

Министерство образования и науки Российской Федерации
Тольяттинский государственный университет
Институт химии и инженерной экологии
Кафедра «Технологии производства пищевой продукции
и организация общественного питания»

Е.В. Павлова

ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ

Электронный лабораторный практикум

© ФГБОУ ВПО «Тольяттинский
государственный университет», 2014

УДК 573.6(075.8)

ББК 30.16я73

Рецензенты:

канд. биол. наук, научный сотрудник Института экологии
Волжского бассейна РАН (г. Тольятти) *А.В. Иванова*;

канд. хим. наук, доцент Тольяттинского государственного
университета *Н.Н. Пономарева*.

Павлова, Е.В. Основы биотехнологии : электронный лабораторный
практикум / Е.В. Павлова. — Тольятти : Изд-во ТГУ, 2014. — 80 с. :
1 оптический диск.

Электронный лабораторный практикум «Основы биотехнологии» содержит описание проводимых исследований, перед каждой работой помещен перечень используемых оборудования и материалов. Приведена пропись питательных сред и расписаны методы получения используемых чистых культур микроорганизмов. К каждому лабораторному занятию сформулированы вопросы для контроля знаний и приведён список рекомендованной литературы для изучения материала.

Предназначен для студентов очного и заочного обучения направлений подготовки 020100.62 «Химия» и 240100.62 «Химическая технология».

Текстовое электронное издание

Рекомендовано к изданию научно-методическим советом
Тольяттинского государственного университета.

Минимальные системные требования: IBM PC-совместимый компьютер: Windows XP/Vista/7/8; 500 МГц или эквивалент; 128 Мб ОЗУ; SVGA; Adobe Reader.

Номер государственной регистрации электронного издания

© ФГБОУ ВПО «Тольяттинский
государственный университет», 2014

Редактор *Т.Д. Савенкова*
Технический редактор *З.М. Малявина*
Компьютерная верстка: *Л.В. Сызганцева*
Художественное оформление,
компьютерное проектирование: *Г.В. Карасева*

Дата подписания к использованию 13.10.2014.

Объем издания 52,3 Мб.

Комплектация издания: компакт-диск, первичная упаковка.

Заказ № 1-62-13.

Издательство Тольяттинского государственного университета

445667, г. Тольятти, ул. Белорусская, 14

тел. 8(8482) 53-91-47, www.tltsu.ru

Содержание

Введение.....	5
Лабораторная работа 1. Морфология основных групп микроорганизмов и структуры клетки прокариот. Способы окрашивания включений цитоплазмы и структур микроорганизмов	6
Лабораторная работа 2. Получение чистых культур микроорганизмов	16
Лабораторная работа 3. Влияние разных режимов стерилизации на гибель микроорганизмов	24
Лабораторная работа 4. Влияние состава питательной среды на накопление амилазы при твёрдофазном культивировании микомицета	32
Лабораторная работа 5. Молочнокислое брожение.....	42
Лабораторная работа 6. Спиртовое брожение.....	48
Лабораторная работа 7. Уксуснокислое брожение.....	51
Лабораторная работа 8. Маслянокислое брожение.....	54
Лабораторная работа 9. Микрофлора почвы.....	57
Лабораторная работа 10. Выделение чистых культур нефтеокисляющих микроорганизмов.....	62
Лабораторная работа 11. Выделение чистых культур азотфиксирующих бактерий.....	64
Лабораторная работа 12. Получение накопительной культуры денитрифицирующих бактерий.....	69
Лабораторная работа 13. Получение накопительных культур микроорганизмов, разрушающих целлюлозу.....	71
Лабораторная работа 14. Получение накопительных культур сульфатредуцирующих бактерий.....	73
Лабораторная работа 15. Трансформация клеток <i>Escherichia coli</i> НВ 101 плазмидной ДНК, имеющей гены устойчивости к антибиотикам.....	75
Правила техники безопасности при выполнении лабораторных работ по биотехнологии	79
Рекомендуемая литература	80

Введение

Предлагаемое пособие представляет собой практикум по выполнению лабораторных работ по курсу «Основы биотехнологии» для студентов очного и заочного обучения направлений подготовки 020100.62 «Химия» и 240100.62 «Химическая технология».

В лабораторном практикуме дано необходимое описание проводимых исследований, перед каждой работой помещен перечень используемых оборудования и материалов. Приведена пропись питательных сред и расписаны методы получения используемых чистых культур микроорганизмов. К каждому лабораторному занятию сформулированы вопросы для контроля знаний и приведён список рекомендованной литературы для изучения материала.

По мере выполнения лабораторных работ студентами будут освоены методы стерилизации и приготовления питательных сред; методы культивирования клеток; определение физиологической активности дрожжей при спиртовом брожении; изучены свойства микроорганизмов, вызывающих молочнокислое, уксуснокислое, маслянокислое и спиртовое брожение; проведена трансформация клеток *Escherichia coli* HB 101 плазмидной ДНК, имеющей гены устойчивости к антибиотикам; предусмотрено изучить участие микроорганизмов в процессах разложения органических азотсодержащих веществ, в превращении углеводов в органические кислоты и другие продукты, в восстановлении неорганических соединений серы до сероводорода и окисления соединений железа, что способствует круговороту веществ.

Высокий уровень метаболизма, уникальная скорость размножения при относительно простой структурной организации сделали прокариот излюбленной моделью в экспериментах по биотехнологии, они широко используются в биотехнологических процессах для получения биологически активных веществ. Подобное знакомство с микромиром позволит значительно расширить кругозор студентов, обогатить их представления об окружающей природе, роли и деятельности не видимых человеческим глазом организмов.

Лабораторная работа 1

МОРФОЛОГИЯ ОСНОВНЫХ ГРУПП МИКРООРГАНИЗМОВ И СТРУКТУРЫ КЛЕТКИ ПРОКАРИОТ. СПОСОБЫ ОКРАШИВАНИЯ ВКЛЮЧЕНИЙ ЦИТОПЛАЗМЫ И СТРУКТУР МИКРООРГАНИЗМОВ

Цель – изучение морфологии бактерий и способы окрашивания различных включений и структур клеток прокариот.

План проведения занятия

1. Изучить морфологические свойства основных групп микроорганизмов и структурные компоненты прокариотной клетки.

2. Рассмотреть методику окраски нуклеоида в клетках дрожжей, описать метод, приготовить и окрасить мазок, изучить бактериологический препарат под иммерсионной системой микроскопа.

3. Усвоить методы окраски волютина, гликогена, гранулы (крахмалоподобное вещество), включений жировой природы, описать методы, выполнить окраску фиксированных и прижизненных мазков, изучить бактериологические препараты под иммерсионной системой микроскопа и зарисовать.

4. Усвоить методы окраски капсул микроорганизмов. Приготовить бактериологические препараты по обнаружению капсул в исследуемых культурах бактерий, изучить бактериологические препараты под иммерсионной системой микроскопа и зарисовать.

Используемое оборудование и материалы: предметные стекла в жидкости Никифорова, покровные стекла, стерильные пипетки, чашки Петри, химические стаканы, водяная баня, микроскопы, спиртовки, спички, фильтровальная бумага, карболовый фуксин, метиленовый синий, генцианвиолет, раствор Люголя, черная тушь, судан-3, концентрированный раствор йода, 40 %- и 1 %-ные растворы формалина, 1Н раствор HCl, 5 %-ный раствор хромовой кислоты, 1 %-ный раствор H₂SO₄. Культуры: дрожжи, сенная палочка, картофельная палочка.

Основные сведения о морфологии и строении микроорганизмов

Бактерии составляют наиболее обширную и весьма разнообразную группу микроорганизмов. Это одноклеточные организмы, размножающиеся простым делением клетки. Морфологические различия: по форме, величине, взаимному расположению клеток, по наличию или отсутствию жгутиков и капсул, по способности клеток к спорообразованию. Морфологические признаки учитываются при определении систематического положения микроорганизмов.

По форме бактерии делят на три группы: шаровидные, палочковидные и извитые.

Шаровидные бактерии – кокки

Систематическим признаком при делении родов шаровидных бактерий служат направление плоскости деления клетки и характер взаимного расположения клеток. Диаметр кокков – 0,5–1,2 мкм.

Моно- или микрококки (род *Micrococcus*). Их клетки делятся в одной плоскости и сразу после деления располагаются одиночно.

Диплококки (род *Diplococcus*) и стрептококки (род *Streptococcus*) образуются при делении клеток в одной плоскости, у диплококков клетки располагаются попарно, у стрептококков – в цепочку.

Тетракокки (род *Tetracosus*) возникают при делении клеток в двух взаимно-перпендикулярных плоскостях, клетки образуют группы по четыре особи.

Сарцины (род *Sarcina*) формируются при делении клеток в трех взаимно перпендикулярных областях, при этом образуются пакеты из восьми-шестнадцати и более. Стафилококки (род *Staphylococcus*) представлены скоплением клеток, напоминающих виноградные гроздья. Деление клеток идет в нескольких плоскостях.

Помимо правильной шаровидной формы кокки могут иметь овальную или ланцетовидную форму (пневмококки), бобовидную форму кофейного зерна (гонококки, менингококки). Шаровидные бактерии не имеют жгутиков, неподвижны и споры не образуют. Исключение составляет мочева сарцина – *Sarcina ureae*.

Палочковидные бактерии

Это самая многочисленная и разнообразная группа бактерий. Палочковидные бактерии различают по величине клеток, их расположению, очертанию концов клетки, по наличию или отсутствию жгутиков. Длина клеток палочковидных бактерий колеблется от 0,7 до 15 мкм, ширина – 0,5–1 мкм. Размер клеток зависит от условий выращивания культуры. Большинство бактерий этой формы спор не образуют и относятся к роду *Bacterium* (обозначают *Bact.*, или *B.*).

Те палочковидные бактерии, которые при неблагоприятных условиях способны формировать споры, принято называть бациллами (обозначают *Bacillus* – *Bac.*). Бактерии и бациллы могут располагаться одиночно, попарно или соединяться в цепочки. В последнем случае они называются стрептобациллами или стрептобактериями.

Извитые бактерии

В зависимости от формы клетки и количества витков их делят на три вида:

- 1) вибрионы (род *Vibrio*) представлены короткими изогнутыми палочками в виде запятой. Клетки вибрионов изогнуты на 1/3 оборота;
- 2) спириллы (род *Spirillum*) имеют вид латинской буквы S. Они значительно крупнее. Длина – 15–20 мкм, клетки имеют два-три витка;
- 3) спирохеты (пор. *Spirochaetales* Bergey) – это очень тонкие длинные клетки, штопорообразные, с большим числом витков. Длина клетки превосходит ширину в 5–200 раз. По числу витков клетки одних видов отличаются от других.

Вибрионов и спирилл можно наблюдать на мазках, приготовленных из настоев навоза или стоячей воды.

Для ознакомления со спирохетами готовят мазки из зубного налета в капле воды. Среди прочих бактерий легко выделяются большая и малая зубная спирохеты (*Spirochaeta macro-* и *microdentata*). Среди структурных компонентов прокариот различают как основные, так и временные.

К **основным** структурным компонентам прокариот относятся:

- клеточная стенка, имеющая различное строение у грам(+) и грам(-) бактерий;

- цитоплазматическая мембрана с включениями (мезосомы, хроматофоры);
- цитоплазма – гомогенная белково-коллоидная фракция с растворенными в ней компонентами (белками, ферментами, продуктами обменных реакций);
- нуклеоид – ядерное вещество прокариот, представленное молекулой ДНК в виде длинной нити, перекрученной и замкнутой в кольцо, собственно ядерная мембрана отсутствует;
- плазмиды – внехромосомные генетические элементы, имеющие свои небольшие кольцевые молекулы ДНК;
- прочие постоянные включения цитоплазмы – органеллы: рибосомы, хлоросомы, аэросомы, фикобилисомы, карбоксисомы.

К **временным** структурным компонентам прокариот относятся:

- жгутики, возникающие на определенной стадии жизненного цикла и служащие для передвижения бактерий;
- реснички, выполняющие функции взаимодействия с другими клетками бактерий (при конъюгации) или с субстратом;
- капсула, или слизистый защитный матрикс, окружающий клетку прокариот снаружи;
- запасные питательные вещества в виде включений – отложений их в цитоплазме. Сюда входят вещества различной природы.

Полифосфаты – представлены волютином. Зерна волютина округлой формы диаметром 0,5 мкм. В них входит комплекс неорганических полифосфатов и РНК, где содержится запас азота и фосфора в клетке. Они служат источником потенциальной энергии и расходуются при голодании бактерий. Волютиновые зерна фиолетово-красного цвета, выражены хорошо при окраске метиленовым синим в клетках дрожжей, молочнокислых и ряда патогенных бактерий.

К резервным питательным веществам относят гранулы углеводной природы – гликоген (животный крахмал) и гранулезу (крахмалоподобное вещество). Гликоген легко выделяется при окраске йодом в клетках дрожжей и аэробных бацилл (гранулы бурокрасного цвета). Гранулеза характерна для анаэробных споровых бактерий рода *Clostridium* (гранулы темно-синего цвета). Гликоген и гранулеза являются энергетическим запасом клетки и расходуются при ее голодании.

Жиры в клетках бактерий видны в виде мелких капель, неравномерно распределенных в цитоплазме. Жировые включения накапливаются при обильном питании клеток безазотистыми веществами или являются результатом жирового перерождения цитоплазмы при старении культуры. Их легко можно выявить в клетках дрожжей и аэробных бацилл.

У серобактерий встречаются включения молекулярной серы, также служащей для них источником энергии. В процессе жизнедеятельности у ряда бактерий происходит накопление зерен аморфного карбоната кальция, кристаллов щавелевой и других кислот, гранул или кристаллов белка. Все виды включений бактериальной клетки можно выявить при помощи специальных цитохимических методов окраски.

Порядок выполнения работы

Окраска нуклеоида в клетках дрожжей

1. Из суточной культуры дрожжей готовят суспензию (при необходимости разбавляют стерильной дистиллированной водой) и готовят мазок на стерильной поверхности предметного стекла.

2. Мазок высушивают на воздухе.

3. На поверхность мазка наносят раствор судана-3 на 3 мин, высушивают.

4. Подвергают мазок гидролизу, для чего погружают предметное стекло в стаканчик с 1Н раствором соляной кислоты, который ставится в водяную баню, предварительно нагретую до 60 °С. При этой температуре раствора кислоты процесс гидролиза происходит за 2–3 мин.

5. Затем тщательно промывают мазок водой.

6. Мазок заливают 1 %-ным раствором формалина на 2 мин и промывают водой.

7. Окрашивают мазок 1 %-ным раствором фуксина в течение 1–2 мин, промывают водой, высушивают на воздухе, микроскопируют под иммерсионным объективом. На розовом фоне цитоплазмы выделяется нуклеотид, окрашенный в ярко-малиновый цвет, в виде одного образования в центре или двух телец, смещенных к полюсам.

Окраска волютина дрожжей по методу Омелянского

1. Сделать тонкий мазок культуры дрожжей, высушить на воздухе, зафиксировать над пламенем горелки.
2. Окрасить мазок фуксином в течение 1 мин, затем смыть краситель водой.
3. Обработать мазок 1 %-ным раствором H_2SO_4 в течение 30 с, затем тщательно мазок промыть водой.
4. Окрасить мазок метиленовым синим в течение 1 мин, промыть водой, высушить между листками фильтровальной бумаги. Микроскопировать под иммерсионной системой микроскопа. На голубом фоне цитоплазмы видны красные зерна волютина.

Окраска волютина по методу Леффлера

1. Тонкий фиксированный мазок культуры микроорганизмов (дрожжей или *Vac. subtilis*) окрашивают синькой Леффлера в течение 3 мин.
2. Мазок промывают водой, не высушивают, а накрывают покровным стеклом, микроскопируют при увеличении 40 или 90. Зерна волютина на препарате окрашены в красновато-фиолетовый цвет, цитоплазма — в голубой.
3. Для более четкой картины волютина под покровное стекло добавляют каплю 1 %-ного раствора серной кислоты. При этом цитоплазма обесцвечивается, а зерна волютина сохраняют красно-фиолетовую окраску.

Окраска гликогена и гранулезы

1. Для обнаружения гранулезы на предметное стекло наносят взвесь культуры *Clostridium pasteurianum*, добавляют каплю раствора Люголя, накрывают покровным стеклом и микроскопируют под объективом 40 или 90. Гранулеза окрашивается в темно-синий цвет.
2. Для обнаружения гликогена из культуры дрожжей готовят мазок, фиксируют смесью Никифорова в течение 5 мин. Затем мазок окрашивают концентрированным раствором Люголя (30–40 с), промывают водой, накрывают покровным стеклом и микроскопируют под объективом 40. Гранулы гликогена окрашиваются в красновато-бурый цвет.

Выявление включений жировой природы

1. Жировые включения в клетках некоторых дрожжей можно видеть и без специальных методов окраски, пользуясь прижизненным микропрепаратом. В клетках дрожжей можно видеть крупные капли жира, сильно преломляющие свет.

2. У бактерий жировые включения легче выявляются на окрашенных препаратах. К капле водной взвеси микроорганизмов на предметном стекле добавляют каплю раствора судана-3, накрывают покровным стеклом и микроскопируют под увеличением $\times 40$. Судан-3 растворяется в жировых включениях, окрашивая их в оранжево-красный цвет, а жироподобные вещества – в желтый.

Контрастная окраска жира

К капле густой суспензии микроорганизмов на предметном стекле добавляют одну каплю 40 %-ного раствора формалина на 5 мин, затем одну каплю метиленового синего на 10 мин, после чего наносят каплю раствора судана-3 и оставляют на 5 мин. Препарат покрывают покровным стеклом и микроскопируют под объективом 40 или 90. Жировые включения окрашиваются в красно-оранжевый цвет, цитоплазма – в синий.

Выявление капсул на негативном прижизненном препарате

Многие виды бактерий на определенной стадии развития формируют капсулу, ее образованию способствует избыток углеводов и солей кальция в питательной среде. Капсула представлена слизистым слоем, где присутствуют полисахариды: декстраны, галактаны, целлюлозы. Сюда входят и полипептиды, состоящие главным образом из цепочек молекул глютаминовой кислоты. Химический состав капсул различных бактерий характеризуется строгой специфичностью. Для некоторых бактерий наличие капсулы – важный диагностический признак.

На обезжиренное предметное стекло наносят большую каплю неразбавленной черной туши и в нее вносят каплю исследуемой культуры микроорганизмов. Смесь тщательно перемешивают и накрывают покровным стеклом, которое осторожно прижимают к предметному стеклу полоской фильтровальной бумаги. Препарат

микроскопируют при увеличении $\times 40$. На темном фоне туши выявляются прозрачные зоны капсул вокруг резко очерченных клеток.

Окраска жгутиков по методу Шимвелла

Многие палочковидные бактерии, вибрионы и спириллы на поверхности клетки несут жгутики. Из кокковых форм жгутики имеют лишь единичные виды бактерий, например *Planosarcina ureae*. Для окраски жгутиков следует использовать молодые 6–12-часовые культуры микроорганизмов *Proteus vulgaris*, *Bacillus subtilis*.

1. Каплю суспензии микроорганизмов наносят на предметное стекло, не распределяя, чтобы не повредить жгутики, высушивают препарат на воздухе.

2. Фиксируют препарат парами 40 %-ного формалина 3–5 мин. Для этого препарат помещают в чашку Петри на обрезки стекла над двумя каплями фиксатора. Фиксированный препарат обрабатывают раствором танина-1 в течение 15 мин.

3. Раствор сливают, препарат промывают раствором танина-2, оставляя с ним на 10 мин.

4. Затем раствор танина-2 сливают, препарат промывают водой.

5. Заливают препарат 1 %-ным раствором генцианвиолета на 3–5 мин. Можно слегка подогреть до образования паров.

6. Препарат окончательно промывают водой, высушивают на воздухе, микроскопируют под иммерсионным объективом. На препарате видны клетки бактерий, окрашенные в ярко-фиолетовый цвет, со жгутиками в виде тончайших сиреневых нитей.

Окраска спор у бактерий по методу Циля

Образование спор у бактерий следует рассматривать как один из этапов в жизненном цикле клетки, связанный с переживанием клеткой неблагоприятных условий. В период спорообразования в бактериальной клетке наблюдается высокий уровень обменных процессов. В районе протоспоральной зоны накапливаются нуклеиновые кислоты, запасные белки, липиды, углеводы, некоторые минеральные соединения: соли магния, кальция. Появляется новая дипиколиновая кислота, которая в соединении с солями Са придает споре высокую термостойкость. Переход протоспоры в зрелую спору характеризуется

резким скачком в светопреломлении, слабосветящаяся проспора начинается сильно преломлять свет и ярко светиться.

Зрелая спора представлена густой цитоплазмой с тяжами ядерного вещества. Снаружи цитоплазма покрыта цитоплазматической мембраной и многослойной оболочкой: внутренней – интиной, средней – корой (кортексом), наружной – экзиной. Некоторые виды бактерий на поверхности споры имеют воздушный мешок, называемый экзоспориумом.

У бактерий выделяют три типа спорообразования: бациллярный – спора занимает центральное положение в клетке, клостридиальный – спора занимает эксцентричное положение, плектридиальный – спора формируется полярно. Сформировавшиеся свободно лежащие споры различают по форме (округлая, продолговатая, эллипсоидная) и величине.

Ввиду слабой проницаемости многослойных оболочек споры бактерии в этом случае при обычной окраске мазка не прокрашиваются и под микроскопом имеют вид бесцветных, ярко светящихся телец. Поэтому методы окраски спор основаны на применении слабых кислот, разрыхляющих оболочку споры, и дальнейшей окраски мазка сильным красителем при нагревании. Окрасившийся протопласт споры обладает высокой кислотоустойчивостью по сравнению с протопластом вегетативной клетки. Он не обесцвечивается при последующей дифференциации мазка в кислоте и сохраняет воспринятую им окраску. Вегетативные клетки бактерии полностью отмываются в кислоте и на препарате имеют цвет дополнительного красителя.

1. Тонкий мазок из культуры микроорганизмов высушить на воздухе и залить 5 %-ным раствором хромовой кислоты на 5 мин.

2. Промыть мазок водой, накрыть фильтровальной бумагой, залить раствором карболового фуксина на 6–8 мин при нагревании до образования паров, держа стекло высоко над пламенем горелки. По мере испарения краситель периодически добавляют, не давая препарату подсохнуть.

3. Тщательно промыть мазок водой и дифференцировать в 1 %-ном растворе серной кислоты 30–60 с до приобретения им слабозеленой окраски. При этом краситель под действием кисло-

ты полностью уходит из цитоплазмы вегетативных клеток. Зона проспоры в спороносных клетках и зрелые споры остаются окрашенными.

4. Мазок немедленно промыть водой (после действия H_2SO_4) и докрасить раствором метиленового синего в течение 10–15 мин.

5. Мазок окончательно промыть, высушить на воздухе и микрофотографировать с иммерсией. Споры и зона проспоры окрашиваются на препаратах в красный цвет, а вегетативные клетки – в синий или голубой.

Требования к отчету

1. Описать морфологические свойства прокариот.
2. Описать методы окрашивания различных включений и структур клеток прокариот.

Контрольные вопросы

1. На какие три основные группы делят бактерии по их форме?
2. Чем отличаются внешне сарцины от стафилококков?
3. Чем характеризуются бациллы?
4. Назовите структурные основные компоненты клетки прокариот.
5. Какие структурные элементы бактериальной клетки относят к временным?
6. Какие питательные вещества относятся к резервным, или запасным, в клетках прокариот?
7. Как окрасить нуклеоид в клетках дрожжей?
8. В чем сущность метода окраски запасных питательных веществ – волютина, гранулезы, гликогена, жировых веществ?
9. Как выявить капсулы на прижизненном препарате бактерий? Из каких веществ состоят капсулы?
10. Как отличить кластридиальную форму бацилл от плектридиальной?
11. В чем сущность окраски спор у бактерий по методу Циля?

Лабораторная работа 2

ПОЛУЧЕНИЕ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР МИКРООРГАНИЗМОВ

Цель работы – приобретение опыта по выделению чистой культуры микроорганизмов.

План проведения занятия

1. Объяснить понятия «чистая культура», «клон».
2. Объяснить и отработать методы по выделению чистых культур микроорганизмов.
3. Методы разведения чистых культур.

Используемые оборудование и материалы: чашки Петри с пластинами мясопептонного агара, чашки Петри с пластинами сусло-агара, бактериологические петли, шпатель Дригальского, предметные и покровные стёкла, пробирки с 5 мл стерильной дистиллированной воды, пробирки со стерильным мясопептонным бульоном, спиртовки, микроскопы.

В биотехнологических производствах в качестве одного из видов исходных материалов используют чистую культуру микроорганизмов. Чистой культурой (ЧК) называют популяцию, представляющую собой потомство одной или нескольких клеток одного вида микроорганизмов. В генетических исследованиях пользуются клонами – чистыми культурами, полученными от одной споры или гаплоидной клетки.

В естественных условиях различные объекты содержат, как правило, смешанную микрофлору. Для диагностических исследований с целью выяснения возбудителей порчи пищевых продуктов или их обсемененности микроорганизмами требуется выделение чистой культуры. Методы выделения ЧК могут быть *прямыми* и *косвенными*.

Прямые методы основаны на выделении ЧК под непосредственным контролем через микроскоп, например метод Линднера. Известны методы извлечения одной клетки из взвеси микроорганизмов с помощью специальных приборов (микроманипулятор, микроселектор Перфильева) под контролем микроскопа. Однако наиболее распространенным способом выделения чистых культур микроорганизмов являются *косвенные методы*, основанные на

изоляции одной микробной клетки от массы микроорганизмов и последующем выращивании потомства этой клетки на питательных средах изолированно от других видов. Для посева чаще используются агаризованные среды в чашках Петри. Этот метод предложен известным немецким микробиологом Кохом и носит название метода пластинчатых (или чашечных) культур Коха. Основной задачей метода является разведение концентрации микроорганизмов в исследуемом материале с таким расчетом, чтобы при посеве его на питательной среде выросли изолированные колонии. Существуют два основных метода разведения исследуемого материала:

- 1) на поверхности плотной питательной среды методом истощающего посева;
- 2) предварительное разведение материала в физиологическом растворе или стерильной водопроводной воде в пробирках и высев готового разведения на плотную питательную среду.

Метод истощающего посева на поверхности плотной среды используется для выделения чистых культур аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов. С этой целью для посева берут ряд чашек Петри с плотной средой; в первую чашку наносят исследуемый материал и распределяют его по поверхности шпателем Дригальского или бактериологической петлей. Затем, не стерилизуя шпатель (или петлю), производят посев последовательно на поверхность среды в остальных чашках. Количество материала, внесенного в среду, при этом последовательно убывает (истощающий посев).

Метод *предварительного разведения* исследуемого материала в стерильной водопроводной воде (или физиологическом растворе) используется для выделения чистых культур микроорганизмов как аэробных, так и анаэробных. Готовят разведения материала в 10–100 раз и более (в зависимости от предполагаемой обсемененности микроорганизмами) и производят посев разведений, пользуясь поверхностным или глубинным методом. Выделение чистых культур строгих анаэробов по методу Коха требует условий выращивания без доступа кислорода. Если разведение исследуемого материала выполнено правильно, на поверхности среды или в ее толще (в зависимости от метода посева) образуются изолированные колонии микроорганизмов, видимые невооруженным глазом. Каждая колония состоит из клеток одного вида, однако для выделения чистой

культуры необходимо пересеять колонию на отдельную среду, т. е. изолировать ее от микроорганизмов других видов.

Завершающим этапом выделения чистой культуры микроорганизмов неизвестного вида является проверка ее чистоты на изолированной среде визуально (просмотр посева невооруженным глазом) и микроскопией мазка.

Видовое название чистых культур большинства микроорганизмов устанавливают путем изучения морфологических, культуральных и биологических свойств. Для идентификации плесневых грибов достаточно изучить морфологические и культуральные свойства. По совокупности изученных признаков определяют таксономическое положение (положение в систематике) микроорганизмов, пользуясь специальными определителями. Морфологические свойства исследуют при микроскопии прижизненных или фиксированных окрашенных препаратов. Морфологическая характеристика микроорганизма должна включать форму клеток, их сочетание и размеры, подвижность, способность к образованию спор, наличие включений. При описании морфологии следует указывать возраст культуры, состав среды, условия культивирования. Культуральные свойства микроорганизмов устанавливают по особенностям роста на питательных средах.

На жидких питательных средах отмечают характер распределения культуры – равномерное, вызывающее помутнение среды, придонное или поверхностное, что обусловлено отношением микроорганизмов к кислороду воздуха. Мутность среды может быть хлопьевидной, однородной. Пленка – тонкой, плотной и рыхлой, гладкой, морщинистой или складчатой. Осадок – скудным или обильным; плотным, рыхлым, слизистым.

На плотных питательных средах исследуют характер колоний. Поскольку колония образуется в результате размножения одной клетки, то ее строение зависит от особенностей деления клеток данного вида микроорганизмов. Наиболее типично видовые признаки выражены у поверхностных колоний:

- форму, профиль, блеск и цвет определяют визуально;
- край и структуру – при малом увеличении микроскопа;
- консистенцию (мягкая, слизистая, тягучая или хрупкая) определяют прикосновением к ее поверхности петлей;

- размеры – обычной линейкой или окулярным микрометром при малом увеличении микроскопа (колонии точечные или «россинчатые» – менее 1 мм в диаметре, мелкие – 1–2, крупные – более 4 мм).

Физиологические свойства микроорганизмов обусловлены ферментативной активностью и, следовательно, выражают особенности обмена веществ клетки. Это важный дифференциальный признак, который используется при идентификации бактериальных и дрожжевых видов. Распространенным методом изучения физиологических свойств микроорганизмов является выращивание их на дифференциально-диагностических средах, позволяющих определить биохимическую активность микроорганизмов в отношении веществ, введенных в среду.

Отношение к кислороду (тип дыхания) определяется по характеру роста в столбике агара (МПА) при посеве уколом. После инкубации в термостате в течение 48 ч при температуре 30–38 °С возможны три типа роста в зависимости от типа дыхания:

- рост шляпкой на поверхности (аэробные микроорганизмы);
- рост на дне пробирки (анаэробные микроорганизмы);
- рост, равномерный по всей длине укола (факультативно анаэробные микроорганизмы).

Протеолитические свойства определяют по выделению из питательной среды газов – продуктов расщепления белка; для этой цели культуру выращивают на МПБ или мясной воде, закрепив в пробирке полоску фильтровальной бумаги, пропитанную реактивом, реагирующим на наличие определенного газа. Так, выделение аммиака обнаруживают по синему цвету лакмусовой бумаги, сероводорода – с помощью фильтровальной бумаги, пропитанной уксуснокислым свинцом (бумага чернеет в результате образования сернистого свинца), индола – с помощью бумаги, пропитанной щавелевой кислотой (покраснение в результате образования соединения с индолом).

О протеолитических свойствах микробов судят также по способности разжижать желатин. При посеве уколом в столбик желатина через 2 часа культивирования отмечают наличие и характер разжижения – послойное, воронкообразное, пузырчатое.

Сахаролитические свойства определяют на МПБ, 1 %-ном растворе пептонной воды и других, содержащих тот или иной углевод и индикатор. Расщепление углеводов под влиянием микробов сопровождается изменением цвета индикатора в результате подкисления среды, а на жидких средах в ряде случаев и газообразованием, которое улавливают с помощью стеклянного «поплавка». Образовавшийся газ вытесняет среду и обнаруживается в поплавке в виде пузырька.

Характер свертывания лакмусового молока является важным биохимическим признаком. При посеве на лакмусовое молоко отмечают изменения pH и оценивают характер сгустка. В зависимости от того, на какую составную часть молока действуют ферменты изучаемого микроорганизма, различают следующие изменения в молоке:

- 1) кислотное свертывание – действие фермента на лактозу – сопровождается образованием плотного сгустка и повышением кислотности; цвет молока изменяется от сиреневого к красному;
- 2) пептонизация – действие протеолитических ферментов на белки молока – сопровождается образованием мутной желтоватой жидкости, среда становится щелочной из-за выделения аммиака и молоко синее.

Способности расти на картофеле выявляют при посеве микроорганизмов на скошенный стерильный ломтик картофеля. При этом отмечают дополнительный культуральный признак, а также амилолитическую способность культуры по пробе с йодом. Посиление среды после нанесения капли раствора Люголя в зоне роста микроорганизмов указывает на наличие у них фермента амилазы.

Следует подчеркнуть, что перечень исследуемых признаков, как и методы культивирования, дифференцируется в зависимости от предполагаемого вида микроорганизмов.

Порядок проведения работы

Работа выполняется в два этапа. На первом этапе (первое занятие) студенты используют пищевые продукты, имеющие один или несколько пороков микробного происхождения для выделения чистой культуры и визуального изучения.

Занятие 1. В тетради указывают по следующей схеме исходные данные исследуемого объекта.

Наименование объекта _____

Органолептические показатели продукта:

Цвет _____

Запах _____

Консистенция _____

Характеристики микробиологического порока:

Внешний вид _____

Цвет _____

Затем следует приготовить препарат «раздавленная капля» для дрожжевых и микроскопических грибов и «фиксированный мазок» для бактерий. Провести микроскопирование, выполнить микрографии и описать морфологические признаки препаратов: формы клеток, их сочетание и размеры, способность к образованию спор, форму спораносцев.

По окончании изучения необходимо классифицировать выявленные микроорганизмы по их принадлежности – микомицеты, дрожжи, бактерии.

Далее выполняются операции по выделению чистой культуры микроорганизмов методом Дригальского.

Техника выполнения посева по методу Дригальского

1. Взять каждому студенту для посева по две чашки Петри с мясопептонным агаром (для бактерий) или сусло-агаром (для дрожжей и микомицетов).

2. Промаркировать чашки Петри, указав дату, номер чашки, инициалы, поставить на стол крышками вверх.

3. С помощью профламбированной бактериологической петли взять небольшое количество изучаемого материала, внести в пробирку с 5 мл стерильной воды и хорошо перемешать.

4. Одну каплю такой взвеси с помощью петли или стерильной пипетки нанести на поверхность агара первой чашки. Стерильным шпателем Дригальского аккуратно и тщательно распределить по всей поверхности среды. Этим же шпателем (не фламбруя его) проводят по поверхности второй, при необходимости третьей чашки. По окончании посева шпатель погружают в дезинфицирующий раствор.

5. Чашки переворачивают вверх дном, чтобы накапливающаяся конденсационная вода при застывании среды и росте культуры не стекала с крышки и не размывала рост. Поставить подготовленные

посевы в термостат: чашки с МПА при температуре 37 °С, с сусло-агаром – при 32 °С.

6. Оформить протокол занятия.

Занятие 2. Второй этап работы осуществляется на следующем занятии и состоит из подсчета количества колоний, выросших на чашках Петри, описания их культуральных признаков, микроскопического контроля чистоты культуры в колониях; изоляции чистой культуры на скошенный агар в пробирку. Для этого выполняют действия в следующей последовательности.

1. Визуально, не открывая крышки чашки Петри, описать культуральные признаки колоний микроорганизмов преобладающего типа на плотных средах (МПА, СА):

Положение в среде (поверхностное или глубинное)

Форма колонии _____

Размер колонии _____

Профиль _____

Блеск _____

Цвет _____

Используя малое увеличение микроскопа отметить для колонии:

Форму края _____

Структуру _____

Для бактерий и дрожжей прикосновением к поверхности петли определяют консистенцию (мягкая, слизистая, тягучая, крупинчатая)

Консистенция _____

2. Провести микроскопирование колонии.

Для этого из небольшой части колонии приготовить фиксированный мазок и окрасить его фуксином. Микроскопировать с использованием иммерсионного объектива. Наличие однородных клеток свидетельствует о чистоте культуры. Выполнить микрографию.

3. Пересеять культуру изученной колонии на скошенный агар в пробирку. Соблюдая условия стерильности, отобрать бактериологической петлей часть микробной биомассы и посеять ее штрихом на поверхность скошенного агара. Со стороны агара на стенке пробирки указывают дату посева, Ф.И.О. и номер группы.

4. Оформить протокол.

Требования к отчёту

1. Название работы, дата выполнения.
2. Цель работы.
3. Определение терминов «чистая культура», «клон».
4. Наименование методов выделения чистой культуры прямым и косвенным способами.
5. Сущность методов выделения ЧК.
6. Перечислить операции по выделению чистой культуры методом Дригальского.
7. Схема записи результатов первого занятия, микрография.
8. Перечень технических приемов, используемых для изучения культуральных и морфологических признаков выделенной культуры на втором занятии, микрографии.
9. Схема записи результатов второго занятия.
10. Заключение о видовой принадлежности.

Контрольные вопросы

1. Что следует понимать под терминами «чистая культура» и «клон»?
2. Каково назначение чистой культуры?
3. На каких приемах основаны методы выделения чистой культуры?
4. Какой ученый предложил метод выделения чистой бактериальной культуры?
5. Чем отличаются методы выделения чистой бактериальной культуры?
6. Перечислите последовательность операций метода Дригальского по выделению чистой культуры.
7. В чем заключается завершающий этап выделения чистой культуры?
8. Какие признаки устанавливают при идентификации чистой культуры?
9. Какие питательные среды рекомендуются для выделения чистой культуры?
10. Какие виды микробных поражений характерны для пищевых продуктов и продовольственного сырья?

Лабораторная работа 3

ВЛИЯНИЕ РАЗНЫХ РЕЖИМОВ СТЕРИЛИЗАЦИИ НА ГИБЕЛЬ МИКРООРГАНИЗМОВ

Цель работы – изучение эффективности различных методов и режимов стерилизации.

Используемое оборудование и материалы: автоклав, чашки Петри с пластинами мясопептонного агара (МПА), чашки Петри с пластинами сусло-агара (СА), бактериологические петли, шпатель Дригальского, предметные и покровные стёкла, спиртовки, микроскопы, стерильные лабораторные пипетки на 1 см³, пробирки с 9 мл стерильной воды, ледяная уксусная кислота, взвеси бактериальные, взвесь из дрожжей, взвесь из микомицетов.

План проведения занятия

1. Характеристика методов тепловой обработки, приводящих к гибели микроорганизмов.
2. Действие химических веществ, органических и неорганических соединений на микробную клетку.
3. Проведение микробиологического исследования по изучению влияния температуры, излучения и ледяной уксусной кислоты на микробную, дрожжевую клетки и спору плесневых грибов.

Ряд биотехнологических производств и отдельные стадии получения продукции с использованием биотехнологических приемов требуют обеспечения асептических условий.

Под асептическими условиями понимают мероприятия, режимы, препятствующие попаданию контаминантов. Термином «*контаминанты*» обозначают постороннюю микрофлору, микроорганизмы-загрязнители.

Под созданием и поддержанием асептических условий в технологии следует понимать:

- обеспечение условий получения чистых культур в лаборатории и специализированных отделениях в растительных аппаратах, камерах;
- стерилизацию, герметизацию оборудования и коммуникаций;

- специальные приемы при введении добавок, посеве, отборе проб;
- стерилизацию пеногасителей, питательных сред, воздуха.

Под *стерилизацией* понимают полное освобождение любого материального потока, а также оборудования и коммуникаций от жизнеспособных микроорганизмов и их спор.

Процессы, использование на практике которых способствует достижению и поддержанию асептических условий, можно разделить на две группы: процессы, уничтожающие постороннюю микрофлору; процессы, удаляющие микроорганизмы из материального потока.

При выборе метода стерилизации следует учитывать чувствительность микроорганизмов к применяемым факторам, а также их численность, видовую принадлежность, содержание в них влаги, физиологическую форму (вегетативная, споровая), возраст клеток и спор, значение рН, химический состав, физические свойства среды и ее объем.

Гибель микроорганизмов при стерилизации обусловлена повреждением биологически важных макромолекул клетки и, как следствие, нарушение определенных физиологических функций. Так, отмирание клеток при термообработке во влажной среде наступает из-за денатурации белков, освобождения нуклеиновых кислот, инактивации ферментов, повреждения цитоплазматической мембраны. При воздействии на клетки сухого жара гибель происходит в результате активных окислительных процессов и нарушения клеточных структур.

В пищевых производствах на губительном действии высоких температур основаны многие приемы по уничтожению микроорганизмов в пищевых продуктах и других объектах: кипячение, варка, обжарка, пропаривание, бланширование, пастеризация, стерилизация.

Пастеризация – это нагревание материала при температуре ниже 100 °С в течение 20–40 мин. При пастеризации погибают не все микроорганизмы, некоторые термоустойчивые бактерии, а также споры остаются живыми. Поэтому пастеризованные продукты следует медленно охлаждать до 4–8 °С и хранить в холоде, чтобы задержать прорастание спор и развитие сохранившихся клеток. Пастеризации подвергают молоко, пиво, вино, икру, фруктовые соки.

Стерилизация – это термическая обработка при температурах выше 100 °С, в результате которой гибнут и вегетативные клетки, и их споры. Стерилизуют баночные консервы, многие предметы и материалы в медицинской практике, питательные среды и оборудование в биотехнологическом производстве.

Воздействие на микроорганизмы различных форм **лучистой энергии**, представляющей собой электромагнитные колебания волн различной длины, проявляется по-разному и зависит от длины волны, дозы облучения.

При облучении наиболее угнетаемым в клетке процессом является окислительное фосфорилирование, изменяются физико-химические свойства нуклеопротеидов, происходят изменения в ДНК, нарушаются транскрипция, трансляция, функции мембран, угнетаются энергетические процессы. Возможны все виды мутаций: геномные – кратные изменения гаплоидного числа хромосом; хромосомные – структурные или численные изменения хромосом; генные или точковые – изменение молекулярной структуры генов, в результате синтезируются белки, утратившие свою биологическую активность.

Среди **химических веществ** можно выделить антисептики – губительно действующие на микроорганизмы (бактерицидные, фунгицидные) и задерживающие развитие (бактериостатические, фунгистатические). Эффективность действия антисептиков зависит от природы вещества, концентрации, биологических особенностей микроорганизмов, продолжительности воздействия, температуры, рН и состава среды. Вегетативные клетки более чувствительны к антисептикам, чем споры.

Из **неорганических соединений** сильнодействующими являются соли тяжелых металлов. Бактерицидное действие проявляют окислители Cl_2 , I_2 , H_2O_2 , KMnO_4 , H_2SO_4 , HCl , H_2S , CO_2 , SO_2 .

Из **органических соединений** ядовиты для микроорганизмов фенолы, альдегиды, спирты, органические кислоты (салициловая, уксусная, бензойная, сорбиновая), эфирные масла, смолы, красители (генцианвиолет, фуксин, бриллиантовая зелень).

Механизм действия антисептиков различен:

- повреждение клеточной стенки и нарушение мембраны;
- нарушение обмена веществ в результате взаимодействия с компонентами клетки после проникновения в нее;
- воздействие на белки, ферменты;
- растворение липидов клеточных мембран;
- изменение рН среды.

Химические вещества используют для дезинфекции воды, тары, оборудования, инвентаря, как консерванты готовой продукции, сырья. Применение антисептиков ограничено и строго нормируется по дозе, цели обработки, назначению продукции.

Порядок выполнения работы

Лабораторная работа выполняется в несколько этапов. На первом занятии студенты стерилизуют объекты при различных термических режимах, дозах излучения и химической обработкой. На втором занятии производят анализ результатов.

Занятие 1. Объектом обработки является суспензия нескольких видов микроорганизмов: бактерий, дрожжей, спор микомицетов. Она подвергается воздействию термообработкой, облучением УФ-лучами и воздействию уксусной кислотой.

Для изучения **влияния величины температуры** на гибель микроорганизмов три пробирки с 10 мл исходной суспензии помещают поочередно на 15 мин в автоклав и стерилизуют соответственно при 0,5 атм (112 °С), при 1 атм (121 °С) и при 1,5 атм (127 °С). После стерилизации с соблюдением условий асептики стерильной пипеткой на 1 мл по одной капле обработанной суспензии вносят на поверхность агаризованной среды СА и МПА в чашки Петри и шпателем распределяют по поверхности. Чашки подписывают, переворачивают и помещают в термостат на 1–2 суток при 37 °С.

Следует определить количество клеток в исходной суспензии. Для этого из пробирки с исходной взвесью берется 1 мл и вносится в пробирку с 9 мл стерильной воды, затем 1 мл разведенной взвеси разбавляется в 100 и 1000 раз. Из этих пробирок по 1 капле взвеси вносят на чашки Петри с СА и МПА, равномерно распре-

деляют шпателем по пластине питательной среды, маркируют и помещают в термостат.

Для изучения **кинетики гибели клеток** одну пробирку с исходной суспензией помещают в кипящую водяную баню и через каждые 15 мин в течение часа отбирают стерильной пипеткой (всякий раз новой) каплю суспензии и вносят на агаризованные пластинки с СА и МПА в чашки Петри. Каплю распределяют шпателем по поверхности среды. Чашки подписывают, переворачивают и помещают в термостат.

Для изучения **влияния дозы облучения** из пробирок с исходными суспензиями микроорганизмов стерильной пипеткой на поверхности четырех чашек с МПА и четырех чашек с СА вносят с соблюдением правил асептики по одной капле суспензии. Распределяют шпателем их по поверхности среды. Устанавливают восемь чашек под бактерицидной лампой на расстоянии 40 см от нее. Через 10 мин вынимают первые две чашки, последующие попарно с интервалом 10 мин. Подписывают, переворачивают и устанавливают чашки Петри в термостат.

Для изучения **влияния концентрации органических кислот** на микроорганизмы используют четыре пробирки с исходной суспензией, в каждую из которых вносят ледяную уксусную кислоту по схеме.

Схема внесения реагента

Номер пробирки	1	2	3	4
Объем суспензии, мл	10	10	10	10
Количество ледяной уксусной кислоты, мл	0,01	0,02	0,03	0,04

Аккуратно взбалтывают содержимое пробирок и оставляют в покое на 15 мин. Затем из каждой пробирки стерильными пипетками отбирают по одной капле обработанной суспензии и наносят на агаризованную среду СА и МПА. Распределяют каплю по всей поверхности пластинки среды шпателем. Чашки маркируют, переворачивают и помещают в термостат.

Занятие 2. Результаты воздействия стерилизующих факторов оценивают по числу колоний на поверхности агаризованной среды путем прямого подсчета. Для облегчения подсчета пластинку со стороны дна чашки делят на секторы и считают колонии по секторам. Полученные данные заносят в таблицы.

**Результаты учета количества жизнеспособных организмов
после обработки исходной суспензии**

методом _____ при условиях _____
(наименование метода стерилизации)

Питательная среда	Бактерии		Дрожжи		Микомицеты	
	Количество КОЕ	Титр клеток, кл/мл	Количество КОЕ	Титр клеток, кл/мл	Количество КОЕ	Титр клеток, кл/мл
Сусло-агар						
Мясопептонный агар						

Для наглядности следует выполнить диаграммы с использованием цветных фломастеров.

Рассчитать для каждого режима величину критерия стерилизации как натуральный логарифм отношения жизнеспособных клеток после обработки к исходному количеству клеток и построить график зависимости: $\Delta = f(t \text{ } ^\circ\text{C})$, $\Delta = f(\tau, \text{мин})$, $\Delta = f(c_{\text{асептика}}, \%)$.

По полученным результатам сделать развернутое заключение, которое должно содержать краткое изложение характера влияния стерилизующего фактора, механизм его действия на клетки микроорганизмов, условия эффективного воздействия фактора, область использования в пищевой биотехнологии этого фактора.

Требования к отчёту

1. Указать название и цель лабораторной работы.
2. Привести определения терминов «асептические условия», «стерилизация», «пастеризация».
3. Указать в виде схемы группы процессов, обеспечивающих асептические условия.

4. Указать последовательность операций первого занятия.
5. Указать последовательность действий второго занятия.
6. Оформить таблицу.
7. Построить диаграммы.
8. Заполнить сводную таблицу.

Сводная таблица

Титр, кл/мл	Бактерии		Дрожжи		Микомицеты	
	СА	МПА	СА	МПА	СА	МПА
КОЕ/мл исходного материала						
После автоклавирования 15 мин						
0,5 атм (112 °С)						
1 атм (121 °С)						
1,5 атм (128 °С)						
После кипячения при 100°С						
10 мин						
20 мин						
30 мин						
40 мин						
После облучения УФ-лучами мощностью 13 Вт						
15 мин						
30 мин						
45 мин						
60 мин						
После обработки уксусной кислотой						
1 капля						
2 капли						
3 капли						
4 капли						

Контрольные вопросы

1. Что понимают под асептическими условиями?
2. Какие факторы внешней среды могут оказывать бактерицидное действие?
3. От каких параметров зависит интенсивность губительного воздействия на клетку прокариот?
4. Каковы причины гибели клеток микроорганизмов при воздействии высоких температур, излучения, химических соединений?
5. Чем отличается пастеризация от стерилизации?
6. Какие химические вещества используют для обеспечения асептических условий?

Лабораторная работа 4

ВЛИЯНИЕ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ НА НАКОПЛЕНИЕ АМИЛАЗЫ ПРИ ТВЁРДОФАЗНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ МИКОМИЦЕТА

Цель работы – изучение влияния состава и влажности питательной среды на накопление амилолитических ферментов при твердофазном культивировании микроскопического гриба *Aspergillus oryzae*.

План проведения занятия

1. Понятие «твёрдофазная ферментация». Использование твёрдофазной ферментации в биотехнологии.
2. Приготовление питательной среды для выращивания культуры гриба *Aspergillus oryzae*.
3. Выращивание культуры гриба *Aspergillus oryzae* на приготовленной питательной среде.
4. Экстрагирование ферментов и анализ активности амилазы в вытяжке.

Используемое оборудование и материалы: пшеничные отруби, опилки, 1 %-ный раствор крахмала, 2 %-ный раствор хлорной извести, дистиллированная вода, забуференная дистиллированная вода (10 мл ацетатного буфера, рН = 4,7, и 90 мл дистиллированной воды), рабочий раствор йода, пробирки со стерильной скошенной агаризованной средой, стерильные лабораторные пипетки на 1 см³, центрифуга, колбы, цилиндры.

К твердофазной ферментации, культивированию принято относить выращивание микроорганизмов на твердом, полутвердом субстрате или твердом носителе, инертном к питательным веществам, применение которого облегчает микроорганизмам доступ к последним. Такой тип культивирования называют поверхностным.

В биотехнологических производствах твердофазное культивирование применяется при биокомпостировании, получении микотоксинов, органических кислот, ферментных препаратов, приготовлении различных блюд из зерновых, корнеплодов и плодов.

Твердофазное культивирование микроскопических грибов было одним из первых способов промышленного получения ферментных препаратов. Технология твердофазного культивирования продуцентов ферментов подразделяется на стадии получения посевного материала, производственной культуры, ферментного препарата. Посевным материалом служит поверхностно выращенная до обильного спорообразования культура гриба или глубинно выращенный мицелий. На процесс накопления эндоферментов мицелиальными грибами при их твердофазном культивировании оказывают влияние технологические условия, состав и структура питательной среды, ее влажность, температура в слое, относительная влажность и температура воздушной среды в растильной камере, длительность развития культуры, вид посевного материала. Твердофазное культивирование микроорганизмов в производстве ведут на сыпучих питательных средах на основе пшеничных отрубей, свекловичного жома, солодовых ростков и т. п. при высоте слоя 25 мм и более.

Подготовка питательной среды состоит в дозировании компонентов, их увлажнении до влажности 35–40 %, стерилизации при 120 °С в течение 1 ч, доувлажнении до 55–58 %, охлаждении до 40 °С и внесении посевного материала из расчета $7,5 \cdot 10^8$ конидий на 1 кг сухой среды. Эти операции проводят в специальном стерилизаторе. После внесения посевного материала среду перемешивают в течение 40 мин. Засеянная питательная среда влажностью 58–60 % раскладывается на перфорированные кюветы слоем 30 мм и более, которые размещаются на стеллажах растильной камеры. В процессе выращивания регулируют температуру, влажность среды и расход стерильного воздуха. Внешний теплообмен микроорганизмов при твердофазном культивировании создается в режиме конвективного движения стерильного воздуха через слой среды методом объемной аэрации. Воздух выполняет роль теплохладагента, изменяет концентрацию углекислого газа в порах среды и камере, снабжает растущую культуру кислородом. Расход воздуха увеличивается пропорционально скорости выделения тепла биомассой и составляет 1–25 л/ч на 1 т среды.

В период активного роста мицелий гриба пронизывает весь слой материала, оплетая частицы среды, поэтому в конце культивирова-

ния питательная среда имеет вид плотного коржа и называется поверхностной культурой. Она содержит 65–78 % нерастворимых веществ. Ферменты, находящиеся во внутриклеточном пространстве, из-за небольшого диффузионного сопротивления клеточной стенки мицелия легко извлекаются из культуры продуцента методом водной экстракции. При экстракции из поверхностной культуры одновременно с ферментами извлекаются другие растворимые вещества, такие как аминокислоты, низкомолекулярные углеводы, соли, кислоты и т. д., которые можно удалить в процессе осаждения органическими растворителями или высаливанием. Если принять сухие вещества в культуре гриба за 100 %, то при экстракции 22–23 % их переходят в раствор, а на долю ферментов приходится 3–5 %.

В лабораторной работе предлагается исследовать влияние состава и влажности питательной среды на уровень накопления амилолитического фермента в процессе выращивания культуры микроскопического гриба *Aspergillus oryzae* на твердой сыпучей среде, состоящей из пшеничных отрубей и древесных опилок. Амилаза катализирует реакцию гидролиза крахмала и относится к ферментам группы гидролаз. Под действием α -амилазы из крахмала образуется дисахарид мальтоза, этот процесс называют осахариванием крахмала. Осахаривание лежит в основе приготовления суслу из зерна и картофеля в спиртовом производстве, приготовлении затора в пивоварении. В качестве промежуточных продуктов при гидролизе крахмала образуются соединения разного молекулярного веса, называемые декстринами. На первых стадиях гидролиза получают декстрины с высокой степенью полимеризации (35–40), с йодом они дают синее окрашивание, как и крахмал. По мере дальнейшего гидролиза молекулярный вес декстринов снижается и йод окрашивает их в фиолетовый, затем темно-бурый, красноватый цвет и наконец перестает изменять окраску. Это свойство положено в основу определения количества фермента амилазы в культуре гриба или ферментном препарате. В данной работе активность амилазы определяется по количеству крахмала, расщепленного до неокрашивающихся йодом декстринов за единицу времени при строго определенных условиях, так как выделить фермент в чистом виде и определить его количество очень сложная задача. Удобнее опреде-

лить количество фермента именно по активности его воздействия на соответствующий субстрат.

Порядок проведения работы

Лабораторная работа проводится на двух занятиях: на первом готовят питательную среду, засевают и выращивают культуру гриба; на втором – экстрагируют ферменты и анализируют активность амилазы в вытяжке.

Занятие 1. Группа студентов делится на две подгруппы. Одна изучает влияние состава, а вторая – влияние влажности питательной среды на уровень накопления амилолитических ферментов.

1. Определить влажность сырьевых компонентов – пшеничных отрубей и опилок на приборе ПИВИ.

Просушить бумажные конверты (16×16 см) при 160°C в течение 3 мин и охладить в эксикаторе. Взвесить пустой пакет, заполнить 5 г отрубей или опилок и взвесить. Распределить материал тонким слоем и сушить при 160 °С 6 мин, охладить в эксикаторе и взвесить.

Запись в лабораторном журнале:

Масса пустого конверта, г _____

Масса конверта с влажной навеской, г _____

Масса конверта с высушенной навеской, г _____

Масса испаренной влаги _____, г _____

(наименование среды)

Влажность _____, W, % _____

(наименование среды)

Влажность рассчитывают по формуле

$$W = \frac{a - c}{a - n} \times 100\% ,$$

где a – масса конверта с влажной навеской, г; c – масса конверта с высушенной навеской, г; n – масса пустого конверта, г.

Результаты вычислений записывают до второго десятичного знака. Выполнить параллельно два определения влажности пшеничных отрубей и опилок, рассчитать среднюю величину, результаты внести в таблицу.

Результаты определения влажности

№ опыта	Наименование среды	Масса влажной навески, г	Масса высушенной навески, г	Количество испаренной влаги, г	Влажность, W, %	Средняя влажность, W _{ср} , %
1	Пшеничные отруби					
2	Пшеничные отруби					
3	Опилки					
4	Опилки					

2. Приготовить 6 вариантов питательной среды по 20 г, отличающихся соотношением пшеничных отрубей и древесных опилок, которые участвуют в разрыхлении среды и регулировании содержания крахмала согласно приведённой таблице.

Содержание компонентов, %

Вариант среды	1	2	3	4	5	6
Пшеничные отруби	100	90	80	70	60	50
Древесные опилки	0	10	20	30	40	50

Рассчитать массу компонентов для каждого варианта, взвесить на технических весах. Высыпать на гладкую поверхность (стекло) опилки, отруби и смешать. Рассчитать количество воды, необходимое для увлажнения среды до 60 % влажности. Уменьшить расход воды на 1 мл, учитывая посевной материал, вводимый в виде суспензии конидий. Алгоритм расчета представить в лабораторном журнале, а результаты внести в таблицу.

Результаты определения расхода воды для увлажнения среды

Вариант среды	1	2	3	4	5	6
Промежуточные данные расчета						

Отмерить необходимое количество воды мерным цилиндром, медленно приливать ее к массе, перемешивая для равномерного увлажнения частиц. Увлажненную массу переносят в коническую колбу. Во избежание загрязнения поверхности горлышка колбы следует использовать металлическую воронку. Колбы закрывают ватно-марлевой пробкой, бумажным колпачком и стерилизуют 30 мин при 120 °С в автоклаве. Содержимое колбы после стерилизации и охлаждения интенсивно встряхивают.

3. Для изучения влияния влажности питательной среды на накопление ферментов приготовить шесть вариантов сред по 20 г с разным содержанием влаги согласно приведённой таблице.

Рекомендуемая влажность питательной среды

Вариант	1	2	3	4	5	6
Заданная влажность, %	45	50	55	60	65	70
Влажность среды до увлажнения, %						
Расход воды на 20 г среды, мл						

Взвесить навески пшеничных отрубей и древесных опилок по варианту 4. Рассчитать влажность среды и расход воды до достижения влажности, уменьшая его на 1 мл суспензии посевного материала согласно заданию. Алгоритм расчета выполнить в журнале работы, результаты внести в таблицу. Дальнейшие операции выполнить как в п. 2.

4. Засеять питательную среду суспензией спор гриба.

Для этого в пробирку с культурой гриба на скошенной агаризованной среде заливают стерильную воду до верхнего края косяка. Конидии переводят концом стерильной пипетки во взвешенное состояние и отбирают 1 мл суспензии спор, перенося ее затем в колбу со стерильной средой. После засева среду тщательно перемешивают путем встряхивания и пересыпают в стерильную кювету, потом закрывают ее крышкой. Кювета имеет перфорации для воздухообмена. Операции по засеву среды необходимо производить, соблюдая асептические условия, возле пламени спиртовки. Кюветы с засеянной средой помещают в термостат. Выращивание длится 48–54 ч

при температуре 33 °С в течение первых 12 ч роста, а далее поддерживается на уровне 28–30 °С.

Занятие 2. Выросшая культура имеет вид коржа с пушистой поверхностью. Для каждого коржа следует определить влажность (для высушивания брать 3 г культуры) и амилолитическую активность.

Порядок выполнения работы

1. Провести экстракцию ферментов из выросшей культуры гриба. Корж тщательно измельчают в кювете с помощью шпателя и на технических весах отвешивают 5 г поверхностной культуры. Шпатель обязательно погрузить в дезинфицирующий раствор. Взвешенную порцию помещают в фарфоровую ступку и тщательно растирают пестиком со 100 мл забуференной дистиллированной воды, которую получают, смешивая 10 мл ацетатного буфера (рН 4,7) и 90 мл дистиллированной воды. После этого помещают в термостат на 30 мин при 30 °С. По истечении времени экстракции содержимое фарфоровых ступок переносят на капроновый фильтр и хорошо отжимают для отделения экстракта от биошрота (остатков питательной среды и мицелия).

2. Определить влажность выросшей культуры, сделать запись в журнале работы аналогично п. 1 занятия 1 данной работы.

3. Осветлить полученный экстракт (вытяжку) путем центрифугирования. Для этого мерным цилиндром отмеряют 25 мл фильтрата и переносят в центрифужные стаканчики, которые устанавливают на роторе центрифуги попарно напротив друг друга. Центрифугирование длится 5 мин при 3000 об/мин. Осветленный экстракт сливают в колбу для дальнейшего анализа.

4. Определяют амилолитическую способность (АС) экстракта, используя капельный метод по Климовскому и Родзевич. В основе метода лежит способность фермента амилазы, находящегося в вытяжке, катализировать гидролиз крахмала до не окрашиваемых йодом продуктов. Для определения АС важно строго соблюдать температурные условия реакции. Для этого все растворы – субстрат, 1 %-ный раствор крахмала, раствор фермента – и дистиллированная вода должны быть нагреты до 30 °С в ультратермостате в течение 10 мин.

В широкую пробирку заливают 25 мл раствора крахмала. Не вынимая пробирок из термостата, с помощью пипеток добавляют воду, а затем вытяжку от 1 до 25 см³. Общий объем реакционной смеси был 50 см³. Если ферментная вытяжка малоактивна, то можно внести только ее в количестве 25 см³, а воду вообще не добавлять. Содержимое в пробирке перемешивают палочкой и отмечают время по секундомеру, когда была добавлена вытяжка к раствору крахмала:

- каждые 60 с из пробирки, не вынимая ее из термостата, отбирают палочкой каплю пробы;
- каплю помещают на белую фарфоровую пластину, соединяя эту каплю с каплей рабочего раствора йода, и наблюдают за изменением окраски;
- реакция расщепления крахмала считается оконченной, когда йод перестает давать изменение окраски при соединении с каплей испытуемого раствора в течение первых 10 с;
- изменение окраски йода отчетливо видно на границе соприкосновения двух капель — йода и реакционной смеси.

Время, за которое происходит расщепление крахмала до продуктов, не окрашивающихся йодом, должно быть в пределах 10–20 мин.

Если время гидролиза крахмала менее 10 мин, то определение повторяют, уменьшая объем вытяжки и увеличивая объем воды. Если гидролиз крахмала не заканчивается в течение 20 мин, то анализ также повторяют, увеличивая объем ферментной вытяжки и уменьшая объем воды. Количество ферментной вытяжки, которое необходимо брать на повторный анализ, вычисляют с учетом полученного времени гидролиза. Например, если ферментная вытяжка имеет малую или слишком высокую активность и количество ферментного раствора от 1 до 25 см³ не обеспечивает длительности гидролиза крахмала в течение 10–20 мин, то для анализа берут не 25 см³ раствора крахмала, а большее или меньшее его количество, например 10 или 40 см³, внося соответствующую поправку в расчетную формулу (соответственно 0,1 или 0,4 вместо обычных 0,25 г).

Запись в лабораторном журнале:

Время, за которое произошло расщепление крахмала до неокрашенных йодом продуктов, мин _____

Количество ферментного раствора, взятое на анализ, мл _____

Влажность гриба, W , % _____

Амилолитическая активность, ед./г _____

За единицу амилолитической активности (способности) принято такое количество фермента, которое катализирует расщепление 1 г растворимого крахмала до продуктов, не окрашиваемых йодом, за 1 ч при температуре 30 °С в строго определенных условиях. Рассчитывают амилолитическую активность по формуле

$$AC = \frac{0,25 \times 60 \times 100 \times 50 \times 100}{T \times a \times 5 \times (100 - W)},$$

где 0,25 – количество крахмала, которое находится в 25 мл раствора, г; 60 – время в минутах; T – время гидролиза, мин; a – количество ферментного раствора, взятого на анализ, мл; 100 – количество экстрагирующей воды, мл; 5 – масса культуры, взятой на экстракцию, г; 50 – объем реакционной смеси; W – влажность культуры гриба, %.

Требования к отчёту

1. Указать название и цель лабораторной работы.
2. Определить способ культивирования, название продуцента, наименование фермента, состав среды и ее влажность, время и температуру культивирования.
3. Указать массу поверхностной культуры и ее влажность.
4. Выбрать режим экстракции и осветления вытяжки, записать данные в виде таблицы.
5. Описать сущность метода определения AC и промежуточные результаты расчетов и исследования.
6. Указать последовательность выполнения операций на занятиях 1 и 2.
7. Заполнить таблицы.
8. Построить графики зависимостей $AC = f(\text{содержание крахмала})$, $AC = f(W, \%)$.

9. Заполнить сводную таблицу о результатах исследования и сделать выводы.

Результаты исследования

Вариант среды	Состав среды, % Пшеничные отруби	Состав среды, % Древесные опилки	Вода для увлажнения, мл	Влажность культуры, %	АС, ед./г

Контрольные вопросы

1. Почему не рекомендуют выращивать в условиях твердофазного культивирования бактерии, дрожжи?
2. Какие параметры технологического процесса влияют на уровень накопления ферментов при твердофазном культивировании микроскопических грибов?
3. Каким методом можно воспользоваться для выделения ферментов из поверхностной культуры?
4. Что представляет собой биощрот?
5. К какому классу ферментов относится амилаза? Каков механизм ее действия?
6. Как определяют количество фермента в исследуемом образце?
7. Какая величина принимается за единицу активности фермента?
8. Как можно влиять на время гидролиза крахмала?
9. Как изменяется окраска реакционной смеси при добавлении раствора йода в течение реакции гидролиза крахмала?

Лабораторная работа 5

МОЛОЧНОКИСЛОЕ БРОЖЕНИЕ

Цель – познакомиться с химизмом молочнокислого брожения, изучить методики и провести качественные реакции на молочную кислоту, изучить морфологию молочнокислых бактерий.

План проведения занятия

1. Сделать качественные реакции на молочную кислоту, записать уравнения реакций.
2. Определить кислотность молока, вычислить количество молочной кислоты в 100 мл молока.
3. Познакомиться с морфологией молочнокислых бактерий. Приготовить мазки, окрасить метиленовым синим и по Граму, изучить под иммерсионной системой микроскопа, зарисовать.

Используемые оборудование и материалы: свежее и кислое молоко, ряженка, простокваша, кислые сливки, сметана, кефир, сливочное масло, рассолы капусты, огурцов, 0,1N раствор NaOH, 10 %-ная серная кислота, насыщенный раствор CuSO_4 , 2 %-ный спиртовой раствор тиофена, 2 %-ный раствор KMnO_4 , 0,5 %-ный аммиачный раствор AgNO_3 , 5 %-ный спиртовой раствор фенола, концентрированная H_2SO_4 , 5 %-ный раствор FeCl_3 , 1 %-ный спиртовой раствор фенолфталеина, водный раствор метиленового синего, жидкость Никифорова, раствор генцианвиолета, раствор Люголя, 96 %-ный этиловый спирт, раствор карболового фуксина, дистиллированная вода, колбы на 50 мл, пипетки на 10 мл, фильтровальная бумага, вата, предметные стекла, спиртовки, микроскопы, настольные лампы, стеклянные штативы с кристаллизаторами, промывалки.

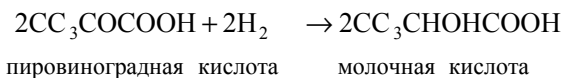
Брожение – древний и примитивный способ получения энергии, характерный для ряда прокариот. Причины возникновения спиртового, молочнокислого и маслянокислого брожения были объяснены Луи Пастером.

Химизм молочнокислого брожения

Молочнокислое брожение вызывается молочнокислыми бактериями, которые с помощью ферментов сбраживают молочный сахар (лактозу) и любой другой сахар (глюкозу) до молочной кислоты и других продуктов. Молочнокислое брожение происходит в две стадии. На первой стадии (превращение глюкозы в пировиноградную кислоту) происходит разрыв углеродной цепи глюкозы и отнятие от неё двух пар атомов водорода. Эту окислительную стадию брожения можно записать в виде следующего уравнения:



На второй стадии пировиноградная кислота восстанавливается в молочную кислоту:



Процесс идет с накоплением энергии в виде АТФ. По характеру брожения молочнокислые бактерии делятся на две группы: гомоферментативные, когда в процессе сбраживания в основном образуется молочная кислота (более 90 %), и гетероферментативные, вызывающие образование кроме молочной кислоты других продуктов брожения – этилового спирта, уксусной кислоты, CO_2 .

Гомоферментативное молочнокислое брожение вызывают молочнокислый и сливочный стрептококки, ацидофильная и болгарская палочки.

Характеристика представителей гомоферментативного брожения

Молочнокислый стрептококк (*Streptococcus lactis*). Имеет вид овальных кокков диаметром 0,5–1 мкм, которые располагаются в культуре попарно. Это диплококки, а короткими цепочками – стрептококки. Микроорганизмы грам(+), оптимальная температура развития – 30–35 °С. Сбраживают молочный сахар (лактозу), а также мальтозу. Молоко свертывается через 10–12 часов.

Сливочный стрептококк (*Streptococcus cremoris*). Встречается в молочнокислых продуктах с большой жирностью, имеет вид более длинных цепочек. Используется для производства масла, сыров и сметаны.

Болгарская палочка (*Lactobacterium bulgaricum*). Неподвижная, грам(+), располагается в виде отдельных клеток и коротких цепочек. Оптимальная температура ее развития – 40–45 °С.

Ацидофильная палочка (*Lactobacterium acidophilum*). По морфологии близка к болгарской палочке, но имеет другой температурный оптимум развития – 37 °С. Используется для изготовления ацидофилина.

Огуречная палочка (*Lactobacterium cucumeris*). Короткая, грам(+) бактерия, неподвижная. Развивается в рассоле засоленных огурцов, капусты, в силосе.

К группе гетероферментативных бактерий относятся капустная палочка, ряд лактобацилл (*Lactobacillus plantarum*, *L. Fermenti*, *L. brevis*), а также кефирные дрожжи и молочная плесень. Микроорганизмы этой группы чаще встречаются в заквашенных овощах и силосе. Молочнокислые бактерии широко распространены в природе. Они всегда имеются в почве, на поверхности растений, что является источником их постоянного появления в молочных и других продуктах. В промышленности используют культурные расы бактерий, которые имеют ряд преимуществ перед дикими формами.

Характеристика представителей гетероферментативного брожения

Капустная палочка (*Lactobacterium brassicae*). Вместе с огуречной встречается в заквашенных овощах, грам(+), сцеплена в пары и цепочки. Оптимум развития – 25 °С. В молочнокислых продуктах можно встретить и пропионовые бактерии, попадающие в молоко из почвы и с растений. Им принадлежит значительная роль при созревании сычужных сыров.

Кефирные дрожжи (*Saccharomyces kefirii*). Переводят молочный сахар (лактозу) в спирт.

Молочная плесень (*Oidium lactis*). Её можно обнаружить сверху на молочнокислых продуктах, имеет мицелий, распадающийся на четырехугольные или овальные клетки, отличающиеся сравнительно большими размерами. Окисляет молочную кислоту до CO_2 и воды, ухудшая качество скисшего молока.

Порядок выполнения работы

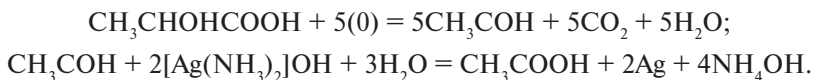
Качественные реакции на молочную кислоту

1. Определение уксусного альдегида

Кислое молоко фильтруют через складчатый фильтр, к 10 мл фильтрата добавляют 1 мл 10 %-ного раствора серной кислоты, нагревают в конической колбе до кипения, затем по каплям прибавляют 2 мл 2 %-ного раствора KMnO_4 . В этих условиях происходит окисление молочной кислоты с KMnO_4 до CH_3COH (уксусный альдегид):



Затем покрывают горлышко колбы фильтровальной бумагой, смоченной аммиачным раствором оксида серебра, смачивают бумагу вначале 0,5 %-ным раствором AgNO_3 , затем раствором NH_4OH . Бумага темнеет под влиянием паров уксусного альдегида:



2. Реакция Уффельмана (проба с фенолом)

В пробирку к 10 мл 5 %-ного раствора фенола добавить 10 капель 5 %-ного раствора хлорного железа (FeCl_3). Наблюдаем образование интенсивно окрашенного синего раствора. Прибавление 1–2 капель сыворотки кислого молока, содержащей молочную кислоту, делает раствор желтоватым.

3. Реакция со спиртовым раствором тиофена

Кислое молоко фильтруют через складчатый фильтр. К 2 мл фильтрата добавляют 5 мл концентрированной серной кислоты и 10 капель насыщенного раствора медного купороса. Нагревают при потряхивании на водяной бане при 100°C в течение 5 мин. При охлаждении добавляют 3–5 капель 0,2 %-ного раствора тиофена в спирту. В присутствии молочной кислоты возникает вишнево-красное окрашивание.

Определение кислотности молока

В широкодонную колбу объемом 150 мл наливают 40 мл свежего молока, закрывают ватной пробкой и помещают в термостат при температуре $30\text{--}35^\circ\text{C}$ до следующего занятия. Затем определяют исходную кислотность молока. Для этого в коническую колбу на 50 мл отмеряют 10 мл молока, добавляют 20 мл дистиллированной воды

и две-три капли 1 %-ного спиртового раствора фенолфталеина. Смесь тщательно перемешивают и титруют 0,1N раствором едкого натра до слабо-розовой окраски. Рассчитывают кислотность в градусах Тернера. Градус Тернера ($^{\circ}T$) – условная величина, равная количеству миллилитров 0,1N раствора щелочи, израсходованного на нейтрализацию 100 мл молока.

• Пример расчета: на титрование 10 мл молока пошло 5 мл 0,1N раствора щелочи; рассчитаем количество щелочи, израсходованное на титрование 100 мл молока:

5 мл щелочи – 10 мл молока;

x мл щелочи – 100 мл молока.

Кислотность в градусах Тернера составит:

$$X = \frac{5 \times 100}{10} = 50^{\circ} T .$$

Кислотность сортового молока составляет 17–20 $^{\circ}T$.

Приготовление препаратов из молочнокислых продуктов

Нанести одну каплю какого-либо молочного продукта на предметное стекло, разбавить с каплей дистиллированной воды и сделать тонкий мазок, чуть подсушить на воздухе, а затем зафиксировать с одновременным обезжириванием смесью Никифорова (не менее 10 мин). Окраску производят в течение 3–5 мин водным раствором метиленового синего, промывают водой, высушивают и микроскопируют с применением иммерсионной системы микроскопа.

Микрофлору рассолов капусты и огурцов препарируют обычным способом, без обезжиривания смесью Никифорова. Окраску мазка производят метиленовым синим или карболовым фуксином 3–5 мин.

Требования к отчету

1. Описать качественные методики по определению наличия молочной кислоты. Оценить результаты исследований.
2. Описать методику по определению титруемой кислотности молока. Оценить результат исследования.
3. Описать порядок приготовления бактериологического препарата из молочнокислых бактерий.
4. Описать морфологию молочнокислых бактерий.

Контрольные вопросы

1. Какие условия необходимы для протекания молочнокислого брожения?
2. Какие микроорганизмы вызывают молочнокислое брожение?
3. Чем отличается гомоферментативный процесс от гетероферментативного?
4. В чём заключается химизм молочнокислого брожения?
5. Чем обусловлена титруемая кислотность коровьего молока?

Лабораторная работа 6

СПИРТОВОЕ БРОЖЕНИЕ

Цель — познакомиться с химизмом и качественными реакциями спиртового брожения, с морфологией возбудителей этого вида брожения.

План проведения занятия

1. Познакомиться с химизмом спиртового брожения и морфологией микроорганизмов, вызывающих спиртовое брожение, приготовить бактериологические препараты, зарисовать.
2. Выполнить качественные реакции на спиртовое брожение, записать уравнения реакций.
3. Провести измерения размеров клеток дрожжей.
4. Заложить опыты на маслянокислое и уксуснокислое брожение.

Материалы и оборудование: дрожжи пекарские, 10 %-ный раствор сахарозы, 10 %-ный раствор едкого натра, йод кристаллический, $\text{Ba}(\text{OH})_2$ или $\text{Ca}(\text{OH})_2$, спиртовки или плитки, колба на 200–250 мл, пробка с газоотводной трубкой, штатив, концентрированная серная кислота, $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ кристаллический.

За час до занятия настоять в колбе дрожжи — 50 мл 10 %-ного раствора сахарозы и 1 г дрожжей.

Химизм и представители спиртового брожения

Возбудители спиртового брожения широко распространены в природе — дикие дрожжи. К ним относятся дрожжевые грибы рода *Mucoderma* и *Torul*, плесневые грибы рода *Mucor* и некоторые бактерии. Культурные дрожжи выведены путем длительной селекции из диких дрожжей. К ним относятся: *Saccharomyces cerevisiae* и *S. vini*, *S. ellipsoides*. Эти дрожжи отличаются от диких тем, что способны выдерживать большие концентрации спирта в среде, образуют меньше побочных продуктов брожения, вследствие чего интенсивнее идут процессы брожения. Спиртовое брожение протекает в анаэробных условиях, тогда как размножение дрожжей происходит при широком доступе кислорода при оптимальных температурах 30–35 °С. Образующийся спирт вреден для дрожжей,

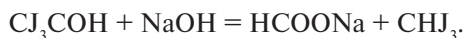
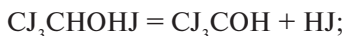
и при накоплении его брожение прекращается. Однако при высокой концентрации сахара в растворе дрожжи могут оставаться живыми в среде, содержащей до 15 % спирта. Суммарно процесс брожения выражается следующим уравнением:



Качественные реакции на брожение

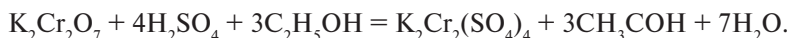
1. Реакция с кристаллическим йодом

К 10 мл бродящей жидкости в пробирку добавить 1–2 мл концентрированного раствора 10 %-ной щелочи и подогреть на спиртовке, не доводя до кипения (60 °С). Затем добавляют несколько кристалликов йода и снова нагревают. В присутствии спирта выпадает желтый осадок йодоформа, имеющий характерный запах:



2. Реакция с двухромовокислым калием

В пробирку с 2–3 мл исследуемой жидкости добавляем кристаллик двухромовокислого калия и несколько капель концентрированной серной кислоты, смесь нагреваем на спиртовке. Цвет меняется до зеленого вследствие восстановления хрома:



Выделяющийся уксусный альдегид ощутим по запаху.

3. Обнаружение углекислого газа

В колбу емкостью 250 мл наливают 50 мл 10 %-ного раствора сахарозы и 1 г пекарских дрожжей, предварительно разведенных в 10 мл 10 % сахарозы. Колбу закрывают пробкой с изогнутой трубкой, нижний конец которой погружают в пробирку с баритом или с известковой водой. Колбу с бродящей жидкостью помещают в водяную баню на плитке, где поддерживается температура 35–40 °С. Через несколько минут после установки в пробирку с баритом начинают поступать пузырьки газа, со временем их становится больше. Баритовая вода начинает интенсивно мутнеть. Следят за выделением пузырьков и помутнением жидкости.

Требования к отчету

1. Описать химизм спиртового брожения.
2. Описать качественные методики по определению спиртового брожения. Оценить результаты исследований.
3. Описать порядок приготовления бактериологического препарата из дрожжей.
4. Описать морфологию микроорганизмов, вызывающих спиртовое брожение. Приготовить бактериологические препараты, изучить и зарисовать.

Контрольные вопросы

1. Какие условия необходимы для протекания спиртового брожения?
2. Какие микроорганизмы вызывают спиртовое брожение?
3. На чём основаны реакции по определению спиртового брожения?
4. В чём заключается химизм спиртового брожения?

Лабораторная работа 7

УКСУСНОКИСЛОЕ БРОЖЕНИЕ

Цель — знакомство с химизмом процесса брожения, морфологией микроорганизмов.

План проведения занятия

1. Рассмотреть и описать микроорганизмы, вызывающие уксусное брожение, зарисовать их с живых и фиксированных препаратов. Живые препараты приготовить методом раздавленной капли и висячей капли из пленки и раствора чайного гриба, кислого пива, подкрасить раствором Люголя. Мазки окрасить по Граму.
2. Провести качественную реакцию на уксусную кислоту.

Используемые оборудование и материалы: кислое пиво, чайный гриб, 10 %-ный раствор пищевой соды, 10 %-ный раствор хлорного железа (FeCl_3), раствор йода, раствор Люголя, фуксин, этиловый спирт, генцианвиолет, полоски фильтровальной бумаги, предметные стекла, спиртовки.

Процесс уксуснокислого брожения вызывается группой бактерий, являющихся облигатными аэробами. Они окисляют этиловый спирт до уксусной кислоты и воды в строго аэробных условиях:



При этом выделяется значительное количество энергии. Различные продукты, содержащие алкоголь (спирт, вино, пиво), являются благоприятным субстратом для развития уксуснокислых бактерий, попадающих сюда из воздуха. Эти бактерии встречаются повсеместно в природе — в пыли, на фруктах, овощах. Уксуснокислые бактерии объединены в род *Acetobacter*. На поверхности растворов бактерии образуют пленки, состоящие из полисахаридов. Типовой вид *Acetobacter aceti* представлен слабоподвижными палочковидными эллиптическими клетками, одиночными, в парах или цепочках с размерами 0,6–0,8×1,0–3,0 мкм. Это бесспорные грамотрицательные палочки, облигатные аэробы, они растут и размножаются на поверхности питательных сред, образуя тонкие пленки. Нередко образуют инволюционные формы в виде раздутых, разветвленных

или нитевидных образований. *Acetobacter aceti* образует гладкую слизистую пленку, желтеющую от раствора йода. Палочка активно развивается при температуре около 34 °С, выносит концентрацию уксусной кислоты до 6 %. *Acetobacter xylinum* образует в культуре грубую, морщинистую, слизистую пленку значительной толщины. Клетки окрашиваются йодом в синий цвет. Бактерии живут в пленке чайного гриба, в сообществе с дрожжами. Такой симбиоз взаимовыгоден: дрожжи сбраживают сахар до спирта, а уксуснокислые бактерии окисляют спирт до уксусной кислоты.

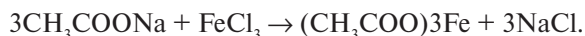
Acetobacter pasteurianum образует сухую морщинистую пленку, поднимающуюся по стенкам колбы и окрашивающуюся от йода в синий цвет. Форма бактерий морфологически близка к *Ac. aceti*. Развивается на алкогольных напитках.

Порядок выполнения работы

Проведение качественной реакции на уксусную кислоту

Закладка опыта: за 7–10 дней до занятия в конические колбы наливают тонкий слой пива (1 см). Толщина слоя пива имеет большое значение для исхода опыта, так как для уксуснокислых бактерий должны быть созданы аэробные условия. К пиву добавляют немного (0,5 мл) спирта. Колбы закрывают ватными тампонами и ставят в термостат при температуре 30–35 °С.

Содержимое колб анализируют, описывают характер образовавшихся пленок, микроскопируют окрашенные мазки, делают качественную реакцию на CH_3COOH . Для этого к 5 мл скисшего пива в пробирку добавляют 2 мл 10 %-ного раствора соды и 3 мл 10 %-ного раствора хлорного железа. Смесь нагревают. При наличии уксусной кислоты появляется красное окрашивание вследствие образования ацетата железа:



Требования к отчету

1. Описать химизм уксуснокислого брожения.
2. Описать качественные методики по определению уксусной кислоты. Оценить результат исследования.
3. Описать порядок приготовления бактериологического препарата из уксуснокислых бактерий.
4. Описать морфологию микроорганизмов, вызывающих уксуснокислое брожение. Приготовить бактериологические препараты и зарисовать.

Контрольные вопросы

1. Какие условия необходимы для протекания уксуснокислого брожения?
2. Какие микроорганизмы вызывают уксуснокислое брожение?
3. На чём основана реакция по определению уксусной кислоты?
4. В чём заключается химизм уксуснокислого брожения?

Лабораторная работа 8

МАСЛЯНОКИСЛОЕ БРОЖЕНИЕ

Цель – познакомиться с морфологией, химизмом, качественными реакциями маслянокислого брожения.

План проведения занятия

1. Познакомиться с закладкой опыта культуры маслянокислых бактерий, химизмом процесса брожения.
2. Приготовить препараты маслянокислых бактерий методами раздавленной капли и мазка.
3. Выполнить качественные реакции на масляную кислоту.

Используемое оборудование и материалы: 5 %-ный раствор FeCl_3 , 96 %-ный этиловый спирт, концентрированная серная кислота, фуксин, раствор Люголя, предметные стекла, спиртовки, культура картофельной палочки.

Маслянокислое брожение – сложный процесс превращения углеводов в масляную кислоту и другие продукты, совершаемый группой анаэробных спороносных бактерий. Химизм этого процесса сложен и до настоящего времени недостаточно выяснен. Схематично процесс можно выразить следующим образом:



Распаду подвергаются не только сахара, но и более сложные углеводы под действием различных сложных активных ферментов маслянокислых бактерий. Образующаяся масляная кислота в невысоких концентрациях является стимулятором роста растений. Маслянокислое брожение вызывается облигатными анаэробными бактериями из рода *Clostridium*.

Порядок выполнения работы

За 7–10 дней до занятия закладывают опыт. Для этого неочищенный промытый картофель нарезают ломтиками, которыми заполняют пробирку на 1/3 объема, добавляют щепотку мела и заполняют водой почти доверху. Пробирки помещают в водяную баню при тем-

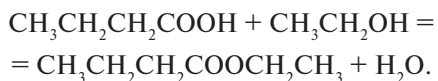
пературе 80 °С на 10–15 мин, затем закрывают пробками и ставят в термостат с температурой 35 °С. В этих условиях уже через два-три дня в жидкости обнаруживают бактерии маслянокислого брожения. Культура маслянокислых бактерий является при этом элективной. Для их преимущественного развития созданы анаэробные условия, бесспорные формы других видов убиты предварительным нагреванием, добавка мела нейтрализует образующиеся кислоты и способствует развитию бактерий.

Другой способ получения культуры маслянокислых бактерий: 5 г ячменя (солода), 2 г мела, 5 г сахара – все заливают водой (100 мл) и кипятят в течение 5 мин. Горячую жидкость переливают в высокую пробирку, в которую предварительно поместили кусочек почвы или горох. Пробирку держат в термостате при 30–35 °С семь дней. На следующем занятии производят микроскопирование жидкости, в которой обнаруживают главным образом *Clostridium pasteurianum*, подвижные палочки с закругленными концами, одиночные и парные. В старых культурах у одного из концов клетки обнаруживают споры.

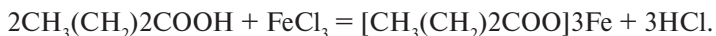
Clostridium pasteurianum – свободноживущий анаэробный азотфиксатор, обитающий в почве. В клетках этих бактерий содержится гранулеза, которая окрашивается раствором Люголя в синий цвет. Ее можно видеть при микроскопировании живых бактерий в капле суспензии культуральной жидкости с добавкой реактива методом раздавленной капли с масляной иммерсией. Каплю суспензии берут со дна пробирки трубочкой. С культуральной жидкостью проводят качественные реакции на масляную кислоту.

Качественные реакции

1. К 3–4 мл жидкости в пробирку добавляют 0,5 мл 96 %-ного спирта и одну-две капли концентрированной серной кислоты. Содержимое пробирки перемешивают и нагревают. В присутствии масляной кислоты появляется запах масляно-этилового эфира, напоминающий запах ананаса:



2. К 5 мл исследуемой жидкости добавляют 2 мл 5 %-ного FeCl_3 . При нагревании образуется маслянокислое железо коричневого цвета:



Требования к отчету

1. Описать химизм маслянокислого брожения.
2. Описать качественные методики по определению масляной кислоты. Оценить результат исследования.
3. Описать порядок приготовления бактериологического препарата из маслянокислых бактерий.
4. Описать морфологию микроорганизмов, вызывающих маслянокислое брожение. Приготовить бактериологические препараты и зарисовать.

Контрольные вопросы

1. Какие условия необходимы для протекания маслянокислого брожения?
2. Какие микроорганизмы вызывают маслянокислое брожение?
3. На чём основана реакция по определению масляной кислоты?
4. В чём заключается химизм маслянокислого брожения?
5. Как можно получить культуру маслянокислых бактерий? Каковы особенности бактерий рода *Clostridium*?

Лабораторная работа 9

МИКРОФЛОРА ПОЧВЫ

Цель работы — знакомство с микроорганизмами почвы.

План проведения занятия

1. Теоретическое ознакомление с правилами подготовки инструментов, почвенных мешочков и бумажных пакетов для отбора почвенных проб, правила отбора почвенной пробы.
2. Проведение микробиологического анализа.

Используемое оборудование и материалы: стерильные колбы и чашки Петри, пробирки со стерильной водой, мясопептонный агар, среда Чапека, почвенный агар, среда Эшби, сусло-агар, резиновые перчатки, спиртовка, стерильные пипетки на 10, 2, 1 мл, стеклянные шпатели, водяная баня, этикетки.

Порядок проведения работы

1. Отбор почвенной пробы и подготовка образца к анализу. Микроорганизмы играют важную роль в процессе формирования почвы. Численность микроорганизмов в почве во многом определяет ее плодородие. Изучение микроорганизмов почвы дает надежные результаты лишь в том случае, если правильно взяты почвенные образцы. До взятия почвенных образцов следует сделать описание района исследования, указав характер рельефа, растительность и агротехнику. Необходимо дать подробную характеристику почв. При исследовании микроорганизмов в почвенных горизонтах делают почвенный разрез. Вертикальную стенку почвенного разреза зачищают каждый раз перед взятием образцов почвы. При изучении микрофлоры участка определенной площади готовят смешанные образцы почвы, отбирая пробы по диагонали участка на определенной глубине от поверхности.

Микроорганизмы в почве распространены неравномерно, поэтому важно анализировать большое число почвенных образцов. По Н.А. Красильникову, рекомендуется на участке площадью 100 м² анализировать три образца почвы, каждый из которых состоит из

трех проб. Почвенные образцы берут в стерильные пергаментные пакеты или стеклянные банки, закрытые ватно-марлевыми пробками. Для отбора почвенных образцов удобно использовать металлические совки, садовые ножи или небольшие лопаты, иногда почвенный бур. Оборудование протирают ватным тампоном, смоченным спиртом, и обжигают на пламени. Для количественного учета почвенных микроорганизмов и качественного анализа допустимо совки и ножи обтирать многократным размещением их в исследуемый почвенный горизонт.

Каждый образец почвы сопровождают этикеткой, где указывают дату взятия образца, район участка и горизонт. Для взятия пробы почвы стерильным ножом снимают верхний слой почвы 1,5–2 см, который может быть загрязнен посторонней микрофлорой. Далее совком или лопатой берут 100–200 г почвы и насыпают в пакет или банку. При изучении микроорганизмов пахотных почв образцы берут на всю глубину пахотного слоя. При изучении микроорганизмов на разной глубине пробы почвы берут по генетическим горизонтам из почвенного разреза. В горизонте делают нишу и из нее извлекают почвенную пробу, начиная с нижнего горизонта к верхнему.

Почвенные образцы желательно анализировать в тот же день, так как количество микроорганизмов в них может измениться. Или же оставить в холодильнике. Для диспергирования почвенных агрегатов и десорбции клеток микроорганизмов с поверхности почвенных частиц почву подвергают обработке ультразвуком (установка УЗДН-1), растиранию или встряхиванию на пропеллерной мешалке. Такая предварительная обработка почвы позволяет учесть значительно большее количество микроорганизмов.

Наиболее доступным приемом предварительной обработки почвы, дающим хорошие результаты, следует считать растирание почвенного образца. Исследуемую почву высыпают на стерильное стекло. (Стекло заранее протирают спиртом и обжигают на пламени.) Почву тщательно перемешивают шпателем, удаляя механические частицы и корни растений. Соблюдая стерильность, на часовом стекле отвешивают 10 г почвы и переносят ее в стерильную ступку. Навеску почвы в ступке увлажняют до пастообразного состояния,

добавляя 2–3 мл воды из первой колбы, содержащей 90 мл стерильной воды, и растирают 5 мин пальцем в резиновой перчатке.

После растирания почву из ступки переносят с помощью воды во вторую сухую колбу, получают первое разведение 1:10. Почвенную суспензию в колбе встряхивают в течение 5 мин, дают отстояться 30 с и далее стерильной пипеткой переносят 1 мл почвенной суспензии из колбы в пробирку № 1 с 9 мл стерильной дистиллированной воды, получают второе разведение – 1:100. Подобным образом готовят ряд последующих разведений почвенной суспензии – 1:1000, 1:10000, 1:100000 1:1000000 и более в зависимости от предполагаемой численности микроорганизмов, учитывая тип почвы, генетический горизонт, сезон года, влажность почвенной пробы и т. д. Для приготовления каждого нового разведения почвенной суспензии следует пользоваться новой стерильной пипеткой.

2. Посев. Для выделения и количественного учета бактерий почвенную суспензию высевают на одну из питательных сред пластинки МПА, почвенный агар, среду Эшби; для учета актиномицетов используют среду Чапека; для выделения и количественного учета грибов и дрожжей применяют СА или модифицированную среду Чапека. Питательную среду, расплавленную на водяной бане, соблюдая стерильность, разливают в чашки Петри слоем 0,5–0,8 см. Для высева на каждое разведение почвенной суспензии готовят по 3–5 чашек Петри. После застывания среды для удаления капель воды с крышек чашки Петри подсушивают в термостате при температуре 60–70°C. Чашки Петри маркируют, указывая номер почвенной пробы, дату посева, разведение и повторность. Стерильной пипеткой на 1 мл наносят каплю почвенной суспензии из соответствующего разведения по центру питательной среды в чашке Петри и тщательно растирают ее стеклянным шпателем по всей поверхности агаровой пластинки. Для посева почвенной суспензии удобно пользоваться микропипетками на 0,1–0,2 мл. Засеянные чашки Петри помещают в термостат при температуре 28–30°C.

Подсчет колоний бактерий на чашках Петри проводят через 3–5 суток, грибов и дрожжей – через 5–7, актиномицетов через 7–15. Наиболее точный результат получается при развитии на чашке Петри 50–200 колоний бактерий и актиномицетов и 30–50 колоний

грибов. Следует иметь в виду, что при очень большом и очень малом количестве колоний на чашках Петри могут быть значительные ошибки при подсчете микроорганизмов. Обычно почвенную суспензию высевают из 3–4 последовательных разведений на 3–5 чашек Петри из каждого разведения. Для учета грибов почвенную суспензию высевают из разведений на один-два порядка ниже, чем для учета бактерий и актиномицетов.

3. Подсчет колоний микроорганизмов на чашках Петри. Для удобства подсчета колоний микроорганизмов дно чашки Петри разделяют фломастером на секторы или сегменты. Если питательная среда прозрачна, то подсчет колоний ведут в проходящем свете со дна чашки; в случае непрозрачной питательной среды колонии микроорганизмов подсчитывают непосредственно с поверхности питательного агара. Ученные колонии отмечают точками на стекле. Подсчитав число колоний микроорганизмов, образовавшихся на питательной среде в чашке Петри по всем повторностям соответствующего разведения, определяют среднее число колоний и далее делают пересчет количества микроорганизмов на 1 г воздушно-сухой почвы по формуле

$$a = \frac{\bar{b} \times v}{d},$$

где a – число клеток микроорганизмов в 1 г воздушно-сухой почвы; \bar{b} – среднее количество КОЕ микроорганизмов на питательной среде в чашке Петри; v – соответствующее разведение; d – количество жидкости в пипетке.

Требования к отчёту

1. Описать правила подготовки инструментов, почвенных мешочков и бумажных пакетов для отбора почвенных проб.
2. Описать правила подготовки почвенной пробы для проведения микробиологического исследования.
3. Описать порядок проведения микробиологического исследования почвы.
4. По результатам исследований оформить таблицу.

№ образца почвы	Общее количество КОЕ	Количество КОЕ, образован. бактериями	Количество КОЕ, образован. актиномицетами	Количество КОЕ, образован. спорами плеснев. грибов
1				
2				
3				

Контрольные вопросы

1. Какие существуют методы определения бактериального загрязнения почвы?
2. Для выделения бактерий, актиномицетов, дрожжей, грибов какие питательные среды применяются?
3. Как производится подсчет количества КОЕ?
4. На чем основан бактериологический анализ почвы?
5. В чём заключаются правила отбора проб почвы и их подготовки к бактериологическому исследованию?

Лабораторная работа 10

ВЫДЕЛЕНИЕ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР НЕФТЕОКИСЛЯЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Цель работы – научить студентов использованию аборигенной микробиоты для очистки почвы от нефтезагрязнений.

План проведения занятия

1. Приготовление питательных сред для получения накопительных культур.
2. Выделение чистых культур нефтеокисляющих микроорганизмов.
3. Скрининг выделенных культур нефтеокисляющих бактерий на способность утилизировать углеводороды нефти в жидкой среде.

Оборудование и материалы: микроскоп, набор красок, спиртовка, иммерсионное масло, сырая нефть, среда Чапека.

Порядок проведения работы

1. Выделение чистых культур нефтеокисляющих бактерий.

Из нескольких проб нефтезагрязненных почв получают накопительные культуры нефтеокисляющих микроорганизмов на синтетической среде следующего состава (г/л): KNO_3 – 4,0; KH_2PO_4 – 0,6; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ – 1,4; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,8; вода водопроводная, рН среды 7,0. В колбы со 100 мл жидкой среды указанного состава вносят по 1 мл нефти и небольшое количество нефтезагрязненной почвы. Накопительные культуры получают на качалке (220 об/мин) при 24 °С в течение 7 суток. Из накопительных культур выделяют чистые культуры нефтеокисляющих микроорганизмов по методу Коха на агаризованной среде Чапека. Культуры поддерживают на скошенной агаризованной среде Чапека при +4 °С.

2. Скрининг выделенных культур нефтеокисляющих бактерий на способность утилизировать углеводороды нефти в жидкой среде.

Для получения посевного материала выделенных культур бактерий используют среду следующего состава (г/л): глюкоза – 10,0; NH_4NO_3 – 1,0; MgCl_2 – 0,1; KH_2PO_4 – 3,0; K_2HPO_4 – 7,0; CaCO_3 – 1,0, рН среды 7,0. Для определения степени нефтепотребления культу-

ры выращивают на жидкой среде вышеуказанного состава, в которой источником углерода вместо глюкозы служит сырая нефть (1 мл нефти на 100 мл жидкой среды). Засев производят из расчета 10 мл посевного материала на 100 мл среды. Культивирование проводят в колбах при перемешивании (220 об/мин) с объемом питательной среды 100 мл при 24 °С. Исходное значение рН среды составляет 7,0 без дальнейшего регулирования в процессе культивирования.

3. Определение содержания остаточной нефти. Содержание нефти в процессе исследования определяют с помощью аппарата – флюоратора или же весовым методом путем экстрагирования нефтепродуктов из определенных навесок почвы или объемов жидкой среды гексаном из расчета количества нефти по разности веса в исходных образцах и после эксперимента.

Требования к отчёту

1. Описать состав питательных сред, необходимых для получения накопительных культур, и порядок выделения из накопительных культур нефтеокисляющих микроорганизмов.
2. Описать порядок выделения нефтеокисляющих микроорганизмов из накопительных культур.
3. Описать порядок проведения скрининга выделенных культур нефтеокисляющих бактерий на способность утилизировать углеводороды нефти в жидкой среде.

Контрольные вопросы

1. Каков состав и порядок приготовления питательных сред для получения накопительных культур нефтеокисляющих микроорганизмов?
2. Как выделить чистую культуру нефтеокисляющих микроорганизмов?
3. Как провести скрининг выделенных культур нефтеокисляющих бактерий на способность утилизировать углеводороды нефти в жидкой среде?

Лабораторная работа 11

ВЫДЕЛЕНИЕ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР АЗОТФИКСИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ

Цели работы – усвоить материал о значимости азотфиксирующих бактерий для растений и изучить методы выделения чистых культур азотфиксирующих бактерий.

План проведения занятия

1. Приготовление питательных сред – Эшби и бобового агара для выделения азотфиксирующих культур.
2. Подготовка клубеньков для посева.
3. Идентификация бактерий по культуральным и морфологическим признакам.

Используемые оборудование и материалы: микроскоп, набор красок, спиртовка, предметные и покровные стёкла, иммерсионное масло, почва, горох, соя, среда Эшби, бобовый агар, 0,1 %-ный водный раствор сулемы, 96 %-ный этиловый спирт, миллиметровая бумага, стерильная вода.

Азотфиксирующим микроорганизмам принадлежит важная роль в обогащении почвы азотом (на 1 г потреблённого органического вещества они могут фиксировать 15–20 г азота), кроме того, они вырабатывают биологически активные вещества – витамины и белки, являющиеся стимуляторами роста, в связи с чем увеличивается урожайность на 20–30 %, а процесс их созревания значительно сокращается. При этом количество витаминов группы В и белка увеличивается в растительном масле и зерне. Азотфиксирующие бактерии улучшают приживаемость растений при их культивировании в новых природных условиях, они образуют антибиотик, который обуславливает иммунитет к возбудителям болезней растений.

Порядок проведения работы

1. Выделение чистой культуры бактерий (1-й день)

Свободноживущие азотфиксирующие бактерии рода *Azotobacter* – облигатные аэробы, источником азотного питания для них служит молекулярный азот воздуха, источниками углерода являются углеводы, органические кислоты, спирты; они чувствительны к увлажнённости, наличию органических веществ и микроэлементов, особенно молибдена.

Для выделения и накопления азотфиксирующих бактерий используют **метод посева** комочков почвы на агаризированную среду Эшби следующего состава: 1 литр дистиллированной воды, 20,0 г – маннита или глюкозы, или сахарозы; 0,2 г – K_2HPO_4 ; 0,2 г – $MgSO_4$; 0,2 г – $NaCl$; 0,1 г – K_2SO_4 ; 5,0 г – $CaCO_3$.

К жидкой среде Эшби добавляют 2 % агара, нагревают среду до расплавления агара и стерилизуют её при 0,5 атм 20 мин. Готовую среду разливают в чашки Петри.

На пластину питательной среды Эшби раскладывают комочки почвы при помощи стеклянной палочки с вытянутым концом, который смочен стерильной водой, приблизительно на 1 см друг от друга. Для удобства посева используют трафарет из миллиметровой бумаги, который подкладывают под чашку Петри. Обычно высевают до 60 комочков в одну чашку. После посева чашки, не переворачивая на крышку, помещают в термостат при температуре 28–30 °С на 5–7 суток. Развиваясь, азотфиксирующие бактерии образуют вокруг комочков почвы слизистые колонии.

Выделение чистой культуры симбиотических азотфиксирующих бактерий рода *Rhizobium* проводят из клубеньков, имеющихся на корнях различных видов бобовых растений. Для этой цели делают посев истончающим мазком по Дригальскому – капли сока из клубеньков наносят на пластины бобового агара. Перед посевом клубеньки тщательно отмывают от почвы водой, погружают в 0,1 %-ный водный раствор сулемы на 5 минут, промывают дистиллированной водой, выдерживают в 96 %-ном этиловом спирте 10 мин и снова промывают дистиллированной водой. Клубенёк стерильным пинцетом раздавливают в стерильной чашке Петри, полученный сок используют для посева. Чашки Петри маркируют, пе-

реворачивают вверх дном и инкубируют при температуре 28–30 °С в течение 4–5 суток (для быстрорастущих видов – с клевера, гороха) или 9–10 суток (для медленно растущих видов – с люпина, сои).

Приготовление бобового агара: в 1 литре воды кипятят 100 г белой фасоли, не допуская ее растрескивания и превращения крахмала в клейстер. Полученный отвар фильтруют в горячем виде, добавляют 2 % агара, расплавляют и стерилизуют при 1 атм 20 мин.

2. Приготовление мазков клубеньковых бактерий: на стерильную поверхность предметного стекла кладут чистый клубенёк, раздавливают пинцетом и распределяют выделившийся сок. Препарат высушивают на воздухе, фиксируют в пламени горелки и окрашивают простым методом.

Микрокартина: мелкие палочки – молодая культура, зрелая культура – палочки или бактероиды в виде разветвлённых или грушевидных клеток.

3. Идентификация бактерий (2-й день)

При просмотре чашки с посевами отмечают и подсчитывают слизистые колонии, выросшие вокруг почвы. Колонии группируют по наличию пигмента, описывают их культуральные признаки (профиль, прозрачность, цвет, размер, состояние краёв и т. д.), затем готовят бактериологический препарат для изучения морфологических свойств бактерий. Идентификацию азотфиксирующих бактерий проводят по культуральным и морфологическим признакам. Род *Azotobacter* включает 6 видов, но чаще всего в природе встречаются три вида:

Az. chroococcum – в молодой культуре клетки имеют вид палочек 3–7 мкм размером, подвижные; в старой культуре клетки кокковидные, соединены в пары и сарциноподобные пакеты, обычно окружены слизистой капсулой. В клетках имеются зёрна волютина. Колонии на плотной питательной среде слизистые, растекающиеся или выпуклые серо-черного цвета, пигмент в среду не проникает.

Az. beijerinckii – крупные слегка овальные клетки, соединённые попарно, в тетрады или короткие цепочки. Неподвижные, окружены слизистой капсулой, образуют светло-коричневый или жёлтый пигмент.

Az. vinelandii – в молодой культуре клетки мелкие (2–3 мкм), палочковидной формы, в старой культуре – шаровидные. Волютина в клетках нет. Колонии слизистые, гладкие, прозрачные. Бактерии выделяют в субстрат зелёный флюоресцирующий пигмент.

Окраска капсул. На хорошо обезжиренное стерильное предметное стекло наносят большую каплю чёрной туши и в неё вносят исследуемую культуру, эмульгируют на ограниченном участке стекла. Смесь накрывают покровным стеклом. Препарат микрокопируют при увеличении $\times 40$ и $\times 90$. Микроскопия: на чёрном фоне туши выявляются прозрачные зоны капсул вокруг резко очерченных клеток.

Методы окраски волютина

1. *Метод Омелянского.* Фиксированный мазок окрашивают фуксином Циля в течение 30–40 с, промывают дистиллированной водой. Затем опускают предметное стекло с препаратом в стакан с 1 %-ным раствором серной кислоты на 20–30 с и промывают дистиллированной водой. Серная кислота обесцвечивает цитоплазму, зёрна волютина остаются окрашенными фуксином. Препарат докрашивают метиленовой синью в течение 20–30 с, промывают дистиллированной водой, высушивают и микрокопируют при увеличении объектива $\times 90$. Микрокартина: зёрна волютина красного цвета, а цитоплазма – синяя.

2. *Метод Лёффлера.* Фиксированный мазок окрашивают синькой Лёффлера в течение 3 мин. Краску смывают дистиллированной водой, не высушивая, накрывают препарат покровным стеклом и микрокопируют при увеличении объектива 40. Микрокартина: зёрна волютина окрашены в красно-фиолетовый цвет, цитоплазма – голубой.

Метахромазия. Многие бактерии и зелёные водоросли обладают способностью запасать фосфорную кислоту в виде гранул. Поскольку такие гранулы были впервые обнаружены в *Spirillum volutans*, их назвали волютиновыми гранулами. Другое их название – метахроматические гранулы дано в связи с тем, что они вызывают у некоторых красителей (метиленовой сини) характерное изменение цвета – метахромазию. Эти гранулы состоят преимущественно из полифосфатов. Волютиновые гранулы выполняют функцию депо фосфатов.

Требования к отчёту

1. Провести количественный учёт азотобактерий в исследуемой почве. Для этой цели подсчитывают количество комочков, возле которых образовались колонии, и определяют их процентное содержание на одну чашку Петри с учётом повторности посевов. Результаты исследований записать в таблицу.

Почва	Повторности	Общее количество комочков почвы	Число комочков почвы с колониями	Выделено азотобактерий, %
Парниковая				
Подзолистая лесная				

2. Описать морфологию азотобактерий и зарисовать.

Контрольные вопросы

1. Каково значение азотфиксирующих бактерий для растений?
2. Как выделить и идентифицировать азотфиксирующие бактерии?
3. Каковы культуральные и морфологические свойства азотфиксирующих бактерий?

Лабораторная работа 12

ПОЛУЧЕНИЕ НАКОПИТЕЛЬНОЙ КУЛЬТУРЫ ДЕНИТРИФИЦИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ

Цель работы – освоить метод получения накопительной культуры денитрифицирующих бактерий, методы определения нитратов, нитритов и аммиака в среде культивирования.

План проведения занятия

1. Приготовить питательную среду для получения культуры денитрифицирующих бактерий.
2. Осуществить посев земли на приготовленную питательную среду.
3. Через 7 суток изучить посевы.
4. Провести тесты на наличие аммиака и отсутствие нитратов и нитритов.
5. Изучить морфологию клеток денитрифицирующих бактерий.

Используемое оборудование и материалы: микроскоп, предметные стекла, почва, бактериологические петли, спиртовка, пинцет, скальпель, компоненты для среды Гильтая или готовая среда в пробирках, парафиновое или вазелиновое масло, красная лакмусовая бумага, 1 %-ный водный раствор фуксина или генцианвиолета, дифениламин, 20 %-ный раствор серной кислоты, 10 %-ный раствор хлорида бария, цинк-йод-крахмал, реактив Несслера.

Порядок выполнения работы

1. Приготовьте среду Гильтая следующего состава, г/л: лимоннокислый калий или натрий (трехзамещенный) – 5,0; KNO_3 – 2,0, KH_2PO_4 – 2,0; MgSO_4 – 2,0; CaCO_3 – 0,2; аспарагин – 1,0; FeCl_3 – следы; вода водопроводная. pH среды доведите до 6,8–7,2 10 %-ными растворами NaOH и HCl. Среду разлейте в пробирки высоким слоем и стерилизуйте в автоклаве при 0,5 атм 20 мин.

2. Поместите в пробирки со средой комочек почвы, на поверхность среды аккуратно по стенке пробирки налейте 0,2 мл вазелинового масла для создания анаэробных условий и инкубируйте

в термостате при 30–37 °С в течение 1–2 недель. Одну пробирку оставьте незасеянной в качестве контроля.

3. Через 7–14 суток просмотрите посевы, отметьте помутнение среды, выделение газов, изменение цвета (сине-зеленый цвет является следствием размножения бактерий *Pseudomonas aeruginosa*).

4. Проведите тесты на наличие аммиака и отсутствие нитратов и нитритов. Аммиак обнаруживают по запаху и посинению красной лакмусовой бумаги или с помощью реактива Несслера. Нитраты и нитриты обнаруживают по реакции с реактивом цинк-йод-крахмал: к трем каплям цинк-йод-крахмала добавляют одну каплю 20 %-ного раствора серной кислоты и одну каплю исследуемой среды. Синий цвет свидетельствует о наличии азотистой кислоты.

5. Приготовьте фиксированные мазки полученных культур, покрасьте и микроскопируйте. Зарисуйте морфологию клеток денитрифицирующих бактерий.

Требования к отчёту

1. Указать название и цель работы.
2. Дать описание микробиологического исследования.
3. Сформулировать результаты исследования.
4. Сделать выводы.

Контрольные вопросы

1. Какого состава среда используется для выделения денитрифицирующих бактерий?
2. Каков порядок проведения тестов на наличие аммиака и отсутствие нитратов и нитритов?
3. Какими культуральными и морфологическими свойствами характеризуются денитрифицирующие бактерии?

Лабораторная работа 13

ПОЛУЧЕНИЕ НАКОПИТЕЛЬНЫХ КУЛЬТУР МИКРООРГАНИЗМОВ, РАЗРУШАЮЩИХ ЦЕЛЛЮЛОЗУ

Цель работы – освоить метод получения накопительной культуры микроорганизмов, разрушающих целлюлозу.

План проведения занятия

1. Приготовить питательную среду для получения культуры целлюлозоразрушающих бактерий.
2. Осуществить посев земли на приготовленную питательную среду.
3. Изучить культуральные и морфологические свойства целлюлозоразрушающих бактерий.

Используемое оборудование и материалы: микроскоп, предметные и покровные стекла, стерильная фильтровальная бумага, стерильные стеклянные палочки, бактериологические петли, спиртовка, пинцет, скальпель, стерильные чашки Петри, компоненты для среды Гетчинсона или готовая среда, почва.

Порядок выполнения работы

1. Приготовьте среду Гетчинсона следующего состава, г/л: KH_2PO_4 – 0,1; NaCl – 0,1; CaCl_2 – 0,1; FeCl_3 – 0,1; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,3; NaNO_3 – 2,5; агар-агар – 20 г (2 %).

2. Среду разлейте в чашки Петри и на поверхность положите стерильную фильтровальную бумагу, вырезанную по размеру диаметра чашки.

3. Комочки почвы разложите на поверхность фильтра стерильной стеклянной палочкой параллельными рядами на расстоянии 1 см друг от друга.

4. Поместите чашки в термостат при 30–37 °С и инкубируйте в течение 10–14 суток.

5. После инкубации просмотрите посевы, определите образование колоний целлюлозоразлагающих бактерий, вокруг них бумага становится прозрачной, ослизняется, видны желтые, зеленые, оранжевые и коричневые пятна. Подсчитайте процент колоний целлю-

лозоразлагающих бактерий в вашей пробе почвы (общее количество комочков почвы – 100 %, целлюлозоразлагающих бактерий – x %).

6. Приготовьте препарат «раздавленная капля» из зон разрушения клетчатки. Опишите и зарисуйте морфологию клеток целлюлозоразлагающих бактерий.

Требования к отчёту

1. Указать название и цель работы.
2. Дать описание микробиологического исследования.
3. Сформулировать результаты исследования.
4. Сделать выводы.

Контрольные вопросы

1. Какого состава среда используется для выделения целлюлозоразлагающих бактерий?
2. Каков порядок проведения бактериологического исследования для получения культуры целлюлозоразрушающих бактерий?
3. Какими культуральными и морфологическими свойствами характеризуются целлюлозоразрушающие бактерии?

Лабораторная работа 14

ПОЛУЧЕНИЕ НАКОПИТЕЛЬНЫХ КУЛЬТУР СУЛЬФАТРЕДУЦИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ

Цель работы – освоить метод получения накопительной культуры сульфатредуцирующих бактерий.

План проведения занятия

1. Приготовить питательную среду для получения культуры сульфатредуцирующих бактерий.
2. Осуществить посев земли на приготовленную питательную среду.
3. Изучить культуральные и морфологические свойства сульфатредуцирующих бактерий.

Используемое оборудование и материалы: микроскоп, предметные стекла, бактериологические петли, спиртовка, мостик для окраски мазков, промывалка с водой, красители для окраски по Граму, стерильные пробирки, компоненты для среды Постгейта или готовая среда, резиновые пробки, парафин, пробы сточной воды или почвы (лучше болотной).

Порядок выполнения работы

1. Приготовьте среду Постгейта следующего состава:

раствор 1, г: K_2HPO_4 – 1,0; NH_4Cl – 1,0; $\text{CaSO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 1,0; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 2,0; лактат Na (70 %-ный раствор) – 3,5; дрожжевой экстракт – 1,0; pH = 7,4; дистиллированная вода – 980 мл;

раствор 2, г: $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5; дистиллированная вода – 10 мл;

раствор 3, г: аскорбиновая кислота – 0,1; Na тиогликолят – 0,1; дистиллированная вода – 10 мл, pH = 7,4.

Растворы простерилизуйте отдельно, затем слейте и расфасуйте по стерильным пробиркам до самого верха.

2. Внесите почву или пробу сточной воды, плотно закройте пробирки резиновыми пробками и залейте парафином.

3. Инкубируйте пробирки в течение 20–25 суток в термостате при 30–37 °С.

4. Просмотрите посе́вы после инкубации. Пробы считают положительными по сульфатредуцирующим бактериям, если в пробирках осадок после инкубации почернел.

5. Приготовьте фиксированный мазок, окрасьте, изучите под иммерсионным объективом.

6. Опишите характер роста в пробирках и зарисуйте морфологию клеток сульфатредуцирующих бактерий.

Требования к отчёту

1. Указать название и цель работы.
2. Дать описание микробиологического исследования.
3. Сформулировать результаты исследования.
4. Сделать выводы.

Контрольные вопросы

1. Какого состава среда используется для выделения сульфатредуцирующих бактерий?
2. Каков порядок проведения бактериологического исследования для получения культуры сульфатредуцирующих бактерий?
3. Какими культуральными и морфологическими свойствами характеризуются сульфатредуцирующие бактерии?

Лабораторная работа 15

ТРАНСФОРМАЦИЯ КЛЕТОК *ESCHERICHIA COLI* НВ 101 ПЛАЗМИДНОЙ ДНК, ИМЕЮЩЕЙ ГЕНЫ УСТОЙЧИВОСТИ К АНТИБИОТИКАМ

Цели работы – ознакомление с методом выделения ДНК плазмид из бактериальной клетки; освоение метода трансформации бактериальных клеток плазмидной ДНК.

План проведения занятия

1. Понятие о генетической инженерии. Генная, геномная и хромосомная инженерия.
2. Выполнение микробиологического исследования по трансформации клеток *E. coli* НВ 101 плазмидой, несущей гены устойчивости к антибиотикам.

Используемые оборудование и материалы: клеточная суспензия *E. coli* НВ 101, 0,1N раствор CaCl_2 , пробирки с мясопептонным бульоном, чашки Петри с пластинами мясопептонного агара, центрифуга, ампициллин, тетрациклин, трис-НСI буфера (рН 8,0), водяная баня, ледяная баня, ацетат натрия, изопропанол, колбы Эрленмейера.

Порядок выполнения работы

1. Подготовка клеток *E. coli* НВ 101 для трансформации.
2. Трансформация клеток *E. coli* НВ 101 плазмидой, несущей гены устойчивости к антибиотикам.

Для выполнения студентами лабораторного задания по трансформации клеток *E. coli* НВ 101 плазмидой, несущей гены устойчивости к антибиотикам, необходимо заранее подготовить культуры *E. coli*, несущей плазмиду резистентности к ампициллину и тетрациклину.

Подготовительная работа (выполняется лаборантами)

Подготовка культуры E. coli, несущей плазмиду резистентности к ампициллину и тетрациклину. Для этого *E. coli* выращивали на питательном бульоне, содержащем эти антибиотики, в течение 24 ч при 37 °С.

Концентрирование клеток E. coli:

- 5 мл бульонной культуры перенесли в центрифужную пробирку и отцентрифугировали в течение 5 мин при 4000 об./мин;
- надосадочную жидкость слили в специальную колбу-приемник.

3. Лизис клеток *E. coli*:

- осадок ресуспендировали в 2 мл трис-НСI буфера (рН = 8,0), содержащего 8 % сахарозы, 50 мл М ЭДТА и 10 мг/мл лизоцима;
- перемешали встряхиванием в течение 3–5 секунд;
- поместили пробирки на водяную баню (100 °С) на 1 мин и сразу же охладили на ледяной бане;
- полученную после теплового шока смесь, содержащую остатки клеточных структур и молекулы ДНК, перенесли в стерильную центрифужную пробирку и отцентрифугировали в суперцентрифуге при 25000 об./мин;
- после центрифугирования надосадочную жидкость, содержащую ДНК, перенесли в другую пробирку и провели осаждение ДНК с использованием соответствующих реагентов (ацетат натрия, изопропанол).

4. Подготовка рецепиентной культуры *E. coli* НВ 101. Для этого *E. coli* НВ 101 культивировали в колбах Эрленмейера с жидкой питательной средой в течение 24 ч при 37 °С. Из выращенной культуры приготовили разведение в 1000 раз.

Работа, выполняемая студентами

5. Подготовка клеток *E. coli* НВ 101 для трансформации. Студенты получают по 5 мл разведенной клеточной суспензии *E. coli* НВ 101:

- определение количества клеток *E. coli* НВ 101, взятых для проведения трансформации (контроль), для чего 0,1 мл суспензии *E. coli* НВ 101 высевают «газоном» на МПА;
- оставшуюся взвесь культуры *E. coli* НВ 101 (4,9 мл) переносят в стерильную центрифужную пробирку и охлаждают 3 мин на льду;
- центрифугируют суспензию при 4000 об./мин в течение 5 мин;
- сливают надосадочную жидкость в специальную колбу-приемник;
- клетки ресуспендируют в 2 мл трис-НСI буфера для трансформации (рН = 8,0), содержащего 0,1М CaCl₂ (обработка бактерий

ионами кальция увеличивает эффективность поглощения ими ДНК, при этом компетентной, т. е. способной поглощать плазмидную ДНК, становится только часть культуры, подвергающейся трансформации).

6. Трансформация клеток *E. coli* HB 101 плазмидой, несущей гены устойчивости к антибиотикам. Раствор плазмидной ДНК (0,5 мл) выдается студентам в пробирке:

- в пробирку с 0,5 мл раствора плазмидной ДНК добавляют 0,5 мл суспензии клеток *E. coli* HB 101, подготовленных для трансформации (из центрифужной пробирки);
- пробирку, в которой проводится трансформация, выдерживают на ледяной бане в течение 3 мин;
- переносят пробирку на водяную баню (37 °С) на 2 мин;
- в пробирку добавляют 1 мл питательного бульона и инкубируют 3 мин на водяной бане при 37 °С (за это время у бактерий должна восстановиться жизнеспособность, и начинают экспрессироваться гены, определяющие устойчивость к антибиотикам);
- 0,1 мл суспензии клеток после трансформации высевают «газоном» на селективную питательную среду (МПА с антибиотиками) для определения на следующем занятии количества трансформантов.

Требования к отчёту

1. Указать название и цель работы.
2. Дать описание микробиологического исследования.
3. Сформулировать результаты исследования.
4. Сделать выводы.

Контрольные вопросы

1. Понятие о генетической инженерии. Генная, геномная и хромосомная инженерия.
2. Особенности структуры генов прокариот и эукариот.
3. Схема типового генноинженерного эксперимента. Компоненты, необходимые для его постановки.
4. Источники получения чужеродной ДНК. Цель и стадии получения ДНК.
5. Векторы и их свойства. Методы введения векторов в клетки различных организмов.
6. Пермиссивные клетки, их свойства.
7. Основные этапы рДНК-биотехнологии.
8. Полимеразная цепная реакция как метод накопления (амплификации) ДНК *in vitro*.
9. Биологически активные вещества, получаемые с использованием технологии рекомбинантной ДНК.

Правила техники безопасности при выполнении лабораторных работ по биотехнологии

1. В учебных лабораториях по выполнению биотехнологических исследований не разрешается работать с живыми патогенными микроорганизмами.

2. Рабочее место, где непосредственно проводится работа с культурами микроорганизмов, следует дезинфицировать не только до начала работы, но и после ее окончания растворами лизола или хлорамина, а также 70 %-ными растворами изопропилового или этилового спиртов.

3. Нельзя загромождать рабочее место посторонними предметами.

4. Все сосуды, содержащие реактивы и другие вещества, должны иметь маркировку.

5. Нельзя пробовать на вкус химические вещества и питательные среды.

6. Нельзя работать в лаборатории без спецодежды.

7. По окончании работ в лаборатории дежурный и руководитель перед уходом обязаны проверить, закрыты ли все газовые и водяные вентили, потушены ли спиртовки, выключены ли электронагревательные приборы и вентиляция, убраны ли горючие вещества.

8. Работа под вакуумом должна производиться в очках, стеклянные сосуды должны быть защищены экранами или обернуты полотенцем.

9. Проводить операции с нагревом, при которых используются кислоты или щелочи, следует только в очках.

10. По окончании работы привести рабочее место в порядок.

11. Не оставлять в открытом состоянии реактивы, едкие щелочи и кислоты.

12. Сдать в мойку лабораторную посуду или вымыть её самому.

13. Нельзя находиться в помещениях при включенной бактерицидной лампе.

14. Не разрешается в лаборатории курить, хранить и употреблять еду, напитки, жевательную резинку.

15. К работе с автоклавом и другими сосудами под давлением допускаются только подготовленные лица.

Рекомендуемая литература

Основная

1. Артемова, Э.К. Основы общей и биоорганической химии : учеб. пособие / Э.К. Артемова, Е.В. Дмитриев. – М. : КноРус, 2010. – 248 с.
2. Биологическая химия : учеб. пособие для вузов / Ю.Б. Филиппович [и др.] ; под ред. Н.И. Ковалевской. – 3-е изд., испр. и доп. – М. : Академия, 2009. – 255 с.
3. Экологическая химия : учеб. пособие / В.В. Егоров [и др.]. – СПб. : Лань, 2009. – 192 с.
4. Санитарная микробиология : учеб. пособие / Р.Г. Госманов [и др.]. – СПб. : Лань, 2010. – 240 с.

Дополнительная

5. Артеменко, А.И. Органическая химия : учеб. для вузов / А.И. Артеменко. – 3-е изд., перераб. и доп. – М. : Высш. шк., 1994. – 560 с.
6. Комов, В.П. Биохимия : учеб. для вузов / В.П. Комов, В.Н. Шведова. – 2-е изд., испр. – М. : Дрофа, 2006. – 639 с.
7. Кноре, Д.Г. Биологическая химия : учеб. для хим., биолог. и мед. вузов / Д.Г. Кноре, С.Д. Мызина. – 3-е изд., испр. – М. : Высш. шк., 2002. – 479 с.
8. Биологическая химия : учеб. пособие. для вузов / Ю.Б. Филиппович [и др.] ; под ред. Н.И. Ковалевской. – 2-е изд., перераб. и доп. – М. : Академия, 2008. – 255 с.