

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ

«САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ ПРОМЫШЛЕННЫХ ТЕХНОЛОГИЙ И ДИЗАЙНА»

ВЫСШАЯ ШКОЛА ТЕХНОЛОГИИ И ЭНЕРГЕТИКИ

Е. А. Павлова, Н. К. Удовенко, Э. П. Терентьева

БИОТЕХНОЛОГИЯ

Учебно-методическое пособие

Санкт-Петербург
2017

УДК 577.1(075)
ББК 28.072я7
Б 637

Биотехнология: учебно-методическое пособие / сост. Е. А. Павлова, Э. П. Терентьева, Н. К. Удовенко; ВШТЭ СПбГУПТД. СПб., 2017. – 56 с.

В настоящем учебно-методическом пособии представлены правила по технике безопасности при работе в микробиологической лаборатории, техника подготовки питательных сред, методы стерилизации питательных сред и посуды, методы выделения чистых культур микроорганизмов, исследование их макро- и микроморфологических характеристик.

Кроме того, даны краткие теоретические сведения и примеры расчетов для определения активности биологических агентов в биотехнологических процессах. Указаны также методики приготовления рабочих растворов и некоторые аналитические методы исследования.

Предназначено для студентов – бакалавров направления 29.03.03 «Технология упаковочного производства» всех форм обучения и для самостоятельной работы.

Рецензент: зав. отделом производства пищевых растительных белков и биотехнологии Всероссийского научно-исследовательского института жиров, канд. техн. наук, доцент М. Л. Доморощенко

Подготовлено и рекомендовано к печати кафедрой технологии целлюлозы и композиционных материалов Высшей школы технологии и энергетики СПбГУПТД (протокол № 3 от 30 ноября 2017 г.).

Утверждено к изданию методической комиссией института технологии Высшей школы технологии и энергетики СПбГУПТД (протокол № 2 от 5 декабря 2017 г.).

Рекомендовано к печати Редакционно-издательским советом ВШТЭ СПбГУПТД в качестве учебно-методического пособия.

© Высшая школа технологии и
энергетики,
СПбГУПТД 2017

© Павлова Е.А, Удовенко Н.К.,
Терентьева Э.П., 2017

ВВЕДЕНИЕ

Учебно-методическое пособие по дисциплине «Основы биотехнологии» состоит из двух частей: первая часть посвящена технической микробиологии и манипуляциям, связанным с ней. Во второй части рассматриваются биотехнологические процессы.

В настоящее время понятие «биотехнология» включает в себя множество направлений деятельности. Это управляемое получение целевых продуктов с помощью биологических агентов и целенаправленное конструирование биологических агентов с применением генной и клеточной инженерии.

Определить, что такое биотехнология, нелегко, так как эта область широко интегрирует с такими отраслями науки и техники, как:

- молекулярная биология;
- генетика;
- генная инженерия;
- биохимия;
- микробиология;
- физическая химия;
- химическая технология и другие.

Расширение сферы приложения биотехнологии приводит к поиску новых режимов и технологий, которые во многом зависят от свойств компонентов биотехнологической системы, в первую очередь – биологического агента, от требований, предъявляемых к продукту (от назначения продукта), и от технико-экономических показателей, которые необходимо достигнуть.

Основными компонентами биотехнологического процесса являются биологический агент, субстрат и технологический режим. Наличие этих компонентов предполагает получение целевого продукта.

В качестве биологических агентов могут выступать микроорганизмы, культуры клеток, комплексы ферментов и чистые ферменты.

Главное требование к субстрату – наличие источника углерода в легкоусвояемой форме, а также наличие элементов питания.

Технологический режим включает в себя все необходимые условия протекания процесса и его аппаратное оформление.

Чаще всего в качестве биологических агентов используют живые микроорганизмы, поэтому важно владеть методами работы с ними, в том числе с сохранением стерильных условий.

Лабораторный практикум по дисциплине "Основы биотехнологии" включает в себя работы по изучению свойств биологических агентов и методов их использования в биотехнологических процессах. **Промышленная биотехнология** объединяет методы переработки, в которых для получения ценных продуктов используются живые организмы и биологические процессы. Если в химической технологии на сырье воздействуют химическими реагентами, то в биотехнологических

процессах на исходный материал – субстрат - воздействуют биологическими агентами. Биологическими агентами могут быть микроорганизмы, клетки животных и растений и выделенные из клеток биологические структуры. Поскольку в промышленности наиболее широко используемыми биологическими агентами являются микроорганизмы, часть лабораторного практикума организована в микробиологической лаборатории.

Микробиологическая лаборатория представляет собой комплекс помещений, оборудования и приборов, позволяющих использовать различные приемы для культивирования микроорганизмов и изучения их морфологических, физиологических и биохимических свойств. Организация и оборудование микробиологической лаборатории определяются её назначением. Обычно в структуру любой микробиологической лаборатории входят комнаты для микробиологических исследований и подсобные помещения (автоклавная, моечная, для приготовления питательных сред).

Работа в микробиологической лаборатории должна проводиться в **асептических условиях**, т.е. в условиях, предупреждающих попадание чужеродных, посторонних микроорганизмов на исследуемые объекты. Создание асептических условий предусматривает дезинфекцию помещений, стерилизацию инструментов и материалов. Рабочие помещения должны быть оборудованы вентиляцией. Стены рабочих помещений для проведения влажной уборки и обработки дезинфицирующими средствами выкладываются плитками или окрашиваются масляной краской.

Лабораторные помещения оборудованы шкафами, полками для хранения аппаратуры, посуды, реактивов. В состав оснащения микробиологической лаборатории обязательно входят: газовые или спиртовые горелки, штативы для пробирок, стеклянные шпатели (шпатель Дригальского), пипетки градуированные и Пастера, пинцеты, бактериальные петли (крючки, иглы), ножницы, фильтровальная бумага, предметные и покровные стекла, биологические микроскопы, лупы, установки для культивирования микроорганизмов, биксы для стерилизации, наборы красителей и реактивов для окраски препаратов. В лаборатории должен присутствовать определенный набор лабораторной посуды, включающий пробирки, чашки Петри, колбы Виноградского и Линднера, качалочные колбы, флаконы Ру (матрацы), промывалки, ампулы и т.п.

Общие правила по охране труда и технике безопасности при работе в микробиологической лаборатории

В лабораторном практикуме по дисциплине "Основы биотехнологии" наряду с общими правилами по охране труда и технике безопасности (ТБ) при работе в химической лаборатории, должны соблюдаться требования, обусловленные спецификой микробиологической лаборатории.

К работе в лаборатории студенты допускаются только после ознакомления с организацией её работы и правилами ТБ. Работать одному в лаборатории запрещается. Приступать к работе можно только в присутствии преподавателя или лаборанта. Работы выполняются строго в соответствии с методикой эксперимента. Следует бережно и аккуратно обращаться с посудой, приборами и предметами оборудования; разумно экономить реактивы, воду, газ и электричество.

Во время работы в лаборатории необходимо соблюдать тишину, чистоту и порядок на своем рабочем месте и в лаборатории. Нельзя отвлекаться от работы и отвлекать других студентов. Запрещается держать на лабораторном столе портфель, сумку и другие посторонние предметы. Для них должно быть отведено специальное место. В лаборатории запрещается пить воду, принимать и хранить пищу, курить. В качестве рабочей одежды необходимо иметь хлопчатобумажный халат.

Для обеспечения стерильности работу с микроорганизмами лучше проводить в специальных стеклянных или полустеклянных камерах--боксах, которые бывают разных размеров. В боксах вмонтированы ультрафиолетовые бактерицидные лампы, уничтожающие микроорганизмы.

Необходимо следить за тем, чтобы дрожжевая масса не загрязняла руки, стол и окружающие предметы. Ватные пробки, закрывающие сосуды с микроорганизмами, не должны своей внутренней частью соприкасаться со столом или руками. Пролитую дрожжевую суспензию необходимо обезвредить с использованием дезинфицирующих средств (спирт и т.п.). Бактериальная петля после пересева микроорганизмов должна быть прокалена над пламенем и поставлена в специальный штатив. Вся рабочая лабораторная посуда, содержащая живые микроорганизмы, после работы должна подвергнуться термической обработке в автоклаве.

При работе со спиртовками следует остерегаться воспламенения паров спирта внутри спиртовки. Нельзя зажигать спиртовку от другой спиртовки. Гасить спиртовку следует только с помощью специального колпачка. Необходимо контролировать наличие спирта в спиртовке. По окончании работы не оставлять спиртовку зажженной. В случае воспламенения ватных пробок, пробирок и колб необходимо немедленно накрыть их полотенцем, прекратив к ним доступ воздуха.

По завершении работы необходимо привести в порядок рабочее место. Не разрешается бросать в раковины бумагу, вату, стекло от разбитой химической посуды.

Двери лаборатории держат закрытыми. Для обозначения действительного или возможного присутствия биологической опасности употребляют международный знак биологической опасности (рис. 1). Данным знаком обозначают помещения, оборудование, емкости, а также материалы, в которых выращиваются живые микроорганизмы. Знак окрашен люминесцирующей оранжевой или оранжево-красной краской.

Рядом со знаком дается соответствующая информация о характере опасности, и указываются меры, обеспечивающие безопасную работу с данной группой микроорганизмов.

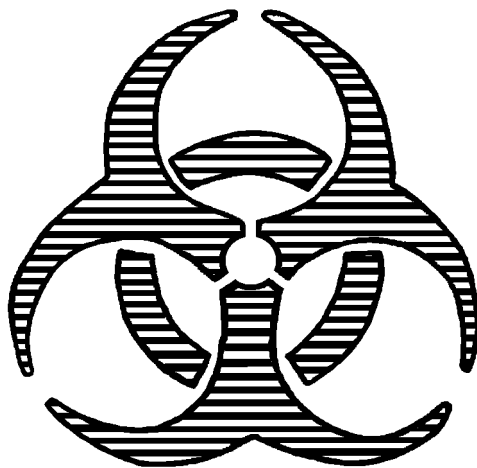


Рис. 1. Знак биологической опасности

1. Основы общей микробиологии

Микробиология - наука о живых организмах, имеющих малые размеры и невидимых невооруженным глазом. Она изучает строение, физиологию, биохимию, генетику и экологию микроорганизмов, а также роль и значение в жизни человека.

Несмотря на то, что микробиология как наука сформировалась значительно позже, чем ботаника и зоология, она заняла ведущее место среди биологических дисциплин в теоретических и прикладных исследованиях. Использование микроорганизмов в качестве объектов генетических и биохимических исследований открыло новую эпоху в естествознании.

Изучение биосинтетической деятельности микроорганизмов показало их способность к синтезу ценных соединений, имеющих большое практическое значение. Появились новые отрасли промышленности, основанные на микробном синтезе сложных веществ, когда химический способ получения, их либо невозможен, либо очень сложен и дорог. Это, прежде всего, относится к белкам, липидам, аминокислотам, витаминам, ферментам, гормонам антибиотикам и другим биологически активным веществам.

В настоящее время налажено промышленное производство микробного белка на углеродсодержащих средах. По содержанию аминокислот этот белок более богат, чем растительный и синтезируется быстрее, чем высшими организмами.

Преимуществом микробиологического синтеза является то, что он не требует особых условий (высоких температур, давления, вакуума), исходным материалом служит доступное и дешевое сырье, включая отходы ряда производств (деревообрабатывающего, свеклосахарного, гидролизного, нефтеперерабатывающего и др.).

Некоторые направления общей микробиологии оформились в самостоятельные дисциплины. Среди них можно отметить медицинскую, ветеринарную, техническую, почвенную, геологическую и водную микробиологии, а также вирусологию и др.

Техническая, или промышленная микробиология рассматривает особенности развития микроорганизмов, используемых для получения различных органических веществ, применяемых в народном хозяйстве; разрабатывает и совершенствует научные методы синтеза ферментов, витаминов, аминокислот, антибиотиков и других биологически активных веществ.

Работа с живыми микроорганизмами требует специфического оборудования и методов его подготовки. Поэтому в настоящем пособии этим вопросам уделено особое внимание.

1.1. Подготовка посуды и оборудования к работе с живыми объектами

Посуда и оборудование, контактирующие с микроорганизмами, должны быть стерильными. Перед стерилизацией посуду и оборудование тщательно моют, высушивают и готовят к стерилизации. Вымытые и высушенные пробирки закрывают ватно-марлевыми пробками, объединяют по 15...20 штук и заворачивают в бумагу. На колбы с пробками надевают бумажные колпачки.

При подготовке к стерилизации градуированных пипеток или пипеток Пастера в их верхнюю часть помещают кусочек ваты, который не должен быть очень плотным, но и не должен свободно двигаться в пипетке. Вату проталкивают вглубь пипетки, выступающие волокна обжигают в пламени горелки, чтобы они не мешали плотно зажимать пипетку пальцем. Пипетки затем обматывают полосками бумаги шириной 4...5 см и длиной 50...70 см, начиная с нижней части и постепенно перемещаясь к верхнему концу с ватным тампоном. Полностью обернув пипетку, на бумаге обязательно указывают вместимость пипетки. Завернутые пипетки объединяют по 10...15 штук и заворачивают в бумагу или помещают в специальный бикс.

Чашки Петри заворачивают по 3...5 штук или помещают в специальные биксы по 10...12 штук, не заворачивая их в бумагу.

Расширяющуюся часть шпателя Дригальского (рис. 2, а) заворачивают в бумагу, затем группируют по 3...5 штук и заворачивают вместе.

Предметные и покровные стекла, используемые для приготовления препаратов микроорганизмов, необходимо вымыть и обезжирить. Обезжиривание стекол особенно важно при изготовлении фиксированных препаратов.

Новые стекла промывают водой, вытирают, а затем обрабатывают смесью спирта и эфира (50:50 по объему), опуская в эту смесь на 2...3 дня. После этого стекла вытирают или обжигают на огне.

Бывшие в употреблении старые стекла опускают на 2 ч в хромовую смесь, затем хорошо промывают водой и кипятят в 2%-ном растворе соды или в мыльной воде, промывают водой и смесью спирта с эфиром. Иногда для обезжиривания используют мыло. Сухим куском мыла натирают стекла, а затем протирают их чистой сухой тканью. Обезжиренные стекла следует брать в руки за грани.

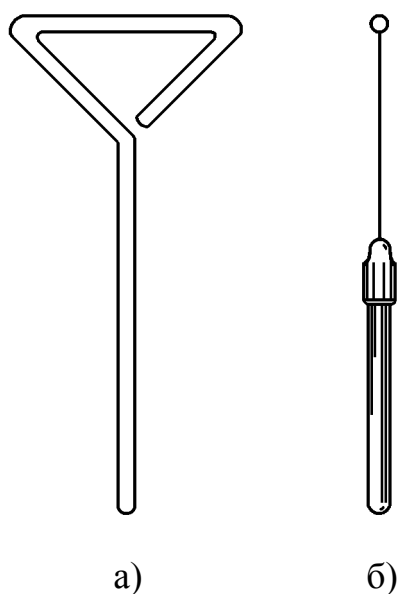


Рис. 2. Инструменты для работы с микроорганизмами:

а – шпатель Дригальского;

б – бактериальная петля

Стерилизацию посуды и оборудования проводят различными физическими и химическими методами. Выбор метода определяется материалом и размерами стерилизуемого предмета. Наиболее распространены и надежны термические методы стерилизации (прокаливание в пламени, стерилизация сухим жаром, стерилизация паром под давлением и т.д.).

Мелкие металлические инструменты [бактериальные петли (рис. 2, б), иглы, крючки, пинцеты, ножницы] стерилизуют прокаливанием в пламени спиртовки непосредственно перед использованием. При прокаливании микроорганизмы и их споры сгорают. В пламени спиртовки стерилизуют также покровные и предметные стекла перед использованием.

Крупные предметы и различную стеклянную и фарфоровую посуду стерилизуют сухим жаром или горячим воздухом в сухо-жаровых стерилизаторах, способных обеспечить нагрев до 200 °С.

Часть материалов, таких как резина, дерево, ткани, бумага, не способны выдерживать многократную стерилизацию сухим жаром при 180...200 °С, поэтому стерилизацию этих материалов и изделий из них проводят при меньших температурах, но с помощью водяного пара. Совместное действие высокой температуры и водяного пара повышает эффективность тепловой стерилизации, и уже при 110...120 °С происходит уничтожение как вегетативных, так и споровых форм микроорганизмов. Менее термостойкие материалы, например некоторые виды пластмасс, стерилизуют облучением (ультрафиолетовые лучи, γ - излучение), или ультразвуком. Можно также использовать антисептики - химические вещества, уничтожающие микроорганизмы, такие как спирт, растворы формалина, хлорамина, сульфата меди (медного купороса) и др.

1.2. Техника подготовки и методы стерилизации питательных сред

Питательными средами называют смеси веществ, на которых выращивают микроорганизмы в лабораторных и промышленных условиях. Состав питательной среды и её физико-химические характеристики должны соответствовать физиологическим потребностям выращиваемой культуры микроорганизмов.

1.2.1. Классификация питательных сред

Питательные среды **по своему назначению** делятся на диагностические, элективные и производственные. **Диагностические среды** предназначены в основном для обнаружения, выделения и идентификации патогенных микроорганизмов по морфологическим и физиологическим признакам. **Элективные среды** обеспечивают преимущественное развитие одного вида или группы родственных микроорганизмов и непригодны или менее пригодны для других. **Производственные питательные среды**, в свою очередь, подразделяют на **посевные** и **основные ферментационные**. Первые предназначены для приготовления посевного материала, вторые для производства продукции.

Среды должны содержать отдельные ингредиенты в определенных соотношениях, пропорциональных потребностям в них данной культуры микроорганизмов. Специфичность питательных сред определяется набором соединений, поставляющих клеткам углерод и азот. Во многих случаях соединения, необходимые для существования одних микроорганизмов, оказываются совершенно непригодными для других, и поэтому не может быть универсальной питательной среды для всех

микроорганизмов. Менее разнообразны организмы по потребностям в минеральных веществах, поэтому минеральный фон сред для многих микроорганизмов бывает очень близким по составу.

Питательные среды **по составу** подразделяют на естественные, искусственные и синтетические. **Естественные, или натуральные среды** представляют собой натуральные продукты животного или растительного происхождения со сложным и неопределенным составом (солодовое сусло, молоко, яйца, овощи и т.п.). Их используют для поддержания культур микроорганизмов и накопления биомассы. **Синтетические среды** готовятся из определенных химически чистых соединений в точно указанных концентрациях. Эти среды, в отличие от натуральных, имеют определенный состав и используются для изучения обмена веществ у микроорганизмов и составления рецептов питательных сред. **Искусственные, или полусинтетические среды** готовят на основе натуральных продуктов сложного состава (дрожжевой экстракт, солодовое сусло, гидролизаты растительных материалов и т.п.) с добавлением органических и неорганических соединений известного состава (углеводы, фосфаты, нитраты и др.). Такие среды широко применяются в промышленной биотехнологии для производства крупнотоннажных продуктов.

Для питательных сред, кроме состава, очень важны и такие физико-химические факторы, как рН, осмотическое давление или активность воды, окислительно-восстановительный потенциал, парциальное давление кислорода и др. Кислотность среды является важным фактором, значение которого для разных микроорганизмов может существенно отличаться (рН от 3,5 до 9,0). Большинство микроорганизмов развивается в нейтральной или слабощелочной среде, тогда как дрожжи обычно развиваются в более кислой среде.

Активность воды (0,6...0,998) определяет границы жизни микроорганизмов и учитывается при составлении жидких сред и определении влажности твердых питательных сред. При длительном культивировании микроорганизмов может происходить значительное концентрирование жидких сред вследствие испарения содержащейся в них воды, что окажется неблагоприятным для роста микроорганизмов. Поэтому в процессе длительного культивирования необходимо регулярно доводить объем культуральной жидкости до первоначального объема стерильной водой.

1.2.2. Составы и способы приготовления питательных сред

Питательные среды в зависимости от предназначения могут быть разной консистенции: сухие, сыпучие, жидкие, полужидкие и плотные. Питательные среды **в сухом виде** (влажность до 10 %) выпускаются промышленностью. Они удобны при хранении и транспортировке, легко растворяются в воде при комнатной температуре. **Сыпучие среды**

применяют в промышленности для хранения культур микроорганизмов. В качестве сыпучих сред используют разваренное пшено и кварцевый песок, пропитанный питательным раствором.

Жидкие питательные среды используют в биотехнологии для накопления биомассы и продуктов метаболизма, также их применяют для изучения физиологических и биохимических особенностей микроорганизмов. В некоторых случаях жидкие среды уплотняют. Так, например, для хранения культур удобно использовать **полужидкие среды**, а для выделения чистых культур микроорганизмов и в диагностических целях - **плотные среды**. В качестве уплотнителя жидких сред обычно используют **агар** - полисахаридный препарат, получаемый из водорослей. Агар не растворяется в холодной воде и легко растворяется в кипящей. При охлаждении водных растворов агара они образуют прочные гели, которые при нагревании расплавляются, а при охлаждении вновь застывают. Такие агаризованные среды можно неоднократно подвергать термической обработке для стерилизации. Для получения полужидких сред используют 0,5%-ные растворы агара, а для плотных - 1,5...2,0%-ные.

Солодовое сусло. Солод представляет собой проросшие в искусственных условиях зерна злаков, отличающиеся повышенным содержанием водорастворимых соединений и гидролитических ферментов (гидролаз). При приготовлении сусла происходит ферментативный гидролиз углеводов и белков. В результате получается полноценная среда для выращивания микроорганизмов, содержащая легко усваиваемые углеводы (глюкоза, фруктоза, сахароза, мальтоза, мальтотриоза, мальтотетраоза), аминокислоты, все основные витамины группы В и минеральные вещества. Сусло получают либо с пивоваренных заводов (неохмеленное), либо готовят из ячменного солода.

В лаборатории для приготовления сусла в 1 дм³ воды вносят 250 г ячменного солода крупного помола с высокой осахаривающей способностью и нагревают до 50 °С. Через 30 мин температуру повышают до 55 °С, а еще через 30 мин постепенно поднимают температуру до 62,5...63,0 °С и не снижают до исчезновения реакции на крахмал (йодная проба). Затем сусло отфильтровывают через марлю или вату, разливают по колбам и стерилизуют.

Сусло-агар. Для приготовления плотных сред сусло разводят водой в отношении 1:1. Если рН раствора ниже 5,5, доводят рН до 5.6...6.0 аммиачной водой или раствором карбоната натрия или гидроксида калия и добавляют 2 % агара от массы уплотняемой среды. Растворение агара происходит в ходе термической стерилизации при 115 °С.

Мясопептонный бульон. Для количественного учета микроорганизмов и выделения их в чистую культуру применяют прозрачные плотные среды на основе мясопептонного бульона. 500 г свежего мелко изрубленного или размолотого мяса заливают 1 дм³ воды, нагревают до 50 °С и выдерживают 60 мин при этой же температуре или 12 ч в холодном месте. Экстракт

отфильтровывают через холст или марлю и кипятят 30 мин. Затем добавляют 0,5 % NaCl и 1 % пептона (смесь продуктов неполного гидролиза белков). Фильтруют в горячем состоянии через двойной бумажный фильтр. Фильтрат доводят водой до первоначального объема (1 дм³) и устанавливают pH.

Мясопептонный агар. К мясопептонному бульону прибавляют мелко нарезанный агар в количестве от 1,5 до 2,0 % и расплавляют его. Расплавленный мясопептонный агар фильтруют через вату или вату с марлей и быстро разливают по емкостям.

Среда Андреева - синтетическая среда, используемая для культивирования дрожжей. В 1 дм³ воды растворяют: 0,7 г H₃PO₄ (в виде 10 %-ного водного раствора), 4 г CH₃COOH (также предварительно разбавить водой до 10 %-ной концентрации), 0,6 г KCl, 0,3 г MgSO₄ · 7 H₂O, 0,084 г Ca(H₂PO₄), 8 см³ 0,1 н NaOH или 3...4 капли силикатного клея, 20 г глюкозы. Аммиачной водой доводят pH до 5,6...6,0. В некоторых случаях добавляют 5...20 см³ дрожжевого автолизата. Буферная емкость данной среды позволяет культивировать дрожжи без контроля pH.

Среда Ридер - синтетическая среда, используемая для культивирования дрожжей. В 1 дм³ среды содержится: 20 г сахарозы, 3 г (NH₄)₂SO₄, 0,7 г MgSO₄, 0,5 г NaCl, 0,4 г Ca(NO₃)₂, 1 г KH₂PO₄, 0,1 г K₂HPO₄.

Дрожжевая вода применяется как компонент питательной среды. Получают кипячением в 1 дм³ воды в течение 10 мин 70 г свежих прессованных или 20 г сухих дрожжей. После кипячения сразу же фильтрацией удаляют остатки дрожжей.

Среды на основе гидролизатов древесины и сульфитных щелоков - искусственные среды для культивирования дрожжей. Среду готовят смешением 8 объемных частей гидролизата или щелока с 2 объемными частями дрожжевой воды. На 1 дм³ среды добавляют 1 г K₂HPO₄ и 1 г (NH₄)₂SO₄ и доводят значение pH до 4,6...5,0 аммиачной водой (5 % NH₄OH).

Агаризованные среды на основе гидролизатов древесины. Гидролизаты древесины содержат, главным образом, моносахариды, массовую долю которых оценивают по содержанию редуцирующих веществ (РВ). Сульфатом аммония и гидрофосфатом калия доводят массовую долю азота и фосфора до определенного уровня: для РВ = 1,5...1,6 % массовая доля азота - 0,7...0,8 мг/см³, фосфора (в пересчете на Р₂O₅) - 0,35...0,40 мг/см³; для РВ = 2,8...3,0 % массовая доля азота - 1,4...1,6 мг/см³, фосфора (в пересчете на Р₂O₅) - 0,7...0,8 мг/см³. На 1 дм³ среды добавляют 30 г агара и аммиачной водой доводят pH до 5,4...5,6.

Среда для плесневых грибов. В 1 дм³ воды растворяют 2 г NaNO₃, 1 г K₃PO₄, 0,5 г MgSO₄, 0,5 г KCl, 0,01 г Fe₂(SO₄)₃ и 30 г сахарозы.

1.2.3. Стерилизация питательных сред

При приготовлении питательных сред необходимо учитывать возмож-

ность их инфицирования посторонними микроорганизмами. Источником инфекции могут быть окружающий воздух, вода, компоненты питательной среды, загрязненная посуда и оборудование. Поэтому принимают меры для уничтожения живых микроорганизмов и предотвращения их попадания во время хранения и проведения исследований в питательную среду. Обработка, при которой достигается полное освобождение от живых микроорганизмов, в том числе и от их споровых форм, называется **стерилизацией**.

Питательные среды обеззараживают с использованием различных методов. Наиболее распространены **термические методы**, при которых питательные среды нагреваются и выдерживаются при определенной температуре в течение времени, достаточного для стерилизации. Обычно питательные среды стерилизуют обработкой насыщенным водяным паром под давлением в автоклавах - сосудах, предназначенных для работы под давлением. Питательные среды перед стерилизацией паром под давлением (автоклавированием) разливают в чистую посуду не более чем на половину её вместимости и закрывают ватно-марлевыми пробками и бумажными колпачками. Емкости с питательной средой помещают в автоклав, в который подается водяной пар. После удаления из автоклава воздуха и заполнения его паром закрывают паровой клапан и контролируют температуру и давление в автоклаве. Продолжительность обработки зависит от температуры и объема стерилизуемой среды. Небольшие объемы жидкости (примерно до 3000 см³) можно простерилизовать при 115...117 °С (0,7 МПа) в течение 30 мин, для стерилизации больших объемов требуется более длительная обработка.

Некоторые компоненты питательной среды могут не выдержать длительную обработку при повышенных температурах (более 100 °С), поэтому приходится снижать температуру стерилизации. Однако при температурах 100 °С и ниже многие споровые формы микроорганизмов остаются жизнеспособными и для их уничтожения используют дробную стерилизацию. Сущность **дробной стерилизации** заключается в том, что стерилизуемый материал нагревают и выдерживают при определенной температуре в течение времени, достаточного для уничтожения вегетативных клеток, затем охлаждают и выдерживают при 18...37 °С. Споровые формы при этой температуре прорастают и превращаются в вегетативные, которые при повторных прогревах погибают. Дробную стерилизацию при 100 °С проводят текучим паром, используя автоклав с открытым паровыпускным клапаном. Дробная стерилизация при 60...80 °С называется **тиндализацией**. Недостатком дробной стерилизации является возможность образования споровых форм вегетативными клетками, образовавшимися из проросших спор. Следует отметить, что этот недостаток можно использовать для выделения спорообразующих чистых культур в методе, называемом **пастеризацией**. Однократный нагрев при

60...80 °С убивает бесспорные микроорганизмы. Пастеризацию проводят при 60...75 °С продолжительностью 15...30 мин или при 80 °С – 10...15 мин. Иногда нагревают до 90 °С и сразу же охлаждают. Пастеризацию широко применяют в промышленности при переработке пищевых продуктов.

Для стерилизации питательной среды, содержащей термолабильные компоненты, можно использовать "холодную" стерилизацию ультрафильтрацией. При стерилизации **ультрафильтрацией** жидкая среда продавливается (0,1...1,0 МПа) через мембранный фильтр, задерживающий микроорганизмы и споры. Мембранные фильтры представляют собой пористые материалы - мембраны с размерами пор 0,01-0,10 мкм. Стерилизуют их в дистиллированной воде автоклавированием или длительным кипячением.

Более просты в употреблении асбестовые и стеклянные фильтры, которые задерживают клетки микроорганизмов не только механически, но и частично из-за адсорбции на стенках пор. Для стерилизации используют отечественные асбестовые фильтры марки "СФ" (стерилизационный фильтр) в виде пластинок толщиной 3...5 мм и диаметром 35 и 140 мм. Перед употреблением асбестовые пластинки монтируют в специальный фильтровальный аппарат-прибор Зейтца, состоящий из двух частей: металлического или стеклянного полого цилиндра и нижней части с опорной сеткой. На опорную сетку кладут асбестовый фильтр и обе части соединяют винтами или зажимами. На трубку нижней части одевается резиновая пробка, посредством которой она вставляется в колбу с тубусом (колбу Бунзена). Приготовленный таким образом фильтр обертывается в бумагу и стерилизуется в автоклаве.

Питательные среды стерилизуются и далее хранятся в сосудах (колбы, пробирки), закрытых ватными пробками и бумажными колпачками. Ватные пробки препятствуют попаданию внутрь микроорганизмов из окружающего воздуха и наоборот, но в то же время они должны быть достаточно пористыми для обеспечения газообмена с окружающей средой. Для изготовления пробок используют гигроскопическую вату, которую разрывают на длинные узкие полосы соответствующей величины. Полосы кладут на стол и загибают внутрь боковые стороны или все четыре края так, чтобы получилась ровная лента шириной около 4...5 см (в длину пробки). Из ленты скатывают валик требуемого диаметра и отрывают остаток ленты. Правильно изготовленная пробка должна легко входить в пробирку (колбу и т.п.), плотно прилегать к её стенкам, не нарушая газообмена между содержимым пробирки и внешней средой. Форма пробки не должна изменяться после извлечения из сосуда. Ватные пробки обтягивают марлей, такая ватно-марлевая пробка более удобна и имеет более длительный срок использования. Пробки готовят и подбирают к сосудам заблаговременно до разлива питательной среды и стерилизации.

В таблице приведены способы и режимы стерилизации питательных сред, посуды и лабораторных материалов.

Способы и режимы стерилизации

№ п/п	Стерилизуемый материал	Способ стерилизации	Режим стерилизации	Примечание
1	Питательные среды:			
	- жидкие и агаризованные, не содержащие компонентов, разлагающихся при 120 °С	Автоклавирование	120 °С (0,1 МПа), 20 мин	В колбах, пробирках, флаконах и т.д., закрытых ватными пробками с бумажными колпачками
	- жидкие и агаризованные с сахарами и другими соединениями, не выдерживающими нагревание при 120 °С	Автоклавирование	110 °С (0,05 МПа), 15...30 мин	То же
		Дробная стерилизация	Текущий пар (100 °С); 30...60 мин, 3 дня подряд	-- “ --
2	Колбы, химические стаканы, флаконы, пробирки	Автоклавирование	115 °С (0,07 МПа), 25...40 мин	-- “ --
		Сухим жаром	160...170 °С, 90 мин	Закрытые ватными пробками с бумажными колпачками
3	Чашки Петри, пипетки, шпатели	Автоклавирование	120 °С (0,1 МПа), 20 мин	То же
		Сухим жаром	160...170 °С, 90 мин	Завернутые в бумагу
4	Держатели бактериальных фильтров, резиновые пробки и шланги, фильтры Зейтца	Автоклавирование	120 °С (0,1 МПа), 30 мин	То же
		Автоклавирование	120 °С (0,1 МПа), 20 мин	Завернутые в бумагу

Окончание таблицы

№ п/п	Стерилизуемый материал	Способ стерилизации	Режим стерилизации	Примечание
5	Мембранные фильтры	Автоклави- рование	110 °С (0,05 МПа), 15 мин	В сосуде с дистиллиро- ванной водой
		Кипячение	30 мин (2...3 раза меняют воду)	

1.3. Вспомогательные операции в микробиологической лаборатории

1.3.1. Пересевы микроорганизмов

В микробиологической практике постоянно встречается необходимость перевести культуру микроорганизмов из одного сосуда в другой. Такая операция называется **пересевом микроорганизмов**. Пересевы производят при выделении чистой культуры микроорганизма, при необходимости размножить микроорганизмы, при изучении микрофлоры объектов и для освежения старой культуры.

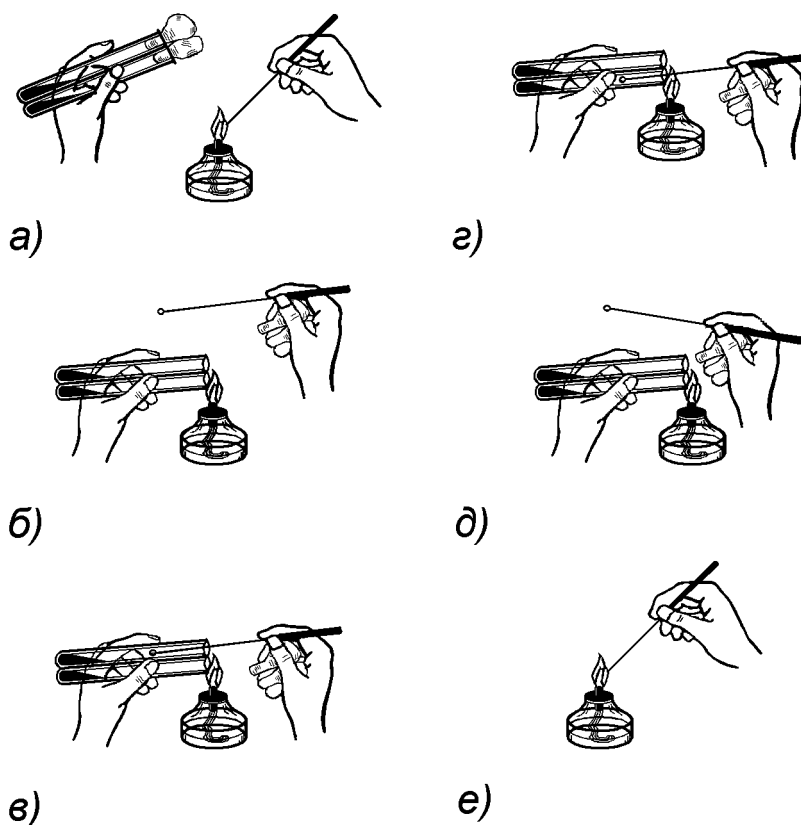


Рис. 3. Посев культуры из пробирки в пробирку

Пересевы микроорганизмов следует проводить в асептических условиях в помещении с чистым воздухом, лучше в отгороженном участке комнаты (застекленном боксе), при наименьшем движении воздуха. Стол должен быть чистым, предварительно протертым смоченным в спирте ватным тампоном. Перед работой необходимо тщательно вымыть руки, одеть халат. Посев культуры производится над пламенем спиртовой горелки в условиях, обеспечивающих наименьшую возможность попадания посторонней микрофлоры в засеваемую питательную среду.

Посев производится бактериальной платиновой или хромоникелевой петлей, впаянной в стеклянную палочку или укрепленной в специальном держателе. При посеве бактериальная петля берется в правую руку за держатель, зажимается между большим и указательным пальцами и стерилизуется прокаливанием на пламени горелки (рис. 3,а). После накаливания докрасна петли обжигается вся проволока и соприкасающаяся с ней часть держателя. Затем в левую руку берут две пробирки (одна с культурой дрожжей, которая служит посевным материалом, а другая со скошенной питательной средой). Пробирки держат в наклонном положении. Мизинцем и безымянным пальцем правой руки захватывают пробки пробирок и прижимают к ладони правой же руки; левая рука делает осторожные вращательные движения, а правая вынимает пробки над пламенем (рис. 3,б). При таком осторожном извлечении пробок должно исключаться резкое вхождение окружающего воздуха в открываемые пробирки, а вместе с ним и посторонних микроорганизмов. Всю эту операцию производят быстро, продолжая держать в правой руке обожженную бактериальную петлю, не касаясь ею каких-либо предметов. После извлечения пробок горловины пробирок сразу же обжигают кругом на пламени горелки, затем вводят в пробирку с культурой петлю и охлаждают её, прикасаясь к внутренней поверхности сосуда, после чего петлей подхватывают кусочек или каплю посевного материала (рис. 3,в). Отобранный посевной материал бактериальной петлей переносят в пробирку со стерильной питательной средой (рис. 3,г). Обе пробирки закрывают над пламенем горелки пробками (рис. 3,д). После посева бактериальную петлю обязательно обжигают (рис. 3,е).

При пересеве микроорганизмов, находящихся в виде суспензии в жидкой среде, помимо бактериальной петли используют градуированные пипетки и пипетки Пастера. Пипетки должны быть стерильными, завернутыми в бумагу. При разворачивании бумаги и последующих операциях нельзя трогать руками нижнюю часть пипетки и прикасаться ею к посторонним предметам. Работа с посевным материалом проводится с соблюдением тех же правил, что и при работе с бактериальной петлей. Использованные пипетки помещают в дезинфицирующий раствор и повторно используют только после стерилизации.

В микробиологической практике для количественных измерений часто работают с суспензиями микроорганизмов. В качестве суспензионных

жидкостей используют стерильную водопроводную воду. Смешивая суспензию микроорганизмов с определенным объемом воды, можно добиться необходимого разведения. Высев на плотные среды из подготовленной суспензии делают пипеткой, внося в каждую чашку со средой по $0,05 \text{ см}^3$ или по одной капле измеренного объема. Для каждого разведения высевают производят не менее чем в три чашки, и результаты измерений затем усредняют.

1.3.2. Разлив агаризованных сред в чашки Петри

Колбу с агаризованной средой (сусло-агар или мясопептонный агар) нагревают на водяной бане до расплавления среды, а затем остужают до $45...50 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Среду разливают по стерильным чашкам в асептических условиях. Горловину колбы берут в правую руку и над пламенем горелки левой рукой вынимают ватно-марлевую пробку, прижав ее мизинцем к ладони. Обжигают горловину колбы, левой рукой слегка приподнимают крышку чашки. Осторожно, не прикасаясь к чашке, вводят горловину под крышку и наливают расплавленную среду (рис. 4). В каждую чашку наливают по $15...20 \text{ см}^3$ среды, распределяя ее равномерно по дну чашки слоем $5...6 \text{ мм}$, и закрывают крышку. Образовавшиеся пузырьки воздуха сразу же удаляют, поднося к ним зажженную спичку. Заполненные чашки ставят на горизонтальную поверхность, где при комнатной температуре за $15...30 \text{ мин}$ происходит уплотнение среды.

При проведении посева в день разлива среду подсушивают в термостате $20...30 \text{ мин}$. В термостате осторожно снимают крышку с чашки и

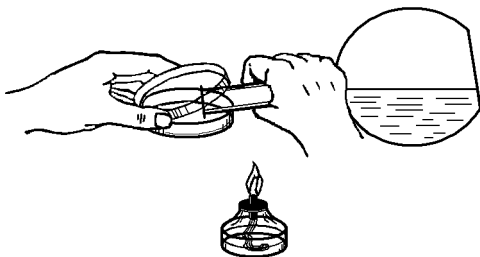


Рис. 4. Выливание питательной среды в чашку Петри

устанавливают их отверстием вниз. Если посев производят на другой день, то чашки, не подсушивая, заворачивают в бумагу, в которой их стерилизовали, и помещают в холодильник или термостат.

1. 4. Методы выделения чистых культур микроорганизмов

Совокупность жизнеспособных микроорганизмов, выращенных на определенной питательной среде, называется **культурой микроорганизмов**, а сам процесс выращивания - **культивированием**.

Чистая культура микроорганизма представляет собой популяцию микроорганизмов одного вида, выросшую на стерильной питательной среде. **Вид** - таксономическая категория, объединяющая группу микроорганизмов общего происхождения, близких по своим свойствам, обособленную отбором от других видов и приспособленную к определенной среде обитания. Культуру, состоящую из разных видов микроорганизмов, называют **смешанной культурой**. В биотехнологии применяют высокопродуктивные штаммы микроорганизмов. **Штаммом** называют чистую культуру микроорганизмов, выделенных из определенного источника, т.е. из среды их обитания, и отличающихся некоторыми передаваемыми по наследству свойствами от других представителей вида. Штамм представляет собой генетически однородную культуру, искусственно поддерживаемую с помощью отбора наследственно однородных клеток.

В реальных условиях одновременно сосуществуют разные виды микроорганизмов. Из естественной среды обитания микроорганизмы переносят в специальные среды, условия в которых будут благоприятны только для определенного вида микроорганизмов и неблагоприятны для сопутствующих видов. Такие питательные среды называют **элективными**. Элективные условия можно создавать, меняя состав среды, значение pH, температуру и т.д. Например, дрожжи выделяют, используя кислые среды (pH 3,5...5,0) или среды, обогащенные углеводами (массовая доля сахаров – 20...50 %). В элективной питательной среде происходит накопление определенного вида микроорганизмов и подавление жизнедеятельности сопутствующих видов. Полученные культуры называют **накопительными**.

Из накопительной культуры выделяют чистую культуру микроорганизмов, используя методы, основанные либо на биологических свойствах микроорганизмов, либо на принципе механического их разделения. **Практически выделение чистой культуры сводится к изоляции одной клетки и получению чистой культуры в виде потомства этой родительской клетки.** Генетически однородное потомство одной клетки называется **клоном**.

Таким образом, получение чистой культуры микроорганизмов и ее использование включает три этапа: получение накопительной культуры, выделение чистой культуры и контроль чистоты культуры.

В лабораторном практикуме по дисциплине "Основы биотехнологии" для приобретения навыков работы с микроорганизмами используются отдельные виды дрожжей. Термин "дрожжи" не имеет самостоятельного таксономического значения. Дрожжами называют грибные организмы, проводящие большую часть своего жизненного цикла в виде отдельных клеток. Следовательно, дрожжи могут быть определены как одноклеточные грибы, размножающиеся почкованием или делением. Однако, как представители высших грибов, они могут образовывать

мицелий и размножаться спорами.

Дрожжи более удобный объект для исследования, чем другие микроорганизмы. Клетки дрожжей достаточно крупные, имеют круглую, овальную или удлинённую форму, с максимальными размерами от нескольких микрометров до 15-25 мкм и более. Дрожжи не токсичны и не патогенны для человека и с древнейших времен используются в качестве биологического агента для производства пищевых продуктов. Аскоспорогенные дрожжи, входящие в роды *Saccharomyces* (сахаромицеты) и *Schizosaccharomyces* (шизосахаромицеты), широко используются в пищевой промышленности и, в качестве продуцентов этанола, в гидролизной промышленности и на сульфитно-спиртовых заводах. Дрожжи, относящиеся к несовершенным грибам, среди которых выделяются представители рода *Candida*, используют для производства белковой биомассы, так как в дрожжевых клетках содержится много белка, углеводов, аминокислот и витаминов группы В. Отдельные виды дрожжей выращивают не только на углеводном сырье, но и на углеводородном.

1.4.1. Методы поверхностного посева на плотные среды

Метод основан на том, что на поверхности плотной среды происходит иммобилизация микроорганизмов, т.е. они теряют подвижность и при размножении образуют видимые невооруженным взглядом скопления микроорганизмов - **колонии**. При выделении чистой культуры необходимо обеспечить такое распределение на поверхности плотной среды микроорганизмов, чтобы колонии образовывались из отдельных клеток и при разрастании не объединялись. Только в этом случае микроорганизмы, взятые из отдельной колонии, можно использовать для выращивания чистой культуры.

Рассев микроорганизмов производят на поверхность агаризованной плотной питательной среды в чашки Петри либо петлей по принципу "истощающегося штриха", либо из суспензии пипеткой с последующим рассевом шпателем по Дригальскому, или по методу последовательных разведений. Чашки Петри с плотной средой готовят предварительно.

Посев методом "истощающегося штриха" производят бактериальной петлей, нанося очень частые штрихи на поверхность агаризованной среды без промежуточного прожигания петли либо прожигая петлю после каждого штриха. В последнем случае на чашку Петри с сусло-агаром производят посев петлей в виде вертикального штриха в левой части чашки (рис. 5). Затем петлю обжигают, охлаждают, касаясь петлей внутренней стенки чашки или поверхности агаризованной среды и проводят горизонтально второй штрих, начиная от первого. Петлю вновь обжигают, охлаждают и проводят петлей вертикальный штрих, пересекая второй штрих. Далее этой же петлей (без обжига) наносят на поверхность среды сетку из горизонтальных и вертикальных штрихов, не касаясь

первых трех штрихов. При нанесении штрихов происходит растаскивание клеток микроорганизмов по поверхности среды. С каждым новым штрихом число растаскиваемых клеток уменьшается и, если вначале при попадании на сусло-агар большого количества клеток рост микроорганизмов будет в виде сплошного штриха, то на последних штрихах должны вырасти отдельные колонии из изолированных клеток. Засеянные чашки Петри помещают в термостат и выдерживают 3...4 суток при 28...32 °С.

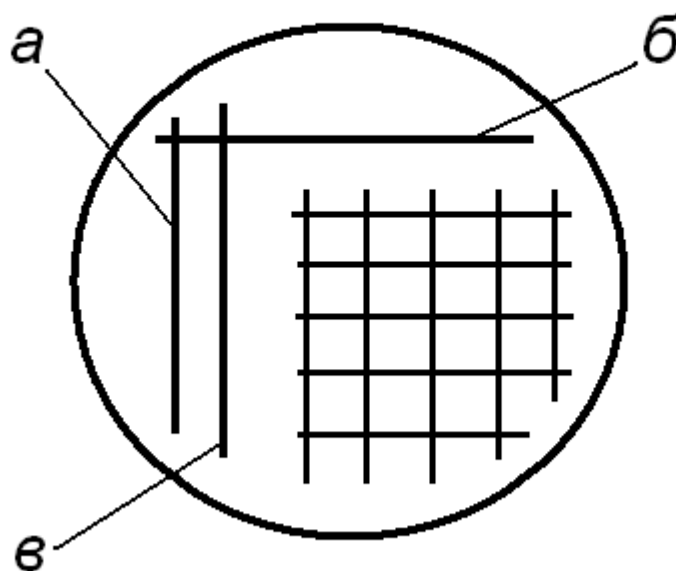


Рис. 5. Схема «истошающегося штриха»: *а* — первый штрих; *б* — второй штрих; *в* — третий штрих

Рассев шпателем по Дригальскому. Каплю суспензии дрожжевых клеток стерильной пипеткой или петлей наносят на поверхность сусло-агара в чашке Петри и стерильным шпателем Дригальского растирают каплю по всей поверхности питательной среды (рис. 6). Затем шпатель переносят во вторую чашку и втирают оставшуюся на шпателе культуру в поверхность питательной среды, и т.д. Обычно подобным образом последовательно засевают 3...4 чашки на случай, если в первой будет очень густой рост колоний. Этот метод поверхностного посева иногда называют "истошающимся мазком". Чашки с засеянными культурами помещают в термостат и выдерживают 3...4 суток при 28...32 °С.

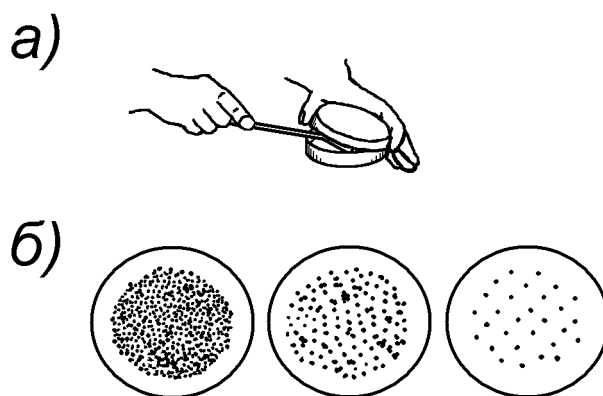


Рис. 6. Рассев шпателем по Дригальскому: *а* – рассев; *б* – выросшие колонии микроорганизмов

Метод последовательных разведений более надежен, так как позволяет наносить на поверхность плотной питательной среды определенное число клеток микроорганизмов. Известно, что размеры стандартной чашки Петри обеспечивают изолированный рост не более 50...100 колониям. Следовательно, при внесении в чашку суспензии, содержащей около 50 клеток, и её равномерном распределении по поверхности питательной среды будут выращены изолированные колонии, образовавшиеся из отдельных клеток. Метод разведений особенно удобен для смешанной культуры, которая часто развивается в производственных условиях.

В тех случаях, когда известна концентрация клеток в суспензии, можно рассчитать необходимый коэффициент разведения, обеспечивающий внесение с определенным объемом суспензии требуемого числа клеток (**метод предельных разведений**). Например, в 1 см^3 исходной дрожжевой суспензии содержится 100000 клеток. Если градуированной пипеткой в одну чашку Петри вносят $0,05 \text{ см}^3$ суспензии, то для получения изолированных колоний в этом объеме должно быть 50 клеток. Следовательно, в 1 см^3 суспензии должно содержаться 1000 клеток. Поэтому исходную суспензию следует развести в 100 раз. Для этого в две стерильные пробирки наливают по $4,5 \text{ см}^3$ стерильной водопроводной воды. В первую пробирку вносят $0,5 \text{ см}^3$ исходной суспензии, т.е. разводят суспензию в 10 раз, и перемешивают. Затем из первой пробирки стерильной пипеткой отбирают $0,5 \text{ см}^3$ и переносят во вторую пробирку, т.е. разводят ещё в 10 раз. В результате двух последовательных разведений исходная суспензия разводится в сто раз. После перемешивания из второй пробирки рассеивают суспензию на плотную питательную среду. Засеянные чашки термостатируют.

В случае неизвестной концентрации клеток в суспензии готовят несколько **последовательных разведений** (рис. 7) в стерильной

водопроводной воде с определенным коэффициентом разведения, обычно равным 10. Для этого 1 см^3 исходной дрожжевой суспензии стерильной

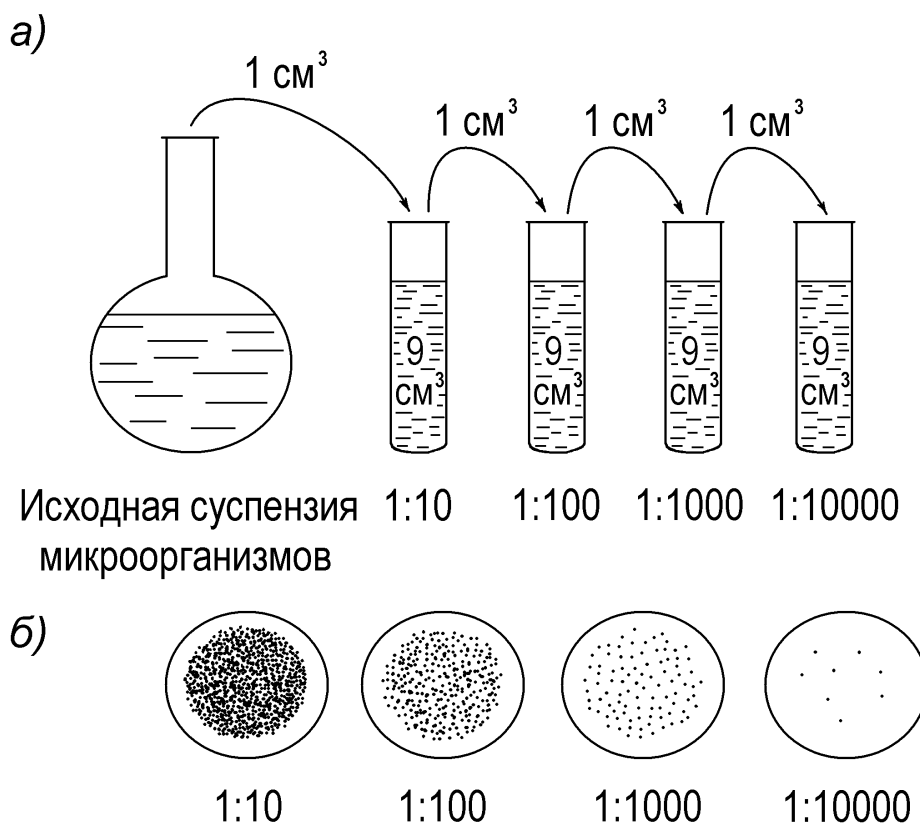


Рис. 7. Метод последовательных разведений: а – схема метода; б – выросшие колонии микроорганизмов

пипеткой добавляют в пробирку с 9 см^3 стерильной водопроводной воды (получают разведение 1:10), перемешивают содержимое пробирки и этой же пипеткой берут каплю взвеси, переносят в чашку Петри и засевают шпателем по поверхности агаризованной среды. Следующее разведение готовят аналогичным образом, используя вместо исходной суспензии суспензию с разведением 1:10, 1:100, 1:1000 и т.д. Для каждого посева используют стерильные инструменты (пипетки, шпатели Дригальского), колба с исходной суспензией микроорганизмов и пробирки закрыты ватно-марлевыми пробками (на рис. 7а не показаны). Засеянные чашки термостатируют. Чаще всего в первых двух чашках образуются сплошные "газоны", тогда как в последующих чашках можно выделить отдельные колонии. Если для посева брать пипеткой строго определенный объем суспензии, то по числу изолированных колоний в одной чашке, зная разведение, можно рассчитать концентрацию жизнедеятельных микроорганизмов в исходной суспензии, предполагая, что каждая колония образуется из отдельной живой клетки.

Процесс выделения чистой культуры микроорганизма методом поверхностного посева на плотные среды заканчивается пересевом бактериальной петлей микроорганизмов из одной, выросшей изолированно колонии в пробирку с питательной средой. Накопление чистой культуры в лаборатории проводят в два этапа - выращивание в пробирках, а затем в колбах на жидких и плотных средах. Контролем чистоты выделенной культуры служит однородность клеток под микроскопом и однотипность колоний на чашке Петри при последующем расसेве.

1. 5. Морфология микроорганизмов

Морфология (от греческих слов "морфа" - форма, "логос" - учение) - наука о форме и строении организмов. Видовые отличия микроорганизмов, сформировавшиеся в ходе эволюции, включают в себя макро- и микроморфологические признаки. **Макроморфологические признаки** объединяют культуральные признаки, т.е. признаки, характеризующие рост культуры на плотных средах или в жидких. **Микроморфологические признаки** характеризуют отдельные вегетативные клетки (форма, размеры), а также способы вегетативного или бесполого размножения и образуемые при этом структуры. Макроморфологические признаки в основном изучают визуально, микроморфологические - с помощью микроскопа.

При описании культур дрожжей изучают как макро-, так и микроморфологические признаки. Работа проводится только на чистых культурах. Необходимо также использовать стандартные среды и методы культивирования, так как морфологические признаки существенно изменяются в зависимости от состава среды и условий выращивания.

1.5.1. Макроморфологические характеристики на плотных средах

Рост дрожжей в жидких средах наблюдают и описывают после посева двухсуточной культуры (культуры, выросшей за 2 суток после посева на сусло-агаре) в солодовое сусло (15 % сухих веществ) или в глюкозо-пептонную среду (глюкоза 2 %, пептон 1 %, дрожжевой экстракт 0,5 %, дистиллированная вода). Посев производят в пробирки или колбы Эрленмейера и термостатируют при 25 °С. При росте в жидких средах дрожжи могут образовывать пленки разного характера, вызывать образование пристеночного кольца, осадка и помутнение среды.

Рост в виде пленки характеризует способность клеток объединяться в мицелиальные структуры. При образовании истинного мицелия пленка обычно толстая и плотная, но в старых культурах она может превращаться в слизистую массу. В течение 1...2 суток роста образуется тонкая, тусклая, иногда мелкоморщинистая и взползающая по стенкам пробирки пленка, обычно характерная для дрожжей с окислительным типом энергетического метаболизма, имеющих потребность в кислороде.

Описание характера роста дрожжей при термостатировании при 25 °С в жидкой среде дается через сутки, 6 суток и 4 недели. При этом указываются все наблюдаемые внешние признаки. **Пленка:** толстая, тонкая, морщинистая, складчатая, слизистая, плесневидная, блестящая, влажная, кожистая, цвет, всплывающая по стенке. **Кольцо пристеночное:** цвет, сплошное, прерывистое, тонкое, широкое. **Осадок:** скудный, обильный, плотный, рыхлый, зернистый, хлопьевидный, слизистый, цвет. **Муть:** слабая, сильная, равномерная, хлопьевидная.

При росте на плотных средах, в зависимости от метода посева, дрожжи могут образовывать сплошные штрихи, изолированные колонии и гигантские колонии. Описание штриха или колонии будет составлять их культуральные признаки. Среда уплотняется либо агар-агаром (2 % от массы среды), либо желатином (20 % от массы среды).

Стандартный штрих получают на скошенном сусло-агаре (10 % сухих веществ) или глюкозо-пептонном агаре с дрожжевым экстрактом. Посев производится бактериальной петлей. Штрих наносят по косой поверхности агаризованной среды снизу вверх (только касаясь поверхности, но не царапая её). Описание штриха дается через 5...7 суток и через 1 месяц выращивания при комнатной температуре. При этом отмечают **рост штриха** (скудный, умеренный, обильный), **характер поверхности** (гладкая, зернистая, пористая, бугристая, складчатая, блестящая, матовая), **цвет** (большинство видов дрожжей дают бесцветный штрих, но некоторые виды синтезируют пигменты), **профиль** (плоский, выпуклый), **форму краев** (ровные, извилистые, фестончатые, изрезанные) и **консистенцию** (штрих сочный, вязкий, сухой).

Колонии на сусло-агаре в чашке Петри описывают через 5...7 дней, а также через 4 недели после посева суспензии дрожжей. Колонии в чашках Петри можно изучать и фотографировать при небольшом увеличении через микроскоп. При описании выросших колоний отмечают их размеры, форму, контур края колонии, рельеф поверхности, характер поверхности, цвет, структуру и консистенцию (рис. 8).

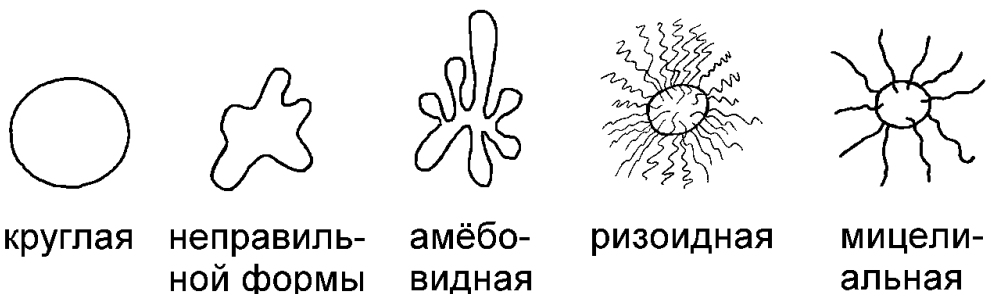
Размер колонии (диаметр) измеряют с помощью линейки или окулярного микрометра при малом увеличении микроскопа и указывают значение в миллиметрах. При этом точечными называют колонии диаметром менее 1 мм (но видимые невооруженным глазом), мелкими – 1...2 мм, средними – 2...4 мм и крупными – более 4 мм в диаметре. **По форме** различают округлые колонии, неправильной формы, амёбовидные, ризоидные и мицелиальные.

Контур края колонии исследуют с помощью лупы или через микроскоп при малом увеличении. Контур может быть ровным или неровным. В последнем случае дают характеристику контура края колонии. Например, волнистый (с крупными округлыми зубцами); зазубренный, или эродированный (с острыми зубцами различной величины и формы); фестончатый (с крупными слегка округленными или уплощенными

зубцами правильной формы); бахромчатый (с длинными изогнутыми ворсинками по краю колонии).

Рельеф колонии (профиль колонии) характеризуют приподнятостью

а) форма колонии



б) контур края колонии



в) рельеф колонии

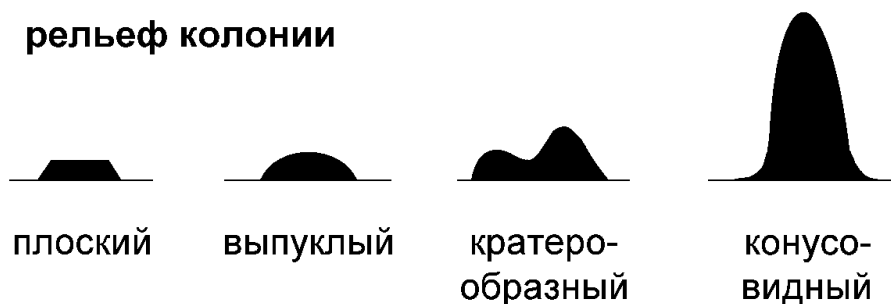


Рис. 8. Культуральные признаки колонии микроорганизмов

её над поверхностью питательной среды и формой контура вертикального разреза. Определяют рельеф колонии при рассмотрении сверху и сбоку. Различают каплеобразные, куполообразные колонии, правильной, круглой формы с различно выраженной степенью выпуклости, которые в вертикальном разрезе представляют собой сегмент шара и отличаются длиной радиуса. Слабо выпуклые колонии имеют большую длину радиуса, куполообразные - меньшую. Плоско-выпуклые колонии имеют в вертикальном разрезе форму трапеции (плоский верх, полого - или круто обрывающиеся края), конусообразные - форму треугольника. Колонии с вдавленным центром называют кратерообразными. Плоские колонии стелятся по поверхности среды.

По характеру поверхности различают следующие формы роста: гладкие (S - smooth) и шероховатые (R - rough), матовые (M - mat) и блестящие глянцевые (G - glossy). Иногда виды дают расщепление на R- и S-формы или на M- и G-формы.

Цвет колоний зависит от образования дрожжами пигментов, соответственно различают бесцветные и пигментированные колонии. Большинство видов дрожжей не синтезируют пигментов и формирует колонии бесцветные или слегка кремового или коричневого оттенка при старении. Грязно-белые колонии также относят к бесцветным. Пигментированные колонии могут быть белыми, черными, темно-зелеными, красными, желтыми и т.д.

Структуру колонии (однородная, мелко- или крупнозернистая, струйчатая, волнистая, чешуйчатая и т.д.) определяют при малом увеличении микроскопа. **Консистенцию колонии** (плотная, мягкая, вырастающая в агар, слизистая, тягучая, волокнистая, хрупкая и т.д.) определяют, прикасаясь к ее поверхности бактериальной петлей.

Гигантские колонии выращивают в небольших конических колбочках или в чашках Петри с толстым (10 мм) слоем плотной питательной среды (сусло-агар или сусло-желатин). В колбочках среду закаливают. Посев производят, нанося стерильной иглой или стеклянной трубкой с оттянутым в капилляр концом каплю суспензии дрожжей на середину поверхности среды в колбочке или чашке. Выращивание проводят в течение 30 суток при комнатной температуре. Описание выросших гигантских колоний проводят согласно вышеприведенной схеме.

1.5.2. Микроморфологические характеристики

Микроморфологические характеристики описывают при исследовании отдельных клеток микроорганизмов. Это могут быть **форма и размеры клеток**. Так, дрожжевые клетки обычно округлые, но у некоторых дрожжей форма клетки (треугольная, серповидная и т.п.) может служить признаком рода. При изучении клеток можно использовать в качестве вспомогательных признаков - **образование капсул и внутрицитоплазматических включений**, представляющих собой резервные вещества разного химического состава.

Небольшие размеры клеток микроорганизмов приводят к необходимости использования микроскопа. Глаза человека с нормальным зрением способны различать детали исследуемого предмета при расстоянии между ними не меньше 0,08 мм. Эту величину принято называть разрешающей способностью. У световых микроскопов разрешающая способность, т.е. то минимальное расстояние между двумя точками, при котором они видимы раздельно, может достигать 0,2 мкм. Микроскопические методы исследования предполагают в качестве объектов наблюдения специально приготовленные препараты. Препараты готовят как живой, так и убитой культуры в окрашенном и неокрашенном

состояниях на специальных предметных стеклах. Длина предметного стекла составляет 76 мм, ширина 26 мм, толщина 1,1...1,4 мм. Приготовленные препараты в некоторых случаях накрывают более тонкими (0,15...0,17 мм) покровными стеклами с размерами 14 x 14 мм, 18 x 18 мм и более. Стекла должны быть чистыми и обезжиренными. Хранят их сухими или в этаноле.

1.6. Приготовление препаратов для микроскопирования

1.6.1. Приготовление препаратов живых культур

Для изучения микроорганизмов в живом неокрашенном состоянии используют препараты "раздавленная" и "висячая капли".

Препарат "раздавленная капля". На предметное стекло пастеровской пипеткой, либо бактериальной петлей или стеклянной палочкой наносят каплю суспензии микроорганизмов (рис. 9). Нанесенную каплю раздавливают. Для этого покровное стекло ставят на ребро, прикасаясь к краю капли, и осторожно опускают его на каплю, постепенно вытесняя воздух, находящийся между предметным и покровным стеклом. Это позволяет избежать образования в капле пузырьков воздуха. В правильно приготовленном препарате "раздавленной капли" стекла плотно склеиваются и жидкость тончайшим слоем заполняет пространство между ними, не выступая за края покровного стекла. Если жидкость выступает за края покровного стекла, то её избыток удаляют фильтровальной бумагой.

При исследовании культуры, выросшей на плотной питательной среде, на предметное стекло наносят каплю водопроводной воды или изотонического раствора хлорида натрия. В эту каплю бактериальной петлей вносят небольшое количество исследуемого материала. Содержимое капли тщательно перемешивают петлей. Если взвесь очень густая, то её разбавляют, перенося часть взвеси петлей в другую каплю воды на отдельное предметное стекло. Затем каплю с микроорганизмами накрывают покровным стеклом. При приготовлении препарата из культуры грибов вместо изотонического раствора хлорида натрия на предметное стекло наносят каплю смеси спирта с глицерином, в которую помещают кусочек мицелия.

В некоторых случаях для лучшей видимости микроорганизмов их подвергают прижизненной окраске очень разбавленными (0,01...0,0001 %) растворами красителей. Например, дрожжевые клетки при обработке раствором метиленового синего или нейтрального красного приобретают, соответственно, синюю или красную окраску. Для этого каплю раствора красителя наносят у края покровного стекла приготовленного препарата "раздавленная капля". Затем к противоположному краю покровного стекла подносят полоску фильтровальной бумаги. Краситель при этом проникает

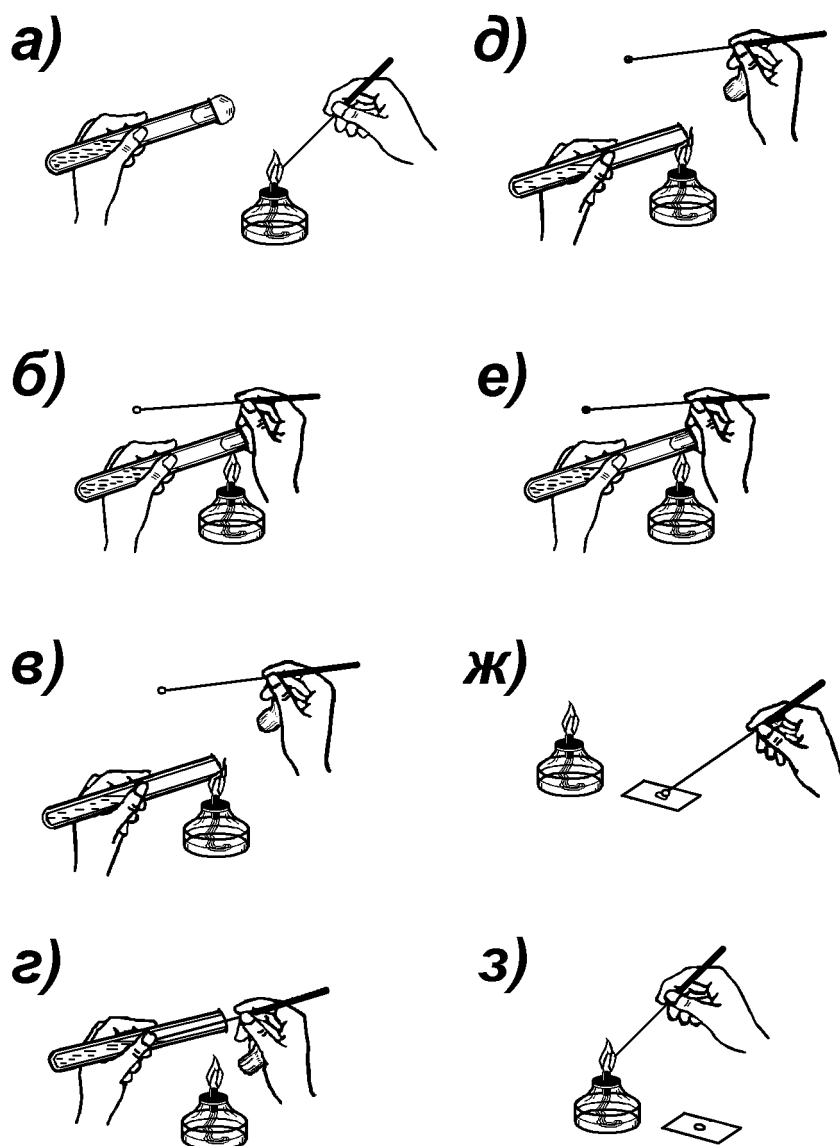


Рис. 9. Приготовление препаратов для микроскопирования

под покровное стекло и окрашивает дрожжевые клетки. Можно препарат "раздавленная капля" готовить непосредственно в растворе красителя. Тип красителя и его концентрацию подбирают с учетом того, что окрашенные микроорганизмы должны оставаться длительное время живыми и способными размножаться.

Препарат "висячая капля". Препарат готовят аналогичным образом, но капля наносится на покровное стекло (рис. 10). Затем покровное стекло резко переворачивают каплей вниз и накладывают на предметное стекло с углублением ("лункой") в середине. Капля должна свободно свисать в углубление, не соприкасаясь с его дном и краями. Края выемки на предметном стекле предварительно смазывают вазелином. Таким образом, капля оказывается в герметически закрытой камере и защищенной от высыхания.

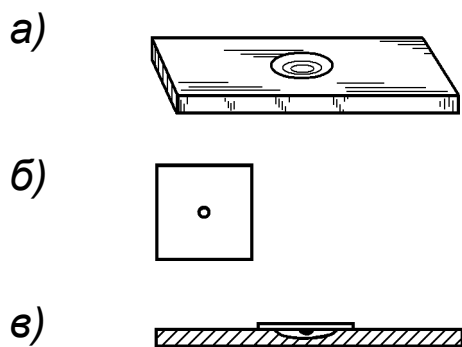


Рис. 10. Препарат «висячая капля»: *а* – предметное стекло, *б* – покровное стекло с каплей, *в* – приготовленный препарат

В препаратах "раздавленная и висячая капли" можно изучать форму и размеры микроорганизмов, наблюдать их подвижность, размножение, образование и прорастание спор, следить за действием на микроорганизмы различных химических раздражителей. Однако в этих прижизненных, или витальных препаратах хорошо видны только сравнительно крупные объекты (дрожжевые клетки, мицелий грибов). Для изучения более мелких объектов, выявления спор, капсул, органоидов, включений препараты микроорганизмов фиксируют и окрашивают, т.е. готовят постоянный (фиксированный) препарат.

1.6.2. Приготовление постоянных (фиксированных) препаратов

Приготовление постоянных препаратов микроорганизмов начинают с **получения мазка**, для чего на поверхности предметного стекла бактериальной иглой распределяют (растирают) тонким слоем по площади 2...4 см² каплю суспензии изучаемой культуры. Слишком растирать каплю не следует, так как при этом нарушается естественное взаиморасположение клеток микроорганизмов. Мазок высушивают на воздухе и фиксируют. В **процессе фиксации** микроорганизмы погибают и фиксируются на поверхности предметного стекла, что защищает их от смывания при окрашивании. Кроме того, убитые микроорганизмы лучше воспринимают красители, чем живые.

Фиксацию осуществляют физическими и химическими методами. В **физическом методе** фиксация полностью высушенного мазка происходит над пламенем спиртовки в течение нескольких секунд. Для этого конец предметного стекла мазком вверх захватывают за грани большим и указательным пальцами и проводят стекло 3...4 раза через верхнюю часть пламени спиртовки. При термической фиксации возможны необратимые изменения в строении клетки, поэтому фиксацию проводят быстро, не допуская перегрева предметного стекла. Тем не менее, при изучении строения клетки этот метод фиксации не используют.

В **химическом методе** фиксации предметное стекло с мазком погружают в

фиксирующую жидкость или наносят её на поверхность мазка. Время обработки зависит от используемого фиксатора: 10...15 мин - этанол, спиртоэфирная (1 : 1) смесь, 5 мин - ацетон, смесь Флеминга (75 см³ 1 %-ной хромовой кислоты, 20 см³ 2 %-ной осмиевой кислоты и 5 см³ 75 %-ной уксусной кислоты), 3 мин - метанол, несколько секунд - формалин, пары осмиевой кислоты. Обычно при фиксации этанолом или спиртоэфирной смесью несколько капель фиксатора пипеткой или из капельницы наносят на поверхность препарата и оставляют до полного испарения фиксатора. После фиксации препарат промывают водой и окрашивают.

1.6.3. Окрашивание препаратов

Окраска фиксированного препарата производится простыми и сложными методами. **Простым методом окраски** называют окраску препарата каким-либо одним красителем. В **сложных методах** окраску проводят в несколько стадий разными красителями. Сложные методы окраски позволяют изучать структуру клетки и провести дифференциацию микроорганизмов.

В простых методах используют красители анилинового ряда (основные или кислотные). Для окраски микроорганизмов обычно используют основные красители (генциановый фиолетовый, кристаллический фиолетовый, метиленовый синий, основной фуксин), которые более интенсивно их окрашивают по сравнению с кислыми красителями (эритрозин, эозин, кислый фуксин). Красители выпускаются в виде аморфных или кристаллических порошков, из которых сначала готовят насыщенные спиртовые растворы, а из них – вводно-спиртовые, которые и используют для окрашивания.

Микроорганизмы окрашивают, нанося на определенное время раствор красителя на поверхность фиксированного препарата. Например, окраску основным фуксином ведут 2 мин, метиленовым синим – 5...7 мин. Если необходимо длительное окрашивание, то раствор красителя наливают в чашку Петри, в неё помещают предметные стекла препаратами вниз на подложенные стеклянные палочки и закрывают крышкой. По истечении требуемого времени краситель сливают с предметного стекла и промывают препарат водой до бесцветной промывной воды, стекающей с поверхности стекла. Затем препарат высушивают на воздухе или осторожно осушают фильтровальной бумагой. Если препарат правильно окрашен и хорошо промыт, то в поле зрения микроскопа он будет совершенно прозрачным с интенсивно окрашенными клетками.

Окраска по методу Грама (модификация Синева). Согласно методу, предложенному Грамом в 1884 г., все микроорганизмы делят на грамположительные и грамотрицательные. Окраску по данному методу проводят полосками фильтровальной бумаги, предварительно пропитанными 1 %-ным раствором генцианового, или кристаллического фиоле-

тового и высушенными. На фиксированный препарат накладывают окрашенную бумагу и заливают небольшим количеством воды. Краситель растворяется в воде и окрашивает при этом препарат. Через 2 мин бумагу удаляют пинцетом, сливают раствор красителя (но не смывают) и наносят раствор Люголя. Через 30-60 с после почернения препарата раствор сливают, и предметное стекло погружают в этанол на 20...30 с. Обесцвечивание спиртом производят до исчезновения фиолетовых струй краски, после чего препарат тщательно промывают водой. Затем в течение 2 мин окрашивают препарат водным фуксином и промывают водой до обесцвечивания промывной воды. Препарат высушивают фильтровальной бумагой. У грамположительных микроорганизмов образовавшийся в клеточной стенке комплекс йода с основным фиолетовым красителем при обработке спиртом не вымывается, и они сохраняют сине-фиолетовую окраску. Грамотрицательные микроорганизмы при обработке спиртом обесцвечиваются и легко окрашиваются фуксином в светло-красный цвет.

Исследование микрофлоры молочных продуктов. Готовят бактериальной петлей мазки молочных продуктов (кефир, сметана, простокваша и т.д.) на предметных стеклах. Если исследуемый продукт густой, то на стекло предварительно наносят каплю стерильной воды, в которой и разводят продукт. Мазок высушивают при комнатной температуре и фиксируют спиртоэфирной смесью, для чего на мазок пипеткой наносят фиксатор на 5...7 мин. Спиртоэфирная смесь, помимо фиксации, растворяет жиры, мешающие микроскопическому исследованию бактерий, содержащихся в молочных продуктах. Фиксированные препараты окрашивают метиленовым синим в течение 7...10 мин. Препарат подсушивают и просматривают под микроскопом с иммерсионным объективом (см. далее). Бактерии *Streptococcus lactis* (молочнокислые стрептококки) представляют собой шарообразные клетки диаметром 0,5...1,0 мкм, расположенные попарно короткими или длинными цепочками. Бактерии *Lactobacillus bulgaricus* (болгарская ацидофилиновая палочка) имеют палочкообразные клетки длиной 4...5 мкм, располагающиеся отдельно или короткими цепочками.

Окраска по методу Циля-Нильсена применяется для окрашивания кислотоустойчивых микроорганизмов, не окрашиваемых другими методами, а также для выявления спор. Для этого используют контрастное окрашивание, при котором сначала полностью окрашивают препарат, в том числе и споры. Затем препарат частично обесцвечивают. При этом споры, сильнее удерживающие краситель, остаются окрашенными, а цитоплазма обесцвечивается. Далее другим красителем подкрашивают цитоплазму, создавая цветовой фон, на котором хорошо просматриваются окрашенные в другой цвет споры.

При окрашивании по методу Циля-Нильсена фиксированный препарат покрывают полоской фильтровальной бумаги, на которую наливают карболовый фуксин Циля. Затем, держа препарат пинцетом, нагревают его

над пламенем спиртовки до появления паров. Добавляют новую порцию красителя и повторяют операцию в течение 3...5 мин. Далее удаляют фильтровальную бумагу и охлаждают препарат до комнатной температуры, после чего тщательно промывают водой. Препарат обесцвечивают 5 %-ным раствором серной кислоты, опуская предметное стекло на 20...30 с в кислоту, и затем препарат тщательно промывают водой. Далее препарат в течение 5 мин окрашивают спиртоводным раствором метиленового синего, снова промывают водой и высушивают. В результате споры окрашиваются в красный цвет, а сами клетки в синий.

В одной из модификаций этого метода на фиксированный препарат наливают карболовый фуксин так, чтобы весь мазок был покрыт краской. Препарат медленно (2...5 мин) нагревают на пламени горелки до появления паров, при этом краске не дают подсохнуть, подливая новые порции краски. Затем краска смывается водой и обесцвечивается 95 %-ным этанолом, содержащим 1 об. %-ной концентрированной соляной кислоты. Препарат промывают водой и докрашивают 3...5 мин 1 %-ным раствором метиленового синего.

Наличие спор в дрожжевых клетках можно установить при рассмотрении и неокрашенного препарата. При этом они будут выглядеть как сильно преломляющие свет однообразные по размерам и форме (круглые или овальные) тельца, содержащиеся внутри клеток. При обычных методах окрашивания эти тельца остаются неокрашенными.

Окраска по методу Виртца. Фиксированный препарат дрожжевых клеток заливают 5 %-ным водным раствором малахитового зеленого и 3...4 раза прогревают над пламенем спиртовки до появления паров (30...50 с). Окрашивание можно производить, выдерживая препарат 3...5 мин в растворе красителя при 80 °С. После окрашивания препараты промывают водой и докрашивают 30 с 0,5 %-ным водным раствором сафранина. В результате споры окрашиваются в сине-зеленый, а клетки в красный цвет.

Окрашивание включений волютина метиленовым синим. Фиксированный препарат дрожжевых клеток окрашивают 3 мин метиленовым синим и промывают водой. Зерна волютина при этом окрашиваются в фиолетовый цвет, а цитоплазма в голубой. Для контрастирования препарата либо обесцвечивают цитоплазму обработкой 1 %-ным раствором серной кислоты в течение 15...20 с с последующей быстрой промывкой водой.

Окрашивание включений волютина по методу Омелянского. Фиксированный препарат окрашивают 30...60 с карболовым фуксином Циля, промывают водой и погружают на 20...30 с в 1 %-ный раствор серной кислоты. Затем быстро промывают водой. Обработка кислотой обесцвечивает цитоплазму, которую для контрастирования дополнительно докрашивают 15...30 с метиленовым синим (в разведении 1:40). После промывки водой препарат осторожно подсушивают фильтровальной бумагой. Цитоплазма клетки окрашивается в синий цвет, а зерна волютина

остаются окрашенными в красный цвет.

Окрашивание включений гликогена. Включения гликогена окрашиваются раствором Люголя в красно-бурый цвет. На предметное стекло наносят каплю суспензии дрожжевых клеток. К капле суспензии добавляют каплю раствора Люголя и накрывают покровным стеклом.

Окрашивание включений жира. Для окрашивания включений жира используют красители, растворимые в жире:

а) на фиксированный препарат наносят каплю раствора судана III и накрывают покровным стеклом. Включения жира окрашиваются в красный цвет, а цитоплазма остается бесцветной;

б) на предметное стекло наносят каплю 40 %-ного раствора формалина и вносят в неё бактериальной петлей культуру дрожжей. Под действием формалина клетки гибнут, и разрушается их оболочка. Через 5 мин к капле инактивированной дрожжевой суспензии добавляют капельку раствора метиленового синего (1:40), выдерживают 10 мин и добавляют каплю раствора судана III. Препарат накрывают покровным стеклом и удаляют избыток жидкости фильтровальной бумагой. Включения жира окрашиваются в розово-оранжевый цвет, а цитоплазма в синий.

1.6.4. Приготовление растворов красителей

Растворы метиленового синего. Для окрашивания препаратов живых культур дрожжей готовят 0,01 %-ной и 0,001 %-ной водные растворы метиленового синего. Для этого соответственно 10 мг или 1 мг сухого красителя растворяют в 100 см³ дистиллированной воды.

Для окрашивания фиксированных препаратов сначала готовят насыщенный спиртовой раствор метиленового синего, который перед употреблением разводят дистиллированной водой (1:10 или 1:40). Насыщенный раствор метиленового синего в 95 %-ном этаноле готовят, добавляя 10 г сухого красителя к 100 г этанола или 3 г красителя к 100 см³ этанола. Растворение проводят в течение 3 суток, периодически встряхивая или перемешивая, затем раствор отфильтровывают.

Красящую способность растворов метиленового синего усиливает добавление в раствор щелочи. Поэтому в некоторых случаях при микроскопических исследованиях используют щелочной раствор метиленового синего. Для его приготовления 30 см³ насыщенного спиртового раствора метиленового синего разбавляют 100 см³ дистиллированной воды и добавляют 1 см³ 1 %-ного раствора гидроксида калия.

Растворы фуксина. Для получения насыщенного спиртового раствора фуксина (фуксин основной), растворяют 10 г сухого красителя в 100 см³ этанола. Разбавленный раствор фуксина получают добавлением к 10... 20 см³ насыщенного раствора фуксина 100 см³ дистиллированной воды. Водные растворы фуксина получают, растворяя 1...10 г сухого красителя в 100 см³ дистиллированной воды.

Карболовый фуксин Циля готовят, растирая в фарфоровой ступке 1 г фуксина с 10 см³ этанола. Затем при растирании добавляют 5 г фенола (карболовая кислота) и постепенно, продолжая растирать, приливают 100 см³ дистиллированной воды. Карболовый фуксин можно приготовить, растворяя 10 см³ насыщенного спиртового раствора фуксина в 100 см³ 5 %-ного водного раствора фенола. Иногда для обычного окрашивания применяют карболовый фуксин, разведенный в 10 раз дистиллированной водой. Но этот раствор не стоек при хранении и поэтому готовится перед употреблением.

Раствор Люголя. 20 г иодида калия растворяют в 100 см³ дистиллированной воды и добавляют 7 г иода. Для ускорения растворения смесь растирают в фарфоровой ступке.

Раствор судана III. Судан III - азокраситель, не растворяющийся в воде, но способный растворяться в жидких жирах (маслах). Для окраски препарата с целью выявления жировых включений в клетках микроорганизмов обычно используют раствор судана III в смеси равных объемов этанола и глицерина. Концентрация красителя в растворе должна быть не менее 0,5 %. Для приготовления раствора сухой порошок судана III растворяют в 96 %-ным этиловом спирте, к которому затем добавляют равный объем глицерина. Для окраски препаратов можно также использовать растворы судана III в молочной кислоте, в 70 %-ном этаноле и в смеси 70 %-ного этанола и ацетона.

1.7. Оценка физиологического состояния дрожжей по микроморфологическим характеристикам

Физиологическое состояние дрожжевых клеток при культивировании на разных питательных средах можно оценивать по наличию включений волютина, гликогена и жира. В молодых активно растущих дрожжевых клетках содержится много **волютина**, который является не только резервным веществом, но и участвует в процессах спорообразования и вегетативного размножения. Волютин встречается в клетках в форме полужидких зерен различной величины и состоит из полифосфатов, липопротеидов, РНК и катионов магния. Накопление волютина происходит в средах, богатых соединениями фосфора. **Гликоген** - резервный полисахарид, массовая доля которого в дрожжевых клетках может достигать в отдельные периоды 30 %. **Жир** также относится к резервным веществам. Включения жира встречаются в клетках многих микроорганизмов, в том числе и дрожжей. В цитоплазме молодых дрожжевых клеток включения жира очень мелкие, тогда как в более зрелых и старых клетках они коалесцируют (слипаются) в крупные капли. При оценке физиологического состояния дрожжей учитывают средний размер и форму клеток, возраст, активность почкования или деления, наличие мертвых клеток. Исследуется и внутренняя структура клеток (тол-

щина стенки, однородность цитоплазмы, наличие и размеры вакуолей, наличие включений).

Измельчение дрожжевых клеток и искажение их формы указывает на недостаток питания, вытягивание клеток может свидетельствовать о недостатке кислорода. Недостаток питания также приводит к исчерпанию резервных веществ, цитоплазма становится зернистой, пропадают вакуоли. С возрастом утолщается оболочка клетки, цитоплазма становится зернистой, появляются и увеличиваются в размерах вакуоли, укрупняются капельки жира и уменьшается содержание волютина. Дрожжи считаются активно почкующимися или делящимися, если число почкующихся или делящихся клеток не менее 50 % общего их числа.

Мертвые клетки при выращивании дрожжей на темных средах приобретают темный цвет. На неокрашенных средах они остаются бесцветными, но в отличие от живых клеток лучше воспринимают красители. Окраску проводят свежеприготовленным водным раствором метиленового голубого (разведение 1:10000). Живые клетки остаются бесцветными, а мертвые окрашиваются. Живые клетки под действием красителя погибают, поэтому окрашенный препарат исследуют сразу же после приготовления. В нормальном состоянии число мертвых клеток не превышает 1...5 %.

1.8. Работа с оптическим микроскопом

Оптический микроскоп (рис. 11) дает увеличение в десятки, сотни и даже тысячи раз, что позволяет непосредственно наблюдать изучаемые объекты. Основные части микроскопа: оптическая система, осветительная система, предметный столик и штатив. Оптическую систему образуют объектив и окуляр, соединенные тубусом. На объективе и окуляре указывается их увеличение. Произведение этих увеличений даст общее увеличение микроскопа. Осветительная система включает в себя источник освещения, двухстороннее зеркало (одна сторона плоская для естественного освещения, другая – вогнутая для искусственного освещения) и конденсор с диафрагмой.

В начале работы добиваются правильного освещения поля зрения микроскопа. При использовании внешнего осветителя исходящий от него пучок света с помощью вогнутого зеркала направляют в наблюдательную систему микроскопа. Диафрагма конденсора при этом открыта, а сам конденсор поднят. При правильной установке освещения поле зрения микроскопа имеет форму круга, хорошо и равномерно освещенного.

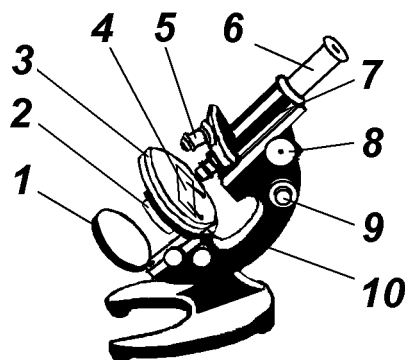


Рис. 11. Оптический микроскоп: 1 – зеркало, 2 – конденсор, 3 – предметный столик, 4 – предметное стекло, 5 – объектив, 6 – окуляр, 7 – тубус, 8 – макрометрический винт, 9 – микрометрический винт, 10 – штатив

На предметный столик микроскопа помещают исследуемый препарат и закрепляют его клеммами. Предварительный осмотр препарата проводят при малом увеличении (с объективом $\times 8$). Следует помнить, что свободное рабочее расстояние (расстояние между объективом и сфокусированным препаратом) зависит от увеличения объектива: для $\times 8$ это расстояние 8 мм, для $\times 40$ – 0,6 мм, для $\times 90$ – 0,15 мм. Поэтому сначала, наблюдая за объективом сбоку, с помощью макрометрического винта опускают тубус микроскопа и приближают объектив к препарату на расстояние, меньше рабочего. Затем, глядя в окуляр, вращением макрометрического винта поднимают тубус до появления в поле зрения изучаемого объекта. Далее с помощью микрометрического винта фокусируют объект, добиваясь четкого изображения. Перемещением конденсора и диафрагмой регулируют освещенность. Препарат исследуют по всей его поверхности, передвигая предметный столик боковыми винтами. При переходе к большему увеличению (объектив $\times 40$) слегка приоткрывают диафрагму и микрометрическим винтом проводят фокусировку.

Для микроскопического исследования бактерий и внутриклеточных структур используют **иммерсионные объективы**. На исследуемый препарат наносится капля иммерсионной жидкости, имеющей близкий к стеклу показатель преломления. Иммерсионный объектив ($\times 90$) с помощью макрометрического винта погружают в иммерсионную жидкость (кедровое масло), не касаясь препарата. Затем, глядя в окуляр, тем же винтом очень медленно поднимают тубус до появления изображения. Фокусируют препарат микрометрическим винтом, который можно осторожно вращать не более чем на половину оборота в ту или другую сторону.

После окончания работы следует поднять тубус микроскопа, снять препарат с предметного столика, привести в рабочее положение объектив $\times 8$, удалить мягкой тканью иммерсионное масло с объектива $\times 90$, отклю-

чить осветитель и накрыть микроскоп полиэтиленовым колпаком.

Для повышения контрастности неокрашенных прозрачных живых объектов используют микроскопию в отраженном свете, темнопольную микроскопию и фазово-контрастную микроскопию.

Темнопольная микроскопия основана на освещении объекта боковыми лучами света, не попадающими в объектив. Специальный темнопольный конденсор имеет затемненную среднюю часть, не пропускающую центральные лучи света в объектив, поэтому поле зрения выглядит совершенно черным. В плоскость препарата попадают только боковые лучи, отраженные от зеркальных поверхностей, расположенных внутри конденсора. Эти боковые лучи освещают клетки, содержащиеся в препарате. В результате клетки микроорганизмов в препарате "раздавленная капля" будут ярко освещенными объектами на темном фоне. Для темнопольной микроскопии требуется более мощный источник света, чем для микроскопии в светлом поле, толщина препарата должна быть минимальной, а предметные стекла стандартной толщины (до 1,2 мм).

Препарат дрожжевых клеток "раздавленная капля" помещают на предметный столик микроскопа и фокусируют при малом увеличении (объектив х8) со светлопольным конденсором. Затем заменяют конденсор темнопольным. На линзу конденсора наносят каплю иммерсионного масла и поднимают конденсор до соприкосновения капли масла с предметным стеклом. Капля должна равномерно заполнять пространство между линзой конденсора и предметным стеклом и не содержать пузырьков воздуха. Просматривают препарат, пользуясь объективом х40.

Фазово-контрастная микроскопия. В поле зрения обычного биологического микроскопа контрастными будут объекты, которые в разной степени поглощают свет по сравнению с окружающей средой. Поскольку при поглощении света происходит уменьшение амплитуды проходящего света, такие объекты называют амплитудными. Объекты, которые поглощают проходящий свет в той же степени, что и окружающая среда, но отличаются от неё значением коэффициента преломления, называют фазовыми. При прохождении света через такой объект происходит только изменение фазы проходящей световой волны за счет разницы в показателях преломления. В фазово-контрастных микроскопах методом интерференционного контрастирования превращают невидимые человеческому глазу различия по фазе в изменения амплитуды света. Интерференционная микроскопия делает возможным наблюдать без окрашивания не только прозрачные клетки живых микроорганизмов, но и внутриклеточные структуры с разными показателями преломления. В биологических лабораториях используют для качественных и количественных исследований микроорганизмов поляризационно-интерференционные микроскопы.

1.8.1. Измерение дрожжевых клеток

Форму и размеры дрожжевых клеток описывают и определяют в культурах разного возраста на плотных и жидких средах. Для измерений лучше использовать препараты живых культур, выращенных на жидких средах. В фиксированных препаратах дрожжевых клеток их размеры могут быть несколько изменены при фиксации по сравнению с размерами живых клеток.

Размеры клеток определяют под микроскопом с помощью окулярной линейки (микрометра). Окулярная линейка представляет собой круглую стеклянную пластинку, в центре которой нанесена линейная шкала, разделенная на 50 частей.

Окулярный микрометр вставляют в окуляр на диафрагму, предварительно отвинтив глазную линзу окуляра. Затем заворачивают глазную линзу и вставляют окуляр в тубус микроскопа. На предметный столик кладут препарат, фокусируют объект и определяют, скольким делениям линейки соответствуют длина и ширина клетки при данном увеличении микроскопа. Определяют размеры не менее чем у 20 клеток и указывают крайние значения.

Цену деления шкалы окулярного микрометра для данного увеличения микроскопа устанавливают с помощью объектного микрометра. Объектный микрометр представляет собой металлическую пластинку, по размерам соответствующую предметному стеклу и с отверстием в центральной части. В отверстии закреплена стеклянная пластинка со шкалой длиной 1 мм, разделенной на 100 частей. Следовательно, цена деления шкалы объектного микрометра составляет 10 мкм.

Для определения цены деления шкалы окулярного микрометра на предметный столик микроскопа вместо препарата помещают объектный микрометр и при малом увеличении фокусируют изображение его шкалы. Затем перемещают её в центр поля зрения и меняют объектив на тот, при котором измеряли клетки. Поворачивая окуляр с окулярным микрометром, и перемещая предметный столик, с объектным микрометром, добиваются параллельности и наложения шкал двух микрометров в поле зрения друг на друга. Затем совмещают одно из делений шкалы микрометров и находят следующее совмещение. Устанавливают, какую часть деления объектного микрометра составляет одно деление окулярной линейки, и умножают полученное число на 10. Таким образом, получают цену деления окулярного микрометра в микрометрах для данного увеличения микроскопа. Например, если 7 делениям объектного микрометра (70 мкм) соответствует 22 деления окулярной линейки, то цена деления линейки будет 3,18 мкм.

2. Биотехнология

2.1. Оценка продуктивности биотехнологического процесса

Оценить продуктивность биотехнологического процесса можно с помощью таких параметров, как:

- q_s – удельная скорость потребления субстрата;
- q_p – удельная скорость образования продукта.

Субстратом – называют то химическое соединение, превращение которого ускоряют ферменты.

В предложенной лабораторной работе физиологическая активность дрожжей определяется с учетом этих параметров.

2.1.1. Определение физиологической активности дрожжей при спиртовом брожении

В работе определяется физиологическая активность дрожжей при спиртовом брожении. К дрожжам относят, так называемые, одноклеточные грибы, т.е. грибные организмы, проводящие большую часть своего жизненного цикла в виде отдельных клеток. Эти микроорганизмы представляют собой факультативные анаэробы, т. е. активно развиваясь в аэробных условиях, они способны существовать и в средах без молекулярного кислорода, переходя для восполнения энергетических затрат с дыхания на брожение. Дрожжи способны к спиртовому брожению, в ходе которого молекулы гексоз (моносахариды с шестью атомами углерода: глюкоза, манноза, гелектоза) расщепляются с образованием этанола:



Физиологическая активность культуры микроорганизмов измеряется массой питательных веществ, потребляемых единицей микробной биомассы за единицу времени (или же массой образующихся продуктов). В случае работы с дрожжами этот показатель обычно называют «бродильной активностью» или «бродильной энергией». Таким образом, физиологическую активность микроорганизмов можно оценивать по удельной скорости потребления субстрата (q_s) или по удельной скорости образования продукта (q_p):

$$q_s = (S_0 - S_1)/X(\tau_1 - \tau_0); \quad q_p = (P_1 - P_0)/X(\tau_1 - \tau_0),$$

где X – концентрация микроорганизмов, кг/м³;

S_0 и S_1 – концентрации субстрата в момент времени τ_0 и τ_1 , соответственно, кг/м³;

P_0 и P_1 – концентрации продукта в момент времени τ_0 и τ_1 , соответственно, кг/м³.

Целью данной работы является оценка физиологической активности дрожжей в процессе спиртового брожения.

Следует отметить некоторые особенности используемой методики определения физиологической активности:

1. Режим брожения периодический.
2. Дрожжи помещают в определенный объем питательной среды, в котором популяция дрожжей проходит стадии своего развития. Следовательно, характеристики биомассы, в том числе и физиологическая активность, будут меняться в процессе брожения.
3. В самом начале из-за имеющегося в питательной среде растворенного кислорода условия будут аэробными. Однако растворимость кислорода в воде очень мала, и уже через несколько минут основная масса кислорода будет израсходована дрожжами, и условия станут близки к анаэробным.
4. Некоторая часть субстрата расходуется дрожжами в структурном обмене для размножения, роста клеток и восполнения внутриклеточных структур. Все это приводит к тому, что значение физиологической активности дрожжей по удельной скорости потребления субстрата (глюкозы) будет больше значения физиологической активности по удельной скорости образования диоксида углерода в сопоставимых единицах. Удельная скорость потребления субстрата будет определять общую физиологическую активность, тогда как удельная скорость образования CO_2 – физиологическую активность дрожжей в процессе брожения.

Для исследования физиологической активности дрожжей используется газометрическая установка (рис. 12). Процесс брожения осуществляется в круглодонной колбе с двумя горловинами в термостатируемых условиях (30 °C). Измеряя объем выделяющегося диоксида углерода за определенные промежутки времени, можно рассчитать удельную скорость образования продукта. В качестве питательной среды субстрата применяется водный раствор D-глюкозы.

Определяя изменение концентрации раствора D-глюкозы в процессе брожения, рассчитывают удельную скорость потребления субстрата. Среднюю удельную скорость потребления субстрата за весь период брожения рассчитывают по разности концентраций раствора D-глюкозы в начале и по окончании опыта.

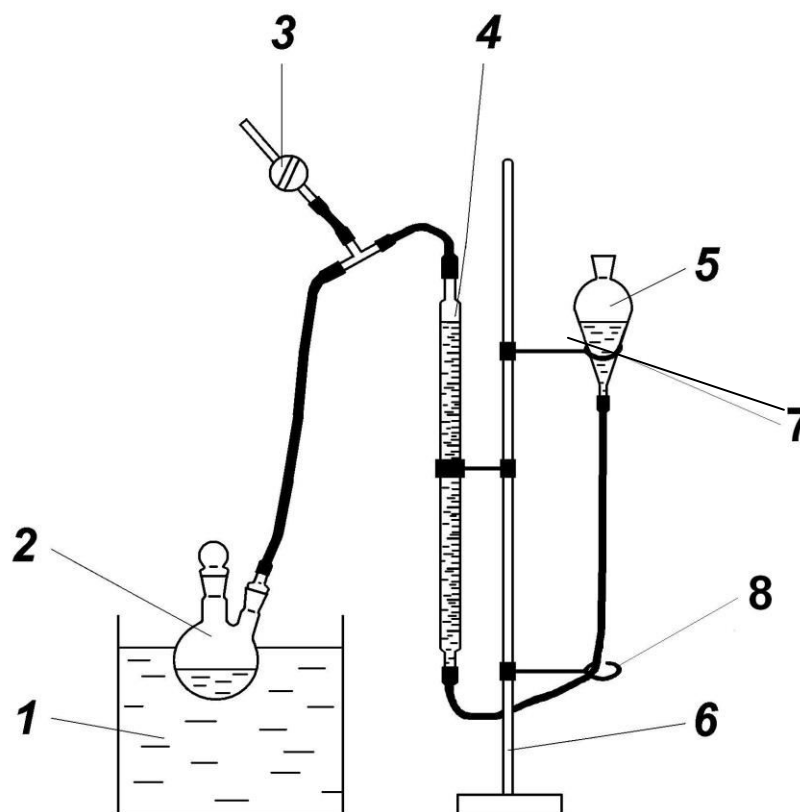


Рис. 12. Газометрическая установка: 1 – водяной термостат; 2 – двугорлая колба; 3 – одноходовой кран; 4 – бюретка; 5 – уравнильный сосуд; 6 – штатив; 7 – верхнее кольцо; 8 – нижнее кольцо

Ход работы

В двугорлую колбу 2 вместимостью 50 см^3 через широкую горловину помещают навеску прессованных дрожжей (с влажностью 75 %) и приливают 30 см^3 водного раствора глюкозы (исходную и конечную концентрации раствора глюкозы определяют рефрактометрически – см. с. 46). Колбу закрывают стеклянной пробкой вращательным движением, притирая шлифовое соединение (плохо притертая пробка будет пропускать газ или ее может выбросить под давлением газа). Затем закрывают одноходовой кран 3 и опускают уравнильный сосуд 5 с верхнего кольца 7 на нижнее кольцо 8. При этом в колбе создается разрежение, ускоряющее переход в бюретку 4 образующегося в реакции CO_2 .

Определение объема выделившегося газа проводят каждые 20 мин. После каждого замера объема CO_2 проводят уравнивание жидкостей в бюретке и уравнильном сосуде. Для этого поднимают уравнильный

сосуд в верхнее кольцо и, открыв одноходовой кран, выводят уровень жидкости в бюретке на нулевую отметку. Снова закрывают кран и опускают уравнильный сосуд в нижнее кольцо.* Результаты измерений записывают в таблицу. По окончании опыта культуральную жидкость после брожения фильтруют для удаления дрожжевых живых клеток для определения конечной концентрации глюкозы.

Газовыделение при спиртовом брожении

Период времени, с	0-1200	1200-2400	2400-3600	3600-4800	4800 - 6000	6000 - 7200
Объем CO ₂ , м ³						

Обработка экспериментальных данных

Рассчитываем массу CO₂ в (килограммах), выделившегося в каждый период времени:

$$m_{CO_2} = \rho_{CO_2} \cdot V_{CO_2}, (\text{кг CO}_2).$$

Плотность CO₂ (ρ) в лабораторных условиях принимается равной $\rho = 1,8 \text{ кг/м}^3$.

Рассчитываем массу выделившегося газа на единицу объема раствора:

$$P_{CO_2} = m_{CO_2}/V_r, \text{ кг CO}_2/\text{м}^3.$$

где V_r – объем глюкозы – $30 \cdot 10^{-6} \text{ м}^3$.

Рассчитываем концентрацию биомассы с учетом влажности дрожжей:

$$X = m \cdot (1 - W)/V_r \text{ кг биомассы/м}^3,$$

где m – масса прессованных дрожжей, кг;

W – влажность дрожжей.

Определяем для каждого периода времени удельную скорость образования CO₂ (q_{CO_2}):

$$q_{CO_2} = P_{CO_2}/(X \cdot \tau) [\text{кг CO}_2/(\text{кг биомассы} \cdot \text{с})],$$

По полученным результатам строим график зависимости удельной скорости образования CO₂ от времени брожения (рис. 13).

*Бюретка и уравнильный сосуд заполняются 5 %-ной H₂SO₄, так как в кислоте снижается растворимость CO₂.



Рис. 13. Изменение удельной скорости образования CO_2 при брожении

Удельную скорость потребления субстрата (q_{Γ}) за весь период брожения определяют по изменению концентрации раствора глюкозы, которую контролируют рефрактометрически.

Рассчитываем удельную скорость потребления глюкозы: (q_{Γ} , кг глюкозы/(кг биомассы $\cdot$ с))

$$q_{\Gamma} = (C_0 - C_K) \cdot \rho_{\Gamma} \cdot / (100 \cdot X \cdot \tau),$$

где C_0 , C_K – начальная и конечная концентрации раствора глюкозы;

ρ_{Γ} – плотность раствора глюкозы ($\rho_{\Gamma} \approx 1040 \text{ кг/м}^3$);

τ – общее время брожения, с.

Для сопоставления общей физиологической активности и активности в процессе брожения необходимо выразить q_{CO_2} и q_{Γ} в одинаковых единицах. По уравнению спиртового брожения моль глюкозы образует 2 моля диоксида углерода, т.е. из 180 кг глюкозы получается 88 кг CO_2 . Следовательно, для перевода q_{Γ} в единицы q_{CO_2} можно воспользоваться уравнением:

$$q_{\text{CO}_2} = q_{\Gamma} \cdot 88/180, \text{ кг } \text{CO}_2/(\text{кг биомассы} \cdot \text{с}).$$

Полученный результат следует сопоставить со средней удельной скоростью образования CO_2 за весь период брожения.

Пример.

Для проведения эксперимента была взята навеска прессованных дрожжей - 2 г ($2 \cdot 10^{-3} \text{ кг}$), за 1200 сек объем выделившегося CO_2 составил 20 см^3 ($20 \cdot 10^{-6} \text{ м}^3$).

Тогда:

рассчитываем массу выделившегося CO_2 в килограммах:

$$m_{\text{CO}_2} = \rho_{\text{CO}_2} \cdot V_{\text{CO}_2} = 1,8 \cdot 20 \cdot 10^{-6} = 36 \cdot 10^{-6} \text{ (кг CO}_2\text{)}.$$

Рассчитываем массу выделившегося газа на единицу объема раствора:

$$P_{\text{CO}_2} = m_{\text{CO}_2} / V_r = 36 \cdot 10^{-6} / (30 \cdot 10^{-6}) = 1,2 \text{ (кг CO}_2\text{/м}^3\text{)}.$$

Рассчитываем концентрацию биомассы на единицу объема раствора с учетом влажности дрожжей:

$$X = m \cdot (1 - W) / V_r = 2 \cdot 10^{-3} \cdot (1 - 0,75) / (30 \cdot 10^{-6}) = 16,7 \text{ (кг биомассы/м}^3\text{)}.$$

Определяем для каждого периода времени удельную скорость образования CO_2 (q_{CO_2}):

$$q_{\text{CO}_2} = P_{\text{CO}_2} / (X \cdot \tau) = 1,2 / (16,7 \cdot 1200) = 0,06 \cdot 10^{-3} \text{ [кг CO}_2\text{/(кг биомассы} \cdot \text{с)]}.$$

Рассчитываем эти показатели для каждого промежутка времени и строим график $q_{\text{CO}_2} = f(\tau)$.

Затем рассчитываем удельную скорость потребления глюкозы ($q_{\text{Г}}$, кг глюкозы/(кг биомассы · с)) за все время опыта. Пусть $\tau_{\text{общ}} = 6000$.

$$C_0 = 10,2, C_k = 4,9.$$

$$q_{\text{Г}} = (C_0 - C_k) \cdot \rho_{\text{Г}} / (100 \cdot X \cdot t) = (10,2 - 4,9) \cdot 1040 / (100 \cdot 16,7 \cdot 6000) = 0,55 \cdot 10^{-3} \text{ (кг глюкозы/кг биомассы} \cdot \text{с)}.$$

$$q_{\text{CO}_2} = q_{\text{Г}} \cdot 88/180 = 0,55 \cdot 10^{-3} \cdot 88/180 = 0,26 \cdot 10^{-3} \text{ (кг CO}_2\text{/кг биомассы} \cdot \text{с)}.$$

Для правильного оформления работы необходимо экспериментальные и расчетные данные свести в таблицу:

τ (с)	0 - 1200	1200 - 2400	2400 - 3600	3600 - 4800	4800 - 6000	6000 - 7200
V_{CO_2} (м ³)						
m_{CO_2} (кг)						
P_{CO_2} (кг/м ³)						
X (кг б.м./м ³)						
q_{CO_2} (кг CO ₂ /кг б.м.)						
$q_{\text{Г}}$, (кг гл./кг б.м. · с)						

Заключительным этапом работы является осмысление результатов. Для этого необходимо сформулировать выводы. В данной работе предлагаем Вам ответить на два вопроса:

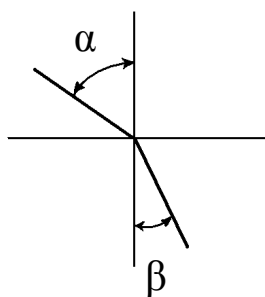
1. Каков характер кривой $q_{CO_2} = f(\tau)$ и чем это можно объяснить?
2. Почему q_T больше q_{CO_2} »?

Рефрактометрия

Рефрактометрия – метод анализа, основанный на измерении показателя преломления. Относительный показатель преломления (n) представляет собой отношение скорости света в воздухе к скорости света в исследуемой среде. Его можно представить как отношение синусов угла падения света на поверхность раздела двух сред (α) и угла преломления света (β) (рис. 14,а). Он не зависит от угла падения света, но зависит от длины волны света и от температуры. Поэтому показатель преломления измеряют при монохроматическом свете и постоянной температуре, которые указываются в виде индексов при показателе преломления, например, n_D^{20} означает, что измерение проводили при длине волны 589,3 нм (желтый цвет линии натрия) и 20 °С.

Показатель преломления измеряют на рефрактометрах, из которых наиболее распространенным является рефрактометр типа Аббе, работающий на принципе измерения предельного угла преломления. Главным узлом рефрактометров этого типа является призмный блок (рис. 14,б). Блок состоит из двух призм 1 и 2, на горизонтальную поверхность между которыми помещают исследуемую жидкость 3. Одна из призм осветительная. Ее поверхность, контактирующая с жидкостью, сделана матовой для рассеивания света. Пройдя через эту призму, свет попадает в исследуемый раствор и на границе между раствором и гранью измерительной (рефрактометрической) призмы преломляется.

а



б

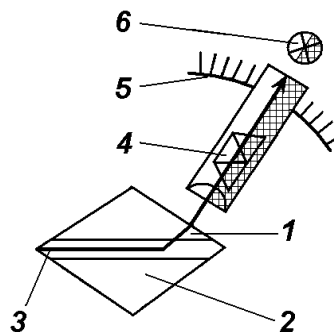


Рис. 14. Принцип рефрактометрических измерений (а) и схема рефрактометра Аббе (б): 1,2 – призмы; 3 – исследуемая жидкость; 4 – призма Амичи; 5 – шкала рефрактометра; 6 – линза окуляра

Преломленный луч направляют в зрительную трубку, где находится система линз и призма Амичи 4. Призма Амичи уничтожает дисперсию луча света и позволяет использовать обычное освещение вместо источника монохроматического света. Она склеена из трех призм, выполненных из разных сортов стекла. На линзу окуляра нанесено перекрестье, соответствующее оси нанесено перекрестье, соответствующее оси зрительной трубки. Поворотом призмы или зрительной трубки вокруг оси призмы совмещают оптическую ось с предельным углом преломления, видимым как граница света и тени. С поворачиваемым блоком связана шкала рефрактометра 5.

При работе с растворами измеряют показатель преломления раствора (n_p), а затем показатель преломления растворителя (n_0), который вычитают из показателя преломления раствора. Концентрацию раствора (C , %) рассчитывают по калибровочному графику, по таблицам значений показателей преломления для различных концентраций данного раствора или по рефрактометрическому фактору (F). В последнем случае пользуются формулой $C = (n_p - n_0)/F$. Аналитический рефрактометрический фактор определяется экспериментально и равен увеличению показателя преломления при повышении концентрации на 1 %.

В этой работе используется рефрактометр, отградуированный по концентрации водного раствора сахарозы. В окуляре рефрактометра видны два светлых окошка (рис. 15): верхнее с перекрестьем и нижнее с двумя шкалами. Верхняя шкала - для определения показателя преломления, нижняя – для определения процентной концентрации раствора. Перед измерением открывают осветительное оконце над верхней призмой (осветительной) и отводят оправу с этой призмой вверх до отказа. Далее обязательно очищают поверхности осветительной и измерительной линз мягкой тряпочкой, смоченной спиртом или дистиллированной водой. В последнем случае тщательно промокают (не протирают!) воду фильтро-

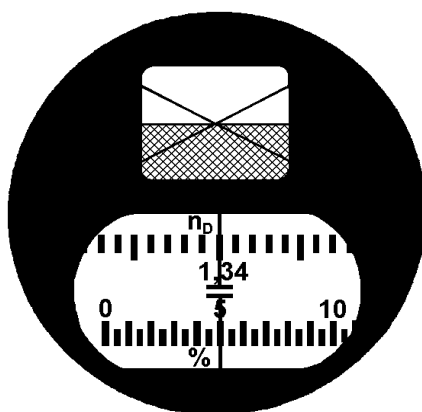


Рис. 15. Вид поля зрения в окуляре рефрактометра

вальной бумагой. Затем круглой стеклянной палочкой или пипеткой наносят на измерительную плоскость рефрактометрической линзы (нижняя линза) несколько капель исследуемого раствора так, чтобы после закрытия призм вся измерительная плоскость была покрыта жидкостью. Следует при этом избегать прикосновения пальцами к измерительной плоскости и испытываемой жидкости. Опускают прикрывающую осветительную призму и прижимают ее к измерительной плоскости несколько секунд для выравнивания температур жидкости и призм. Устанавливают рефрактометр осветительным оконцем в направлении самого интенсивного источника света. Вращением цилиндрических ручек с накаткой получают резкое, четкое бесцветное разграничение светлого и темного полей в поле зрения окуляра. Вращая левую ручку с накаткой, наводят граничную линию точно на середину перекрестия в верхнем оконце окуляра (см. рис. 15). Вертикальная линия в нижнем оконце показывает в этот момент значение показателя преломления на верхней шкале (n_D) и процентную концентрацию раствора на нижней шкале.

2.2. Общие сведения о ферментах

Еще в глубокой древности человек использовал некоторые ферментативные процессы, не понимая их сущности. Давно было известно, как готовить хлеб, вино и сыр, как обрабатывать кожу и получать льняное волокно. В основе получения этих и многих других продуктов лежат ферментативные реакции.

Сегодня мы знаем, что ферменты катализируют миллионы химических превращений в клетках животных, растений, микроорганизмов и воздействуют на соответствующие субстраты вне клетки.

Ферменты – это вещества белкового происхождения, способные ускорять протекание биохимических реакций, то есть являются биокатализаторами. Такое название происходит от латинского слова *fermentare* – вызывать брожение. А связано оно с тем, что впервые, ферменты были выделены из бродильной жидкости и их деятельность вначале связывали именно с брожением.

Все ферменты по своему строению можно объединить в две группы:

- 1) простые белки;
- 2) сложные белки.

Первую группу представляют белковые молекулы, не связанные с другими соединениями.

Вторую группу составляют белки, химически связанные с небелковой частью фермента. Эту часть называют простетической группой, или коферментом. «Партнерами» белка по ферменту могут быть витамины, а также сахара, нуклеотиды и другие соединения.

Ферменты обладают уникальной способностью «узнавать» и связывать строго определенный **субстрат**, в этом проявляется **специфичность** деятельности ферментов.

Зависимость каталитической активности от **температуры** – еще одно замечательное свойство ферментов. Температурный оптимум большинства ферментов лежит в интервале от 40 до 50 °С. Однако есть среди них и «теплолюбивые» катализаторы (70 – 90° С), и ферменты, явно предпочитающие низкую температуру (5 – 7° С).

На деятельность ферментов большое влияние оказывают различные химические соединения. Одни соединения повышают активность ферментов, их называют **активаторами**. Нередко в роли активаторов выступают ионы металлов.

Другие химические соединения тормозят действие ферментов, их называют **ингибиторами**. В роли ингибиторов могут оказаться как органические соединения, так и неорганические, например, соли тяжелых металлов (ртути, свинца и др.).

В настоящее время описано более 2000 ферментов. Молекулярная масса ферментов от 15 тысяч до миллиона и выше.

По характеру катализируемых реакций ферменты делят на шесть основных классов: **оксидоредуктазы, трансферазы, гидролазы, лиазы, изомеразы и лигазы**.

Ферменты синтезируются, как все белки, на рибосомах и локализуются в цитоплазме, в различных субструктурах, встроенных в мембраны и находятся на поверхности клетки или в окружающей клетку среде.

Ферменты животного происхождения преимущественно выделяют из органов животных (печени, сердца и других).

Из ферментов растительного происхождения наиболее широко в народном хозяйстве используют гидролазы – инициируют гидролиз крахмала до олигосахаридов. Условно ферментным препаратом можно назвать и ячменный солод, в котором содержится до 1% амилаз. Из растительного сырья получают также другие ферменты.

Совершенно иная ситуация с получением биологически активных веществ, в том числе ферментов, микробиологическим путем. Современные методы генетики и генетической инженерии позволяют целенаправленно увеличить выход необходимого фермента. Кроме того, среди микроорганизмов можно найти формы, живущие в экстремальных условиях (термофилы, галлофилы и другие). Это означает, что из микроорганизмов можно выделить ферменты с улучшенными свойствами – термостабильные, осмоустойчивые, кислото- и щелочеустойчивые.

Ферменты прочно заняли видное место в жизни человека. Они находят широкое использование в медицине и ветеринарии, в молочной, хлебопекарной, спиртовой промышленности и в пивоварении, в кожевенном и меховом производстве, в бытовой химии и других областях.

Далее представлена лабораторная работа, для которой фермент получен из растительной ткани методом экстракции.

2.2.1. Определение каталитической активности фермента каталазы

Ферменты – биокатализаторы.

В биотехнологии используют ферменты, выделенные из живых тканей. Это могут быть хорошо очищенные индивидуальные ферменты для проведения определенной реакции, либо комплекс ферментов для осуществления превращения субстрата в результате последовательности химических реакций. В последнем случае значительно облегчается процедура получения биологического агента, так как это могут быть всего лишь дезинтегрированные клетки, содержащие требуемый набор ферментов.

В работе исследуется активность каталазы в растительных тканях. Активность каталазы определяют на водных экстрактах предварительно дезинтегрированных тканей картофеля.

Целью данной работы является определение активности фермента каталазы, выделяемого из тканей клубня картофеля.

H_2O_2 образуется в процессе биологического окисления в организме – это токсичный продукт.

Каталаза – фермент, ответственный за разложение в живых тканях пероксида водорода по реакции



Каталаза – фермент увеличивает скорость этой реакции в 10^5 раз.

Разложение пероксида водорода можно контролировать либо по выделению кислорода, либо по изменению концентрации раствора пероксида.

Эффективность биологического агента оценивается по удельной каталитической активности. Удельную каталитическую активность рассчитывают как скорость превращения субстрата на единицу массы фермента.

При определении активности каталазы в серии экспериментов, например, для различных растительных тканей, необходимо использовать одну и ту же концентрацию пероксида водорода в реакционной смеси. Следовательно, при заданном объеме реакционной среды в нее должно вноситься одно и то же количество пероксида. Поскольку пероксид водорода при хранении разлагается, перед проведением эксперимента определяют его концентрацию.

В работе для измерения объема выделяющегося кислорода используется газометрическая установка (рис. 12), в которой разложение

пероксида водорода происходит в круглодонной колбе с двумя горловинами. Процесс протекает в термостатируемых условиях ($t = 29 - 30\text{ }^{\circ}\text{C}$).

2.2.2. Экспериментальная часть

Получение водного экстракта тканей картофеля. (Упрощенный вариант дезинтегрирования)

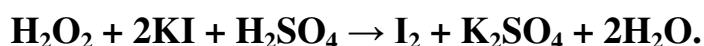
Свежеочищенный клубень картофеля трут на терке и заливают стаканом дистиллированной воды на 1 час, постоянно перемешивая. Затем отфильтровывают смесь. Фильтрат практически является водным экстрактом тканей картофеля.

Определение начальной концентрации и объема раствора пероксида водорода

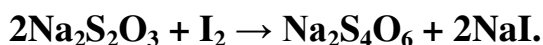
Начальную концентрацию пероксида водорода определяют с целью определения необходимого объема перекиси для проведения опыта.

Определение концентрации раствора пероксида проводится с **использованием иодометрии**. **Иодометрия** – метод титриметрического анализа, основанный на определении количества иода, которое затрачивается на окисление восстановителей или выделяется при взаимодействии окислителя с раствором иодида калия. Преимуществами метода являются возможность проводить иодометрические определения в широком интервале кислотности раствора ($\text{pH } 2 \dots 10$) и высокая точность установления точки эквивалентности. Последнее связано с наличием чувствительного специфического индикатора на иод. В качестве индикатора применяют раствор крахмала, образующего с иодом интенсивно окрашенное адсорбционное соединение. Реакция отличается высокой чувствительностью – уже $0,00001\text{ M}$ растворы иода окрашиваются в присутствии крахмала в синий цвет.

Пероксид водорода в кислой среде окисляет иодид калия:



Выделившийся иод оттитровывают рабочим раствором тиосульфата натрия, который реагирует с иодом с образованием тетраионата натрия по уравнению:



Внимание! Поскольку йод и его растворы обладают летучестью, **все процедуры, связанные с выделением йода, необходимо проводить в закрытых сосудах**. Кроме того, йод плохо растворяется в воде, поэтому

для растворения выделяющегося при реакции твердого иода и уменьшения его летучести в растворе создают большой избыток иодида калия (в 3...4 раза больше необходимого для взаимодействия с пероксидом). Ионы иода в растворе также необходимы для образования окрашенного соединения с крахмалом, так как сам молекулярный иод не дает такого соединения. Однако иодид калия на свету окисляется кислородом воздуха с выделением иода, поэтому **обработку раствора пероксида водорода иодидом проводят в темноте. Титровать иод раствором тиосульфата следует в два этапа: сначала без индикатора, затем с индикатором.** Это делается для максимально возможного уменьшения времени контакта крахмала с иодом, так как иод может расходоваться на побочную реакцию окисления крахмала. К тому же в кислой среде крахмал постепенно гидролизуеться, что также может быть причиной погрешности анализа.

В колбу со шлифом вместимостью 250 см³ наливают 30 см³ дистиллированной воды, добавляют 10 см³ 10 %-ного раствора KI и 5 см³ 1моль/дм³ H₂SO₄. Пипеткой отбирают 1 см³ раствора пероксида водорода и также переносят в колбу. Затем колбу закрывают притертой пробкой и помещают в темное место. Через 30 мин содержимое колбы титруют 0,1 моль/дм³ Na₂S₂O₃ до появления светло-желтой окраски раствора. Затем добавляют 1...2 капли раствора крахмала и продолжают титрование до исчезновения синего окрашивания. Расчет массовой концентрации исходного раствора пероксида водорода проводят по формуле:

$$C_0 = 0,0017 \cdot A, \text{ г/см}^3,$$

где A – объем раствора тиосульфата натрия,

пошедший на титрование, см³;

0,0017 – коэффициент, соответствующий условному титру
раствора тиосульфата по пероксиду, г.

Требуемый для эксперимента объем раствора пероксида водорода (V_{H₂O₂}) определяют, исходя из объема газа, который можно измерить на газометрической установке. При полном разложении 1 г H₂O₂ в соответствии с уравнением объем выделяющегося кислорода в лабораторных условиях (температура 20 °С) составит 357,3 см³. Для проведения лабораторной работы можно ограничиться массой H₂O₂ количеством 0,2 г, выделяющих 71,5 см³ кислорода. Тогда объем пероксида водорода составит:

$$V_{\text{H}_2\text{O}_2} = 0,2/C_0, \text{ см}^3.$$

Расчет объема воды в реакционной смеси производят по формуле:

$$V_{H_2O} = V_{общ} - V_{H_2O_2}$$

Ход работы

В реакционную колбу через широкую горловину вносят 10 см³ экстракта каталазы. Затем разбавляют экстракт таким количеством дистиллированной воды, чтобы **общий объем реакционной смеси после добавления рассчитанного объема раствора пероксида ($V_{H_2O_2}$) составил 25 см³**. Раствор пероксида приливают к реакционной смеси последним и колбу сразу же закрывают стеклянной пробкой вращательным движением, притирая шлифовое соединение. Плохо притертая пробка будет пропускать газ, и, кроме того, ее может выбросить под давлением газа. Затем закрывают двухходовой кран и опускают уравнительный сосуд на нижнее кольцо. При этом в колбе создается разрежение, снижающее растворимость газа и ускоряющее переход образующегося O_2 из жидкой фазы в газовую.

Определение объема выделяющегося газа проводят каждые 3 мин. Результаты измерений записывают в таблицу.

Газовыделение при разложении пероксида водорода каталазой

Время, мин	3	6	9	12	15	18		
Объем O_2 , см ³								

Замеры останавливают, когда разница в изменении объема газа становится меньше 0,1 см³. Данные по кинетике газовыделения изображают на графике (рис. 16).

Определение конечной концентрации и объема раствора пероксида водорода

В работе разложение пероксида дополнительно контролируется по его остаточной концентрации в реакционной смеси (C_K).

Определение конечной концентрации перекиси делают вышеописанным способом **йодометрией** сразу же после завершения эксперимента, но раствора иодида калия берут 5 см³, а серной кислоты – 1 см³, время выдержки смеси в темноте сокращают до 5 мин. Для титрования используют 0,01 моль/дм³ $Na_2S_2O_3$, соответственно коэффициент в уравнении для расчета остаточной концентрации C_K будет равен 0,00017.

$$C_K = 0,00017 \cdot A, \text{ г/см}^3.$$

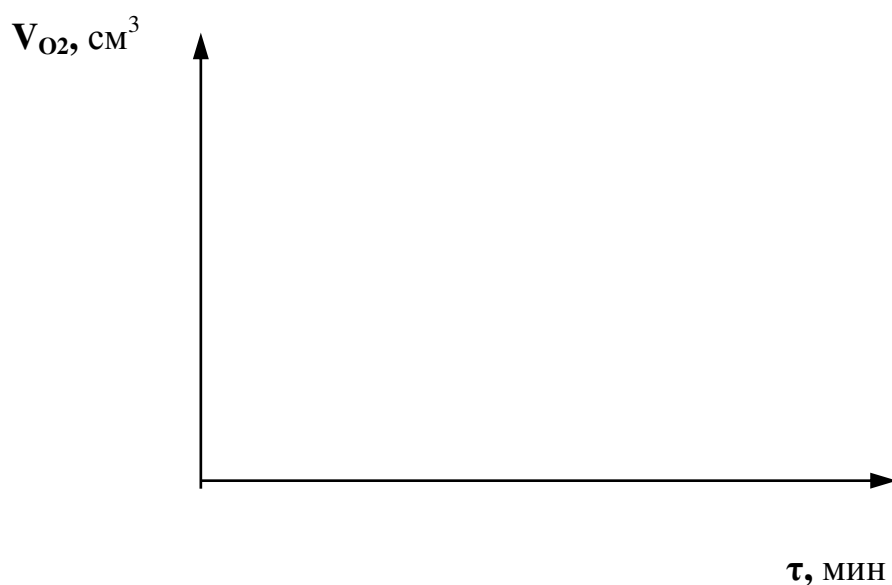


Рис. 16. Кинетика газовыделения при разложении пероксида водорода каталазой

Обработка экспериментальных данных

По остаточной концентрации пероксида водорода рассчитывают массу разложившегося пероксида ($m_{H_2O_2}$):

$$m_{H_2O_2} = V_{H_2O_2} \cdot C_0 - V_{\text{общ}} \cdot C_K, \text{ г},$$

где $V_{H_2O_2}$ – исходный объем H_2O_2 в реакционной смеси, cm^3 ;

$V_{\text{общ}}$ – общий объем реакционной смеси, cm^3 ;

C_0 – исходная концентрация H_2O_2 , г/см^3 ;

C_K – конечная концентрация H_2O_2 , г/см^3 .

Определяют, сколько должно было выделиться кислорода при разложении этого количества пероксида:

$$V_{O_2} = 357,3 \cdot m_{H_2O_2} \text{ (теоретический)},$$

где $357,3 \text{ cm}^3$ – объем O_2 , выделяющийся при полном разложении 1 г H_2O_2 в соответствии с уравнением реакции.

Количество разложившегося пероксида рассчитывают по объему выделившегося кислорода V_{O_2} :

$$n_{H_2O_2} = 10^6 \cdot V_{O_2} / (357,3 \cdot 34), \text{ мкмоль},$$

где 10^6 – коэффициент перевода;

34 – молекулярная масса H_2O_2 .

Оценку каталитической активности фермента каталазы производят по удельной каталитической активности водного экстракта:

$$A_y = n_{H_2O_2} / (t \cdot 10), \text{ мкмоль}/(\text{мин} \cdot \text{см}^3),$$

где $n_{H_2O_2}$ – количество разложившегося пероксида водорода, мкмоль;

t – время, мин;

10 – объем водного экстракта, см^3 .

Удельную каталитическую активность вычисляют за первые 10 мин эксперимента и за все время эксперимента. Объем O_2 за первые 10 мин определяют по графику $V_{O_2} = f(t)$ методом экстраполяции.

Для формулирования выводов по лабораторной работе предлагается ответить на следующие вопросы:

1. Сравнить объемы выделившегося кислорода теоретический и газометрический (реальный), объяснить разницу.
2. Прокомментировать экспериментальную кривую $V_{O_2} = f(t)$.
3. Сопоставить значение V_{O_2} с результатом газометрического определения. Объяснить возможное расхождение результатов.
4. Дать объяснение значительному снижению каталитической активности фермента со временем.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

Тюменцева Е.Ю. Основы микробиологии. - учебное пособие.- Омск: ОГУС, 2015.- 123 с. [электронный ресурс]: Режим доступа: <http://www.iprbookshop.ru/32788html>

Тихонов Г.П., Юдина Т.А. Основы биохимии. - учебное пособие.- М.: МГАВТ, 2014. - 179 с. [электронный ресурс]: Режим доступа: <http://www.iprbookshop.ru/46495html>

Нетрусов А.И. Введение в биотехнологию. - учебник для вузов– М.: Изд. Центр «Академия», 2014. - 288 с.

Чхенкели В.А. Биотехнология. - учебное пособие. – СПб.: Проспект науки, 2014. – 336 с.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	3
1. Основы общей микробиологии.....	6
1.1. Подготовка посуды и оборудования к работе с живыми объектами.....	7
1.2. Техника подготовки и методы стерилизации питательных сред...	9
1.2.1. Классификация питательных сред.....	9
1.2.2. Составы и способы приготовления питательных сред.....	10
1.2.3. Стерилизация питательных сред.....	12
1.3. Вспомогательные операции в микробиологической лаборатории..	16
1.3.1. Пересевы микроорганизмов.....	16
1.3.2. Разлив агаризованных сред в чашки Петри.....	18
1.4. Методы выделения чистых культур микроорганизмов.....	18
1.4.1 Методы поверхностного посева на плотных средах.....	20
1.5. Морфология микроорганизмов.....	24
1.5.1. Макроморфологические характеристики на плотных средах.....	24
1.5.2. Микроморфологические характеристики.....	27
1.6. Приготовление препаратов для микроскопирования.....	28
1.6.1. Приготовление препаратов живых культур.....	28
1.6.2. Приготовление постоянных (фиксированных) препаратов.....	30
1.6.3. Окрасивание препаратов.....	31
1.6.4. Приготовление растворов красителей.....	34
1.7. Оценка физиологического состояния дрожжей по микроморфологическим характеристикам.....	35
1.8. Работа с оптическим микроскопом.....	36
1.8.1. Измерение дрожжевых клеток.....	39
2. Биотехнология.....	40
2.1. Оценка продуктивности биотехнологического процесса.....	40
2.1.1. Определение физиологической активности дрожжей при спиртовом брожении.....	40
2.2. Общие сведения о ферментах	48
2.2.1. Определение каталитической активности фермента каталазы....	50
2.2.2. Экспериментальная часть.....	51
Библиографический список.....	55

Учебное издание

Павлова Елена Анатольевна
Удовенко Нина Константиновна
Терентьева Эльвира Петровна

БИОТЕХНОЛОГИЯ

Учебно-методическое пособие

Редактор и корректор Т.А. Смирнова
Техн. редактор Л. Я. Титова

Темплан 2017 г., поз. 140

Подп. к печати 18.12.17. Формат 60х84/16. Бумага тип. № 1.
Печать офсетная. 3,75 печ. л. 3,75 уч. - изд. л. Тираж 50 экз.
Изд. № 140 Цена «С». Заказ

Ризограф Высшей школы технологии и энергетики СПбГУПТД, 198095,
СПб., ул. Ивана Черных, 4.