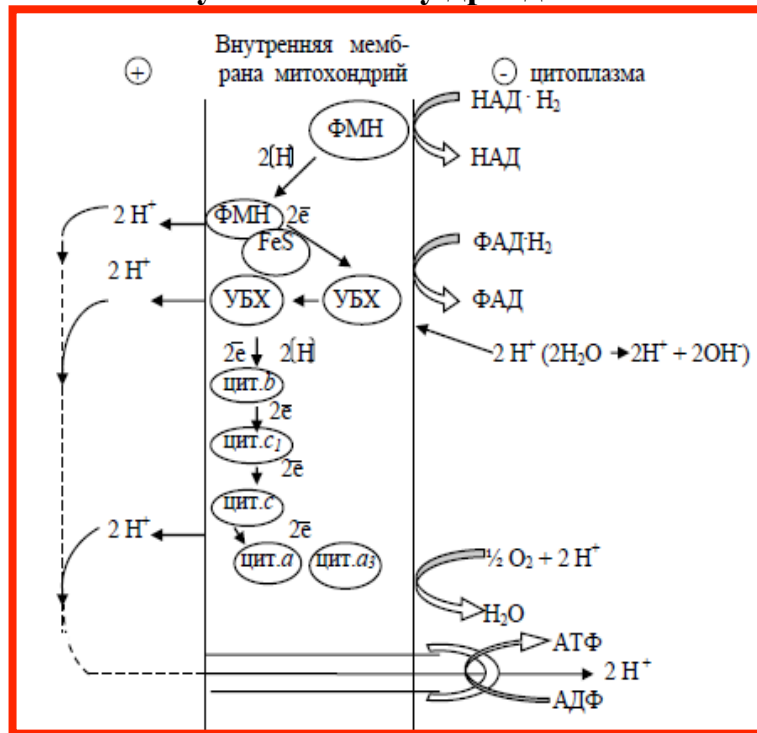
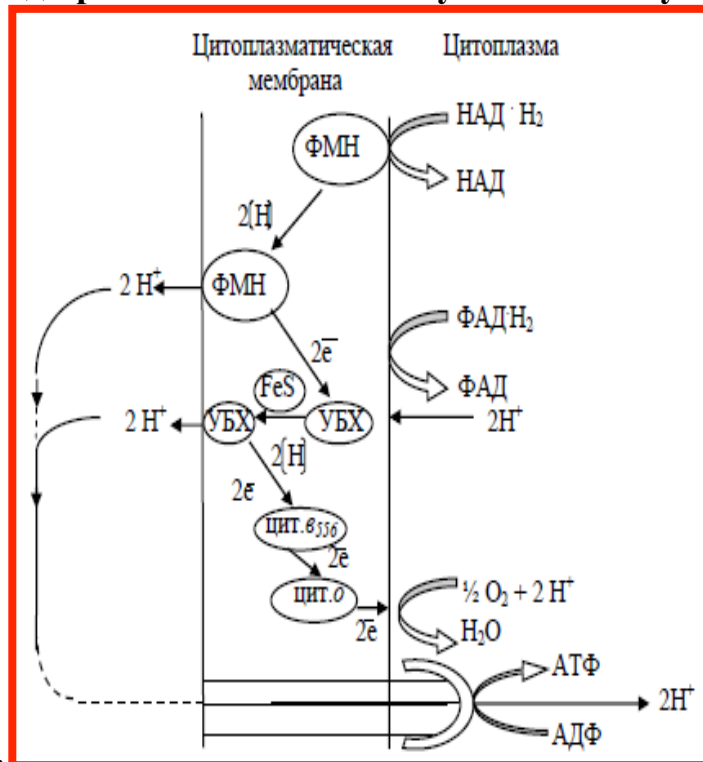


Рис. 5 - Організація компонентів дихального ланцюга мітохондрій дріжджів

Завдання №3. Вивчити організацію компонентів дихального ланцюга у бактерій на прикладі кишкової палички. Розрахувати

енергетичний вихід при окисненні 1 молекули глюкози у кишкової



палички.

Рис. 6 - Організація компонентів дихального ланцюга кишкової палички

ЛІТЕРАТУРА:

Основна література:

1. Лысак В.В. Микробиология: Учебное пособие для студентов биологических специальностей. – Мн.: БГМУ, 2005. – 261 с.
2. Пирог Т.П. Загальна мікробіологія. – К.: НУХТ, 2004. – 471 с.
3. Пирог Т.П. Загальна мікробіологія: Підруч. – 2-е вид., доп. і перероб. – К.: НУХТ, 2010. – 632 с.
4. Промышленная микробиология / Под ред.. Н.С. Егорова. – М. Высш.шк., 1989. – 688 с.
5. Шлегель Г.Г. Общая микробиология. М.: Мир, 1987. – 567 с.

Інформаційні ресурси:

6. biotech.nuph.edu.ua
7. http://www.labprice.ua/ukrainski_naukovi_tovaristva/tovaristvo_mikrobiologiv_ukraini_im_sm_vinogradskogo_tmu
8. <http://www.antibiotic.ru/index.php>
9. <http://collegemicrob.narod.ru/microbiology/>
10. http://www.allvet.ru/knowledge_base/microbiology/mikrobiologiya.php
11. <http://www.grandars.ru/college/medicina/mikrobiologiya.html>
12. <http://mikrobiki.ru/>