

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

**Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего профессионального образования**

**«Северо-Осетинский государственный университет
имени Коста Левановича Хетагурова»**

Г.С. Качмазов



БИОЛОГИЯ КЛЕТКИ С ОСНОВАМИ БИОТЕХНОЛОГИИ

Учебно-методическое пособие к лабораторным занятиям



Владикавказ

2016

ББК 74.202
УДК 61(071.1)
О-91

Биология клетки с основами биотехнологии: учебно-методическое пособие к лабораторным занятиям / сост.: Г.С. Качмазов.

Рецензент:

Г.А.Ермолаева— д.т.н., профессор, зав. кафедрой «Процессы ферментации и промышленного биокатализа» ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет пищевых производств»

Дисциплина «Биология клетки с основами биотехнологии» читается студентам, обучающимся по направлению подготовки 19.03.02 – Продукты питания из растительного сырья (уровень бакалавриата), профиль «Технология хлеба, кондитерских и макаронных изделий». Образовательная программа дисциплины «Биология клетки с основами биотехнологии» состоит из двух взаимосвязанных частей: лекций и лабораторных занятий.

В учебно-методическом пособии к лабораторным занятиям изложены методы, необходимые для овладения и закрепления практических навыков в исследовании морфологических и физиологических свойств эукариотических и прокариотических клеток, используемых в различных отраслях пищевой промышленности. Приведены теоретические основы и лабораторные методы контроля клеточного синтеза в биотехнологических процессах.

Предназначено для студентов технологических и биотехнологических факультетов высших учебных заведений.

Рекомендовано к печати решением учебно-методического совета ФГБОУ ВПО «Северо-Осетинский государственный университет имени К.Л. Хетагурова».

© ФГБОУ ВПО «СОГУ им. К.Л. Хетагурова», 2016

Оглавление

Лабораторная работа № 1. Микроскоп и техника микроскопирования	4
Лабораторная работа № 2. Методы окраски и цитохимические методы исследования клеток	16
Лабораторная работа № 3. Питательные среды. Методы стерилизации питательных сред и посуды	22
Лабораторная работа № 4. Выделение чистой культуры микроорганизмов. Культуральные свойства на плотных и жидких питательных средах	31
Лабораторная работа № 5. Методы количественного учета микроорганизмов	41
Лабораторная работа № 6. Определение чувствительности микроорганизмов к антибиотикам ...	59
Лабораторная работа № 7. Образование дрожжами <i>Saccharomyces cerevisiae</i> спирта и углекислого газа. Определение бродильной активности и подъемной силы	64
Лабораторная работа № 8. Образование молочной кислоты чистой культурой <i>Lactobacillus</i> <i>acidophilus</i> . Определение кислотообразующей активности	75
Лабораторная работа № 9. Образование уксусной кислоты бактериями <i>Acetobacter</i>	80
Лабораторная работа № 10. Образование лимонной кислоты плесневыми грибами <i>Aspergillus</i> <i>niger</i>	84

Лабораторная работа № 1.

Микроскоп и техника микроскопирования.

Теоретический обзор.

Микроскопы, дающие увеличение в сотни (световой) или тысячи раз (электронный), используют для изучения морфологии и строения микроорганизмов. Производственные микробиологические лаборатории снабжены световыми микроскопами различных типов отечественного и импортного производства. Преимущество за бинокулярными микроскопами с автономной подсветкой и полным набором основных и дополнительных оптических систем.

Световой микроскоп.

Микроскоп состоит из механической и оптической частей (**Рис. 1**).

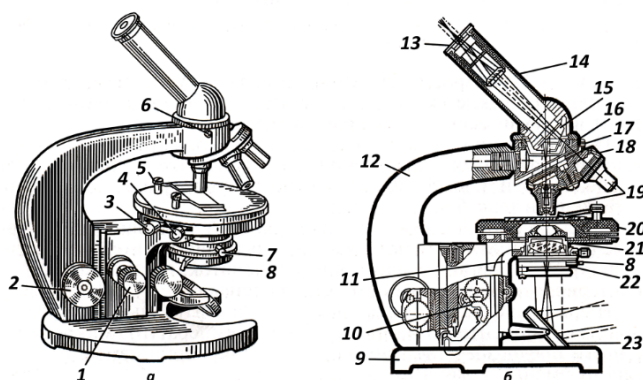


Рис. 1. Общий вид (а) и схема (б) микроскопа:

1 – микрометрический винт; 2 – макрометрический винт; 3 – стопорный винт; 4 – центрировочный винт для установки препарата; 5 – пружинные клеммы; 6 – винт для укрепления тубуса; 7 – стопорный винт конденсора; 8 – рукоятка перемещения диафрагмы; 9 – башмак микроскопа; 10 – коробка с микромеханизмом; 11 – кронштейн конденсора; 12 – тубусодержатель; 13 – окуляр; 14 – наклонный тубус; 15 – призма; 16 – головка тубусодержателя; 17 – винт для фиксации револьвера; 18 – револьвер на салазках; 19 – объективы; 20 – предметный столик; 21 – конденсор; 22 – апертурная диафрагма; 23 – зеркало.

К механической части микроскопа относят штатив, который состоит из подставки (башмак) 9, придающей прибору устойчивость, и тубусодержателя.

К тубусодержателю 12 прикреплен тубус 14, имеющий у различных моделей современных микроскопов конструктивные отличия.

В нижней части тубуса находится револьверный механизм **18** – вращающийся диск с гнездами для объективов, состоящий из двух пластин. Верхняя из них закреплена наглухо, а нижняя с отверстиями и резьбой для объективов свободно передвигается, причем центровка ввинченного в отверстие объектива фиксируется защелкивающейся пружинкой, попадающей в соответствующую прорезь.

Предметный столик **20**, круглый или прямоугольный, с отверстием в центре для прохождения света. Столик можно передвигать при помощи винтов **4** в двух взаимно перпендикулярных направлениях. Для закрепления препарата на столике имеются специальные зажимы **5** разной конструкции.

Механизм для передвижения тубуса вверх-вниз состоит из двух основных узлов – макро- **2** и микрометрического **1** винтов.

Макрометрический винт (кремальера) служит для быстрого поднятия и опускания тубуса при грубой настройке. Один оборот зубчатого колеса позволяет перемещать тубус на 20 мм вверх или вниз.

Микрометрический винт предназначен для передвижения тубуса при тонкой настройке и просматривания препарата в глубину. Полный оборот ведущего колесика продвигает тубус на 0,1 мм. Барабан винта разделен на 50 делений, каждое деление равно 0,002 мм.

Оптическая часть микроскопа состоит из осветительного устройства, окуляров и объективов.

Осветительное устройство состоит из конденсора, ирис-диафрагмы и осветителя (или плосковогнутого зеркала).

Конденсор **21** применяют для концентрирования отраженных зеркалом лучей света, фокус которых должен находиться в плоскости препарата. Он состоит из двух линз, заключенных вместе с ирис-диафрагмой в общую цилиндрическую оправу. Верхняя линза в конденсоре плосковыпуклая, нижняя – двояковыпуклая. Весь конденсор можно передвигать вверх и вниз при помощи особого винта. При поднятии и опускании конденсора меняется угол сходимости лучей, в результате меняется и интенсивность освещения: при поднятом конденсоре – освещение ярче, при опущенном – слабее.

Под конденсором помещена апертурная (ирисовая) диафрагма **22**. Ирис-диафрагма состоит из нескольких подвижных сегментов, сдвигаемых и раздвигаемых при помощи рычажка **8**. Диафрагма установлена перед нижней линзой конденсора и позволяет также регулировать освещение. Изменяя диаметр отверстия, через которое проходит пучок света, регулируют интенсивность освещения поля зрения.

Если апертура конденсора меньше апертуры рабочего объектива, то из-за слабого потока света возможности линзы объектива задействованы не полностью. Если апертура конденсора больше апертуры рабочего объектива, что характерно для объективов малого увеличения, то уменьшают диаметр отверстия ирисовой диафрагмы конденсора.

Зеркало **23** подвижно закреплено под конденсором на особом рычажке, при помощи которого оно может быть установлено в любой плоскости. Одна его поверхность плоская, другая – вогнутая. При работе с конденсором

используют плоскую, без конденсора – вогнутую поверхность зеркала. При дневном свете пользуются плоской стороной зеркала, при искусственном свете – вогнутой.

При микроскопировании существенное значение имеет освещение исследуемого объекта. Освещение чаще устанавливают по методу Келлера.

1. Осветитель.
2. На предметный столик ставят препарат, в рабочее положение переводят объектив 8×.
3. Конденсор поднимают до упора, полностью открывают ирисовую диафрагму.
4. Зеркало устанавливают плоской поверхностью и почти полностью закрывают диафрагму осветителя.
5. На зеркало помещают лист белой бумаги и, передвигая патрон осветителя, добиваются четкого изображения на бумаге нити накала лампы.
6. Глядя в окуляр, при помощи зеркала получают в центре поля зрения изображение краев диафрагмы осветителя – светлое пятно с нерезко очерченными краями.
7. Используя объектив 8×, фокусируют объект в области светлого пятна.
8. Опуская конденсор, в плоскости препарата фокусируют изображение краев диафрагмы осветителя и движением зеркала переводят светлое пятно в центр поля зрения.
9. Диафрагму осветителя открывают до тех пор, пока светлое пятно не закроет все поле зрения.
10. В дальнейшем положение зеркала, конденсора и диафрагмы осветителя больше не меняют.

При работе со встроенными стационарными осветителями правила настройки подробно изложены в инструкциях по эксплуатации микроскопов.

Окуляр **13** вставляют в верхнюю часть тубуса. Увеличенное объективом изображение дополнительно увеличивается окуляром, но новых деталей структуры при этом не наблюдается. Обычно окуляр состоит из двух плосковыпуклых линз – глазной и собирательной – обращенных своими выпуклыми поверхностями вниз к объективу. Линзы заключены в общую металлическую трубку, между линзами находится диафрагма поля зрения микроскопа. У современных биологических микроскопов имеются окуляры с увеличениями в 7, 8, 10 и 15 раз. Размер увеличения указан на верхней оправе.

Объектив – основная часть оптической системы микроскопа, дающая увеличенное изображение предмета. Объектив состоит из нескольких линз, помещенных в металлическую трубку и закрепленных канадским бальзамом. На верхней части трубки имеется резьба, при помощи которой объектив ввинчивается в гнездо револьверной пластинки. Самая нижняя плосковыпуклая линза объектива, обращенная к предмету, называется фронтальной; именно она позволяет получать увеличение, а остальные линзы только устраняют оптические недостатки изображения (сферическую и

хроматическую aberrацию); чем больше кривизна фронтальной линзы и меньше ее размеры, тем большее увеличение предмета даст объектив. Изображение предмета обратное.

Современные биологические микроскопы обычно снабжены объективами с увеличением в 8, 10, 20, 40, 60, 90 и 100 раз. Эти цифры указаны на объективе. При работе с объективами, увеличивающими в 60, 90 и 100 раз, фронтальная линза погружается в жидкость.

Важно получить не только увеличенное, но и четкое изображение исследуемого объекта.

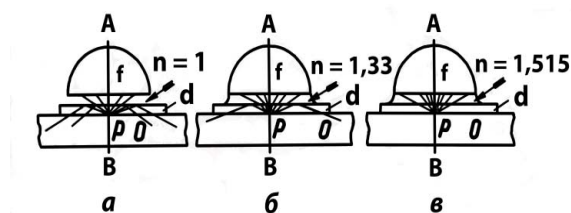


Рис. 2. Ход лучей в сухом (а), водно- (б) и масляноиммерсионном (в) объективе:

- n – показатель преломления;
- РО – препарат;
- f – фронтальная линза объектива;
- d – покровное стекло.

Четкость изображения зависит от разрешающей способности микроскопа, которую понимают, как минимальное расстояние между двумя точками, при котором они видны раздельно. Разрешающая способность микроскопа зависит от числовой апертуры и длины волны используемого света.

Повысить разрешающую способность микроскопа можно за счет применения более коротких лучей света или, что более доступно, за счет приближения показателя преломления среды, граничащей с линзой, к аналогичному показателю стекла. С этой целью прослойку воздуха между линзой объектива и предметным стеклом замещают специальной жидкостью с показателем преломления, близким к показателю преломления стекла. Особенно это необходимо при использовании объективов большого увеличения ($60\times$, $90\times$) с фронтальными линзами малой площади. Показатель преломления стекла и воздуха составляет соответственно 1,52 и 1,0, поэтому в качестве иммерсионных жидкостей, создающих оптически однородную среду между предметным стеклом и линзой объектива, применяют чаще всего кедровое масло ($n = 1,5$), глицерин ($n = 1,4$), воду ($n = 1,3$). Ход лучей света при использовании обычного сухого и иммерсионного объективов показан на **рисунке 2**.

Объективы для масляной иммерсии обозначают «МИ», водной – «ВИ».

Общее увеличение, даваемое системой объектива и окуляра, равно произведению увеличений окуляра и объектива.

Например, при окуляре $15\times$ и объективе $40\times$ увеличение будет: $15 \times 40 = 600$ раз.

При работе с сильными объективами толщина покровного стекла не должна превышать 0,15 – 0,18 мм ввиду малого рабочего расстояния.

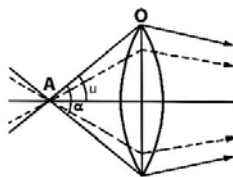


Рис. 3. Схема хода лучей при разном значении угла α :

A – объект;

O – объектив;

u – половина отверстиеного угла.

Под рабочим расстоянием объектива понимают расстояние от плоскости фронтальной линзы до изучаемого объекта при нахождении последнего в фокусе. Чем больше увеличение объектива, тем меньше рабочее расстояние и поле зрения.

На корпусе объектива обозначена его увеличивающая способность ($8\times$, $20\times$, $40\times$, $90\times$) и числовая апертура.

Числовая апертура A отражает количество света (**Рис. 3**), попадающего в линзу.

Величина ее определяется по формуле:

$$A = n \sin u,$$

где

A – числовая апертура линзы;

n – показатель преломления среды, граничащей с линзой;

u – половина отверстиеного угла α .

Микроскопы необходимо хранить под чехлами или колпаками для защиты от пыли. Удобно пользоваться чехлами из полиэтилена; не следует оставлять микроскоп под солнечными лучами или в теплом месте, так как может размягчиться клей, которым склеены линзы.

В комнате, где установлен микроскоп, не должно быть паров кислот и водяных паров. При переносе микроскоп следует брать только за тубусодержатель и следить за тем, чтобы окуляр не выпал из тубуса.

Для наружной очистки оптики применяют смоченные спиртом мягкие ткани, лучше фланель, не оставляющие после себя волокон. Использование ксилола и бензина для этих целей может привести к расклеиванию линз.

Микроскопия.

Приступая к работе с микроскопом, проверяют состояние конденсора: он должен быть поднят до уровня предметного столика, диафрагма открыта. Приподняв тубус микроскопа, устанавливают объектив с наименьшим увеличением ($8\times$, $10\times$); глядя в окуляр, при помощи зеркала добиваются

полного освещения поля зрения. Затем на исследуемый препарат наносят каплю кедрового масла (или его заменителя), помещают препарат на предметный столик, поворотом револьвера устанавливают иммерсионный объектив. (Чтобы избежать соприкосновения объектива со столиком, тубус следует держать приподнятым.) Под контролем глаза (смотреть сбоку) фронтальную линзу объектива легким поворотом макрометрического винта погружают в каплю иммерсионного масла и, наблюдая в окуляр, осторожно поднимают тубус до видимости препарата. Затем легкими поворотами микрометрического винта (вперед-назад) регулируют четкость изображения.

При смене препарата тубус микроскопа поднимают, препарат снимают с предметного столика и, если исследование проводилось с иммерсионной системой, фронтальную линзу объектива тщательно очищают от масла, протерев салфеткой, смоченной спиртом.

В конце работы тубус приподнимают макровинтом, револьвер переводят в нейтральное положение, масло с линзы осторожно снимают мягкой хлопчатобумажной тканью. Микроскоп убирают в деревянный футляр или накрывают стеклянным колпаком (лучше из цветного стекла) для защиты от света.

Микроскопированием определяют морфологические особенности микроорганизмов, их тинкториальные свойства, подвижность, наличие специальных структурных элементов (спора, капсула).

Приготовленные препараты «раздавленная капля» и «висячая капля» просматривают с объективами $20\times$ или $40\times$.

Фиксированные окрашенные препараты микроскопируют вначале с объективом $40\times$, потом – с объективом $90\times$. В правильно окрашенном и хорошо промытом препарате поле зрения остается светлым и чистым, а окрашенными оказываются клетки микроорганизмов.

Чтобы исследовать под микроскопом живые нефиксированные неокрашенные микроорганизмы, используют особые оптические системы: фазово-контрастное устройство и темнопольный конденсор.

Методы исследования микроорганизмов в светлпольном микроскопе.

Микроскопическое исследование микроорганизмов проводят в живых или фиксированных окрашенных препаратах.

Приготовление препаратов.

Приготовление живых препаратов.

Микроскопия клеток в живом состоянии применяется главным образом для изучения их размеров, формы, структуры, подвижности, характера размножения, отношения клеток к различным химическим раздражителям. С этой целью наиболее часто готовят препараты «раздавленная капля» и «висячая капля». Микроорганизмы в этих препаратах можно подвергать

прижизненной окраске. Так как большинство используемых в микробиологии красителей токсичны, для прижизненного окрашивания микроорганизмов их используют в очень малых концентрациях от 0,001 до 0,0001 %. В препарате «висячая капля» микроорганизмы можно наблюдать в течение продолжительного времени – неделю и более.

«Раздавленная капля».

Готовят предметные и покровные стекла для микроскопии. Они должны быть чистыми и хорошо обезжиренными, чтобы нанесенная на них капля равномерно растекалась. Достигается это несколькими способами. Стекла можно прокипятить 15 мин в 1%-м растворе соды или в мыльной воде, сполоснуть водопроводной водой, поместить на 5 – 10 мин в слабую хлористоводородную кислоту и хорошо промыть дистиллированной водой. Можно также готовить стекла к работе, выдержав их предварительно 2 ч в концентрированной серной кислоте или хромовой смеси. После этого промыть их в проточной воде, прокипятить в 2 %-ом растворе щелочи в течение 10 мин, тщательно промыть проточной, а затем дистиллированной водой. Обезжиренные предметные стекла можно приготовить, используя для этой цели кусочек мыла, которым необходимо натереть рабочую поверхность стекла, а затем тщательно вытереть ее сухой салфеткой. Чистые стекла поместить на хранение в сосуды с притертыми пробками в смеси равных объемов спирта и эфира или в 96%-й спирт.

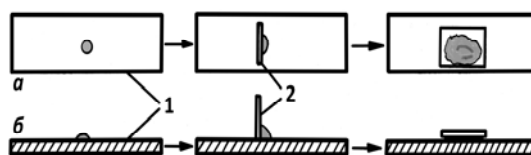


Рис. 4. Схема приготовления препарата «раздавленная капля»:

а — вид сверху;

б — вид сбоку;

1 — предметное стекло; 2 — покровное стекло.

Затем, для приготовления препарата на чистое и обезжиренное предметное стекло бактериологической петлей или пастеровской пипеткой наносят каплю исследуемой культуры. Если микроорганизмы находились в суспензии (в жидкой питательной среде), их наносят непосредственно на предметное стекло. Если же материал взят с плотной питательной среды, тогда его вносят в нанесенную предварительно на предметное стекло каплю стерильной водопроводной воды, стерильного физиологического раствора или какой-либо жидкой питательной среды. Можно также из культуры, выращенной на плотной питательной среде, предварительно приготовить суспензию микроорганизмов. Для этого в пробирку с микроорганизмами, выросшими на агаровой поверхности, вносят 4 – 5 см³ стерильного физиологического раствора или водопроводной воды и, вращая пробирку

между ладонями, смывают микробные клетки с поверхности среды. Кроме того, можно в пробирку с 4 – 5 см³ стерильной воды бактериологической петлей перенести 1 – 2 колонии исследуемых микроорганизмов, выросших на агаре в чашке Петри.

На предметное стекло на край капли опустить ребром под углом 45° покровное стекло и, осторожно наклоняя, накрыть им каплю так, чтобы в ней не образовались пузырьки воздуха (**Рис. 4**).

Каплю нужно брать такой величины, чтобы она заполняла все пространство между покровным и предметным стеклами и не выступала за края покровного стекла. Если жидкость будет нанесена в избытке, ее необходимо удалить при помощи полосок фильтровальной бумаги.

«Висячая капля».

Для приготовления препарата «висячая капля» взять стекло со шлифованной лункой. Края лунки смазать вазелиновым маслом. На покровное стекло стерильно в центр нанести каплю исследуемого материала (**Рис. 5**).

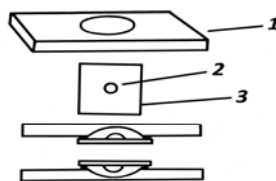


Рис. 5. Схема приготовления препарата «висячая капля»:

1 – предметное стекло с лункой; 2 – капля; 3 – покровное стекло.

Затем предметное стекло перевернуть лункой вниз и поместить на покровное стекло так, чтобы капля находилась в центре лунки, не соприкасаясь с ее краями. Предметное стекло легонько прижать к покровному и перевернуть. В образовавшейся герметичной камере капля не высыхает, что позволяет наблюдать за микроорганизмами продолжительное время.

Приготовление фиксированных препаратов.

Фиксированный окрашенный препарат микроорганизмов готовят в несколько этапов: приготовление мазка, высушивание его, фиксация и окрашивание.

Мазки готовят на чистых обезжиренных предметных стеклах из микробных суспензий или из культур, выращенных на плотных питательных средах. Если необходимо изучить естественное расположение микроорганизмов в колониях, выращенных на поверхности плотной питательной среды или естественного субстрата, то готовят «препарат-отпечаток».

Высушивают мазки или «препараты-отпечатки» при комнатной температуре, так как высушивание при высокой температуре нарушает форму клеток.

На следующем этапе мазок фиксируют. При этом клетки прочно прикрепляются к поверхности стекла, повышается их сродство к красителям и, наконец, клетки гибнут. Самый простой и распространенный способ фиксации – фиксация жаром, пригоден для наблюдения морфологии клеток, но не для изучения их строения, так как при воздействии высоких температур структура клеток существенно изменяется. Помимо жара фиксацию можно проводить химическими веществами (жидкостями и парами). Для этого используют 96%-й этиловый спирт (время фиксации 5 – 10 мин), смесь Никифорова, состоящую из абсолютного этилового спирта и эфира в соотношении 1 : 1 (10 – 15 мин), безводный метиловый спирт (3 – 5 мин), ацетон (5 мин), пары параформальдегида и др. Для дрожжей приоритетными являются химические методы фиксации.

Для химической фиксации микроорганизмов чаще всего используют следующие химические растворы:

1. Жидкость Карнуа:

Ледяная уксусная кислота	– 10 см ³
Этиловый спирт, 96°	– 60 см ³
Хлороформ	– 30 см ³

Хранить жидкость следует в бутылках с притертой пробкой. Она может храниться длительное время, но лучше пользоваться свежеприготовленным раствором. Жидкость Карнуа является хорошим фиксатором для изучения строения бактерий. Экспозиция фиксации 15 мин.

2. Смесь Никифорова:

Этиловый спирт, 96°	– 1 часть
Эфир	– 1 часть

Для фиксации препарат погружают в стакан с жидкостью на 15—20 мин, после чего вынимают и дают возможность подсохнуть.

3. Спирт-формалин:

Этиловый спирт, 96 °	– 95 см ³
Формалин	– 5 см ³

Для фиксации препарат погружают в стакан с жидкостью на 15 мин, после чего вынимают и дают возможность подсохнуть.

После фиксации препарат окрашивают. Большинство красок, применяемых в микробиологической практике, представляют собой соединения, чаще всего производные бензола и его гомологов, которые получают либо путем химического синтеза, либо из каменноугольной смолы. Они могут быть основными, кислыми и нейтральными. В лабораторных условиях можно быстро определить, какой характер (кислый или основной)

имеет водный раствор того или иного красителя. Для этого на фильтровальную бумагу наносят каплю исследуемой краски. Так как фильтровальная бумага заряжена отрицательно, то при основных свойствах краски вода растекается в виде бесцветной зоны вокруг фиксированного пятна краски, при кислых – краска и вода растекаются одинаково. Основные краски соединяются с веществами клетки, имеющими кислые свойства, а кислые – с веществами с основными свойствами. В практике микробиологических исследований чаще используются основные краски. Это объясняется тем, что большинство микроорганизмов несут на поверхности клетки отрицательный электрический заряд и в их цитоплазме преобладают вещества с кислыми свойствами. Исходя из сродства клеточных веществ к основным, кислым или нейтральным краскам, введены соответственно понятия базофилия, ацидофилия и нейтрофилия. Такое деление, однако, является относительным, так как большинство клеточных веществ являются амфотерными соединениями и в зависимости от значения рН среды могут приобретать кислые, нейтральные или основные свойства.

В микробиологической практике наиболее употребительными красками являются:

- красные – фуксин основной и фуксин кислый, нейтральный красный, конго красный, эозин К, эритрозин;
- синие – метиленовый голубой, толудиновый голубой;
- зеленые – малахитовый зеленый, бриллиантовый зеленый, янус зеленый;
- фиолетовые – генциан фиолетовый, кристаллический фиолетовый, гематоксилин;
- коричневые – основной коричневый, хризоидин;
- желтые – пикриновая кислота, флуоресцеин;
- черные – индулин спирторастворимый, нигрозин водорастворимый и др.

Использование разных красок, их концентрация и продолжительность воздействия на клетки обуславливается особенностями выявляемых структур и свойствами красителей.

Процедура приготовления фиксированного окрашенного препарата.

С помощью стерильной бактериологической петли или пипетки Пастера нанести на тщательно обезжиренное предметное стекло каплю суспензии микроорганизмов. Материал с плотных питательных сред взять бактериологической петлей и внести его в каплю стерильной водопроводной воды, предварительно нанесенную на предметное стекло. Микробный материал равномерно тонким слоем растереть на площади 1,5 – 2 см² и высушить приготовленный мазок при комнатной температуре.

После высушивания мазок зафиксировать в пламени горелки. Держа стекло мазком вверх, трижды провести его через пламя горелки. Во избежание перегрева микроорганизмов время прямого воздействия пламени

не должно превышать 3 – 4 секунды. Для лучшего сохранения морфологических параметров клетки целесообразно использовать химические методы фиксации.

Препарат поместить мазком вверх на мостик из двух параллельных стеклянных палочек, соединенных резиновыми трубками и находящихся на стенках кюветы или кристаллизатора.

Подготовленный таким образом препарат окрасить по методике, соответствующей поставленной задаче.

Препарат высушить на воздухе или легко промокнуть фильтровальной бумагой. Края стекла и тыльную сторону хорошо протереть салфеткой или фильтровальной бумагой.

Приготовленный таким образом препарат готов к микроскопированию.

Цель работы.

Ознакомиться с устройством и принципами работы светового микроскопа. Освоить методы приготовления живых и фиксированных препаратов, а также методами их изучения в светлом поле микроскопа.

Материалы и оборудование.

Микроскопы биологические световые, предметные стекла, предметные стекла с лункой, покровные стекла, спиртовые или газовые горелки, бактериологические петли, пастеровские пипетки, иммерсионное масло, живые культуры хлебопекарных дрожжей, живые культуры молочнокислых бактерий, живые культуры спорообразующих бактерий.

Ход работы.

1. Изучить основные узлы светового микроскопа и принцип их действия;
2. Установить свет по Кельдалю;
3. Приготовить препарат *«раздавленная капля»* с хлебопекарными дрожжами и изучить их морфологические признаки при увеличении $40\times$;
4. Приготовить препарат *«висячая капля»* с хлебопекарными дрожжами и изучить их морфологические признаки при увеличении $40\times$;
5. Приготовить фиксированный на пламени горелки препарат с молочнокислыми и спорообразующими бактериями;
6. Окрасить препараты молочнокислых и спорообразующих бактерий простыми методами и изучить их морфологические признаки при увеличении $90\times$ в иммерсионной системе.

Задание.

Зарисовать в рабочей тетради общее строение микроскопа и схемы потока лучей при световой микроскопии.

Зарисовать в рабочей тетради результаты микроскопии препаратов «висячая капля» и «раздавленная капля». Описать морфологические свойства покоящихся и почкующихся клеток хлебопекарных дрожжей.

Зарисовать в рабочей тетради результаты микроскопии фиксированных окрашенных препаратов молочнокислых и спорообразующих бактерий. Описать их морфологические сходства и различия.

Контрольные вопросы:

1. Перечислить основные узлы светового микроскопа и принцип их функционирования;
2. В каких случаях следует использовать методы микроскопии в препаратах «висячая капля» и «раздавленная капля»;
3. Для чего и в каких случаях необходимо использовать иммерсионную систему в микроскопических исследованиях;
4. Какие морфологические различия характерны для дрожжей и бактерий;
5. Какие морфологические различия характерны для молочнокислых и спорообразующих бактерий.

Литература:

1. Качмазов Г.С. Дрожжи бродильных производств. Практическое руководство. СПб.: Издательство «ЛАНЬ», 2012.
2. Практикум по микробиологии: Учебное пособие для студентов высших учебных заведений / А.И. Нетрусов, М.А. Егорова, Л.М. Захарчук и др.; Под ред. А.И. Нетрусова. – М.: Издательский центр «Академия», 2005.
3. Практикум по цитологии. Учебное пособие / Под ред. Ю.С. Ченцова. – М.: Изд-во Моск. ун-та. 1988.

Лабораторная работа № 2.

Методы окраски и цитохимические методы исследования клеток.

Теоретический обзор.

Методы окраски микроорганизмов и цитохимические методы исследования микроорганизмов.

Определение гликогена в клетках дрожжей.

Гликоген – одно из резервных веществ дрожжевых клеток. Он накапливается в цитоплазме и окрашивается раствором Люголя в коричневый или красно-бурый цвет. Наблюдения за содержанием гликогена в клетках дрожжей проводят в динамике развития культуры.

Готовят препарат "раздавленная капля" в растворе Люголя и в нескольких полях зрения подсчитывают общее количество клеток и количество клеток, содержащих гликоген. Общее число подсчитанных клеток должно быть не менее 100.

Полученные данные можно регистрировать в предлагаемой **таблице 1**.

Таблица 1

Содержание гликогена в клетках

<i>Время брожения, ч</i>	<i>Число клеток</i>		<i>%</i>
	<i>всего</i>	<i>с гликогеном</i>	
0			
5			
24			

Если препарат нагреть до 60°C, окраска гликогена исчезает, а при охлаждении препарата она вновь восстанавливается.

Окраска волютина по методу Омелянского.

На предметном стекле готовят тонкий мазок из культуры исследуемых дрожжей, высушивают на воздухе и фиксируют на пламени горелки. Мазок окрашивают карболовым фуксином 30 – 40 секунд и промывают водой. Далее мазок дифференцируют, погружая его в склянку с 1 %-ным раствором серной кислоты на 20 – 30 секунд и немедленно промывают водой. Серная кислота обесцвечивает цитоплазму, а зерна волютина остаются окрашенными фуксином. Препарат докрашивают метиленовым синим (1 : 40) 20 – 30 секунд, промывают водой, высушивают на воздухе и микроскопируют, пользуясь объективом МИ-90.

На препарате зерна волютина окрашены в красный цвет, цитоплазма клетки – в голубой.

Окраска микроорганизмов по Граму.

Препарат, фиксированный в пламени горелки или обработанный метиловым спиртом, покрывают раствором генцианвиолета на 1 – 2 мин, затем обрабатывают в течение 1 – 2 мин раствором Люголя, промывают водой и быстро опускают в 96 %-ный этиловый спирт. В спирте препарат держат до тех пор, пока от него не перестанет отходить краска. После этого препарат вновь промывают водой и окрашивают разбавленным фуксином Пфейфера в течение 0,5 – 1 мин.

Грамположительные бактерии окрашиваются в темно-фиолетовый цвет, грамотрицательные – в красный.

Метод применяется исключительно для окраски бактерий и не эффективен при окрашивании дрожжей, ввиду принципиальных отличий в строении клеточной стенки.

Краски.

Метиленовый синий (насыщенный спиртовой раствор).

К 100 см³ 96 %-ого этилового спирта прибавляют 10 г метиленового синего (в порошке) и оставляют стоять несколько дней (при этом несколько раз встряхивают), затем раствор фильтруют.

Метиленовый синий 1:40.

Метиленовый синий (насыщенный спиртовой раствор)	– 1 см ³
Вода дистиллированная	– 40 см ³

Основной фуксин.

2 г сухой краски и 20 см³ 96 %-ого этилового спирта встряхивают и оставляют стоять несколько дней, получается насыщенный спиртовой раствор.

Карболовый фуксин (по Цилю).

10 см³ насыщенного спиртового раствора основного фуксина растворяют в 100 см³ 5 %-ого раствора карболовой кислоты (фенола).

Разбавленный фуксин (по Пфейферу).

Для окраски микроорганизмов применяют раствор разбавленного в 10 раз карболового фуксина.

Насыщенный спиртовой раствор генцианвиолета (для окраски по Граму).

1 г сухой краски растворяют в 10 см³ 96 %-ого спирта и смешивают со 100 см³ 5 %-ого раствора карболовой кислоты; для достижения прозрачности добавляют несколько капель спирта.

Раствор Люголя для окраски по Граму.

Для приготовления раствора Люголя 1 г кристаллического йода растирают в фарфоровой ступке с 2 г йодида калия и порциями (по 5 см³) добавляют дистиллированную воду до полного растворения кристаллического йода в йодиде калия. После полного растворения кристаллов объем доводят до 300 см³. Приготовленный раствор Люголя хранят в посуде из темного стекла (на свету раствор Люголя быстро обесцвечивается).

Раствор Люголя для выявления гранулезы.

Кристаллический йод	– 1 г
Йодид калия	– 2 г
Дистиллированная вода	– 100 см ³

Гранулеза в клетках окрашивается в темно-синий цвет.

Раствор Люголя для выявления гликогена.

Кристаллический йод	– 7 г
Йодид калия	– 20 г
Дистиллированная вода	– 100 см ³

Гликоген приобретает красно-бурую окраску.

Техника приготовления растворов для выявления гранулезы и гликогена такая же, как раствора Люголя для окраски по Граму.

***Окрашивание дрожжей метиленовым синим
для определения витальности.***

Около 1 г сухеных дрожжей вносят в пробирку со стерильным солодовым суслим плотностью 8 % видимых СВ.

Пробирку ставят в термостат при температуре 30°C на 4 часа. За это время все живые клетки, содержащиеся в пробе, выходят из состояния анабиоза и начинают почковаться. Из подмоложенных таким способом дрожжей готовят препарат, который окрашивают метиленовым синим, приготовленным на буферной смеси.

Для прессованных дрожжей и живой культуры нет необходимости в такой процедуре.

Каплю взвеси дрожжей смешивают с каплей синьки на предметном стекле и накрывают покровным стеклом. Мертвые клетки окрашиваются, а живые остаются неокрашенными. В пяти полях зрения отдельно подсчитывают количество мертвых и живых клеток, процент мертвых клеток вычисляют по отношению ко всему количеству клеток. Материнскую клетку с не отделившейся почкой принимают за одну клетку.

Цель работы.

Ознакомиться с биохимическими основами и методами окраски прокариотических и эукариотических клеток микроорганизмов. Освоить простые и сложные методы окрашивания и их значение в микроскопическом исследовании микроорганизмов.

Материалы и оборудование.

Микроскопы биологические световые, предметные стекла, покровные стекла, спиртовые или газовые горелки, бактериологические петли, пастеровские пипетки, иммерсионное масло, водный раствор метиленового синего 1 : 40, раствор Люголя для выявления гликогена, раствор Люголя для

окраски по Граму, рабочий раствор фуксина Пфейфера, спиртовой раствор генцианвиолета, живые культуры хлебопекарных дрожжей, живые культуры молочнокислых бактерий, живые культуры спорообразующих бактерий.

Ход работы.

1. Приготовить препарат «раздавленная капля» из дрожжевой взвеси и окрасить его раствором Люголя для выявления гликогена. Микроскопировать препарат при увеличении 40^{\times} ;
2. Приготовить фиксированный на пламени горелки препарат хлебопекарных дрожжей и окрасить его метиленовым синим Леффлера для выявления волютина. Микроскопировать препарат при увеличении 60^{\times} в водной иммерсии;
3. Приготовить препарат «раздавленная капля» из дрожжевой взвеси и окрасить его водным раствором метиленового синего 1 : 40 для выявления нежизнеспособных клеток. Микроскопировать препарат при увеличении 40^{\times} ;
4. Приготовить фиксированные на пламени горелки препараты молочнокислых и спорообразующих бактерий, окрасить препараты по Граму и микроскопировать в масляной иммерсии при увеличении 90^{\times} .

Задание.

Зарисовать в рабочей тетради расположение гранул гликогена в дрожжевой клетке.

Зарисовать в рабочей тетради расположение гранул волютина в дрожжевой клетке.

Зарисовать в рабочей тетради поле зрения микроскопа и расположение в нем живых и нежизнеспособных дрожжевых клеток.

Зарисовать в рабочей тетради молочнокислые бактерии, окрашенные по Граму.

Зарисовать в рабочей тетради спорообразующие бактерии, окрашенные по Граму.

Контрольные вопросы:

1. Дать общую характеристику красителей, наиболее широко используемых в микробиологической практике;
2. Обосновать необходимость и различия простых и сложных методов окрашивания;
3. На чем основаны и с какой целью применяются цитохимические методы окрашивания клеток;
4. Какие механизмы лежат в основе определения жизнеспособности дрожжевой культуры;
5. Какие свойства бактериальных клеток определяют их способность окрашиваться по Граму.

Литература:

1. Качмазов Г.С. Дрожжи бродильных производств. Практическое руководство. СПб.: Издательство «ЛАНЬ», 2012.
2. Практикум по микробиологии: Учебное пособие для студентов высших учебных заведений / А.И. Нетрусов, М.А. Егорова, Л.М. Захарчук и др.; Под ред. А.И. Нетрусова. – М.: Издательский центр «Академия», 2005.
3. Практикум по цитологии. Учебное пособие / Под ред. Ю.С. Ченцова. – М.: Изд-во Моск. ун-та. 1988.

Лабораторная работа № 3.

Питательные среды. Методы стерилизации питательных сред и посуды.

Теоретический обзор.

Питательные среды.

Среды общего назначения.

Учитывая отраслевые сырьевые особенности, в качестве основного компонента питательных сред может быть использовано зерновое, виноградное, плодово-ягодное или мелассовое сусло. Однако наиболее универсальным и сбалансированным следует признать солодовое неохмеленное сусло с содержанием 8 – 10 % СВ.

Солодовое сусло.

Для приготовления сусла в лаборатории используют ячменный солод крупного помола с высокой осахаривающей способностью. В 1 л воды вносят 250 г солода и нагревают до 50°C. Через 30 мин температуру повышают до 55°C, а еще через 30 мин постепенно поднимают до 62,5 – 63°C. При этой температуре выдерживают до исчезновения реакции на крахмал (йодная проба). Полученное сусло отделяют от дробины путем фильтрации через марлю и вату, разбавляют водой до нужной концентрации, разливают по колбам и стерилизуют при 112°C 30 мин. Если рН ниже 5,5, то сусло подщелачивают 10%-ным раствором соды или едкого кали до получения рН 5,6 – 6,0. Полученное таким образом сусло желательно очистить от примесей кизельгуром или отстаиванием в холодильнике и фильтрацией через бумажный фильтр.

В отсутствие солодового вполне применимо зерновое сусло, осахаренное комплексом ферментных препаратов с обязательным внесением

дрожжевой золки и 0,3 – 0,5 % дрожжевого автолизата перед автоклавированием.

Для приготовления жидкой питательной среды осахаренное и отфильтрованное сусло разливают в колбы или пробирки на 1/2 – 3/4 объема, закрывают ватно-марлевыми пробками и автоклавируют 20 минут при 0,1 МПа.

Мелассовое сусло.

Густую мелассу отвешивают на технических весах в количестве 200 – 300 г, смешивают с водой в соотношении 1 : 3 и нагревают до 75°C, затем насыпают 4 % суперфосфата и повышают температуру до 85°C при постоянном помешивании. 33 %-ный раствор едкой щелочи в количестве 0,8 % по объему к исходной мелассе разводят в 30 – 50 см³ воды, добавляют к нагретой мелассе и хорошо перемешивают. В результате происходит выпадение осадка трикальцийфосфата, который увлекает за собой коллоиды мелассы и более крупные частицы, осадок быстро оседает на дно, и меласса осветляется. После этого к мелассе добавляют 2,5 % сернокислого аммония и 2 % суперфосфата в виде вытяжки (1 г суперфосфата и 10 см³ воды нагревают до кипения и фильтруют через бумажный фильтр). Мелассу перемешивают с питательными солями и фильтруют через бумажный фильтр, лучше под вакуумом на воронке Бюхнера.

Осветленную мелассовую среду разводят водой до требуемой концентрации 5 – 8 % СВ по сахарометру и разливают в колбы, пробирки или бутылки; для приготовления твердых питательных сред добавляют агар.

Мелассовое сусло стерилизуют в автоклаве при избыточном давлении 0,05 МПа 30 минут или в аппарате Коха при 100°C в течение 1 часа трое суток подряд.

Сусло-агар.

В химическом стакане в сусло (8 – 10 % СВ) внести необходимое количество агар-агара (2,5 г / 100 см³) и выдержать 10 – 15 минут не перемешивая до полного его увлажнения. Стакан поставить на слабый огонь и, постоянно перемешивая, довести до кипения. Содержимое стакана перелить в колбу до 1/2 объема, закрыть ее ватно-марлевой пробкой и автоклавировать 20 минут при 0,1 МПа.

Если питательная среда не требует внесения каких-либо термолабильных ингредиентов, то ее можно сразу после автоклавирования разливать в заранее приготовленные стерильные высушенные чашки Петри. Если же предполагается внесение антибиотиков, факторов роста или других чувствительных к температуре компонентов, то среду в колбе необходимо остудить до 40 – 45°C, стерильно внести нужные компоненты, перемешать и разливать в чашки Петри. После этого чашки со средой не следует более перемешивать, пока агар полностью не остынет.

Чтобы удалить образовавшийся конденсат и уменьшить его дальнейшее образование чашки необходимо подсушить. Для этого чашки с агаром переворачиваются крышкой вниз, дно чашки с агаром извлекается и ставится не ребро крышки. В таком положении в боксе под УФ лампой чашки выдерживаются ≈ 60 минут. Высушенные чашки закрываются и могут использоваться для работы, либо храниться в холодильнике, завернутыми в полиэтиленовый пакет, чтобы исключить пересыхание или случайное обсеменение среды.

Скошенный сусло-агар.

Для приготовления, скошенного сусло-агара, доведенную до кипения среду (см. «Сусло-агар») разливают в пробирки до $1/3$ ее объема, закрывают ватно-марлевыми пробками и автоклавируют 20 минут при 0,1 МПа. По окончании стерилизации пробирки с горячей средой раскладывают на наклонной поверхности для образования скоса нужной высоты и дают полностью застыть. Остывшие пробирки переносят в штатив и используют по назначению.

Полужидкий сусло-агар.

В химическом стакане в сусло (8 – 10 % СВ) внести необходимое количество агар-агара ($0,5 \text{ г} / 100 \text{ см}^3$) и выдержать 10 – 15 минут не перемешивая до полного его увлажнения. Стакан поставить на слабый огонь и, постоянно перемешивая, довести до кипения. Содержимое стакана разлить в пробирки до $1/3 - 1/2$ объема, закрыть ватно-марлевыми пробками и автоклавируют 20 минут при 0,1 МПа.

По окончании стерилизации пробирки раскладывают вертикально в штатив и после полного их охлаждения используют по назначению.

Методы стерилизации инструментов, посуды и питательных сред.

Основываясь на влиянии внешних условий на микроорганизмы, в микробиологической практике разработан ряд приемов, приводящих микроорганизмы к гибели. Одним из таких приемов является стерилизация.

Под стерилизацией (обеспложиванием) понимают полное уничтожение микроорганизмов и их спор в питательных средах, посуде, на инструментах и других предметах лабораторного оборудования. Для их стерильности наиболее часто пользуются воздействием высокой температуры.

Стерилизация обжиганием на пламени горелки.

Небольшие стеклянные (палочка, шпатель) и металлические (игла, петля, пинцет, скальпель) предметы проводят несколько раз через пламя горелки. Стерилизация достигается обугливанием находящихся на их

поверхности микроорганизмов. Обжиганием на пламени пользуются и для стерилизации поверхности ватных пробок.

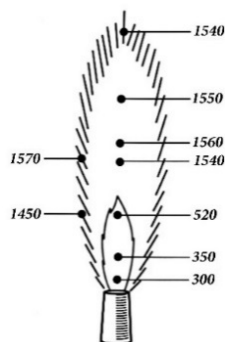


Рис. 6. Значение температуры в разных участках пламени газовой горелки.

Стерилизация кипячением.

Стерилизацию металлических инструментов и резиновых трубок проводят кипячением. Так как споры некоторых бактерий сохраняют жизнеспособность при кипячении в воде в течение нескольких часов, то рекомендуется стерилизацию кипячением проводить в 2 %-ном растворе карбоната натрия в течение 10 мин. В этих условиях споры погибают.

Стерилизация сухим жаром.

Сухим жаром стерилизуют стеклянную посуду. При этом пробирки, колбы предварительно закрывают ватными пробками. Чтобы избежать заражения простерилизованных предметов из воздуха, их перед стерилизацией заворачивают в оберточную бумагу и вынимают только перед работой.

Пипетки перед стерилизацией с концов закрывают ватой. Затем их обертывают длинными полосками бумаги шириной 3,5 – 4 см. Бумагу наматывают по спирали, начиная с конца пипетки, который будет погружен в среду. Концы обертки закрепляют ниткой. Тонкие пипетки обертывают бумагой вместе по несколько штук.

Чашки Петри заворачивают в бумагу в форме квадрата, сторона которого приблизительно равна трем диаметрам чашки. Чашку Петри помещают на середину листа, загибают его с двух противоположных сторон кверху так, чтобы края налегали друг на друга. Два свободных конца загибают вниз. При таком обертывании у чашек легко различать верх и низ.

Подготовленную таким образом посуду помещают в сушильный шкаф, в котором нагревают ее при температуре 160 – 170°C в течение 2 ч (с момента установления нужной температуры). При таком нагревании погибают не только бактерии, но и их споры.

Температуру в сушильном шкафу выше 175°C допускать не следует, так как при этом ватные пробки буреют, а бумажная обертка становится ломкой.

Стерилизация текущим паром – дробная стерилизация или тиндализация.

Питательные среды, воду, резиновые трубки и другие предметы, портящиеся от действия сухого жара, и питательные среды, портящиеся под действием высокой температуры (среды, содержащие молоко, солод, желатину), обеспложивают действием текущего пара.

Стерилизацию текущим паром производят в кипятильнике Коха или в автоклаве с открытым вентилем. Воду в них доводят до кипения, и образующийся пар обтекает стерилизуемые объекты. Температура стерилизуемых питательных сред достигает 100°C. Нагревание в течение 30 – 45 мин приводит к гибели вегетативных клеток бактерий, но споры их не погибают. Затем жидкость охлаждают до температуры, благоприятной для прорастания спор (до 30°C). Нагревание приводит к активации спор и более быстрому их прорастанию. На следующий день нагревание повторяют. При этом погибают вегетативные клетки, развившиеся из спор. Для обеспечения полной стерильности жидкость оставляют еще на сутки и снова повторяют нагревание. Такую стерилизацию называют дробной или тиндализацией.

Пастеризация.

В основе пастеризации лежит нагревание жидкостей до температуры меньше 100°C. Целью ее является уничтожение неспороносных бактерий в жидкостях, теряющих питательные свойства при кипячении (молоко, пиво, вино и др.). Осуществляется пастеризация путем нагревания жидкостей при 60°C в течение 30 мин, или при 75°C в течение 15 мин, или при 80°C в течение 10 мин.

Холодная стерилизация.

Органические жидкости, не выносящие нагревания, освобождают от бактерий, пропуская через стерильные мелкопористые фильтры. Эти фильтры задерживают микроорганизмы, и называют их бактериальными фильтрами.

Бактериальные фильтры имеют разные номера. Фильтры № 1 имеют средний диаметр пор 0,3 мкм и являются наиболее надежными. Фильтры № 5 имеют самые большие отверстия пор, диаметром 1,2 мкм.

Перед употреблением мембранные фильтры стерилизуют кипячением. Фильтры помещают в теплую дистиллированную воду и кипятят 30 мин, меняя 2 – 3 раза воду.

Стерилизация паром под давлением – автоклавирование.

Наиболее надежным и универсальным методом стерилизации питательных сред и материалов является стерилизация их насыщенным паром под давлением. Производят ее в автоклаве, в котором стерилизуемые объекты нагревают чистым насыщенным паром при давлении выше атмосферного. Когда насыщенный пар встречается с более холодным объектом, он конденсируется, превращаясь в воду. При конденсации выделяется большое количество теплоты и температура стерилизуемого объекта быстро повышается.

Полная стерилизация питательных сред при 120°C и давлении 0,1 МПа обеспечивается нагреванием в течение 20 мин.

Правила работы с автоклавом.

Стерилизация в автоклаве производится при повышенном давлении, поэтому работа с ним требует определенной осторожности. Исправность автоклава в определенные сроки проверяют специалисты, которые устанавливают следующий срок проверки.

Системы автоклавов различаются, но все они имеют общие принципы устройства (**Рис. 7**), и правила работы с ними однотипны.

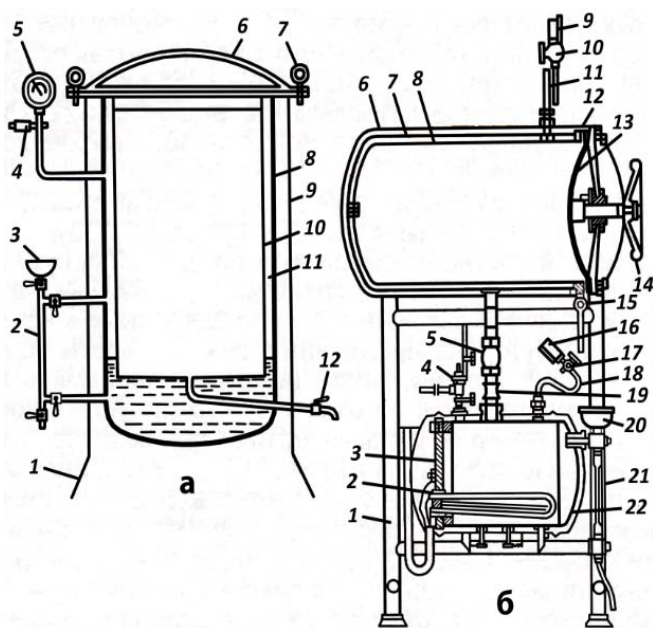


Рис. 7. Устройство автоклава.

а – вертикальный автоклав:

1 – подставка; 2 – водомерная трубка; 3 – воронка; 4 – предохранительный клапан; 5 – манометр; 6 – крышка; 7 – винтовые зажимы; 8 – котел; 9 – кожух; 10 – камера стерилизации; 11 – водопаровая камера; 12 – паровыпускной клапан;

б – горизонтальный автоклав:

1 – постамент; 2 – нагревательный элемент; 3 – крышка котла; 4 – предохранительный клапан; 5 – вентиль; 6 – кожух; 7 – паровая камера; 8 –

стерилизационная камера; 9 – манометр паровой камеры; 10 – трехходовой кран; 11 – сифонная трубка паровой камеры; 12 – опорное кольцо; 13 – крышка паровой камеры; 14 – иштурвал; 15 – впускной кран; 16 – манометр котелка; 17 – трехходовой кран котелка; 18 – сифонная трубка котелка; 19 – патрубков; 20 – воронка; 21 – водоуказательная колонка; 22 – котелок.

Во внутренний котел автоклава (стерилизационную камеру) помещают материал, подлежащий стерилизации.

В водопаровую камеру наливают воду с таким расчетом, чтобы уровень ее в водомерной трубке был между верхней (максимальной) и нижней (минимальной) чертой.

Крышку автоклава привинчивают болтами к корпусу. Завинчивают болты попарно, крест-накрест, чтобы избежать перекоса крышки, который может возникнуть при завинчивании болтов по кругу.

Открывают краны и включают источник обогрева. Когда пар из выпускного крана начинает выходить непрерывной струей, его закрывают и наблюдают за постепенным повышением давления в рабочей камере по манометру.

Отсчет времени стерилизации начинают с того момента, когда в автоклаве установится заданное давление.

Между показаниями манометра и температурой кипения воды имеется определенная зависимость (**Табл. 2**). Время от времени эти соотношения следует проверять. Нарушение их указывает на неисправность автоклава и на необходимость его ремонта.

Таблица 2

Зависимость давления и температуры в камере автоклава

Показатели манометра		Температура кипения воды, °С
МПа	атм.	
0,00	0,0	100
0,02	0,2	105
0,04	0,4	110
0,05	0,5	112
0,06	0,6	114
0,07	0,7	116
0,08	0,8	117
0,09	0,9	119
0,10	1,0	121
0,15	1,5	127

Проверку осуществляют следующим образом: в стерилизационную камеру автоклава помещают 100 г бензойной кислоты с добавлением

небольшого количества фуксина или метиленового синего. Если при показании манометра в 0,1 МПа бензойная кислота расплавится, образуя с красителем сплав, то значит, автоклав дает нужную температуру (120°C).

После окончания заданного срока стерилизации источник нагрева выключают, перекрывают вентиль водопаровой камеры, и только после этого постепенно открывают выпускной клапан. При быстром выпуске пара могут быть вырваны ватные пробки из стерилизуемой посуды.

После полного выхода пара отвинчивают болты крышки начиная от себя для защиты от выходящего пара.

Если во время стерилизации давление начинает подниматься выше заданного уровня, его регулируют, уменьшая нагрев или выпуская часть пара через предохранительный клапан. Последний должен быть отрегулирован так, чтобы при повышении давления излишек пара выходил автоматически.

Цель работы.

Ознакомиться с назначением и основами методами приготовления питательных сред для культивирования микроорганизмов. Изучить основные и вспомогательные компоненты питательных сред общего назначения. Освоить методы приготовления и стерилизации питательных сред для культивирования микроорганизмов. Изучить строение, принцип работы и назначение автоклава в микробиологической лаборатории.

Материалы и оборудование.

Автоклав, сушильный шкаф, бактериологические петли, пастеровские пипетки, шпатели Дригальского, чашки Петри, колбы 500 мл, пробирки, газовые или спиртовые горелки, мука пшеничная, солод ржаной, ферменты для разваривания зернового сырья, агар-агар, автолизат дрожжевой, золка дрожжевая, глюкоза, сахароза.

Ход работы.

1. Приготовить затор и сварить солодовое сусло из пшеничной муки с содержанием 8% СВ;
2. Приготовить затор и сварить сусло из пшеничной муки с использованием ферментов с содержанием 8% СВ;
3. Из готового сусла приготовить жидкий, полужидкий и плотный сусло-агар;
4. Жидкие и агаризованные питательные среды стерилизовать автоклавированием при 1 атм. в течение 30 мин.;
5. Стерильные среды разлить в пробирки столбиком и чашки Петри тонким слоем.

Задание.

Зарисовать в рабочей тетради принципиальную схему устройства автоклава.

Зарисовать в рабочей тетради принципиальную схему устройства сушильного шкафа.

Записать в рабочей тетради методику приготовления зернового сусла.

Записать в рабочей тетради рецептуру жидких, полужидких и плотных питательных сред.

Записать в рабочей тетради последовательность работы с автоклавом и возможные режимы стерилизации.

Контрольные вопросы:

1. Перечислить основные узлы автоклава, его назначение и принцип работы;
2. Перечислить основные узлы сушильного шкафа и его назначение;
3. Объяснить основные процессы, происходящие при приготовлении зернового сусла;
4. Дать общую характеристику, описать методы приготовления и назначение азотного и минерального питания для микроорганизмов;
5. Какие задачи могут решаться в исследовательской и производственной практике при использовании жидких, полужидких и плотных питательных сред.

Литература:

1. Биотехнология: теория и практика: Учебное пособие для вузов / Н.В. Загоскина с соавт.; Под ред. Н.В. Загоскиной, Л.В. Назаренко. – М.: Изд. Оникс, 2009.
2. Качмазов Г.С. Дрожжи бродильных производств. Практическое руководство. СПб.: Издательство «ЛАНЬ», 2012.
3. Практикум по микробиологии: Учебное пособие для студентов высших учебных заведений / А.И. Нетрусов, М.А. Егорова, Л.М. Захарчук и др.; Под ред. А.И. Нетрусова. – М.: Издательский центр «Академия», 2005.

Лабораторная работа № 4.

Выделение чистой культуры микроорганизмов.

Культуральные свойства на плотных и жидких питательных средах.

Теоретический обзор.

Выделение чистой культуры.

Источником чистой культуры дрожжей могут быть лабораторные коллекционные культуры, производственные субстраты и естественные экологические ниши.

Чистой микробной культурой называют популяцию, представляющую собой потомство одной или нескольких клеток одного вида микроорганизма.

Каждый новый изолят носит название штамма, которому присваивают буквенное или номерное обозначение.

Расами называют производственные штаммы одного вида дрожжей, различающиеся между собой по степени проявления физиологической активности.

В генетических исследованиях пользуются так называемыми клонами – чистыми культурами, полученными от одной споры или гаплоидной клетки.

Основной задачей при исследовании любого материала является получение чистой культуры, т.е. изолированных колоний тех организмов, которые находятся в субстрате. При этом важнейшим условием успешной работы является правильный выбор последовательности ее выполнения и подбор необходимых питательных сред.

Существуют прямые и непрямые методы получения чистых культур дрожжей. Первые основаны на выделении одной клетки или споры под непосредственным контролем через микроскоп. Во втором случае используют косвенные приемы для разделения клеток.

Прямые методы.

Капельный способ Линднера.

Суспензию дрожжей разбавляют жидким суслом до концентрации ≈ 100 клеток в 1 мл и стерильным чертежным пером наносят мельчайшие капельки на необезжиренное покровное стекло, простерилизованное фламбированием в пламени горелки. Капельки располагают в определенном порядке, обычно по пять капель в два ряда, т. е. всего 10 капель на стекле. Затем быстро опрокидывают стекло над влажной камерой, которую запечатывают минеральной смазкой. Все капли немедленно просматривают под микроскопом и отмечают те из них, которые содержат по одной единственной клетке. Если все капли содержат по несколько клеток, то увеличивают разбавление суспензии и процедуру повторяют. После трех-четырехдневного инкубирования, когда отмеченные единичные клетки образуют микроколонии, последние переносят стерильной иглой или полоской стерильной фильтровальной бумаги в жидкую среду и инкубируют.

Метод Линднера, упрощенный Вучковичем.

Видоизменение Вучковичем метода Линднера сводится к тому, что капельки суспензии, содержащие 3 – 4 клетки дрожжей, снимают петлей, которой предварительно захватывают стерильную среду, и переносят

штрихом на поверхность плотной среды. Через некоторое время появляются микроколонии, число которых на одном штрихе должно соответствовать количеству исходных клеток в отмеченной капельке.

Из этих колоний пересевом выделяют чистые культуры. Таким способом можно сразу получить несколько одноклеточных культур за короткое время.

Непрямые методы.

В эту группу включаются методы, основанные на разделении клеток в питательных средах и использовании специфических биологических особенностей отдельных видов для создания преимущественных условий для их роста.

Основным методом выделения чистых культур микроорганизмов является метод, предложенный Р. Кохом. Принцип его заключается в получении чистой культуры из изолированной колонии.

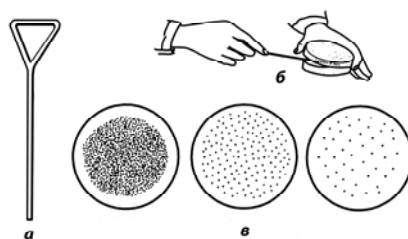


Рис. 8. Рассев культуры микроорганизмов на поверхность плотной питательной среды шпателем Дригальского.

а – шпатель Дригальского;

б – рассев;

в – рост микроорганизмов.

На поверхность плотных питательных сред из пипетки наносят каплю накопительной культуры или ее разведения в стерильной воде и стерильным стеклянным шпателем Дригальского распределяют каплю по поверхности среды в чашке Петри (**Рис. 8**). Далее этим же шпателем протирают поверхность среды последовательно во второй, третьей и четвертой чашках. Обычно в первых двух чашках после инкубации наблюдается сплошной рост микроорганизмов, тогда как в последующих – рост изолированных колоний.

Рассевать накопительную культуру можно бактериологической петлей методом истощающего штриха. В этом случае накопительную культуру или ее разведение отбирают петлей и на поверхности плотной среды проводят штрихи в порядке, указанном на **рисунке 9**. Перед взятием каждого нового инокулята петлю стерилизуют над пламенем горелки.

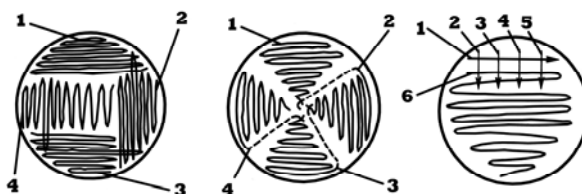


Рис. 9. Рассев культуры микроорганизмов на поверхность плотной питательной среды бактериологической петлей.

1 – 6 – последовательность контакта бактериологической петли с поверхностью плотной питательной среды.

После посева чашки Петри помещают в термостат крышками вниз, чтобы конденсационная вода, образовавшаяся на крышке чашки при застывании агара и в последствии при инкубации, не стекала на поверхность среды и не помешала получить изолированные колонии. Чашки выдерживают в термостате в течение 7 – 10 суток при температуре 28 – 30°C.

С целью сохранения культуры выросшие изолированные колонии отсевают петлей на поверхность скошенного 2,5 %-ого сусло-агара в пробирке или в жидкое неохмеленное сусло (8 % СВ).

Посев на скошенный агар производится бактериологической петлей методом истощающего штриха, начиная со дна пробирки.

Длительное хранение требует особого подбора среды и условий хранения биомассы, при которых культура сохранит свою физиологическую активность.

В зависимости от первичного источника выделения и интенсивности его обсеменения следует принимать решение об использовании накопительных (элективных) сред на стадии посевов первичного материала.

Внесение в питательные среды селективных компонентов, их качественный и количественный состав определяются интенсивностью и биологическим разнообразием обсеменения первоначального субстрата посторонней сопутствующей плесневой, дрожжевой и бактериальной микрофлорой. При выделении дрожжей из сильно загрязненных субстратов и подавления роста сопутствующих микроорганизмов к указанным выше питательным средам добавляют различные ингибиторы селективного действия.

Рост большинства бактерий и актиномицетов подавляется при низком значении pH среды, поэтому чаще всего среды для выделения дрожжей подкисляют до pH 4,5 путем добавления к ним минеральных или органических кислот. Для синтетических сред наиболее применима соляная кислота, для сусловых – молочная, лимонная или винная. Для подкисления солодового сусла (8 % СВ) обычно требуется концентрированной молочной кислоты 3 – 4 см³/л. Кислоты добавляют в жидкую или расплавленную агаровую среду после стерилизации, непосредственно перед засевом или перед разливкой в чашки Петри.

Вместо кислот используют также антибиотики широкого спектра действия: стрептомицин (80 мг/л или 100 ед/см³), пенициллин (20 – 100 ед/см³), левомицетин (50 мг/л) и др. Их можно добавлять в среду порознь и в

комплексе. Например, против кислотоустойчивых бактерий применяют следующие смеси антибиотиков: пенициллин 60 ед/см³ + стрептомицина сульфат 100 ед/см³; левомецетин (хлорамфеникол) 20 мг/л + стрептомицина сульфат 20 мг/л + хлортетрациклин солянокислый 100 мг/л.

Для отделения сахаромикетов от других дрожжей добавляют 2,5% этилацетата и рН до 4,0 доводят уксусной кислотой. Затем чашки герметизируют. При этих условиях колонии сахаромикетов появляются первыми.

Росту дрожжей на питательных средах при высеве из исходного материала зачастую препятствуют грибы с широко распространяющимися по поверхности субстрата мицелиальными колониями. Они имеют общие с дрожжами потребности в источниках питания, устойчивы к низким значениям рН среды и нечувствительны к действию указанных выше противобактериальных антибиотиков. Для ограничения роста микромикетов в среду добавляют специфические вещества: дифенил (0,005 – 0,01%), бычью желчь (0,25 – 0,5%), теллулат калия (0,05 – 0,15%), пропионат натрия (0,15 – 0,25%), или некоторые красители: бромкрезоловый пурпурный (0,0025% или 2,5 см³/л 1% раствора), бенгальский розовый (0,003%), кристаллический фиолетовый (0,001%).

Поскольку дрожжи являются факультативными анаэробами и не требуют особых условий аэрирования, для получения их изолированных колоний посевы из накопительной культуры или другого исследуемого материала лучше производить на поверхность 2,5 %-ого сусло-агара и инкубировать в обычных условиях при 28 – 30°C.

Культуральные свойства.

К культуральным, или макроморфологическим, свойствам относятся характерные особенности роста микроорганизмов на плотных и жидких питательных средах. При изучении культуральных свойств дрожжей и дрожжеподобных грибов вполне применимы термины и определения, используемые в бактериологии для характеристики особенностей бактериального роста.

Рост на плотных средах.

На поверхности плотных питательных сред в зависимости от посева микроорганизмы могут расти в виде колонии, штриха или сплошного газона.

Колонией называют изолированное скопление клеток одного вида, выросшее в большинстве случаев из одной клетки.

В зависимости от того, где развивались клетки (на поверхности плотной питательной среды, в толще ее или на дне сосуда), различают поверхностные, глубинные и донные колонии.

Образование поверхностных колоний – наиболее существенная особенность роста многих микроорганизмов, в том числе и дрожжей, на

плотном субстрате (**Рис. 10, 11**). Такие колонии отличаются большим разнообразием. При их описании учитывают следующие признаки:

форма – округлая, амёбовидная, неправильная, ризоидная и т.д.;

размер (диаметр) – измеряют в миллиметрах; если размеры колонии не превышают 1 мм, то их называют точечными;

поверхность – гладкая, шероховатая, бороздчатая, складчатая, морщинистая, с концентрическими кругами или радиально исчерченная;

профиль – плоский, выпуклый, кратерообразный, конусовидный и т.д.;

блеск и прозрачность – колония блестящая, матовая, тусклая, мучнистая, прозрачная;

цвет – бесцветная (грязно-белые колонии относят к бесцветным) или пигментированная – белая, желтая, золотистая, оранжевая, сиреневая, красная, черная и т.д.; особо отмечают выделение пигмента в субстрат;

край – ровный, волнистый, зубчатый, бахромчатый и т. д.;

структура – однородная, мелко- или крупнозернистая, струйчатая и т.д.; край и структуру колонии определяют с помощью лупы или при малом увеличении микроскопа. Для этого чашку Петри помещают на столик микроскопа крышкой вниз;

консистенция – определяется прикосновением к поверхности колонии петлей; может легко сниматься с агара, быть плотной, мягкой или врастающей в агар, слизистой (прилипает к петле), тягучей, иметь вид пленки (снимается целиком), быть хрупкой (легко ломается при прикосновении петлей).

Глубинные колонии, напротив, довольно однообразны. Они по виду могут быть похожи на более или менее сплюснутые чечевички, в проекции, имеющие форму овалов с заостренными концами. Некоторые глубинные колонии напоминают пучки ваты с нитевидными выростами в питательную среду. Образование глубинных колоний часто сопровождается разрывом плотной среды, если микроорганизмы выделяют углекислоту или другие газы.

Донные колонии разных микроорганизмов обычно имеют вид тонких прозрачных пленок, стелющихся по дну.

Размеры и многие другие особенности колонии могут изменяться с возрастом и зависят от состава среды. Поэтому при их описании указывают возраст культуры, состав среды и температуру культивирования.

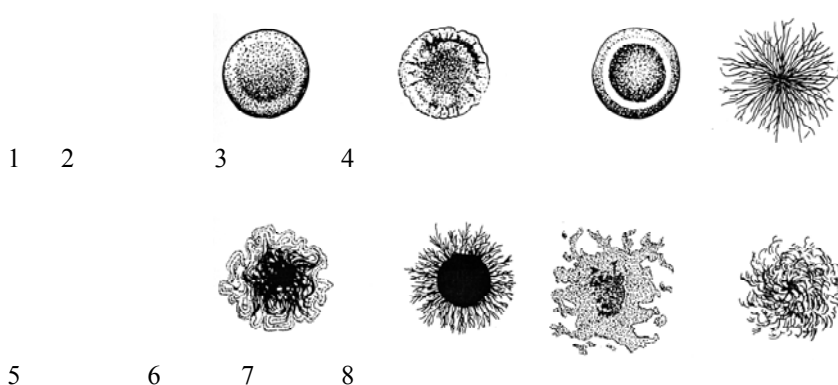




Рис. 10. Форма колонии.

1 – круглая; 2 – круглая с фестончатым краем; 3 – круглая с валиком по краю; 4 – ризоидная; 5 – ризоидная; 6 – с ризоидным краем; 7 – амёбовидная; 8 – нитевидная; 9 – складчатая; 10 – неправильная; 11 – концентрическая; 12 – сложная.

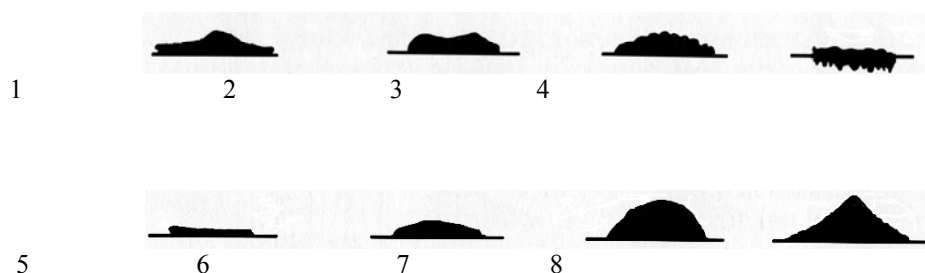


Рис. 11. Профиль колонии.

1 – изогнутый; 2 – кратерообразный; 3 – бугристый; 4 – врастающий в субстрат; 5 – плоский; 6 – выпуклый; 7 – каплевидный; 8 – конусовидный.

При описании роста микроорганизмов по штриху (**Рис. 12**) отмечают следующие особенности: скудный, умеренный или обильный, сплошной с ровным или волнистым краем, четковидный, напоминающий цепочки изолированных колоний, диффузный, перистый, древовидный или ризоидный. Характеризуют оптические свойства налета, его цвет, поверхность и консистенцию.

Определение культуральных признаков дрожжей при росте на плотных средах сводится к описанию штриха, изолированной или гигантской колонии.

Культуры по консистенции бывают чаще всего пастообразными, а также слизистыми, почти полностью стекающими на дно пробирки, вязкими и клейкими, плотными густыми, кожистыми или крошащимися.

Слизистым ростом характеризуются в основном *Lipomyces*, *Cryptococcus* и некоторые виды *Hansenula* со шляповидными спорами, тогда как для видов, образующих истинный и ложный мицелий, например, *Candida*, более обычен рост в виде плотного складчатого штриха с ворсинчатым окаймлением. Край хорошо просматривается визуально при просвечивании пробирки или чашки, а также при наблюдении под малым увеличением микроскопа.

Цвет штриха или колоний зависит от образования дрожжами некоторых пигментов. Наличие желтых, оранжевых и красных пигментов, не проникающих в среду, характерно для *Rhodotorula*, *Sporobolomyces* и некоторых видов *Cryptococcus*. Образование кирпично-красного пигмента

пульхерримина, диффундирующего в агар специфично для *Metschnikowia pulcherrima*. Подавляющее большинство видов дрожжей не синтезирует пигментов и формирует колонии бесцветные или слегка кремового или коричневого оттенка при старении. Такого рода колонии характерны для дрожжей рода *Saccharomyces*.

Для получения стандартного штриха используют две среды: сусло-агар концентрацией 8 – 10% СВ и глюкозо-пептонный агар с дрожжевым экстрактом. Посев производят прямым штрихом в пробирки со скошенным агаром, в чашки Петри или маленькие колбочки.

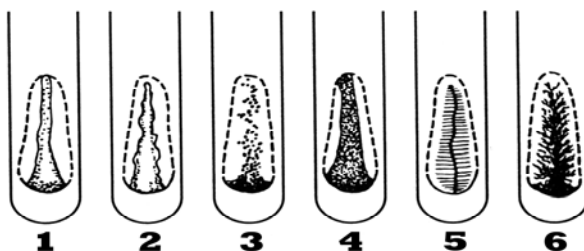


Рис. 12. Рост по штриху.

1 – сплошной с ровным краем; 2 – сплошной с волнистым краем; 3 – четковидный; 4 – диффузный; 5 – перистый; 6 – ризоидный.

Рост описывают через 6 – 8 суток инкубации 25 – 30°C, а в случае медленно растущих культур через 8 суток делают первое описание, а затем через 6 недель просматривают и описывают культуры вторично. Длительное выращивание производят при комнатной температуре – 17 – 18°C.

Для получения гигантской колонии используют сусло с желатиной (20 %) или морфологический агар.

Среды стерилизуют в маленьких колбочках и закашивают. Посев производят легким уколом иглы в центр скошенной поверхности.

Для фотографирования посев лучше делать в чашках Петри с толстым слоем агара. Выращивают в течение 30 суток при комнатной температуре.

Для замедления высыхания агара колбочки сверху обвязывают полиэтиленовым колпачком, а чашки Петри заклеивают сбоку лентой или пластырем.

При описании отмечают диаметр колонии и все признаки, указанные для штриха. Кроме того, при необходимости, обращают внимание на разжижение желатины.

При использовании в диагностических целях культуральных признаков дрожжей следует учитывать, что разные штаммы одного вида на плотных средах могут давать различные формы роста: шероховатые (R - rough) и гладкие (S - smooth), матовые (M - mat) и блестящие глянцевые (Q - glossy).

Рост в жидких средах.

Рост микроорганизмов в жидких питательных средах более однообразен и сопровождается помутнением среды, образованием пленки или осадка. Характеризуя рост микроорганизмов в жидкой среде, отмечают:

степень помутнения – слабая, умеренная или сильная;

особенности пленки – тонкая, плотная или рыхлая, гладкая или складчатая, опускающаяся или поднимающаяся по стенкам пробирки;

образование осадка – скудный он или обильный, плотный, рыхлый, слизистый или хлопьевидный.

Нередко рост микроорганизмов сопровождается появлением запаха, пигментацией среды, выделением газа. Последнее обнаруживают по образованию пены, пузырьков, а также с помощью поплавков.

Для описания характера роста микроорганизмов в жидких средах их выращивают на среде, обеспечивающей хороший рост.

При росте в жидких средах дрожжи вызывают помутнение, образуют осадок, кольцо или разного характера пленки. Рост в виде пленки характеризует способность клеток объединяться в мицелиальные структуры. При образовании истинного мицелия пленка обычно толстая и плотная, но в старых культурах она может превращаться в слизистую массу. Раннее, через 1 – 2 дня, образование тонкой тусклой, иногда мелкоморщинистой и всплывающей по стенкам пробирки пленки обычно наблюдается у дрожжей с окислительным типом энергетического метаболизма.

Рост дрожжей в жидких средах наблюдают и описывают при использовании солодового суслу концентрацией 10 – 15% СВ или в жидкой глюкозопептонной среде с дрожжевым экстрактом. Посев делают в пробирки или колбочки Эрленмейера и инкубируют 4 недели при комнатной температуре – 17 – 18°C.

Цель работы.

Ознакомиться с основами методами получения чистых культур микроорганизмов. Изучить назначение питательных сред различного состава, предназначенных для этих целей. Освоить методы разведения исследуемого материала и посева на питательные среды для получения чистых культур микроорганизмов. Изучить культуральные свойства – основные характеристики чистых культур дрожжей и молочнокислых бактерий, выращенных на различных питательных средах.

Материалы и оборудование.

Ржаная мука, подсырная сыворотка, хлебопекарные дрожжи, по 10 и 200 мл стерильного суслу в пробирках и колбах, по 100 мл стерильной воды в колбах, сусло-агар и сусло-агар с мелом в чашках Петри, стерильные пипетки 1,0 мл, бактериологические петли, шпатели Дригальского, чашки Петри, колбы 500 мл, газовые или спиртовые горелки.

Ход работы.

1. Приготовить ряд 1 : 10 серийных разведений ржаной муки в стерильной воде;
2. Приготовить ряд 1 : 10 серийных разведений подсырной сыворотки в стерильной воде;
3. Из каждой колбы серийных разведений произвести посев 0,1 мл на сусло-агар и сусло-агар с мелом в чашках Петри;
4. Перенесенный в чашки Петри инокулят тщательно растереть по поверхности среды стерильными шпателями Дригальского;
5. Из каждой колбы серийных разведений бактериологической петлей произвести на сусло-агар и сусло-агар с мелом в чашках Петри;
6. Чашки с посевами поместить в термостат при 35°C. Контролировать рост культур каждые 24 часа.

Задание.

Зарисовать в рабочей тетради схему приготовления серийных разведений по методу Коха.

Записать в рабочей тетради изменения в чашках Петри, происходящие каждые 24 часа инкубирования исследуемых культур.

По окончании инкубации в рабочей тетради зарисовать и описать культуральные свойства полученных изолированных колоний микроорганизмов.

Из различных типов колоний приготовить живые и фиксированные препараты и провести их микроскопическое исследование.

Результаты микроскопических исследований записать и зарисовать в рабочей тетради.

Контрольные вопросы:

1. Обосновать необходимость получения чистой культуры в исследовательской и производственной практике;
2. Перечислить критерии оценки культуральных свойств на жидких питательных средах;
3. Перечислить критерии оценки культуральных свойств на плотных питательных средах;
4. Дать общую характеристику дифференциальных, элективных и селективных питательных сред для культивирования микроорганизмов;

Литература:

1. Качмазов Г.С. Дрожжи бродильных производств. Практическое руководство. СПб.: Издательство «ЛАНЬ», 2012.
2. Практикум по микробиологии: Учебное пособие для студентов высших учебных заведений / А.И. Нетрусов, М.А. Егорова, Л.М. Захарчук и др.; Под ред. А.И. Нетрусова. – М.: Издательский центр «Академия», 2005.

Лабораторная работа № 5.

Методы количественного учета микроорганизмов.

Теоретический обзор.

О росте микроорганизмов в естественных субстратах или в питательных средах судят по изменению количества их клеток или биомассы в единице объема. Методы определения этих показателей могут быть прямыми (подсчет клеток под микроскопом, взвешивание) или косвенными. Косвенные методы основаны на измерении параметров, величина которых зависит от количества или биомассы микроорганизмов (число колоний, выросших после посева суспензии клеток на питательную среду, рассеяние или поглощение суспензией света, содержание в ней белка и т.д.). Выбор метода зависит от целей исследования, свойств питательной среды или субстрата, а также особенностей роста и морфологии микроорганизмов.

При оценке численности микроорганизмов, особенно в естественных субстратах, необходимо помнить, что их клетки часто находятся в прикрепленном (адгезированном) состоянии или в виде микроколоний. Поэтому перед началом подсчета их нужно отделить от частиц субстрата и друг от друга (десорбировать). Выбор метода десорбции (механическое перемешивание суспензии клеток, растирание, обработка ультразвуком, применение поверхностно-активных веществ и т.д.) определяется особенностями исследуемого субстрата.

Для подсчета клеток микроорганизмов под микроскопом можно использовать счетные камеры, препараты фиксированных и окрашенных клеток, приготовленные на предметных стеклах или мембранных фильтрах. Перечисленные методы позволяют определить общее количество клеток (как живых, так и мертвых) в единице объема. Основное ограничение большинства указанных методов – необходимость довольно высоких концентраций клеток в единице исследуемого субстрата.

В отличие от подсчета микроорганизмов под микроскопом метод высева на питательные среды дает возможность определить только число жизнеспособных клеток в популяции.

Поскольку сред, пригодных для роста всех микроорганизмов, не существует, метод высева позволяет определить лишь число микроорганизмов, способных расти на среде данного состава. Это важно помнить при анализе таких естественных субстратов, как почва, вода и т.п.

Метод взвешивания биомассы широко применяют для оценки роста микроорганизмов в жидких питательных средах. Можно использовать его и для определения массы клеток, выращенных на плотной питательной среде, однако в этом случае микроорганизмы необходимо предварительно

тщательно смыть с поверхности среды физиологическим раствором или водой и перевести в суспензию.

Оптический (нефелометрический, турбидиметрический) метод определения биомассы нашел широкое применение в лабораторных микробиологических исследованиях, поскольку позволяет быстро и довольно точно определить концентрацию клеток в суспензии или культуральной жидкости. В основе метода лежит измерение ослабления светового пучка при его прохождении через суспензию клеток. В определенных пределах оно обусловлено преимущественно рассеиванием света клетками пропорционально их концентрации. Величина этого показателя зависит от многих факторов (формы и размеров клеток, оптических свойств культуральной среды, длины волны света и т.д.), поэтому нефелометрический метод пригоден лишь для тех микроорганизмов, рост которых вызывает равномерное помутнение среды и не сопровождается заметным изменением формы и размеров клеток, образованием мицелия, пленок или других скоплений.

Точность любого метода определения числа микроорганизмов ограничена ошибкой метода, которая возникает вследствие случайного распределения клеток в суспензии и является результатом ограниченного числа подсчитываемых клеток, а также связана с техническими ошибками, т.е. неточностью в приготовлении разведений, неправильным монтажом камеры, повторным учетом одной и той же клетки (колонии) и т.д. Ошибки метода неизбежны, тогда как технические ошибки зависят главным образом от качества работы исследователя. Следует помнить, что статистическая обработка результатов возможна только при минимальной технической ошибке.

Чашечный метод требует особой чистоты и аккуратности при выполнении всех операций. Необходимо тщательно оберегать пипетки, пробирки и среды от заражения микроорганизмами из воздуха, так как каждая случайно попавшая клетка может заметно завысить число микроорганизмов в исследуемом субстрате.

Методы микроскопирования.

Подсчет клеток в счетных камерах.

Это метод рекомендуется использовать для подсчета крупных объектов – дрожжей, одноклеточных водорослей, конидий грибов, некоторых относительно крупных бактерий. Наиболее распространенной является камера Горяева–Тома (**Рис. 13**). Внешне она представляет собой толстое предметное стекло, разделенное бороздками. Центральная часть стекла содержит выемку глубиной 0,1 мм, на дно которой нанесена сетка. Глубина камеры 0,1 мм, площадь больших квадратов сетки – $1/25 \text{ мм}^2$, площадь малых квадратов – $1/400 \text{ мм}^2$. Эти параметры указаны на предметном стекле.

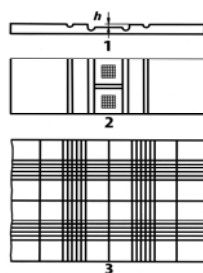


Рис. 13. Счетная камера Горяева-Тома.

*1 – вид сбоку; 2 – вид сверху; 3 – при малом увеличении микроскопа;
h – глубина камеры.*

При работе с камерой необходимо соблюдать определенные правила ее заполнения. Углубление с сеткой покрывают специальным шлифованным покровным стеклом и, слегка прижимая, двигают покровное стекло в противоположные стороны до появления картины интерференции (колец Ньютона), свидетельствующей о том, что стекло притерто к сторонам камеры. Только при таком условии объем камеры соответствует расчетному. После этого под кромку покровного стекла в центральной части камеры капилляром или пипеткой вносят суспензию исследуемых дрожжей. Заполненную камеру помещают на столик микроскопа. Подсчет клеток рекомендуется начинать через 2 – 3 минуты после заполнения камеры, чтобы клетки осели, и при микроскопировании находились в одной плоскости.

Число клеток подсчитывают с объективом $40\times$. С иммерсионным объективом работать нельзя, так как его рабочее расстояние меньше толщины стекла камеры.

Обычно просчитывают клетки микроорганизмов в 10 больших или 20 малых квадратах сетки, следуя по диагонали. Учитывают все клетки, лежащие в квадрате сетки, а также пересекающие верхнюю и правую стороны квадрата. При подсчете число клеток в большом квадрате не должно превышать 20, а в малом – 10, в противном случае исходную суспензию разводят водопроводной водой. Для получения достоверного результата общее число подсчитанных клеток микроорганизмов должно быть не менее 600.

Подсчет клеток повторяют 3 – 5 раз, каждый раз, заново монтируя камеру и заполняя ее суспензией микроорганизмов. Это обеспечивает большую точность, чем подсчет 600 клеток при однократном монтаже камеры. Количество клеток в 1 см^3 исследуемой суспензии вычисляют по формуле:

$$M = \frac{a \cdot 1000}{h \cdot S} \cdot n,$$

где

M – количество клеток в 1 см^3 суспензии;
a – среднее количество клеток в квадрате сетки;
h – высота камеры, мм;

S – площадь квадрата сетки, мм²;
 1000 – коэффициент перевода см³ в мм³;
 n – степень разведения исследуемой суспензии.

Капиллярный метод прямого счета микроорганизмов.

Для подсчета микроорганизмов Б.В. Перфильевым были разработаны специальные многоходовые счетные капилляры с плоскими параллельными стеклами. Они имеют прямоугольное сечение и по принципу подсчета аналогичны счетной камере, их глубина и ширина определяются конструкцией капилляра и представляют известные величины, а длина обычно соответствует диаметру поля зрения микроскопа или может быть измерена. В отличие от камеры Горяева в капиллярах Перфильева можно использовать объективы с большим увеличением, в том числе иммерсионные, что позволяет подсчитывать мелкие микроорганизмы. Поэтому такие капилляры в принципе могут применяться для подсчета микробных клеток и контроля роста бактерий в промышленной, пищевой, а также медицинской микробиологии. Многоходовые капилляры представляют собой конструкцию из нескольких (обычно 5) параллельных капиллярных ячеек, смонтированных на специальном предметном стекле. Клетки микроорганизмов подсчитывают в каждой капиллярной ячейке, а для дальнейших расчетов используют усредненное число.

При погружении капилляра в субстрат он заполняется им в силу своих капиллярных свойств. Затем заливают конец капилляра расплавленным парафином, что позволяет предохранить содержимое капилляра от высыхания, помещают его на предметное стекло, и подсчитывают клетки, используя объективы 40[×], 90[×] или фазово-контрастное устройство.

Для получения достоверного результата подсчитывают клетки в 50 – 100 полях зрения, подсчет ведут во всех капиллярах. Количество клеток в 1 см³ исследуемого субстрата определяют по формуле:

$$M = \frac{a \cdot 1000}{h \cdot l \cdot d} \cdot n,$$

где

M – количество клеток в 1 см³ суспензии;
 a – среднее количество клеток в капилляре длиной в диаметр поля зрения;
 h – глубина капилляра, мм;
 l – ширина капилляра, мм;
 d – диаметр поля зрения (длина капилляра) при данном увеличении микроскопа, мм;
 1000 – коэффициент перевода см³ в мм³;
 n – степень разведения исследуемой суспензии.

Комплексный подсчет клеток в счетных камерах.

При соблюдении всех правил работы со счетными камерами можно объединить в одном стекле несколько тестов. Это позволит существенно сэкономить время.

В пробирку внести 0,5 – 1,0 см³ дрожжевой взвеси и такое же количество раствора метиленового синего 1 : 40. Окрашенную суспензию выдержать 3 – 4 минуты, тщательно перемешать и заправить ею счетную камеру.

При работе с камерой необходимо соблюдать правила ее заполнения и счета, описанные выше.

Число клеток подсчитывают с объективом 40[×].

В приготовленной таким образом дрожжевой взвеси можно одновременно считать общее количество клеток, количество почкующихся клеток и мертвых почек, количество мертвых клеток в 1 см³ питательного субстрата.

Поскольку жидкость под покровным стеклом быстро высыхает, необходимо быстрое проведение и фиксирование результатов подсчета. Замедлить высыхание можно добавлением в окрашенную взвесь такого же количества 0,05 %-ого водного раствора агара, что необходимо учесть в показателе n – степень разведения. В таком препарате возможно произвести и измерение размеров клеток. С этой целью лучше использовать капилляры Перфильева, применяя соответствующие правила подсчета.

Количество клеток в 1 см³ исследуемой суспензии вычисляют по формуле:

$$M = \frac{a \cdot 1000}{h \cdot S} \cdot n \cdot 2,$$

где

- M – количество клеток в 1 см³ суспензии;
- a – среднее количество клеток в квадрате сетки;
- h – высота камеры, мм;
- S – площадь квадрата сетки, мм²;
- 1000 – коэффициент перевода см³ в мм³;
- n – степень разведения исследуемой суспензии;
- 2 – разведение раствором синьки.

Результаты счета можно фиксировать в предлагаемой в качестве примера **таблице 3**.

Таблица 3

Характеристика клеток дрожжевой взвеси

<i>Время брожения (часы/сут)</i>	<i>Общее кол-во клеток</i>	<i>Кол-во почк-ся клеток (млн/мл)</i>	<i>Кол-во мертвых клеток (млн/мл)</i>	<i>% почк-ся клеток</i>	<i>% мертвых клеток</i>	<i>Средний размер клеток</i>
--	------------------------------------	---	---	---------------------------------	---------------------------------	--------------------------------------

	(млн/мл)					

Подсчет клеток в фиксированных окрашенных препаратах (метод Виноградского–Брида).

Этот метод применяется в различных модификациях для определения численности микроорганизмов в разнообразных естественных субстратах – почве, загрязненной воде, оптически непрозрачных средах, содержащих нерастворимые в воде компоненты, например, крахмал, муку и т.д. Преимущество метода заключается еще и в том, что фиксированные окрашенные препараты могут долго храниться, поэтому подсчет можно производить в удобное для исследователя время.

Хорошо обезжиренное предметное стекло помещают на миллиметровую бумагу, на которой размечен прямоугольник площадью 4 или 6 см². Затем на стекло наносят точно отмеренный объем исследуемой суспензии (10; 20 или 30 мкл). В некоторых случаях добавляют каплю 0,03 – 0,1 %-ого водного раствора агара. Нанесенную суспензию равномерно распределяют петлей по площади, отмеченной на миллиметровой бумаге. Препарат подсушивают на воздухе, фиксируют 10 – 20 мин абсолютным спиртом (96°) и окрашивают эритрозин, метиленовым синим, фуксином или другим красителем. Затем препарат промывают, последовательно погружая стекло в 4 – 5 сосудов с водой (промывать под проточной водой не следует) и высушивают на воздухе. В таком виде препараты хорошо сохраняются.

Препарат микроскопируют с иммерсионным объективом. При этом подсчитывают количество клеток в квадратах окулярной сетки, которую помещают в окуляр между собирающей и глазной линзами. При отсутствии сетки подсчитывают число клеток в поле зрения микроскопа. Правило подсчета в квадратах окулярной сетки то же, что и в квадратах сетки счетной камеры. Чтобы результат был достоверным, клетки микроорганизмов рекомендуется подсчитывать в 50 – 100 полях зрения. Общее количество подсчитанных клеток не должно быть менее 600. Количество клеток микроорганизмов в 1 см³ исследуемого субстрата вычисляют по формуле:

$$a \cdot S$$

$$M = \frac{a}{s \cdot V} \cdot n,$$

где

- M* – количество клеток в 1 см³ суспензии;
a – среднее количество клеток в квадрате окулярной сетки (поле зрения);
S – площадь мазка, мм²;
s – площадь квадрата окулярной сетки (поля зрения), мм²;
V – объем нанесенной на стекло суспензии, см³;
n – степень разведения исследуемой суспензии.

Площадь квадрата сетки, или поля зрения, определяют с помощью объект-микрометра, который помещают на столик микроскопа вместо препарата, и при том же увеличении, при котором проводили подсчет, определяют сторону квадрата окулярной сетки или диаметр поля зрения. Площадь поля зрения вычисляют по формуле:

$$S = \pi r^2$$

Методы высева на питательные среды.

Определение количества клеток высевом на плотные питательные среды (метод Коха).

Метод широко применяют для определения численности жизнеспособных клеток в различных естественных субстратах и в лабораторных культурах. В его основе лежит принцип Коха, согласно которому каждая колония является потомством одной клетки. Это позволяет на основании числа колоний, выросших после посева на плотную питательную среду определенного объема исследуемой суспензии, судить об исходном содержании в ней клеток микроорганизмов. Результаты количественного определения микроорганизмов, проведенного по методу Коха, часто выражают не в числе клеток, а в условных, так называемых колониобразующих единицах – КОЕ.

Определение числа микроорганизмов этим методом включает три этапа: приготовление разведений, посев на плотную среду в чашки Петри и подсчет выросших колоний.

Приготовление разведений.

Численность популяции микроорганизмов обычно велика, поэтому для получения изолированных колоний необходимо приготовить ряд последовательных разведений. Разведения готовят в стерильной водопроводной воде или в 0,85 %-ом растворе NaCl (физиологическом растворе). В ходе опыта целесообразно использовать один и тот же коэффициент разведения, например, 10, что уменьшает вероятность ошибки.

Для приготовления разведений стерильную водопроводную воду разливают по 9 см³ в стерильные сухие пробирки. Затем 1 см³ исследуемой суспензии стерильной пипеткой переносят в пробирку с 9 см³ стерильной воды – это первое разведение (10—1). Полученное разведение тщательно перемешивают новой стерильной пипеткой, несколько раз вбирая в пипетку и выпуская из нее полученную суспензию клеток. Затем той же пипеткой отбирают 1 см³ суспензии и переносят во вторую пробирку, получая второе разведение (10—2). Таким же образом готовят последующие разведения. Степень разведения зависит от плотности, исследуемой популяции микроорганизмов.

Для приготовления каждого разведения следует обязательно использовать новую пипетку. Пренебрежение этим правилом приводит к получению ошибочного результата вследствие высокой способности клеток микроорганизмов к сорбции на поверхности стекла.

Посев.

Высевать суспензию можно поверхностным или глубинным способом. Перед посевом поверхностным способом разливают агаризованную питательную среду в ряд стерильных чашек Петри по 15 – 20 см³ в каждую. Чашки оставляют на горизонтальной поверхности, пока среда не застынет. Поверхность агаризованных сред перед посевом рекомендуется подсушить для удаления конденсационной влаги в стерильном боксе или поместив их в термостат на 2 – 3 суток крышками вниз.

В чашку Петри с подсушенной средой вносят точно измеренный объем (0,05 или 0,1 см³) соответствующего разведения и распределяют его стеклянным шпателем по поверхности среды. Высевы на плотную среду проводят, как правило, из трех последних разведений, причем из каждого делают 2 – 4 параллельных посева. Посевы можно делать одной пипеткой, но при этом начинать следует обязательно с большего разведения. Для каждого разведения используют новый стерильный шпатель. После посева чашки Петри помещают в термостат крышками вниз.

При глубинном посеве точно измеренный объем (как правило, 0,1; 0,5 или 1,0 см³) исходной суспензии или разведения вносят в расплавленную и остуженную до 45 – 50°С среду, тщательно перемешивают, затем немедленно выливают в чашку Петри и дают среде застыть. В случае глубинного посева пользуются средой, предварительно разлитой и проавтоклавированной в пробирках.

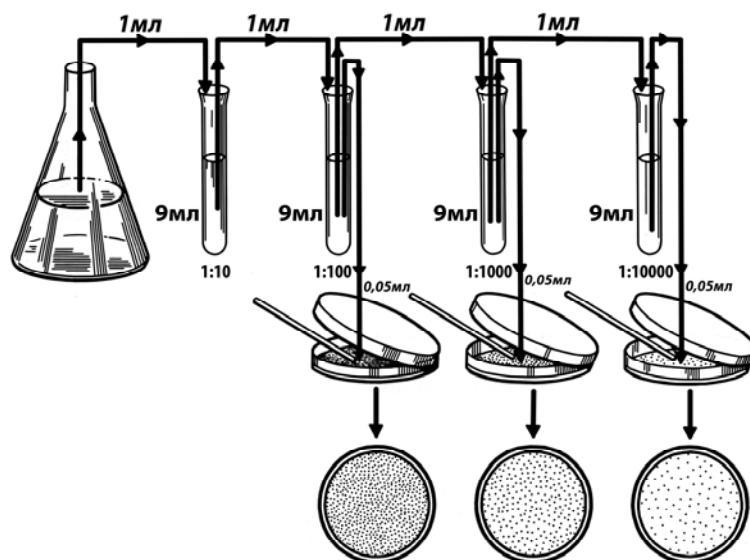


Рис. 14. Схема приготовления разведений и посева суспензии микроорганизмов.

При больших масштабах работы среду по пробиркам не разливают, а поступают следующим образом. По 1 см^3 из соответствующего разведения переносят стерильной пипеткой в 2 – 4 стерильные чашки Петри. Затем заливают в чашки по $15 - 20\text{ см}^3$ среды, расплавленной и остуженной до $45 - 50^\circ\text{C}$, и смешивают питательную среду с посевным материалом легким вращательным движением чашки по поверхности стола, после чего чашки оставляют на горизонтальной поверхности до застывания среды. Когда среда застынет, чашки Петри в перевернутом виде помещают в термостат.

Работа с дрожжами не позволяет использовать метод глубинного посева ввиду интенсивного газообразования и разрыва питательной среды. Однако, используя соответствующие ингибиторы дрожжевого роста, для определения степени инфицирования сопутствующей бактериальной микрофлорой данный метод вполне эффективен.

Для определения количества клеток анаэробных микроорганизмов чашки Петри после посева помещают в анаэростат. Иногда для определения численности анаэробов плотную среду после засева оставляют в пробирках. Поверхность застывшей среды заливают парафином. Для лучшего учета колоний микроорганизмов среды в этом случае рекомендуется осветлять.

Подсчет выросших колоний.

Колонии микроорганизмов в зависимости от скорости роста подсчитывают через 1 – 15 суток инкубации. Подсчет, как правило, проводят, не открывая чашек Петри. Для удобства каждую просчитанную колонию отмечают точкой на наружной стороне дна чашки. При большом количестве колоний дно чашки Петри делят на секторы, просчитывают колонии в каждом секторе и суммируют результаты. Иногда для подсчета колоний используют специальные полуавтоматические счетчики.

Лучшим разведением следует считать то, из которого при высеве в чашке Петри вырастает от 30 – 50 до 100 – 150 колоний. Если число выросших колоний меньше 10, то эти результаты для расчета количества

клеток в исходном материале не используют. Результаты параллельных высевов из одного и того же разведения суммируют и определяют среднее число колоний на одной чашке.

Количество клеток в 1 мл исследуемого субстрата вычисляют по формуле:

$$M = \frac{a \cdot 10n}{V},$$

где

M – количество клеток в 1 см³ исследуемого субстрата;

a – среднее число колоний, выросших после посева из данного разведения;

V – объем суспензии, взятый для посева, см³;

$10n$ – степень разведения.

Упрощенный количественный учет дрожжей.

Дрожжевые колонии в посевах учитывают следующим образом. Обратную сторону каждой чашки разделяют чернилами или тушью на большее или меньшее число частей – от четырех до шестнадцати в зависимости от густоты посева – и просматривают все колонии на каждой ограниченной площади с объективом 10^x в просвечивающем микроскопе или с бинокулярной лупой в отраженном свете. Описывают все встречающиеся типы колоний в стандартных терминах. Из них готовят препараты и микроскопируют при больших увеличениях. Этот детальный просмотр колоний при первом посеве очень важен, так как при последующих пересевах некоторые признаки, например, спорообразование, иногда исчезают. Рекомендуются сразу же делать фотографии или зарисовки. Колонии разных типов нумеруют и просчитывают отдельно.

При необходимости количественного учета расчет численности дрожжей n в единице массы или объема исследуемого материала ведут по формуле:

$$n = a \cdot b \cdot v;$$

где

a – среднее число колоний на одной чашке Петри;

b – число капель в 1 см³ суспензии данного разведения;

v – степень разбавления образца.

Учет производят дважды. В первый срок отмечают с обратной стороны чашки все выросшие и просчитанные колонии, а затем оставляют чашки еще на несколько дней для наблюдения за возможным появлением колоний медленно растущих дрожжей.

Отдельные изоляты (штаммы) получают путем пересева изолированных колоний в пробирки на те же среды, на которые производили первичный высев.

Определение количества клеток с использованием прибора вакуумной фильтрации.

Устройство прибора и порядок работы с ним.

При необходимости количественного учета микроорганизмов приоритетным является использование приборов вакуумной фильтрации отечественного и импортного производства. При некоторых различиях, все они устроены по одному принципу.

Каждая фильтрационная система состоит из коллектора с 3 или 6 приваренными фильтровальными столами, укомплектованными плоским кольцом из политетрафторэтилена под фриттой из высококачественной стали, служащей в качестве опоры фильтра, и краном из высококачественной стали для регулирования вакуума в каждой отдельной фильтрационной воронке. Каждая воронка оснащена рычажным затвором для надежного крепежа на фильтровальный стол и крышкой с силиконовой уплотнительной прокладкой.

Воронка из высококачественной стали (объем 500 см³) имеет на внутренней стенке вытравленные маркировки на объемы 100, 200, 300, 400 и 500 см³. Воронка из высококачественной стали (объем 100 см³) имеет на внутренней стенке вытравленные маркировки на объемы 50 и 100 см³.

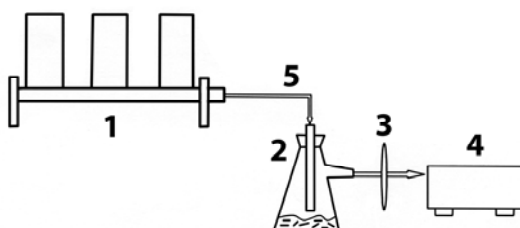


Рис. 15. Принципиальная схема прибора вакуумной фильтрации.

- 1 – фильтродержатель с воронками (1, 3 или 6-секционный коллектор);
- 2 – колба Бунзена;
- 3 – фильтрующий блок Мидисарт;
- 4 – вакуумный насос;
- 5 – резиновый шланг.

Фирма Sartorius производит приборы вакуумной фильтрации с полным набором сопутствующих материалов (фильтры, картонные подложки), предназначенных для решения задач микробиологического анализа в различных отраслях пищевой промышленности.

Безусловными их преимуществами являются: экономия времени при обычных исследованиях – можно одновременно фильтровать 3 или 6 проб; стабильность результатов; практичность и удобство в обращении; независимая регулировка вакуума для каждого отдельного фильтрационного узла.

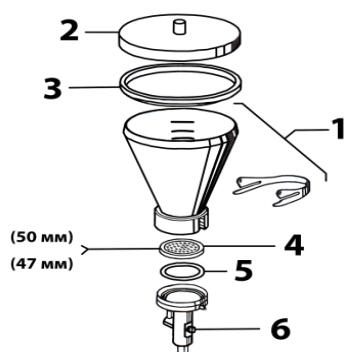


Рис. 16. Принципиальная схема сборки фильтрующего узла.

- 1 – воронка с запорной скобой;*
- 2 – крышка;*
- 3 – силиконовое кольцо;*
- 4 – фритта из нержавеющей стали;*
- 5 – силиконовая прокладка;*
- 6 – кран.*

Микробиологические исследования с использованием прибора вакуумной фильтрации производятся в следующем порядке:

1. Очистить и продезинфицировать лабораторный стол.
2. Расположить в ряд стерильные питательные среды или подготовленные питательные картонные подложки в чашках Петри. Положить рядом стерильно упакованные мембранные фильтры.
3. Поставить рядом с фильтрационной установкой горелку Бунзена, стакан с небольшим количеством спирта и пинцет.
4. Включить источник вакуума (электрический или водоструйный насос) и снять с коллектора воронку.
5. Опалить пламенем фильтровальный стол (металлическую фритту). Открыть кран и провести пламя через фритту. Закрыть кран.
6. Взять воронку и опалить ее снизу.
7. Поместить металлическую воронку на фильтровальный стол и опалить ее внутреннюю часть снизу-вверх, проводя пламя по спирали.
8. Опалить крышку и установить ее. Теперь этот фильтровальный узел стерилен. Остальные фильтровальные узлы подготавливаются таким же образом.
9. Взять стерильный мембранный фильтр плоским пинцетом, который также необходимо кратковременно обжечь; свободной рукой снять

металлическую воронку с крышкой и положить мембранный фильтр по центру на фритту.

10. Поместить воронку на фильтровальный стол и закрыть скобы. Таким же образом подготовить все 3 (или 6) фильтрационных узлов.
11. После заполнения пробами каждой воронки открыть краны и фильтровать.
12. После окончания фильтрации закрыть краны. Стерильным пинцетом поочередно перенести фильтры с поверхности фритт на смоченные питательные картонные подложки или питательные среды.
13. После этого чашки Петри поместить в термостат и выдержать согласно предписаниям.

Перед первым вводом в работу и после каждого употребления систему нужно прочищать и высушивать. При этом она сначала промывается горячей водой, а затем ополаскивается дистиллированной водой. При сильном загрязнении система дополнительно прочищается имеющимися в продаже лабораторными средствами для очистки (металла, стекла, пластмассы) и мягкими щетками.

При поставке краны уже смазаны консистентной смазкой (используется "высоковакуумная тяжелая консистентная смазка"). Впоследствии следует снимать, чистить, сушить, смазывать и снова монтировать краны только в случае затруднений при открывании и закрывании их. Нужно обязательно следить за тем, чтобы каждый кран был снова вставлен в то же шлифованное коническое гнездо, из которого он был вынут.

После частого употребления зажимные скобы утрачивают зажимную способность, и может быть нарушена герметичность. В этом случае необходимо подтянуть зажимную скобу легким сжиманием плоскогубцами.

Подвижные части, подверженные трению из-за открывания и закрывания, должны всегда быть слегка смазаны.

Стерильные мембранные фильтры.

Такие фильтры уже давно стали стандартом в повседневном микробиологическом контроле качества.

Мембранные фильтры Sartorius соответствуют международным нормам. Фильтры поставляются готовыми к использованию и избавляют пользователя от процедуры стерилизации. Так как они индивидуально упакованы, риск контаминации даже уже открытых фильтров крайне низок, что подтверждается сертификатом GLP. Согласно требованиям GLP, каждый фильтр имеет идентификационный номер и номер серии на индивидуальной упаковке.

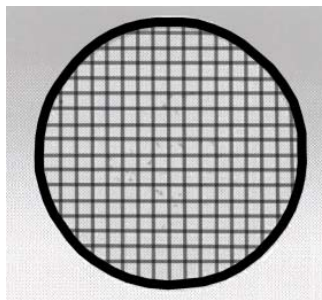


Рис. 17. Мембранный фильтр Sartorius (с сеткой).

Все мембранные фильтры для микробиологии изготавливаются из нитрата целлюлозы, обеспечивающей хорошее удержание микроорганизмов, высокую скорость потока и оптимальный подсчет колоний. Сетка, нанесенная на поверхность мембранных фильтров, с размером ячеек $3,1 \times 3,1$ мм облегчает подсчет колоний, особенно при обильном росте и большом количестве микроколоний. Фильтры различных цветов обеспечивают контраст колоний на своей поверхности, что значительно облегчает подсчет.

Питательные картонные подложки.

Картонные подложки Sartorius в сочетании с методом мембранной фильтрации успешно используются уже в течение более 20 лет. Они обеспечивают простоту и легкость микробиологических исследований.

Питательная картонная подложка (ПКП) – это диск из сорбирующего материала, пропитанный селективной питательной средой, а затем высушенный в специальных условиях и стерильно упакованный в чашку Петри. Активация питательной среды проводится непосредственно перед ее использованием, путём смачивания подложки стерильной дистиллированной водой. В комплекте с подложками поставляются и стерильные мембранные фильтры.

Определение биомассы взвешиванием.

Определение биомассы состоит из трех последовательных операций: доведение массы центрифужных пробирок или фильтров до постоянного значения; отделение клеток микроорганизмов от культуральной жидкости; определение их массы. Чаще всего определяют массу сухих клеток, хотя иногда можно ограничиться определением сырой биомассы. В последнем случае первый этап отпадает; достаточно только взвесить пустую центрифужную пробирку (фильтр), но не доводить ее массу до постоянного значения. Биомассу обычно выражают в граммах или миллиграммах на литр культуральной жидкости.

Доведение массы пробирок или фильтров до постоянного значения.

С этой целью фильтры, предварительно положенные в открытую чашку Петри или центрифужные пробирки (не пластиковые), помещают в сушильный шкаф и высушивают в течение 1 – 2 ч при температуре 80 – 85°C (фильтры) или 90 – 100°C (пробирки). Затем чашку Петри с фильтрами или центрифужные пробирки вынимают из сушильного шкафа и быстро переносят в эксикатор с безводным хлористым кальцием (CaCl_2) или концентрированной серной кислотой. Эксикатор ставят около аналитических весов, на которых будет проводиться взвешивание. Через час фильтры (пробирки) взвешивают с точностью до 0,0001 г. Высушивание и взвешивание повторяют, соблюдая указанную последовательность операций, пока масса не достигнет постоянного значения, т.е. колебания в ее определениях не будут превышать десятых долей мг.

Отделение микроорганизмов от среды.

Осуществляется центрифугированием или фильтрованием. В центрифужную пробирку наливают точно измеренный объем тщательно перемешанной жидкой культуры, который в зависимости от ее плотности колеблется от 5 до 20 см³. Время центрифугирования и число оборотов зависят от размеров клеток. Чем они меньше, тем больше требуется оборотов и тем продолжительнее должно быть время центрифугирования. Чаще всего центрифугируют 20 – 30 мин при 3 – 5 тыс. об/мин. После центрифугирования надосадочную жидкость осторожно сливают, осадок промывают слегка подкисленной дистиллированной водой (1 см³ концентрированной HCl на 1000 см³ воды) и снова центрифугируют при том же числе оборотов. Супернатант сливают сразу после остановки центрифуги. В противном случае часть осадка может быть потеряна.

Мицелий актиномицетов и грибов отделяют фильтрованием. Бумажный фильтр помещают в стеклянную воронку и фильтруют через него точно измеренный объем культуры – от 5 до 10 см³. Осадок на фильтре многократно промывают подкисленной дистиллированной водой.

Для отделения бактерий используют мембранные фильтры. Размеры пор мембранного фильтра должны быть меньше величины клеток, биомассу которых определяют. Мембранный фильтр помещают на пористую пластинку специального держателя, вставленного в колбу. Чтобы ускорить фильтрование, установку подключают к водоструйному насосу. Осадок несколько раз промывают подкисленной водой.

Определение биомассы.

Чтобы определить массу сухих клеток, центрифужную пробирку или фильтр с осадком клеток микроорганизмов помещают в сушильный шкаф, высушивают и взвешивают. Режим высушивания и взвешивания тот же, что использовали и при определении массы пробирок или фильтров. Сухую биомассу определяют по формуле:

$$M = \frac{(A - B) \cdot 1000}{V},$$

где

- M* – сухая биомасса г/л;
A – масса фильтра (пробирки) с осадком, г;
B – масса фильтра (пробирки) без осадка, г;
V – объем культуральной жидкости, взятый для фильтрования (центрифугирования), см³.

Точность метода определяется полнотой отмывания клеток от компонентов среды и тщательностью взвешивания.

Стандарты мутности и их применение.

В ряде случаев количество клеток в суспензии бывает достаточно определить визуально путем сравнения со стандартом мутности. Стандарты мутности представляют собой взвесь частиц стекла пирекс в дистиллированной воде. За единицу стандарта мутности условно принята мутность суспензии (в физ. растворе) бактерий – возбудителей тифа с концентрацией клеток 100 млн./см³. Стандарт мутности включает 4 эталона на 11, 10, 9 и 5 единиц, что соответствует содержанию $1,1 \cdot 10^9$; $1,0 \cdot 10^9$; $0,9 \cdot 10^9$ и $0,5 \cdot 10^9$ клеток в 1 см³ взвеси. Для определения количества клеток пробирку с исследуемой суспензией ставят рядом с эталоном 10 и рассматривают их в отраженном и проходящем свете на фоне белого листа бумаги, в центре которого нанесено несколько черных линий. Эталоны 9 и 11 вспомогательные, позволяющие более четко сравнить мутность исследуемой суспензии бактерий с эталоном. Стандартизация мутности суспензии бактерий (особенно часто в случае тест-организмов) имеет существенное значение при приготовлении посевного материала в серийных опытах.

При работе с дрожжами данным методом, выбранный эталон требует предварительной калибровки, каким-либо из описанных методов. Необходимость такой процедуры вызвана значительно большим размером дрожжевых клеток и существенными межрасовыми различиями.

Цель работы.

Ознакомиться с основами методами количественного учета микроорганизмов в лабораторных и производственных субстратах. Изучить устройство и назначение различных приборов для количественного учета микроорганизмов. Освоить методы разведения исследуемого материала для количественного учета микроорганизмов.

Материалы и оборудование.

Ржаная мука, подсырная сыворотка, хлебопекарные дрожжи, по 10 и 200 мл стерильного суслу в пробирках и колбах, по 100 мл стерильной воды в

колбах, сусло-агар и сусло-агар с мелом в чашках Петри, стерильные пипетки 1,0 мл, бактериологические петли, шпатели Дригальского, чашки Петри, колбы 500 мл, газовые или спиртовые горелки, прибор вакуумной фильтрации Sartorius, мембранные фильтры, питательные подложки.

Ход работы.

1. Приготовить ряд 1 : 10 серийных разведений ржаной муки в стерильной воде;
2. Приготовить ряд 1 : 10 серийных разведений подсырной сыворотки в стерильной воде;
3. Из каждой колбы серийных разведений произвести посев 0,1 мл на сусло-агар и сусло-агар с мелом в чашках Петри;
4. Перенесенный в чашки Петри инокулят тщательно растереть по поверхности среды стерильными шпателями Дригальского;
5. Из каждой колбы серийных разведений бактериологической петлей произвести на сусло-агар и сусло-агар с мелом в чашках Петри;
6. Чашки с посевами поместить в термостат при 35°C. Контролировать рост культур каждые 24 часа.
7. По окончании срока инкубации произвести подсчет колоний дрожжей и бактерий в каждом разведении, в пересчете на 1,0 мл.

Задание.

Зарисовать в рабочей тетради схему приготовления серийных разведений по методу Коха.

Записать в рабочей тетради изменения в чашках Петри, происходящие каждые 24 часа инкубирования исследуемых культур.

По окончании срока инкубации произвести подсчет колоний дрожжей и бактерий в каждом разведении, в пересчете на 1,0 мл.

Результаты зафиксировать в рабочей тетради.

По окончании инкубации в рабочей тетради зарисовать и описать культуральные свойства полученных изолированных колоний микроорганизмов.

Из различных типов колоний приготовить живые и фиксированные препараты и провести их микроскопическое исследование.

Результаты микроскопических исследований записать и зарисовать в рабочей тетради.

Контрольные вопросы:

1. Обосновать необходимость количественного учета микроорганизмов в исследовательской и производственной практике;
2. Описать устройство камеры Горяева;
3. Описать устройство и принцип работы прибора вакуумной фильтрации Sartorius;
4. Описать принцип подсчета клеток в фиксированном препарате;

5. Изложить последовательность приготовления серийных разведений и высева их на плотные питательные среды.

Литература:

1. Биотехнология: теория и практика: Учебное пособие для вузов / Н.В. Загоскина с соавт.; Под ред. Н.В. Загоскиной, Л.В. Назаренко. – М.: Изд. Оникс, 2009.
2. Качмазов Г.С. Дрожжи бродильных производств. Практическое руководство. СПб.: Издательство «ЛАНЬ», 2012.
3. Практикум по микробиологии: Учебное пособие для студентов высших учебных заведений / А.И. Нетрусов, М.А. Егорова, Л.М. Захарчук и др.; Под ред. А.И. Нетрусова. – М.: Издательский центр «Академия», 2005.

Лабораторная работа № 6.

Определение чувствительности микроорганизмов к антибиотикам.

Теоретический обзор.

Широкое использование антибиотиков в рационе животных, а также для профилактики и лечения болезней привело к появлению резистентных (устойчивых) форм микроорганизмов. Для того чтобы определить наличие чувствительности бактерий, используют метод бумажных дисков, пропитанных антибиотиками.

К методам определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам относят метод диффузии в агар и метод серийных разведений (на жидкой и плотной питательных средах).

Для посева используют суточные чистые культуры выделенных микроорганизмов. При отсутствии возможности получения чистой культуры можно использовать дрожжевую взвесь или производственный субстрат, содержащие всю микрофлору в исследуемом материале.

При исследовании материала, содержащего дрожжевые клетки, в остывшие до 45 – 50°C питательные среды вносят нистатин и тщательно перемешивают.

Метод диффузии в агар (метод бумажных дисков).

Метод основан на диффузии антибиотика из пропитанного им диска фильтровальной бумаги в плотную питательную среду. Содержание большинства антибиотиков в дисках колеблется от 1 до 50 мкг.

Это наиболее простой в исполнении метод. Однако его нельзя считать количественным.

В качестве основы питательной среды целесообразно применять производственное агаризованное (2,5 %) сусло с содержанием 120 – 140 мг% аминного азота. Питательную среду разливают в чашки Петри слоем 4 – 5 мм. Перед посевом чашки со средой досушивают в термостате или в стерильном боксе.

Диски с антибиотиками (диаметр 5 – 6 мм) готовят из специальных сортов фильтровальной бумаги. Каждый диск содержит определенное количество антибиотика, которое указано на этикетке флакона. Во флакон насыпают силикагель, который впитывает влагу и служит индикатором: при переувлажнении силикагель меняет окраску с синей на розовую. При изменении окраски силикагеля во флаконе диски для использования непригодны. Флаконы с дисками хранят при температуре 4 – 20°C.

0,5 см³ исследуемого материала наносят на агар и шпателем Дригальского тщательно распределяют по поверхности питательной среды до полного впитывания. Затем на поверхность среды стерильным пинцетом накладывают, плотно прижимая, диски с разными антибиотиками на расстоянии 2 – 2,5 см друг от друга и от края чашки. Чашки с дисками выдерживают в термостате при 37°C в течение 24 – 48 ч в положении вверх дном.

Антибиотик из диска диффундирует в агар, вызывая гибель чувствительных бактерий, формируя, таким образом, вокруг диска зону отсутствия роста. Ближе к диску концентрация антибиотика в агаре выше, по мере удаления от диска концентрация снижается. Следовательно, чем больше диаметр зоны задержки роста вокруг антибиотика, тем более чувствительна к нему исследуемая культура.

Диаметр зоны задержки (отсутствия) роста микроорганизмов измеряют с помощью линейки или миллиметровой бумаги с точностью до 1 мм. Отсутствие зоны задержки роста микроорганизмов вокруг диска указывает на устойчивость исследуемой культуры к данному антибиотику.

При зоне отсутствия роста до 10 мм культура считается устойчивой, от 10 до 15 мм говорят о малой чувствительности к антибиотику, от 15 до 25 мм – о достаточной чувствительности, свыше 25 мм – о высокой чувствительности.

Метод серийных разведений.

Для проведения опыта готовят основные растворы антибиотиков. Готовятся они с таким расчетом, чтобы в первой пробирке концентрация антибиотика составила 100 ЕД/см³.

На этикетке ампулы или флакона указана концентрация антибиотика в ЕД/см³ или мкг/см³. Навески бензилпенициллина калиевой или натриевой соли, ампициллина тригидрата, оксациллина натриевой соли, цефалотина, цефалексина растворяют в 1/15 М фосфатном буфере (калия фосфат

однозамещенный – 3,63 г, натрия фосфат двузамещенный – 7,13 г, вода дистиллированная – до 1000 см³). Основные растворы тетрациклиновых антибиотиков готовят на 0,01 Н растворе соляной кислоты. Для приготовления основных растворов нео-, моно-, канамицина используют дистиллированную воду.

Если на этикетке препарата дозировка указана в весовых единицах, следует иметь в виду, что для большей части антибиотиков 1 г активного вещества соответствует 1 000 000 ЕД. Из этого расчета и следует разводить антибиотик.

Если порошок антибиотика расфасован не мерно и на этикетке указано количество единиц активности в 1 мг, необходимо к точной навеске препарата, сделанной на аналитических весах, добавить равный объем растворителя, т. е. получить раствор мг/см³, в 1 см³ которого содержится столько единиц, сколько их было указано на этикетке. Из этого основного раствора делают дальнейшие разведения.

Для определения чувствительности микробов к сульфаниламидам может быть применен любой из указанных методов, причем во внимание принимается только степень разведения навески препарата.

Метод серийных разведений в жидкой питательной среде.

На основе стерильного производственного суслу готовится серия 2-кратных серийных разведений исследуемого антибиотика. Первая пробирка содержит 100 ЕД/см³ антибиотика, каждая последующая – в два раза меньше. Засевная доза исследуемой суточной бактериальной культуры составляет 10 % от общего объема питательной среды.

Питательную среду разливают по 4,5 см³ в пробирки, расставленные в штативы по 10 в каждом ряду. Готовят основной раствор антибиотика, и добавляют 4,5 см³ этого раствора в первую пробирку. После тщательного перемешивания новой стерильной мерной пипеткой переносят 4,5 см³ из этой пробирки в следующую и т. д. до девятой пробирки, из которой 4,5 см³ выливают. Десятая пробирка, не содержащая антибиотика, служит контролем роста культуры.

Для постановки этого опыта используют имеющиеся в продаже препараты, на этикетке которых указано количество единиц во флаконе. Например, если флакон содержит 500 000 ЕД пенициллина, то, добавив в него 10 см³ дистиллированной воды, получают раствор, содержащий в 1 см³ 50 000 ЕД, при дальнейшем разведении в 100 раз получают раствор с концентрацией пенициллина 500 ЕД/см³. Для получения требуемой концентрации антибиотика дальнейшие разведения целесообразнее делать с использованием стерильной питательной среды.

Чистые агаровые или бульонные культуры микроорганизмов предварительно разводят физиологическим раствором до концентрации клеток $5 \cdot 10^6$ клеток/см³ в соответствии со стандартом мутности.

Агаровую культуру испытуемого микроба смывают изотоническим раствором хлорида натрия. Полученную взвесь по $1,0 \text{ см}^3$ вносят во все пробирки ряда, начиная с контрольной.

Результаты регистрируют после инкубации при 37°C в течение 24 – 48 часов. Последняя пробирка с прозрачным бульоном, при наличии густого роста в контроле, определяет минимальную, подавляющую рост данного микроорганизма концентрацию антибиотика.

Учет результатов: наименьшее количество антибиотика, дающее визуально полную задержку роста (среда прозрачная), соответствует минимальной бактериостатической (подавляющей) концентрации препарата (МБсК или МПК). Минимальную бактерицидную концентрацию (МБцК) определяют высевом на плотные питательные среды из последних прозрачных пробирок, которые предварительно встряхивают. Наименьшее количество антибиотика в пробирке, содержащее которой после инкубирования в течение 24 – 72 ч не дало роста бактерий при высеве на питательную среду, принимают за МБцК.

Метод серийных разведений на плотной питательной среде.

Для определения чувствительности к антибиотикам большинства микроорганизмов используют МПА или 2,5 %-ный агар на основе производственного сула с содержанием аминного азота $120 - 140 \text{ мг/см}^3$. Приготовленный основной раствор антибиотиков разводят в плотной питательной среде. Для этого к расплавленному и охлажденному до 55°C агару, разлитому в широкие пробирки по 18 см^3 , добавляют по 2 см^3 соответствующего разведения определенного антибиотика, тщательно перемешивают и переливают в стерильную чашку Петри. После застывания агара чашки Петри подсушивают в течение 1 ч. Контрольные чашки Петри с агаром не содержат антибиотика. Все чашки Петри делят на сектора, каждый из которых засевают исследуемой культурой. Посев делают бактериологической петлей из микробной суспензии с концентрацией клеток $10^6 - 10^7 \text{ клеток/см}^3$. Чашки помещают в термостат при 37°C на 24 – 48 ч.

Наименьшую концентрацию антибиотика, при которой наблюдают полную задержку роста бактерий на агаре или рост единичных колоний, принимают за МПК препарата. В том случае, когда рост культуры отсутствует на всех чашках, кроме контрольной считают, что исследуемые концентрации антибиотиков превышают МПК препарата. Если на всех чашках отмечают рост культуры, это значит, что микроорганизм устойчив ко всем концентрациям антибиотика.

Общую чувствительность к сульфаниламидам, как и к антибиотикам, можно определить методом канавки. На агаре в чашке Петри по ее диаметру прорезают канавку, в которую вносят определенное разведение изучаемого препарата. Перпендикулярно к канавке засевают штрихом изучаемые культуры микроорганизмов. После инкубации при 37°C 24 – 48 ч отмечают

наличие участков задержки роста микроорганизмов, если последние чувствительны к данному препарату.

Цель работы.

Ознакомиться с основами методами определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам. Освоить метод диффузии с использованием бумажных дисков.

Материалы и оборудование.

Чистая суточная культура хлебопекарных дрожжей, чистые суточные культуры молочнокислых и спорообразующих бактерий, сусло-агар и сусло-агар с мелом в чашках Петри, стерильные пипетки 0,5 мл, шпатели Дригальского, газовые или спиртовые горелки, бензилпенициллин, тетрациклин, нистатин.

Ход работы.

1. На поверхность сусло-агара и сусло-агара с мелом засеять по 0,02 мл суспензии суточных культур исследуемых микроорганизмов.
2. Стерильными шпателями Дригальского внесенный инокулят растереть досуха по поверхности питательной среде в чашке Петри.
3. Стерильным пинцетом разложить диски фильтровальной бумаги диаметром 8 мм, предварительно пропитанные разными антибиотиками (не менее четырех – пяти дисков).
4. Чашки Петри поместить в термостат при 37°C на 24 ч.
5. По окончании инкубации измерить диаметр задержки роста микроорганизмов вокруг дисков с антибиотиками, включая диаметр самих дисков.
6. По диаметру задержки роста провести оценку чувствительности микроорганизмов к используемым антибиотикам.

Задание.

Зарисовать в рабочей тетради результаты эксперимента, выявленные на чашках Петри, с указанием зоны задержки роста.

Записать в рабочей тетради диаметр зон задержки роста для различных антибиотиков, испытанных с разными культурами микроорганизмов.

Определить степень чувствительности микроорганизмов к антибиотикам по принципу: отсутствие зоны задержки роста – испытуемый штамм устойчив к данному препарату; диаметр до 10 мм – штамм характеризуется малой чувствительностью, диаметр более 10 мм – штамм характеризуется высокой чувствительностью.

Контрольные вопросы:

1. Дать краткую характеристику основных групп антибиотиков и механизма их антибактериального и противогрибкового действия;

2. Описать значение антибиотиков в медицинской, исследовательской и производственной практике.

Литература:

1. Биотехнология: теория и практика: Учебное пособие для вузов / Н.В. Загоскина с соавт.; Под ред. Н.В. Загоскиной, Л.В. Назаренко. – М.: Изд. Оникс, 2009.
2. Биотехнология. Принципы и применение: Пер. с англ. / Под ред. И. Хиггинса, Д. Беста, Дж. Джонса. – М.: Мир, 1988.
3. Биотехнология органических кислот и белковых препаратов: учебное пособие / Е.И. Муратова, О.В. Зюзина, О.Б. Шуняева. – Тамбов : Изд-во Тамб. гос. техн. ун-та, 2007.
4. Бирюков В.В. Основы промышленной биотехнологии. – М.: КолосС, 2004. (Учебники и учебные пособия для студентов высших учебных заведений).
5. Качмазов Г.С. Дрожжи бродильных производств. Практическое руководство. СПб.: Издательство «ЛАНЬ», 2012.
6. Мюллер Э., Лёффлер В. Микология: Пер. с нем. – М.: Мир, 1995.
7. Неверова О.А. Пищевая технология продуктов из сырья растительного происхождения: Учебник / О.А. Неверова, Г.А. Гореликова, В.М. Позняковский. – Новосибирск: Сиб. унив. изд-во, 2007.
8. Практикум по микробиологии: Учебное пособие для студентов высших учебных заведений / А.И. Нетрусов, М.А. Егорова, Л.М. Захарчук и др.; Под ред. А.И. Нетрусова. – М.: Издательский центр «Академия», 2005.
9. Практикум по цитологии. Учебное пособие / Под ред. Ю.С. Ченцова. – М.: Изд-во Моск. ун-та. 1988.

Лабораторная работа № 7.

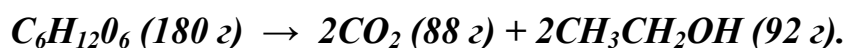
Образование дрожжами *Saccharomyces cerevisiae* спирта и углекислого газа. Определение бродильной активности и подъемной силы.

Теоретический обзор.

Бродильная активность.

Определение по скорости спиртового брожения.

О скорости брожения судят по количеству углекислоты, выделившейся в единицу времени из определенного объема среды:



Количество углекислоты устанавливают по убыли веса сосуда, снабженного затвором (Рис. 18).

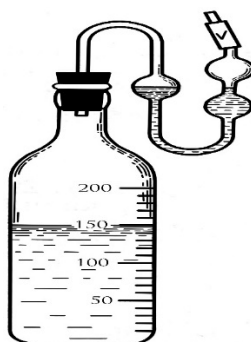


Рис. 18. Колба с сернокислым затвором для брожения.

В колбы (или бутылки) наливают 11 %-ное неохмеленное сусло. Вносят в сусло исследуемую культуру до 7 – 10 млн. клеток в 1 см³. Количество введенных дрожжей определяют подсчетом клеток под микроскопом с помощью камеры Горяева. Колбы закрывают затворами, взвешивают и оставляют при температуре 28 – 30°C или температуре, соответствующей технологической. Колбы или бутылки взвешивают ежедневно до прекращения изменения массы.

По разности начальной и конечной масс определяют бродильную активность дрожжей, выражая ее в граммах диоксида углерода, выделившегося из 100 см³ сусла.

Рассчитывают, сколько граммов CO₂ выделилось из 1000 см³ среды в 1 ч за каждый интервал времени между взвешиваниями сосуда.

Для регистрации результатов можно использовать таблицу 4.

Таблица 4

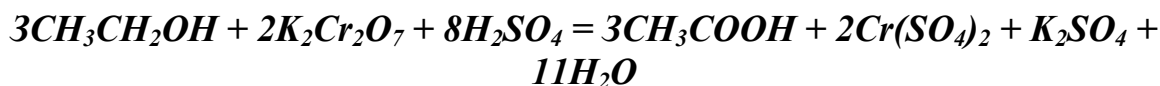
Динамика выделения CO₂ при брожении

Время, ч	Вес колбы, г	Количество CO ₂			
		от начала опыта		за интервал времени	
		г/100 мл	г/л	г/л	г/л/час
0					
6					
12					
18					

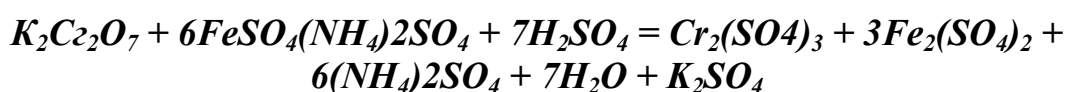
Более информативным и технологически верным будет пересчет граммов CO₂, выделившихся из 1000 см³ среды в 1 ч на 1 млн. клеток засевных дрожжей.

Определение по количеству этанола.

Количество этанола, образовавшегося при брожении, определяют оксидиметрическим методом, основанным на окислении этилового спирта до уксусной кислоты и воды смесью бихромата калия с серной кислотой:



По окончании окисления спирта избыток бихромата оттитровывают раствором соли Мора:



По количеству бихромата, израсходованного на окисление, вычисляют концентрацию спирта. Наиболее точные результаты метод дает при содержании спирта в жидкости в пределах 1 – 2 %. Поэтому при более высоких концентрациях спирта разбавляют культуральную жидкость, а при меньших – растворы соли Мора и бихромата.

В мерную колбу на 100 см³ помещают 20 см³ культуральной жидкости, освобожденной от клеток декантацией, фильтрованием или центрифугированием. Содержимое колбы доводят до метки дистиллированной водой, перемешивают и берут 10 см³ в круглодонную колбу на 50 – 75 см³. В трехшариковый приемник наливают 25 см³ раствора бихромата и 10 см³ концентрированной H₂SO₄. Колбу плотно закрывают резиновой пробкой с отводной трубкой, суженный конец которой должен доходить почти до дна приемника (**Рис. 19**). Затем в течение 10 – 15 мин отгоняют две трети содержимого колбы. Раствор бихромата за это время меняет окраску от оранжевой до грязно-бурой. После отгонки во избежание обратного перебрасывания жидкости из приемника убирают приемник и только потом отставляют горелку.

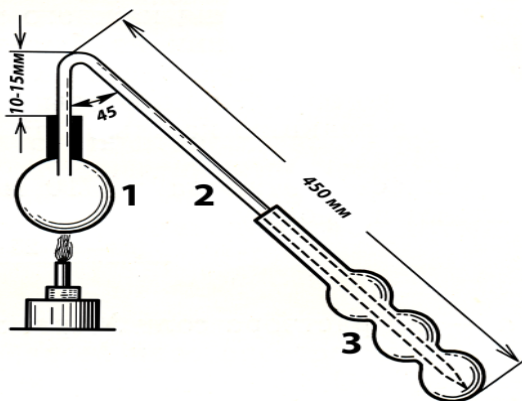


Рис. 19. Прибор Мартена для определения спирта:

1 – круглодонная колба; 2 – отводная трубка; 3 – приемник.

Содержимое приемника переносят в мерную колбу на 100 см³. Дистиллированной водой споласкивают приемник и отводную трубку, и промывные воды выливают в ту же мерную колбу. После этого раствор в колбе доводят до метки дистиллированной водой, перемешивают, отбирают из него 20 см³ в коническую колбу на 250 см³, добавляют 20 см³ дистиллированной воды и титруют солью Мора. Параллельно ведут контрольное титрование, чтобы определить, сколько соли Мора идет на титрование 5 см³ раствора бихромата. Для этого в коническую колбу помещают 5 см³ раствора бихромата, 2 см³ концентрированной серной кислоты, 30 – 40 см³ дистиллированной воды и титруют солью Мора. Так как соль Мора нестойкое соединение, контрольное титрование обязательно делают при каждом определении. Конец титрования устанавливают капельной пробой с раствором феррицианида. Для этого на чистую белую фарфоровую или керамическую пластинку стеклянной палочкой наносят каплю титруемой жидкости и рядом из капельницы каплю раствора феррицианида. Интенсивное синее окрашивание, получаемое при слиянии капель, указывает на конец реакции. Опытный раствор и контроль титруют по два раза. Первое титрование служит для получения ориентировочных результатов, поэтому реакцию титруемой жидкости с раствором феррицианида проводят после добавления каждого миллилитра раствора соли Мора. При втором титровании из бюретки сначала сливают без пробы на индикатор большую часть того количества раствора соли Мора, которое было определено первым титрованием, а затем делают качественную реакцию каждый раз после добавления 0,1 см³ раствора соли Мора.

Количество этанола (г/10 см³) в культуральной жидкости рассчитывают по формуле:

$$(a - б) \cdot 25 \cdot 5$$

$$M_{\text{этанол}} = \frac{\quad}{\quad} \cdot 0,01,$$

a

где

a – см³ раствора соли Мора, пошедшие на титрование контроля;

б – см³ раствора соли Мора, пошедшие на титрование опыта;

25 – см³ K₂C₂O₇;

5 – разведение культуральной жидкости (20 см³ до 100 см³);

0,01 – грамм этанола соответствует 1 см³ K₂Cr₂O₇.

Объемный способ.

Метод основан на том, что состав сусла не всегда одинаков и определение бродильной энергии дрожжей целесообразнее проверять на растворе какого-либо сахара. Прибор, применяемый для этой цели, состоит из колбочки емкостью 50 см³, присоединенной резиновой трубки, бюретки, и уравнительного сосуда. Бюретку и уравнительный сосуд заполняют 20 %-

ным раствором NaCl, подкисленным ортофосфорной кислотой до pH 1,0. Этот раствор почти не поглощает CO₂. В колбочку помещают трехсуточную культуру дрожжей (выращенных на сусло-агаре) промытых и отпрессованных между листками фильтровальной бумаги. В навеске должно содержаться около 0,15 г сухих веществ (определенный вес, например, 0,7 г с влажностью около 75 %). Затем в колбочку наливают 30 см³ 10 %-ого раствора сахара (глюкозы), содержащего 0,2 % KН₂РO₄. Колбочку закрывают пробкой и из бюретки вытесняют воздух, пользуясь уравнительным сосудом. Уровень раствора в бюретке устанавливают на ноль. После этого поворотом трехходового крана соединяют емкость колбочки с бюреткой и начинают процесс брожения, который ведут при температуре 20°С в течение 3 часов. Через каждый час уровень жидкости в бюретке отмечают и устанавливают на ноль.

По объему образовавшегося СО₂ за 3 ч (по сумме трех объемов) судят о бродильной способности дрожжей. Хорошо бродящие дрожжи за 3 ч образуют около 30 см³ СО₂.

Манометрический метод определения бродильной активности.

Для определения бродильной активности дрожжей используется прибор, состоящий из колбы (объем 300 – 500 см³), газоотводной трубки с краном и чувствительного манометра (медицинский для определения артериального давления) (**Рис. 20**).

Перед началом работы измеряют объем используемой колбы до нижнего края тщательно притертой пробки и объем газоотводной трубки. Для этого заполняют колбу и трубку водой, затем мерным цилиндром измеряют объем вместившейся жидкости.

Воспользовавшись уравнением Менделеева-Клапейрона определяют необходимую величину давления в свободном объеме используемой колбы. Порядок расчета величины давления описан в разделе «Зимазная, инвертазная и мальтазная активность. Манометрический способ»

Например, для оценки бродильной активности пивных и винных дрожжей регистрируется 28 – 30 см³ СО₂. Такое количество газа хорошими дрожжами выделяется не более чем за 3 часа.

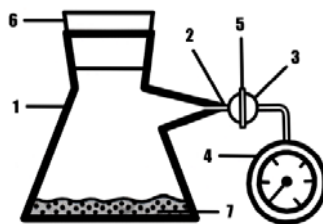


Рис. 20. Прибор для брожения:

1 – колба, 2 – газоотводная трубка, 3 – краник, 4 – манометр, 5 – подвижная часть краника, 6 – пробка, 7 – дрожжевая суспензия.

В колбу вносят 0,7 г отпрессованных на воронке дрожжей, 30 см³ солодового сусла (8 – 10 % СВ) или 10 %-ого раствора сахара и взбалтывают до получения однородной суспензии. Колбу тщательно закрывают и через газоотводную трубку соединяют с манометром. Для уравнивания давления в колбе с атмосферным давлением извлекают подвижную часть краника и сразу помещают на место тщательно притерев и совместив отверстия. Подготовленный таким образом прибор переносят в термостат при температуре, соответствующей технологической, и регистрируют время, за которое стрелка манометра достигнет необходимой отметки, соответствующей определяемому количеству выделенного диоксида углерода.

Степень сбраживания.

Конечная степень сбраживания является не только важным показателем технологической оценки углеводного состава сусла, но и характеризует физиологические возможности исследуемых дрожжей, имеющие решающее значение в оптимизации технологического процесса.

Метод основан на экспериментальном сбраживании дрожжами субстрата с последующим установлением количества сброженных сахаров.

В зависимости от поставленной задачи и особенностей исследуемой расы дрожжей начальная концентрация СВ в субстрате может колебаться от 15 до 20 и более %.

Для того чтобы исключить влияние состава сусла на результаты эксперимента можно использовать среду постоянного состава:

<i>Глюкоза (сахароза, мальтоза)</i>	<i>150 – 200 г</i>
<i>Дрожжевой автолизат</i>	<i>5,0 см³</i>
<i>Биотин</i>	<i>0,02 см³</i>
<i>Вода</i>	<i>до 1000,0 см³</i>

Приготовленный субстрат разлить в бутылки по 200 см³ и туда же внести по 0,5 г отпрессованных на воронке исследуемых дрожжей. Тщательно перемешать до однородной суспензии и инкубировать. На каждую культуру готовить по 10 бутылок и определять степень сбраживания с интервалом 6 – 12 – 24 и более часа.

Температурный режим инкубации может быть оптимальным для дрожжей – 28 – 30°C или же устанавливаться в зависимости от технологических особенностей.

Измерение вести до трех одинаковых результатов, первый из которых считать конечной степенью сбраживания. Перед измерением плотности субстрат фильтровать через бумажный фильтр, возвращая в воронку первые порции.

Конечную степень сбраживания, показывающую количество в сусле сброженных веществ, считают в процентах к их массе в исходном субстрате по формуле:

$$X = \frac{(m_{CB} - m_{CB1}) \cdot 100}{m_{CB}},$$

где

m_{CB} – массовая доля сухих веществ в начальном субстрате, %;

m_{CB1} – видимая массовая доля сухих веществ в субстрате на момент измерения, %.

Регистрировать:

- конечную степень сбраживания,
- скорость сбраживания,
- динамику сбраживания, выраженную графически.

Подъемная сила.

Подъемная сила – основной показатель качества хлебопекарных дрожжей; чем быстрее дрожжи поднимают тесто, тем выше их качество. Хорошие дрожжи поднимают тесто за 60 – 65 мин. В соответствии с требованиями стандарта подъемная сила товарных дрожжей не должна превышать 75 мин.

Следует помнить, что подъемная сила дрожжей может несколько изменяться в зависимости от влажности и качества муки.

Подъемная сила прессованных дрожжей.

Стандартный метод.

280 г пшеничной муки 85 %-ого помола помещают в термостат при температуре 35°C не менее чем на 2 часа. Затем подогревают до 35°C 160 см³ 2,5 %-ого раствора поваренной соли, 5 г анализируемых прессованных дрожжей, отвешенных на технических весах с точностью до 0,01 г, смешивают в фарфоровой чашке с 15 – 20 см³ подготовленного, как указано выше, раствора поваренной соли до исчезновения комков. Разведенные дрожжи быстро вливают в дежу лабораторной тестомесильной машины с частотой вращения 135 об/мин. Оставшимся раствором соли ополаскивают чашку из-под дрожжей и тоже выливают в дежу. Затем насыпают 280 г согретой муки и включают тестомесильную машину.

Через 5 мин тестомесильную машину останавливают, вынимают тесто, придают ему форму батона и кладут в металлическую форму, также предварительно нагретую в термостате при 35°C и смазанную растительным маслом.

При отсутствии месильной машины тесто замешивают вручную, соблюдая указанный выше режим его приготовления.

Форма (**Рис. 21**) должна иметь в продольном и поперечном разрезах трапецию следующих внутренних размеров (в см): верхние основания 14,3 ×

9,2, нижние – $12,6 \times 8,5$, высота – 8,5. На длинные борта ее навешивают поперечную металлическую перекладину, входящую в форму на 1,5 см.

Пробу ставят в термостат с температурой 35°C и фиксируют время. Когда тесто коснется нижнего края перекладины, вновь отмечают время.

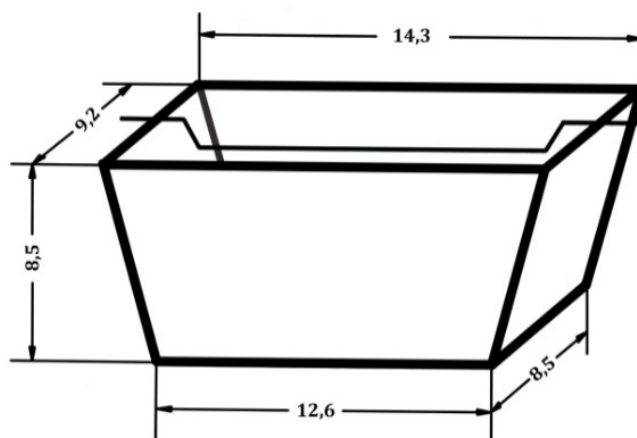


Рис. 21. Форма для определения подъемной силы дрожжей.

Скоростью подъема теста, или подъемной силой, считают продолжительность (в минутах) нахождения теста в форме с момента внесения его до соприкосновения с нижним краем перекладины.

Хорошие дрожжи показывают подъемную силу не более 60 – 65 минут.

«По шарiku»

Навеску дрожжей массой 0,31 г перемешать в ступке с 4,8 см³ подогретой до 35°C воды. Добавить 7,0 г муки II сорта и быстро замешать, придав замесу форму шарика, не прилипающего к рукам. Шарик погрузить в стакан с водой температурой 32°C . Стакан поместить в термостат при 32°C .

Регистрировать время от погружения до всплытия шарика.

Хорошие дрожжи показывают подъемную силу не более 25 минут.

Время, затраченное на всплывание шарика (мин), умножают на коэффициент 3,5 и получают величину подъемной силы, определяемую стандартным способом.

Подъемная сила сухих дрожжей.

К навеске сухих дрожжей (2,5 г), взятой на технических весах, добавляют 30 см³ водопроводной воды, нагретой до 35°C . Смесь помещают в термостат при температуре 35°C на 30 мин. К размокшим дрожжам добавляют 15 г пшеничной муки II сорта, тщательно размешивают и вновь ставят в термостат на 2 часа. Одновременно в термостат помещают 265 г муки того же сорта, 130 см³ воды, в которой растворено 4 г поваренной соли, и стандартную форму (**Рис. 21**), смазанную растительным маслом. Через 2 часа смесь дрожжей, воды и муки переводят в дежу лабораторной

тестомесильной машины (или большую фарфоровую чашку), смывая остатки смеси 130 см³ солевого раствора, после чего засыпают 265 г согретой муки. Тесто замешивают в течение 5 мин с момента внесения дрожжей, затем переносят его в форму и далее поступают так же, как при определении подъемной силы прессованных дрожжей.

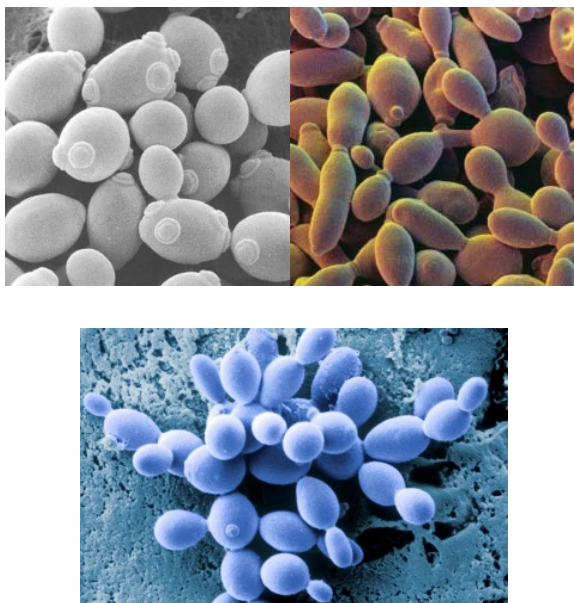


Рис. 22. Клетки *Saccharomyces cerevisiae*.

Цель работы.

Изучить механизм спиртового брожения на примере дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Ознакомиться с основами методами определения бродильной активности дрожжей, используемых в лабораторных и производственных условиях.

Материалы и оборудование.

Солодовое сусло 8% СВ, 8%-ный раствор глюкозы, дрожжи прессованные хлебопекарные, чистая суточная культура хлебопекарных дрожжей, весы лабораторные, манометрический прибор, металлические формы для определения подъемной силы дрожжей, мерные цилиндры 250,0 мл, стерильные пипетки 10,0 мл.

Ход работы.

1. В колбу манометрического прибора налить 190,0 мл солодового сусла и 10,0 мл водной суспензии прессованных дрожжей. Тщательно закрыть резиновой пробкой с газоотводной трубкой и манометром. Зарегистрировать время с момента внесения дрожжевой взвеси.
2. В колбу манометрического прибора налить 190,0 мл солодового сусла и 10,0 мл суточной чистой культуры хлебопекарных дрожжей. Тщательно закрыть резиновой пробкой с газоотводной трубкой и

- манометром. Зарегистрировать время с момента внесения дрожжевой взвеси.
3. В колбу манометрического прибора налить 190,0 мл 8%-ого раствора глюкозы и 10,0 мл водной суспензии прессованных дрожжей. Тщательно закрыть резиновой пробкой с газоотводной трубкой и манометром. Зарегистрировать время с момента внесения дрожжевой взвеси.
 4. В колбу манометрического прибора налить 190,0 мл 8%-ого раствора глюкозы и 10,0 мл суточной чистой культуры хлебопекарных дрожжей. Тщательно закрыть резиновой пробкой с газоотводной трубкой и манометром. Зарегистрировать время с момента внесения дрожжевой взвеси.
 5. Приготовить навеску прессованных дрожжей массой 0,31 г перемешать в ступке с 4,8 см³ подогретой до 35°C воды. Добавить 7,0 г муки II сорта и быстро замешать, придав замесу форму шарика, не прилипающего к рукам. Шарик погрузить в мерный цилиндр с водой температурой 32°C. Стакан поместить в термостат при 32°C. Регистрировать время от погружения до всплытия шарика.
 6. Приготовить 280 г пшеничной муки смешать и 160 см³ 2,5 %-ого раствора поваренной соли, подогретого до 35°C. В 15 – 20 см³ солевого раствора развести 5 г прессованных дрожжей до исчезновения комков. Разведенные дрожжи быстро влить в дежу лабораторной тестомесильной. Оставшимся раствором соли ополоснуть чашку из-под дрожжей и тоже вылить в дежу. Туда же насыпать приготовленные 280 г муки и включить тестомесильную машину. Через 5 мин тестомесильную машину остановить, вынуть тесто, придать ему форму батона и уложить в специальную металлическую форму с перекладиной, предварительно нагретую в термостате при 35°C и смазанную растительным маслом. При отсутствии месильной машины тесто замешать вручную, соблюдая указанный выше режим его приготовления. Пробу поместить в термостат с температурой 35°C и зафиксировать время. Когда тесто коснется нижнего края перекладины, вновь отметить время. Скоростью подъема теста, или подъемной силой, считать продолжительность (в минутах) нахождения теста в форме с момента внесения его до соприкосновения с нижним краем перекладины.

Задание.

Зарисовать в рабочей тетради принципиальную схему манометрического прибора.

Зарисовать в рабочей тетради схему специальной формы для определения подъемной силы.

Записать в рабочей тетради результаты определения бродильной активности дрожжей на разных питательных субстратах.

Записать в рабочей тетради результаты определения подъемной силы «по шарiku».

Записать в рабочей тетради результаты определения подъемной силы стандартным методом.

Контрольные вопросы:

1. Дать краткую характеристику основных биохимических процессов, происходящих при клеточном синтезе спирта и углекислого газа;
2. На чем основаны манометрические методы определения бродильной активности. Их значение в исследовательской и производственной практике.
3. На чем основаны методы определения подъемной силы дрожжей. Их значение в исследовательской и производственной практике.

Литература:

1. Биотехнология: теория и практика: Учебное пособие для вузов / Н.В. Загоскина с соавт.; Под ред. Н.В. Загоскиной, Л.В. Назаренко. – М.: Изд. Оникс, 2009.
2. Биотехнология. Принципы и применение: Пер. с англ. / Под ред. И. Хиггинса, Д. Беста, Дж. Джонса. – М.: Мир, 1988.
3. Качмазов Г.С. Дрожжи бродильных производств. Практическое руководство. СПб.: Издательство «ЛАНЬ», 2012.
4. Мюллер Э., Лёффлер В. Микология: Пер. с нем. – М.: Мир, 1995.
5. Неверова О.А. Пищевая технология продуктов из сырья растительного происхождения: Учебник / О.А. Неверова, Г.А. Гореликова, В.М. Позняковский. – Новосибирск: Сиб. унив. изд-во, 2007.
6. Практикум по микробиологии: Учебное пособие для студентов высших учебных заведений / А.И. Нетрусов, М.А. Егорова, Л.М. Захарчук и др.; Под ред. А.И. Нетрусова. – М.: Издательский центр «Академия», 2005.

Лабораторная работа № 8.

Образование молочной кислоты чистой культурой *Lactobacillus acidophilus*. Определение кислотообразующей активности.

Теоретический обзор.

Молочнокислые бактерии представлены четырьмя родами.

Род *Lactobacillus* – объединяет палочковидные бактерии, форма которых весьма разнообразна – от коротких кокковидных до длинных нитевидных (Рис. 23):

Болгарская палочка (*Lactobacillus bulgarius*) – крупные палочки, часто образующие длинные цепочки. Это сильный кислотообразователь, накапливающий в молоке 2,5 – 3,5% молочной кислоты. Используется при изготовлении простокваши, кумыса.

Сырная палочка (*Lactobacillus casei*) – часто встречается в виде более или менее длинных цепочек. Накапливается до 1,5% кислоты. Используется в сыроделии.

Ацидофильная палочка (*Lactobacillus acidophilus*) – в молоке способна накапливать до 2,2% кислоты. Используется в производстве ацидофильных продуктов, вырабатывает антибиотические вещества, активна в отношении возбудителей кишечных заболеваний.

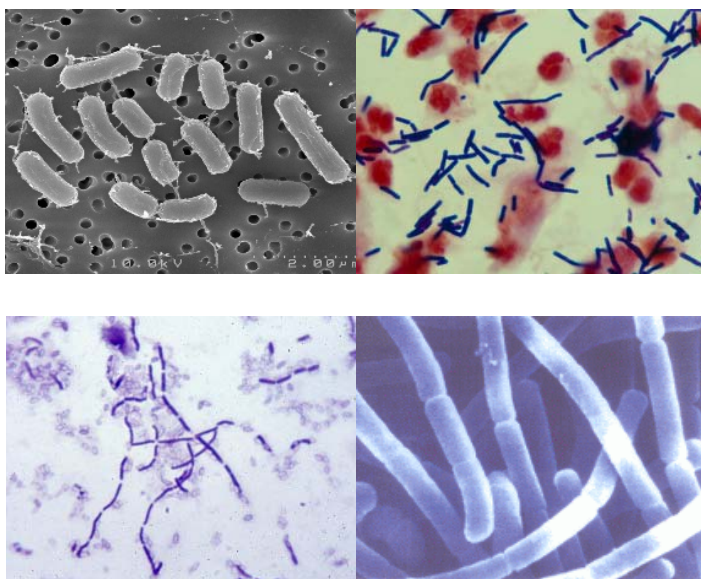


Рис. 23. Клетки *Lactobacillus*.

Дельбрюковская палочка (*Lactobacillus delbrückii*) – зерновая термофильная палочка, встречается поодиночке, короткими и длинными цепочками. Применяется в производстве молочной кислоты и хлебопечении.

Молочнокислая палочка (*Lactobacillus plantarum*) – небольшие палочки, часто сцепленные попарно или цепочкой. Накапливают до 1,3% кислоты. Это основной возбудитель брожения при квашении овощей и силосовании кормов.

Капустная палочка (*Lactobacillus brevis*) – возбудитель брожения, протекающего при квашении капусты и огурцов. Способна образовывать ароматические вещества, придающие сквашиваемому продукту приятный вкус и аромат.

Огуречная палочка (*Lactobacterium cucumeris*) – короткая грамположительная бактерия, неподвижная. Располагается парами или цепочкой. Оптимальная температура ее развития 20 – 25°C. Встречается в рассоле засоленных огурцов, капусты, в силосе.

Род *Streptococcus* объединяет гомоферментативные бактерии сферической или овальной формы, делящиеся в одной плоскости и располагающиеся парами или цепочками (Рис. 24):

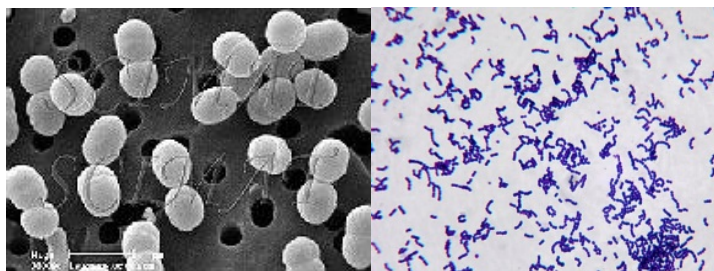


Рис. 24. Клетки *Streptococcus lactis*.

Молочнокислый стрептококк (*Streptococcus lactis*) – кокки, соединенные попарно или короткими цепочками. В среде накапливают до 1% кислоты. Некоторые расы образуют антибиотик низин. Широко используются при изготовлении разнообразных кисломолочных продуктов, кислосливочного масла, сыров.

Сливочный стрептококк (*Streptococcus cremoris*) – сферические клетки, образующие длинные цепочки. Применяют его в заквасках вместе с молочным стрептококком. Некоторые штаммы вырабатывают антибиотик диплококцин.

Стрептококк термофильный (*Streptococcus thermophilus*) – длинные цепочки кокков. Накапливают около 1% кислоты. Применяется вместе с палочковидными бактериями при изготовлении ряженки, простокваши, варенца, сыра.

Ароматобразующие стрептококки (*Streptococcus diacetylactis*, *Streptococcus citrovorus*) образуют кроме кислот и углекислого газа ароматические вещества (эфир, диацетил), что обуславливает аромат кисломолочных продуктов.

Род *Leuconostoc* – объединяет гетероферментативные кокковидные бактерии, которые бывают овальными и яйцевидными. Род включает виды *Leuconostoc cremoris*, *Leuconostoc lactis*, *Leuconostoc oenos*.

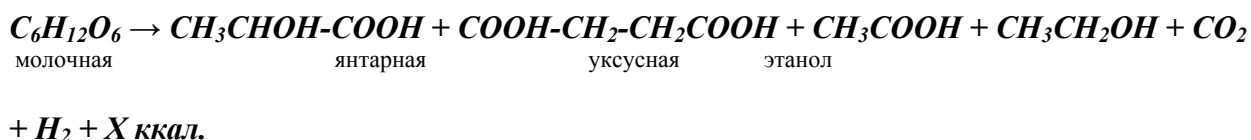
Род *Pediococcus* – сюда относят гомоферментативные кокковидные бактерии. Деление клеток происходит в двух плоскостях, в результате чего часто образуются тетрады или гроздья. Род включает виды *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus damnosus*, *Pediococcus halophilus*.

Молочнокислое брожение представляет собой анаэробный процесс разложения углеводов ферментами молочнокислых бактерий с образованием молочной кислоты и других продуктов. В зависимости от вида бактерий, производящих этот процесс, конечные продукты брожения могут быть разными.

Различают гомоферментативное молочнокислое брожение, при котором молочный сахар образует только молочную кислоту:



При гетероферментативном брожении, кроме молочной кислоты, образуются другие продукты (летучие кислоты, спирты, эфиры). Усложнение процесса брожения связано с тем, что эти бактерии содержат в своих клетках фермент карбоксилазу, а у гомоферментативных бактерий он отсутствует. Общий химизм этого процесса может быть представлен схематическим уравнением так:



Молочнокислые бактерии очень широко распространены в природе. Они всегда имеются в почве, на поверхности растений, и это является источником их постоянного появления в молочных и других продуктах.

Молочнокислые бактерии имеют очень большое практическое значение, так как вызываемый ими процесс молочнокислого брожения лежит в основе переработки молочных продуктов, квашения овощей, силосования кормов.

В кислой среде многие бактерии, в особенности гнилостные, задерживаются в своем развитии и затем совсем перестают расти, в результате наступает консервирование силоса, овощей при квашении и молочных продуктов. Таким образом, консервирующим средством является молочная кислота, образующаяся в процессе жизнедеятельности молочнокислых бактерий.

В промышленности используют культурные расы бактерий, которые имеют ряд преимуществ перед дикими формами.

Цель работы.

Изучить механизм молочнокислого брожения на примере лиофилизированной чистой культуры бактерий *Lactobacillus acidophilus*. Ознакомиться с основами методами определения скорости кислотообразования, используемых в лабораторных и производственных условиях.

Материалы и оборудование.

Микроскопы, рабочий раствор метиленового синего, стерильное молоко 100,0 мл, стерильная заварка из ржаной муки 200,0 г, лиофильная культура *Lactobacillus acidophilus*, весы лабораторные, рН-метр, бюретка для титрования, стаканы химические 100 мл, стеклянные палочки, 0,1 Н раствор NaOH, фенолфталеин.

Ход работы.

1. Содержимое флакона лиофильной культуры *Lactobacillus acidophilus* развести в 10,0 мл стерильного физиологического раствора.
2. Из полученного разведения приготовить фиксированный препарат, окрасить его метиленовым синим и микроскопировать в масляной иммерсии с объективом МИ-90^X.
2. В ряд проб стерильной ржаной закваски внести по 1, 2, 3, 4 и 5,0 мл разведенной культуры *Lactobacillus acidophilus*.
3. Подготовленные таким образом пробы поместить в термостат на 24 часа при 39°C.
4. По истечении срока инкубации определить титруемую кислотность каждой пробы.
5. По истечении срока инкубации определить активную кислотность каждой пробы.
6. В ряд проб стерильного молока внести по 1, 2, 3, 4 и 5,0 мл разведенной культуры *Lactobacillus acidophilus*.
7. Подготовленные таким образом пробы поместить в термостат на 24 часа при 39°C.
8. По истечении срока инкубации определить титруемую кислотность каждой пробы.
9. По истечении срока инкубации определить активную кислотность каждой пробы.

Задание.

Зарисовать в рабочей тетради морфологию *Lactobacillus acidophilus* при простом окрашивании.

Записать в рабочей тетради результаты определения титруемой кислотности в пробах с ржаной заваркой.

Записать в рабочей тетради результаты определения активной кислотности в пробах с ржаной заваркой.

Сопоставить результаты определения титруемой и активной кислотности.

После инкубирования, не перемешивая пробы с молоком, дать характеристику сгустка в каждой пробе и результаты записать в рабочую тетрадь.

Записать в рабочей тетради результаты определения титруемой кислотности в пробах с стерильным молоком.

Записать в рабочей тетради результаты определения активной кислотности в пробах с стерильным молоком.

Сопоставить результаты определения титруемой и активной кислотности.

Контрольные вопросы:

1. Дать общую характеристику кислотообразующих бактерий, принадлежащих к различным таксономическим группам и используемых в производстве продуктов питания;
2. Дать общую характеристику биохимических клеточных процессов при молочнокислом брожении;
3. Описать сущность и метод определения титруемой кислотности среды;
4. Описать сущность и метод определения активной кислотности среды.

Литература:

1. Биотехнология: теория и практика: Учебное пособие для вузов / Н.В. Загоскина с соавт.; Под ред. Н.В. Загоскиной, Л.В. Назаренко. – М.: Изд. Оникс, 2009.
2. Биотехнология органических кислот и белковых препаратов: учебное пособие / Е.И. Муратова, О.В. Зюзина, О.Б. Шуняева. – Тамбов : Изд-во Тамб. гос. техн. ун-та, 2007.
3. Неверова О.А. Пищевая технология продуктов из сырья растительного происхождения: Учебник / О.А. Неверова, Г.А. Гореликова, В.М. Позняковский. – Новосибирск: Сиб. унив. изд-во, 2007.
4. Практикум по микробиологии: Учебное пособие для студентов высших учебных заведений / А.И. Нетрусов, М.А. Егорова, Л.М. Захарчук и др.; Под ред. А.И. Нетрусова. – М.: Издательский центр «Академия», 2005.

Лабораторная работа № 9.

Окисление спирта в уксусную кислоту бактериями *Acetobacter*.

Теоретический обзор.

Процесс окисления этилового спирта в уксусную кислоту носит название уксуснокислого брожения. Процесс называют «брожением» скорее по традиции, чем по смыслу, так как от брожения он отличается аэробным характером. Вызывается процесс группой бактерий, которые являются облигатными аэробами. Любая среда, содержащая небольшое количество спирта, не изолированная от атмосферы, является благоприятным субстратом для развития уксуснокислых бактерий, попадающих туда из воздуха.

В результате этого процесса образуется уксусная кислота и вода. Реакция окисления этилового спирта в уксусную кислоту идет по уравнению:



Вызывается этот процесс специальной группой бактерий, называемых уксуснокислыми бактериями. Уксуснокислое брожение легко возникает самопроизвольно в жидкостях, содержащих небольшое количество спирта и оставленных открытыми при температуре 30–35°C.

Все уксуснокислые бактерии строго аэробные микроорганизмы, очень мелкие, палочковидной формы, неподвижные, встречаются в виде длинных извитых цепочек, состоящих из одного ряда клеток, спор не образуют. Имеют очень широкое распространение в природе и часто появляются на поверхности легко закисающих бродящих жидкостей. Много уксуснокислых бактерий находится в воздушной пыли, на поверхности ягод зрелого винограда.

Наиболее часто встречаются и широко распространены следующие уксуснокислые бактерии: *Acetobacteraceti*, *Acetobacterpasteurianum*, *Acetobacterxylinum*, *Acetobacterkutzningianum*.

Различные виды уксуснокислых бактерий можно различать до некоторой степени по внешнему виду образуемой ими пленки и реакции с йодом.

Acetobacteraceti представляет собой короткую палочку, неподвижную, бесспорную, образующую правильные цепочки (Рис. 25). Йодомокрашивается в желтый цвет и выносит довольно высокие концентрации спирта (до 11%). Чаще всего развивается на пиве. В ходе окисления спирта накапливает в среде до 6% уксусной кислоты. Имеет оптимальную температуру развития около 34°C. Образует гладкую слизистую пленку, не поднимающуюся по стенкам.

Acetobacterpasteurianum очень близка к *Acetobacteraceti*, но отличается от нее тем, что йодом окрашивается (так же как и *Acetobacterkutzningianum*) в синий цвет, а на поверхности субстрата образует сухую морщинистую пленку.

Acetobacterxylinum в отличие от вышеприведенных представителей образует мощную слизистую пленку, которая впоследствии уплотняется, становится хрящевидной и значительной толщины. Йодом окрашивается в синий цвет (реакция на гемицеллюлозу). При окислении спирта накапливает до 4,5% уксусной кислоты, которую далее окисляет до углекислого газа и воды. Эта уксусная бактерия вместе с дрожжевыми грибами образует так называемый чайный гриб и употребляется в быту для изготовления напитка, известного под названием чайного кваса.

Наряду с вышеперечисленными представителями уксусных бактерий имеются и другие, которые представляют особый практический интерес в промышленном получении уксусной кислоты, это *Acetobacterorleanense* и *Acetobacterschiltzenbachii*.

Acetobacterorleanense развивается чаще всего на слабых растворах виноградного вина, которое, благодаря развитию этой бактерии, становится совершенно прозрачным. Образует очень прочную пленку. Имеет важное значение в производстве уксуса из виноградного вина.

Acetobacterschiltzenbachii имеет форму сравнительно длинной палочки. Образует сплошную непрочную пленку только в старых культурах. Может накапливать в среде до 11,5% уксусной кислоты. Является важнейшей культурой в получении уксуса ускоренным способом.

Н.А. Красильников положил в основу определения видов биохимические особенности (наличие каталазы, усвоение аммонийной соли, минерального азота, способность к образованию пигмента) и разделил их на 4 вида: *Acetobacter peroxydans*, *Acetobacter aceti*, *Acetobacter melanogenum*, *Acetobacter xylinum*.

Ж. Фратер также использовал для классификации уксуснокислых бактерий особенности их биологической деятельности. Он предложил разделить их на 4 группы, названные по наиболее характерным представителям: *Peroxydans*, *Oxydans*, *Mesoxydans* и *Suboxydans*.

Н.К. Могилянский (1960) по морфологии клеток, физиологическим и биохимическим свойствам, образованию на поверхности вина пленок, различных по внешним признакам, разделил уксуснокислые бактерии на 3 группы (I — покров сухой, равномерно развитый; II — покров слизистый, плотный; III — покров тонкий, просвечивающий) и на 9 видов рода *Acetobacter*:

Acetobacterorleanense,
Acetobacterxylinoides,
Acetobacterxylinum,
Acetobacterplicatum,
Acetobacterascendens,
Acetobacterkutzingianum,
Acetobacteraceti,
Acetobacterpasteurianum,
Acetobactervini acetati.



Рис. 25. Клетки *Acetobacteraceti*.

Промышленное получение уксуса ведется двумя способами: французским, основанным на окислении виноградного вина, и быстрым способом. При быстром способе производства уксуса исходным материалом служит разбавленный спирт, а «брожение» ведется в особых сосудах, наполненных буковыми стружками. Спирт протекает через сосуды, медленно окисляется до уксусной кислоты.

Положительная роль уксуснокислых бактерий состоит только в промышленном получении уксусной кислоты, которая широко применяется в пищевой промышленности. Во всех остальных случаях развитие уксусных бактерий нежелательно, так как они являются вредителями бродильных производств. Появление их в вине, пиве, хлебном тесте вызывает скисание и порчу продуктов.

Цель работы.

Изучить механизм уксуснокислого брожения бактериями *Acetobacter*. Ознакомиться с основами методами определения скорости кислотообразования, используемых в лабораторных и производственных условиях.

Материалы и оборудование.

Микроскопы, предметные и покровные стекла, стеклянные палочки, рН-метр, бюретка для титрования, стаканы химические 100 мл, колбы 100 мл, пипетки на 1 мл, свежесброженное сусло, винный уксус, этиловый спирт, йод, 0,1 Н раствор NaOH, фенолфталеин.

Ход работы.

1. Приготовить накопительную культуру уксуснокислых бактерий. Для этого взять свежесброженное сусло, измерить титруемую и активную кислотность, разлить по колбам слоем в 2 см и подкислить винным уксусом. К содержимому колбы прибавить еще 0,5 мл этилового спирта для обогащения среды энергетическим материалом. Колбы закрыть ватными пробками и поставить на 5 – 6 суток в термостат при температуре 30—35°C. По истечении срока инкубации на поверхности среды появится беловато-серая пленка, состоящая из уксуснокислых бактерий.
2. Пленку микроскопировать и определить вид развившихся уксусных бактерий.
3. Для распознавания вида уксуснокислых бактерий использовать окрашивание препарата йодом. При добавлении йода клетки *A. aceti* окрашиваются в желтый цвет. Клетки *A. pasteurianum* при действии на них йода окрашиваются в синий цвет. Образующаяся в бродящей жидкости пленка имеет сухой морщинистый вид. При наличии *A. xylinum* клетки, как и у *A. pasteurianum*, от йода окрашиваются в синий цвет. Образующаяся в бродящей жидкости слизистая пленка опускается на дно колбы.
4. Определить титруемую и активную кислотность питательного субстрата после инкубирования.

Задание.

Зарисовать в рабочей тетради структуру образовавшейся поверхностной пленки.

Зарисовать в рабочей тетради результат микроскопии приготовленного из пленки препарата.

Записать в рабочей тетради и сопоставить результаты определения титруемой и активной кислотности.

Контрольные вопросы:

1. Дать общую характеристику уксуснокислых бактерий и описать их значение в производственной практике;
2. Дать общую характеристику биохимических клеточных процессов при уксуснокислом брожении;
3. Описать сущность и метод определения видовой принадлежности уксуснокислых бактерий.

Литература:

1. Биотехнология: теория и практика: Учебное пособие для вузов / Н.В. Загоскина с соавт.; Под ред. Н.В. Загоскиной, Л.В. Назаренко. – М.: Изд. Оникс, 2009.
2. Биотехнология. Принципы и применение: Пер. с англ. / Под ред. И. Хиггинса, Д. Беста, Дж. Джонса. – М.: Мир, 1988.
3. Биотехнология органических кислот и белковых препаратов: учебное пособие / Е.И. Муратова, О.В. Зюзина, О.Б. Шуняева. – Тамбов : Изд-во Тамб. гос. техн. ун-та, 2007.
4. Неверова О.А. Пищевая технология продуктов из сырья растительного происхождения: Учебник / О.А. Неверова, Г.А. Гореликова, В.М. Позняковский. – Новосибирск: Сиб. унив. изд-во, 2007.

Лабораторная работа № 10.

Образование лимонной кислоты плесневыми грибами *Aspergillus niger*.

Теоретический обзор.

В природе лимонная кислота встречается довольно часто, главным образом в незрелых плодах цитрусовых, ананасов, груш, инжира, брусники, клюквы и др. Лимоны и апельсины были главными источниками естественной (растительной) лимонной кислоты, которую производили преимущественно в Италии, где в середине XIX в. начали действовать первые заводы по производству кристаллической лимонной кислоты. Затем аналогичные заводы начали действовать в Калифорнии (США), на Гавайских

островах и в Вест-Индии. Для получения лимонной кислоты путем микробного синтеза в лабораторных условиях использовали микромицеты – *Aspergillus clavatus*, *Penicillium luteum*, *Penicillium citricum*, *Mucor piriformis*, *Ustina vulgaris* и др., но для промышленного биосинтеза наиболее подходящим оказался *Aspergillus niger*. Впоследствии из него было селекционировано множество производственных штаммов для биосинтеза лимонной кислоты из сахарозы. Многие органические вещества сбраживаются микромицетами и могут быть трансформированы в лимонную кислоту, но максимальный выход получается при биосинтезе из сахарозы или фруктозы. В последнее время успешно завершены эксперименты по биосинтезу лимонной кислоты дрожжами *Candida lipolytica* из парафинов и низших спиртов (этанола) с высоким выходом (80–140%).

Aspergillus niger относится к классу сумчатых грибов (*Ascomycetes*), семейству аспергилловых (*Aspergillaceae*), роду *Aspergillus*, который в настоящее время насчитывает свыше 120 видов. Тело гриба (Рис. 26) состоит из бесцветных, сильно разветвленных и переплетенных между собой тонких нитей – гиф, образующих мицелий (грибницу). Гифы септированы – разделены поперечными перегородками (септами) на клетки. Диаметр гиф от 3 до 6 мкм. Для аспергиллов характерен поверхностный стелющийся рост, однако при достаточной аэрации и строгом соблюдении асептики они могут размножаться и в толще твердой и в глубине жидкой среды. При поверхностном росте возвышаются органы плодоношения – конидиеносцы, которые отходят от особых опорных клеток мицелия. Конидиеносцы представляют собой утолщенные неветвящиеся несептированные, сильно зернистые на вид гифы длиной до 2000 мкм и более. На концах конидиеносцев появляется перетяжка без перегородки, выделяющая «пузырек» будущей головки. Пузырек округляется, увеличивается до 400 мкм, на его поверхности вырастают радиально расположенные продолговатые одно- или двухрядные клетки – стеригмы. На свободных концах стеригм размещаются цепочками более мелкие клетки – конидии. Такое строение головки внешне похоже на наконечник лейки, из отверстий которого льются струйки воды. Отсюда русское название аспергилла – леечный гриб. Однако точный перевод термина аспергилл – «косматая голова». Конидии – покоящиеся клетки, с минимальным содержанием воды, шаровидной или эллипсоидной формы, средним размером в поперечнике 4 мкм. Поверхность конидий – гладкая, бугристая или шиповатая, черная (откуда и название этого гриба *niger*) или коричневая с различными оттенками. Окраска конидий определяет цвет всей конидиеносящей поверхности. Число конидий на каждой головке достигает 10 тысяч. Зрелые конидии очень легко отделяются от головок током воздуха или струей воды. Попадая в жидкую питательную среду, они сначала набухают, а затем прорастают, образуя одновременно один или два проростка (гифы), на твердой среде прорастают при наличии капельножидкой влаги, почти не набухая. Гифа растет на свободном конце; удлиняясь, дает боковые отростки, которые в свою очередь также удлиняются, ветвятся, переплетаются между

собой, образуя колонии, видимые невооруженным глазом. Через 16–20 ч в центральной гифе начинают появляться обособленные клетки, из которых вырастают конидиеносцы. Образование зрелых конидий заканчивается через 3–4 суток. Рассмотренный способ размножения *Aspergillusniger* называется бесполом. Вообще же аспергиллы могут размножаться и половым путем – посредством асков, образующихся в плодовых телах. Однако развитие плодовых тел *Aspergillusniger* прекращается на самой ранней стадии и недоразвитые плодовые тела превращаются в плотные скопления сплетенных гиф (склероции). Многие штаммы *Aspergillusniger* склероции не образуют. Гриб может размножаться и вегетативным путем – отделившиеся от гиф частицы способны самостоятельно расти и образовывать новый мицелий.

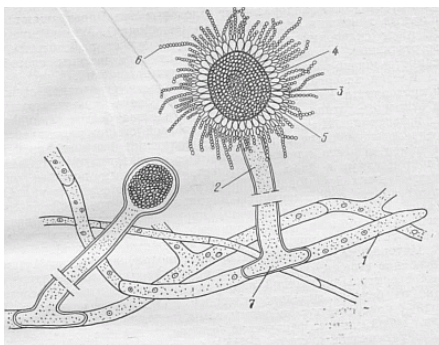


Рис. 26. *Aspergillus niger*.

1 – гифы; 2 – конидиеносец; 3 – пузырек; 4 – стеригмы первого ряда; 5 – стеригмы второго ряда; 6 – конидии; 7 – опорные клетки.

Жизнедеятельность *Aspergillusniger* проявляется в процессах питания, дыхания, роста и в реакциях на внешние раздражения. Питание и дыхание, необходимые организму для синтеза клеточного вещества и получения энергии, являются основой метаболизма (обмена веществ). По типу питания аспергиллы относятся к гетеротрофным организмам, усваивающим углерод из органических соединений. Поступление в клетку растворенных в воде веществ происходит путем диффузии и осмоса через всю поверхность тела и регулируется цитоплазматической мембраной. Таким образом организм отбирает из окружающей среды необходимое питание. Вследствие полупроницаемости цитоплазматической мембраны через нее свободно проникают в основном молекулы растворителя (воды). При этом главной движущей силой диффузии является разность концентраций веществ в окружающей среде и в цитоплазме клетки (перенос по градиенту концентрации) – пассивная диффузия. Большинство других веществ проходит через мембрану благодаря специальной системе переноса, находящейся в мембране и состоящей из белков-переносчиков и ферментов пермеазы, катализирующих связь субстрата с белком-переносчиком. При участии пермеаз осуществляется перенос одних веществ по градиенту концентрации – облегченная диффузия, других – против него – активный транспорт. В первом случае диффузия происходит без затраты энергии, во

втором при переносе каждой молекулы субстрата затрачивается одна молекула АТФ. По сравнению с автотрофами аспергиллы имеют клетки, проницаемые для веществ большей молекулярной массы и обладающие высоким осмотическим давлением (осмотрофы). Питательная среда должна содержать все вещества или их фрагменты, которые не могут быть синтезированы клетками, но необходимы им для роста, размножения и снабжения энергией. Полноценное, сбалансированное питание, удовлетворяя эти потребности организма, не обеспечивает накопления в среде таких первичных метаболитов, как органические кислоты. Таким образом, подобно всем живым организмам, *Aspergillusniger* нуждается в обычных органогенах – углероде, азоте, кислороде, водороде и многих других элементах. Содержатся витамины (мкг/г): тиамин 150; рибофлавин 70–85; пантотеновая кислота 244–727; никотинамид 120–840; фолиевая кислота 210; цианкобаламин 178. Существует мнение, что присутствие витаминов в среде не обязательно, так как *Aspergillusniger* может синтезировать их сам. Все же присутствие некоторых из них в питательной среде желательно. Так, биотин необходим для нормального функционирования всех организмов. Он является протетической группой карбоксилаз. Добавление небольших количеств биотина в питательную среду стимулирует рост *Aspergillusniger*. Аналогичное действие оказывает добавление пантотеновой кислоты (протетической группы ацетил-КоА). Образование лимонной кислоты стимулируется тиаминном.

Цель работы.

Изучить особенности образования лимонной кислоты грибом *Aspergillus niger* в различных условиях выращивания. Ознакомиться с основами методами определения скорости кислотообразования, используемых в лабораторных и производственных условиях.

Материалы и оборудование.

Микроскопы, предметные и покровные стекла, стеклянные палочки, рН-метр, бюретка для титрования, стаканы химические 100 мл, колбы 100 мл, пипетки на 1 и 10 мл, препаровальные иглы, вата, 20%-й раствор сахарозы, 10%-е растворы NH_4NO_3 , KH_2PO_4 , MgSO_4 , FeSO_4 , 0,1 Н раствор NaOH , фенолфталеин, чистая культура гриба *Aspergillus niger*.

Ход работы.

1. Приготовить 200 мл питательной среды, %: сахароза – 10,0; NH_4NO_3 – 0,3; KH_2PO_4 – 0,2; MgSO_4 – 0,05; FeSO_4 – 0,01.
2. Определяют исходную кислотность раствора с помощью рН-метра.
3. Питательную среду тщательно перемешать, разлить по 50 мл в четыре конические колбочки 150 мл, закрыть ватными пробками.
4. Во все колбы внести равное количество спор гриба. Колбы подписать и поставить в термостат при 28-30°C.

5. Инкубировать 6 дней, когда пленка гриба достигнет большой мощности.
6. Для определения сухого веса мицелия из колбы № 1 извлечь мицелий гриба, тщательно промыть с нижней стороны водой, высушить при 105°C в сушильном шкафу до постоянного веса. Определить титруемую и активную кислотность фильтрата.
7. Из колбы № 4 аккуратно слить фильтрат и под мицелий подвести 50 мл свежей среды, после чего колбу поместить в термостат.
8. На седьмой день определить кислотность фильтрата и сухой вес мицелия из колбы № 2 описанным выше способом.
9. На восьмой день определить кислотность фильтрата и сухой вес мицелия из колб № 3 и 4 описанным выше способом.
10. Препаровальные иглой извлечь кусочки мицелия и поместить в каплю воды на предметном стекле. Приготовить препарат «раздавленная капля» и микроскопировать с объективом 40^x.

Предполагаемые результаты.

Первое время гриб интенсивно накапливает кислоту до тех пор, пока в среде достаточно сахара (колбы № 1 и 2), из которого он может синтезировать кислоту. Однако, как только среда истощается (опыт продолжается в прежних условиях), мицелий гриба продолжает увеличиваться в весе, но гриб начинает перерабатывать кислоту, питаясь от части за ее счет (колба № 3). Культура же, получившая подкормку сахаром (колба № 4), дает значительный скачок в сторону большего накопления кислоты и увеличения сухого веса мицелия.

Задание.

Зарисовать в рабочей тетради структуру образовавшегося поверхностного мицелия.

Результаты опыта записать в таблицу.

Сделать выводы об образовании лимонной кислоты грибом *Aspergillus niger* в различных условиях.

Зарисовать в рабочей тетради результат микроскопии приготовленного из мицелия препарата.

Записать в рабочей тетради и сопоставить результаты определения титруемой и активной кислотности.

Контрольные вопросы:

1. Дать общую характеристику плесневых грибов *Aspergillus niger* и описать их экологическое значение и возможности использования в производственной практике;
2. Дать общую характеристику биохимических клеточных процессов при лимоннокислом брожении;
3. Описать сущность происходящих процессов под воздействием внешних факторов.

Литература:

1. Биотехнология: теория и практика: Учебное пособие для вузов / Н.В. Загоскина с соавт.; Под ред. Н.В. Загоскиной, Л.В. Назаренко. – М.: Изд. Оникс, 2009.
2. Биотехнология. Принципы и применение: Пер. с англ. / Под ред. И. Хиггинса, Д. Беста, Дж. Джонса. – М.: Мир, 1988.
3. Биотехнология органических кислот и белковых препаратов: учебное пособие / Е.И. Муратова, О.В. Зюзина, О.Б. Шуняева. – Тамбов : Изд-во Тамб. гос. техн. ун-та, 2007.
4. Бирюков В.В. Основы промышленной биотехнологии. – М.: КолосС, 2004. (Учебники и учебные пособия для студентов высших учебных заведений).
5. Мюллер Э., Лёффлер В. Микология: Пер. с нем. – М.: Мир, 1995.
6. Практикум по микробиологии: Учебное пособие для студентов высших учебных заведений / А.И. Нетрусов, М.А. Егорова, Л.М. Захарчук и др.; Под ред. А.И. Нетрусова. – М.: Издательский центр «Академия», 2005.