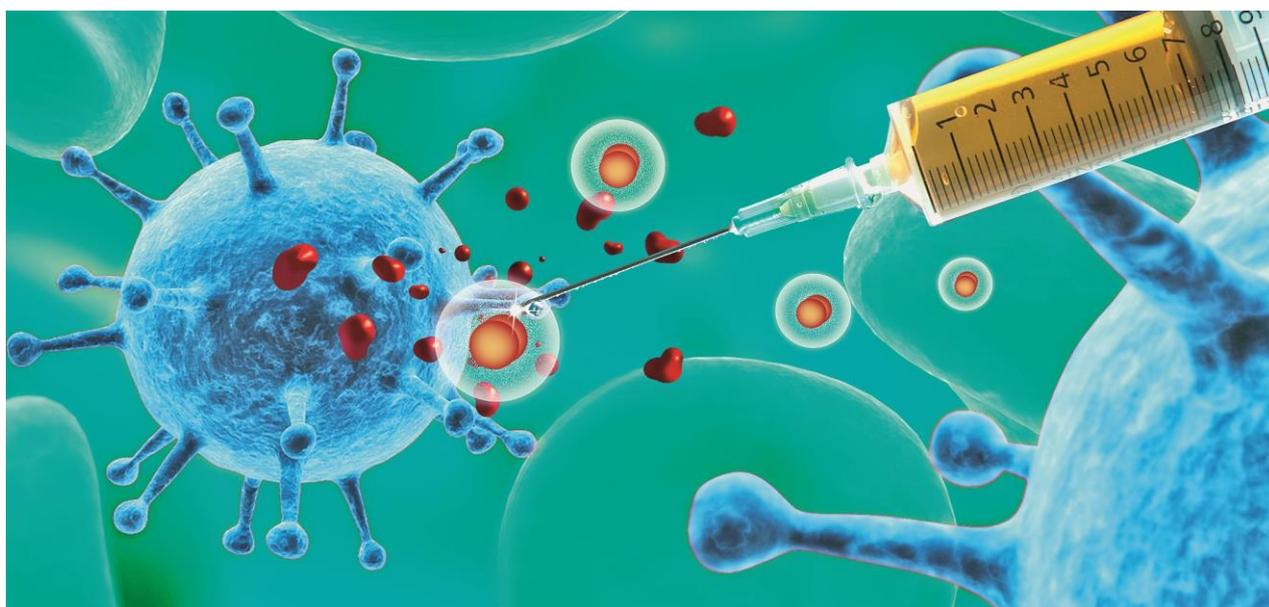


МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ ФГБОУ ВПО «КРАСНОЯРСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

А.И. Машанов, Н.А. Величко, Ж.А. Плынская



«МИКРОБИОЛОГИЯ С ОСНОВАМИ БИОТЕХНОЛОГИИ»
Учебное пособие



Красноярск 2015

Составители: А.И.Машанов
Н.А. Величко
Ж.А Плынская

Рецензент:

«Микробиология с основами биотехнологии»: Учебное пособие для студентов направления подготовки 19.03.02 «Продукты питания из растительного сырья» очной и заочной форм обучения Краснояр. гос. аграр. ун-т – Красноярск, 2015. – с.

Печатается по решению редакционно-издательского совета ФГБОУ ВПО «Красноярский государственный аграрный университет», 2015

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | |
|--|----|
| ВВЕДЕНИЕ | 5 |
| ГЛАВА 1. СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ | 6 |
| 1.1. Систематика микроорганизмов | 6 |
| 1.2. Типы клеточной организации микроорганизмов | 9 |
| 1.3. Строение прокариотической клетки | 9 |
| 1.4. Строение эукариотической клетки | 12 |
| ГЛАВА 2. ПРОКАРИОТЫ | 15 |
| 2.1. Морфология бактерий | 15 |
| 2.2. Спорообразование | 22 |
| 2.3. Движение | 24 |
| 2.4. Размножение | 26 |
| 2.5. Классификация | 28 |
| 2.6. Химический состав | 29 |
| ГЛАВА 3. ЭУКАРИОТЫ | 35 |
| 3.1. Микроскопические грибы | 35 |
| 3.2. Размножение | 37 |
| 3.3. Классификация | 39 |
| 3.4. Дрожжи | 45 |
| 3.5. Классификация | 46 |
| 3.6. Химический состав | 50 |
| ГЛАВА 4. БИОТЕХНОЛОГИЯ И БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ | 54 |
| 4.1 Биотехнология | 54 |
| 4.2. Кинетика роста и развития микроорганизмов | 56 |
| 4.3. Продукты микробного брожения и метаболизма | 59 |
| 4.4. Питательные среды для биотехнологического производства | 59 |
| 4.5. Способы культивирования микроорганизмов | 63 |
| 4.6. Культивирование растительных клеток | 70 |
| ГЛАВА 5. БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ СХЕМА ПРОИЗВОДСТВА ПРОДУКТОВ МИКРОБНОГО СИНТЕЗА | 72 |
| 5.1. Приготовление питательной среды | 72 |
| 5.2. Получение посевного материала | 73 |
| 5.3. Культивирование | 74 |
| 5.4. Выделение продукта | 75 |
| 5.5. Очистка | 77 |
| ГЛАВА 6. БИОТЕХНОЛОГИЯ ПРОИЗВОДСТВА ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ | 78 |

| | |
|---|-----------|
| 6.1. Получение ферментных препаратов из растительного сырья | 79 |
| 6.2. Получение ферментных препаратов с использованием микроорганизмов | 80 |
| 6.3. Номенклатура ферментных препаратов микробного происхождения | 81 |
| 6.4. Применение ферментных препаратов в пищевой промышленности | 83 |
| ГЛАВА 7. БИОТЕХНОЛОГИЯ ПИЩЕВЫХ ПРОИЗВОДСТВ | 86 |
| 7.1. Микроорганизмы источники белка | 86 |
| 7.2. Промышленное производство микробного белка | 88 |
| Заключение | 90 |
| ЛАБОРАТОРНЫЙ ПРАКТИКУМ | 91 |
| Список рекомендуемой литературы | 142 |
| Приложение | 145 |

ВВЕДЕНИЕ

Учебное пособие предназначено к выполнению самостоятельных и лабораторных работ по курсу «Микробиология с основами биотехнологии» предназначено для студентов направления подготовки 19.03.02 – «Продукты питания из растительного сырья» всех форм обучения.

Целью изучения данной дисциплины является приобретение студентами теоретических знаний и формирование навыков и умений в области современной «Микробиология с основами биотехнологии».

Объектом изучения курса являются: растительные клетки, микроорганизмы, биологические и химические соединения, полученные с помощью микроорганизмов, пищевые добавки, ферментные препараты, используемые в процессе производства продуктов питания, а так же пищевые продукты, в производстве которых используются биотехнологические процессы.

В пособии приведены этапы и направления современной «Микробиологии с основами биотехнологии». Подробно изложены вопросы технической и пищевой биотехнологии.

Учебное пособие включает теоретический и лабораторный материал, который может быть использован студентами всех форм обучения.

ГЛАВА 1. СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

1.1. Систематика микроорганизмов

Наука о распределении живых организмов по отдельным группам (таксонам) в соответствии с определенными признаками и присвоении им научного названия называется *систематикой*.

Еще на ранних этапах развития биологии мир живых организмов ученые делили на 2 царства: царство растений и царство животных. С открытием микроорганизмов делались попытки распределить их между этими двумя царствами. Основой для определения принадлежности микробов к животным или растительным организмам служили два признака: подвижность и способность к фотосинтезу. Однако постепенное накопление знаний о микроорганизмах, их чрезвычайное разнообразие сделало затруднительным отнесение некоторых видов к определенному царству, так как они сочетали признаки тех и других клеток или даже существенно отличались от них.

Поэтому в 1886 г. немецкий ученый Геккель предложил выделить микроорганизмы в третье царство - царство протистов (простейших).

В настоящее время благодаря развитию электронной микроскопии царство протистов разделилось на 5 царств в зависимости от структуры их клеточной организации (табл. 1).

Распределение микроорганизмов на царства в зависимости от структуры их клеточной организации

Таблица 1

| Надцарств | Царство | Структура клеточной организации |
|-----------|----------------------------------|---|
| Эукариоты | Простейшие Водоросли Грибы | По своему строению сходны с клетками животных и растений. Важнейшая отличительная особенность эукариотов - наличие в клетке оформленного ядра |
| Прокариот | Бактерии | Доядерные микроорганизмы. Имеется ядроподобное образование - |

| | | |
|-------|--------|---|
| Ациты | Вирусы | Не имеют клеточного строения. Вирусная частица состоит из нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК) и белковой оболочки |
|-------|--------|---|

Целями систематики являются:

1. Классификация - распределение отдельных единиц по группам более высокого ранга (таксономия). Для группирования родственных микроорганизмов по иерархической схеме используют следующие *таксономические категории*:

вид → *род* → *семейство* → *порядок* → *класс* → *отдел* → *царство*.

При распределении микроорганизмов на группы учитывают следующие их свойства:

- *морфологические* (внешний вид (форма и размеры клеток, их взаимное расположение), клеточное строение, способность образовывать споры, особенности размножения, наличие жгутиков);
- *физиологические* (тип питания, характер получения энергии, потребность в кислороде, патогенность, отношение к температуре и др.);
- *культуральные* (характер роста на питательных средах: форма и размер колоний, их цвет, прозрачность, край, профиль, структура, поверхность и др.);
- *биохимические* (различия в путях превращения и синтеза органических веществ).

Основной таксономической единицей является **вид** - совокупность организмов, имеющих общее происхождение, характеризующихся общими морфологическими и физиологическими свойствами и приспособленных к существованию в определенных условиях внешней среды. Другими словами, микроорганизмы одного вида имеют одинаковый генотип.

Более узким является понятие **штамм**. Штаммами называются чистые культуры микроорганизмов одного и того же вида, выделенные из различных природных сред или из одной среды, но в разное время. Штаммы одного вида имеют одинаковые свойства, но отличаются по отдельным признакам. Штаммы культурных дрожжей называются *расами*. Например, расы дрожжей вида *Saccharomyces cerevisiae*, которые используются во многих отраслях пищевой промышленности (например, в производстве хлеба, спирта, пива,

кваса и др.), отличаются друг от друга по скорости и степени использования углеводов, по бродильной активности, по количеству образуемых побочных продуктов и т.д.

Различают два подхода при распределении микроорганизмов на группы: создание естественных классификаций (филогенетический) и создание искусственных классификаций.

При создании *естественных классификаций* изучается генетическая дифференциация микроорганизмов, количественное соотношение азотистых оснований, входящих в состав ДНК (гуанин+цитозин к аденину+тиамину). У близких по родству микроорганизмов это отношение имеет близкие значения.

При создании *искусственных классификаций* микроорганизмы объединяются в группы на основе их сходства. Искусственная классификация рассчитана на использование ее в качестве ключа для определения видовой принадлежности микроорганизмов. В настоящее время все классификации микроорганизмов являются искусственными.

2. Номенклатура - присвоение микроорганизму названия после подробного его изучения.

Для названия микроорганизмов используют *бинарную номенклатуру* (название из двух латинских слов), предложенную Линнеем еще в XVIII веке.

Первое слово - название рода. Это имя существительное, пишется с прописной буквы и обычно характеризует какой-либо морфологический или физиологический признак или же особый отличительный признак, например, место обитания.

Второе слово - это имя прилагательное, пишется со строчной буквы и характеризует какую-либо особенность данного вида.

Например: название микроорганизма *Streptococcus lactis*. *Streptococcus* - родовое название. К этому роду относятся бактерии сферической формы (кокки), которые обычно располагаются цепочками (морфологический признак). Второе слово обозначает основное местообитание этого стрептококка - стрептококк молочнокислый.

Названия микроорганизмам присваиваются в соответствии с правилами Международного кодекса номенклатуры микроорганизмов, они едины во всех странах мира.

3. Идентификация - распознавание микроорганизмов. Это третья цель систематики. Пользуясь определителями бактерий,

грибов, дрожжей, можно определить название микроорганизма, выделенного из окружающей среды.

1.2. Типы клеточной организации микроорганизмов

Наиболее простым типом клеточной организации является **одноклеточность**. Одноклеточные микроорганизмы очень малы из-за малых размеров клеток. Одноклеточность распространена среди бактерий, простейших, дрожжей. Некоторые одноклеточные микроорганизмы подвижны, так как снабжены специальными приспособлениями для движения - жгутиками.

Многоклеточность - более сложный тип клеточной организации. Многоклеточные организмы возникают из одной клетки, но во взрослом состоянии они построены из множества клеток, характер расположения которых и определяет общую форму организмов. Многоклеточную структуру имеют растения, животные и некоторые микроорганизмы.

Для некоторых микроорганизмов биологическая организация представлена многоядерными структурами. Такие микроорганизмы называют **ценоцитными**. У них цитоплазма непрерывна, и растут они, не претерпевая клеточного деления. К таким организмам относится большинство грибов и водорослей.

Существуют два различных типа клеток: эукариотические, которые могут иметь одноклеточную, многоклеточную и ценоцитную структуру, и прокариотические (в основном одноклеточные).

1.3. Строение прокариотической (бактериальной) клетки

Характерной особенностью прокариот является отсутствие системы внутриклеточных мембран (рис. 1).

1. Клеточная стенка придает форму клетке, предохраняет клетку от внешних воздействий (является механическим барьером клетки), защищает клетку от проникновения в нее избыточного количества влаги.

По химическому составу и строению клеточной стенки бактерии делятся на грамположительные (Грам"+") и грамотрицательные (Грам"-"). Названы так по фамилии датского ученого Кристиана Грама, предложившего специальный метод окраски бактерий - окраску по Граму. После окрашивания краской генцианвиолетом

бактерии обрабатывают спиртом, в результате чего Грам+ бактерии сохраняют фиолетовую окраску, а Грам- бактерии обесцвечиваются.

Клеточная стенка Грам "+" состоит из пептидогликана - *муреина* (до 90-95 %), *тейхоевых кислот*, полисахаридов. Она имеет однослойную структуру, плотно прилегает к цитоплазматической мембране.

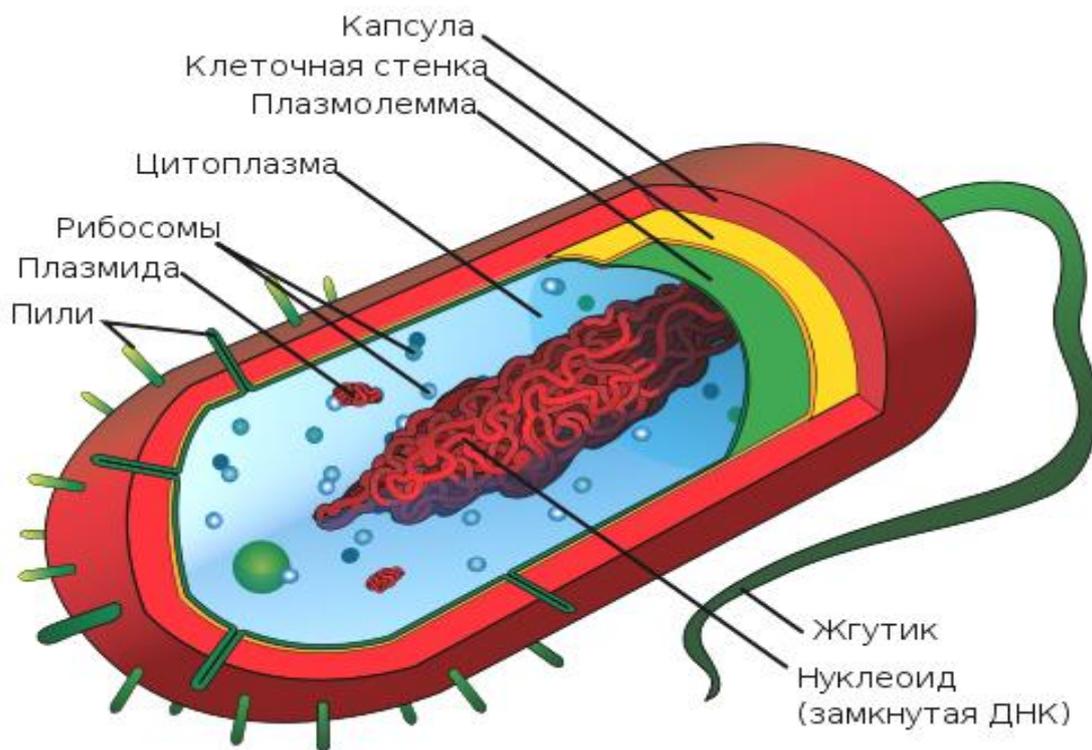


Рис. 1 - Схема строения прокариотической клетки

У Грам "-" бактерий в составе клеточной стенки муреина мало (5-10 %), тейхоевые кислоты отсутствуют, в больших количествах содержатся липопротеиды и липополисахариды.

Клеточная стенка Грам "-" бактерий значительно тоньше, чем у Грам "+", но имеет двухслойную структуру. Наружный слой состоит из липопротеидов и липополисахаридов, которые препятствуют проникновению токсических веществ. Поэтому Грам "-" бактерии более устойчивы к действию антибиотиков, ядовитых химических веществ и борьба с этими микроорганизмами в пищевых производствах менее эффективна, чем с Грам "+" бактериями.

2. Цитоплазматическая мембрана (ЦПМ) играет важную роль в питании клетки, обладает избирательной проницаемостью. Состоит из белково-липидного комплекса, имеет трехслойную структуру. На внешней стороне мембраны расположены белки-переносчики,

осуществляющие транспорт питательных веществ в клетку, а на внутренней стороне расположены окислительно-восстановительные и гидролитические ферменты. Между двумя белковыми слоями располагается фосфолипидный слой.

3. Мезосомы - мембранные образования, выпячивания ЦПМ. Благодаря им увеличивается поверхность обмена клетки. Участвуют в энергетических процессах, а также принимают участие в процессах деления (размножения) клетки.

4. Цитоплазма - внутриклеточное содержимое, полужидкий коллоидный раствор. Здесь содержится до 70-80 % воды от массы клетки, ферменты, субстраты питания и продукты обмена веществ клетки. В цитоплазме располагаются все компоненты прокариотической клетки.

5. Нуклеоид - носитель наследственной информации, единственная хромосома прокариотической клетки, принимает участие в размножении. Это компактное образование, занимающее центральную область в цитоплазме и состоящее из двухцепочной спирально закрученной нити ДНК, замкнутой в кольцо.

Многие бактерии, наряду с хромосомной ДНК, содержат и внехромосомную ДНК, также представленную двойными спиральями, замкнутыми в кольцо. Эти автономно реплицирующиеся элементы ДНК называют *плазмидами*.

6. Рибосомы - небольшие гранулы, содержащие РНК (60 %) и белок (40 %). На рибосомах осуществляется синтез клеточных белков.

7. Запасные вещества состоят из полисахаридных гранул (гликогена гранулезы), включений серы, жировых капель (содержат поли- β -масляную кислоту), волютина (полифосфатные гранулы).

У подвижных форм бактерий имеются *жгутики*, длинные нити, состоящие из структурного белка - флагелина. Прикреплены жгутики к ЦПМ с помощью двух пар дисков основания - *базального тельца*.

У фотосинтезирующих бактерий в клетках имеются *тилокоиды*, с помощью которых осуществляется фотосинтез.

Слизистые виды бактерий имеют *капсулу* или слизистый чехол, чаще состоящий из полисахаридов, реже - из полипептидов. Это дополнительный защитный барьер клетки, источник запасных питательных веществ.

1.4. Строение эукариотической клетки

Клеточная стенка эукариотической клетки (рис. 2), в отличие от клеточной стенки прокариот, состоит главным образом из полисахаридов. У грибов основным является азотсодержащий полисахарид *хитин*. У дрожжей 60-70 % полисахаридов представлены *глюканом* и *маннаном*, которые связаны с белками и липидами. Функции клеточной стенки эукариот те же, что и у прокариот.

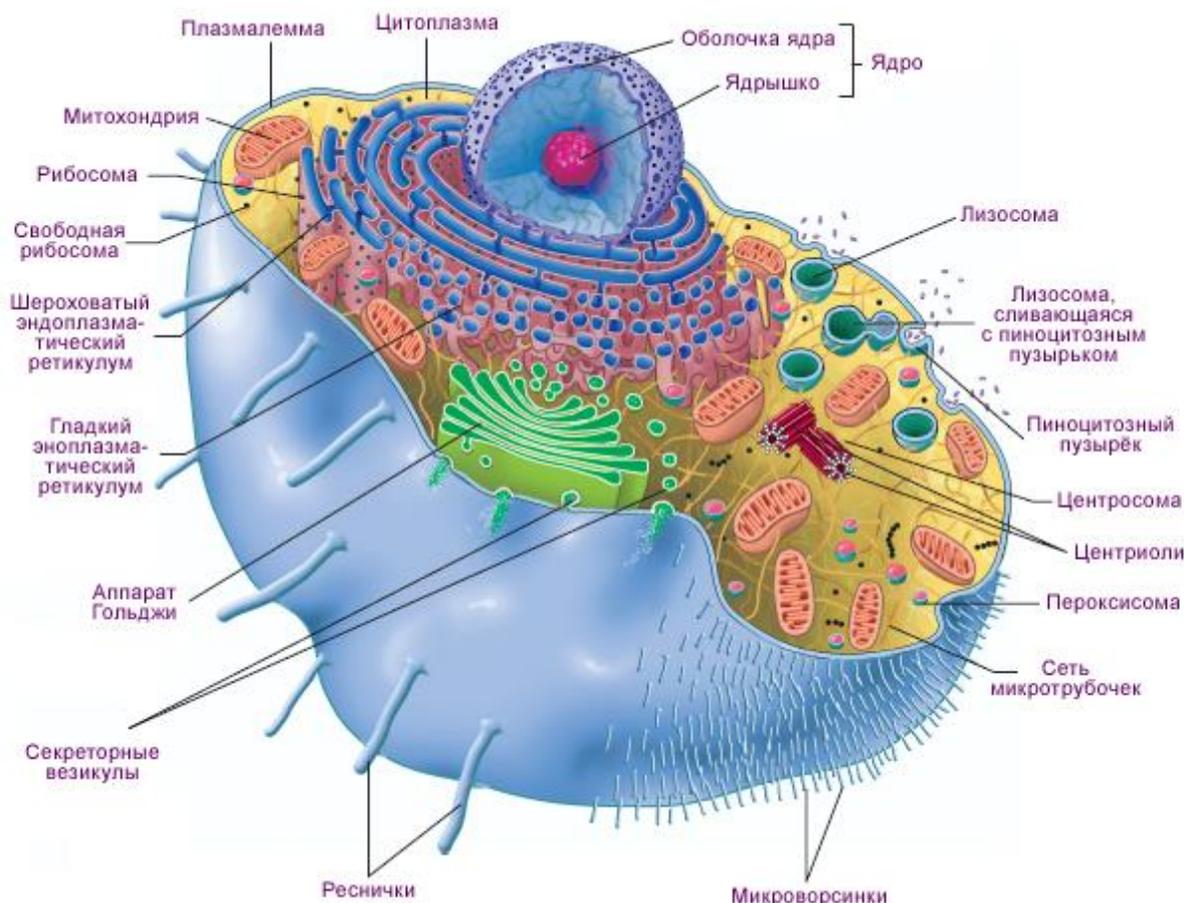


Рис. 2 - Схема строения эукариотической клетки

Цитоплазматическая мембрана (ЦПМ) так же, как и ЦПМ прокариотической клетки, имеет трехслойную структуру. Поверхность мембраны имеет выпячивания, близкие к мезосомам прокариот. ЦПМ регулирует процессы обмена веществ клетки.

У эукариот ЦПМ способна захватывать из окружающей среды большие капли, содержащие углеводы, липиды и белки. Это явление называется *пиноцитозом*. ЦПМ эукариотической клетки способна

также захватывать из среды твердые частицы (*явление фагоцитоза*). Кроме того, ЦПМ ответственна за выброс в среду продуктов обмена.

Ядро отделено от цитоплазмы двумя мембранами, в которых имеются поры. Поры у молодых клеток открыты, служат они для миграции из ядра в цитоплазму предшественников рибосом, информационной и транспортной РНК. В ядре в нуклеоплазме имеются хромосомы, состоящие из двух нитевидных цепочных молекул ДНК, соединенных с белками. В ядре имеется также ядрышко, богатое матричной РНК и связанное со специфической хромосомой - ядрышковым организатором.

Основной функцией ядра является участие в размножении клетки. Это носитель наследственной информации.

В эукариотической клетке ядро - важнейший, но не единственный носитель наследственной информации. Часть такой информации содержится в ДНК митохондрии и хлоропластов.

Митохондрии - мембранная структура, содержащая две мембраны - наружную и внутреннюю, сильно складчатую. На внутренней мембране сосредоточены окислительно-восстановительные ферменты. Основной функцией митохондрии является снабжение клетки энергией (образование АТФ). Митохондрии - саморепродуцирующая система, так как в ней имеется собственная хромосома - кольцевая ДНК и другие компоненты, которые входят в состав обычной прокариотической клетки.

Эндоплазматическая сеть (ЭС) - мембранная структура, состоящая из канальцев, которые пронизывают всю внутреннюю поверхность клетки. Бывает гладкой и шероховатой. На поверхности шероховатой ЭС располагаются рибосомы, более крупные, чем рибосомы прокариот. На мембранах ЭС расположены также ферменты, осуществляющие синтез липидов, углеводов и ответственных в клетке за транспорт веществ.

Комплекс Гольджи - пакеты уплощенных мембранных пузырьков - цистерн, в которых осуществляется упаковка и транспорт белков внутри клетки. В комплексе Гольджи происходит также синтез гидролитических ферментов (место образования лизосом).

В **лизосомах** сосредоточены гидролитические ферменты. Здесь происходит расщепление биополимеров (белков, жиров, углеводов).

Вакуоли отделены от цитоплазмы мембранами. В запасных вакуолях содержатся запасные питательные вещества клетки, а в шлаковых - ненужные продукты обмена и токсические вещества.

Вопросы для самопроверки

1. Какие вопросы изучает систематика как наука?
2. Какие задачи ставятся при классификации микроорганизмов?
3. Какие таксономические категории вам известны?
4. Что такое «номенклатура микроорганизмов»?
5. Как делятся микроорганизмы в зависимости от структуры их клеточной организации?
6. Какие типы клеточной организации вы знаете?
7. Какие микроорганизмы называются ценоцитными?
Приведите примеры таких микроорганизмов.
8. Назовите основные компоненты прокариотической клетки.
9. Чем отличаются грамположительные и грамотрицательные бактерии?
10. Назовите химический состав и функции нуклеоида. В каких клетках имеется нуклеоид?
11. Какую функцию в клетке выполняют рибосомы? Чем отличаются рибосомы прокариот от рибосом эукариот?
12. Каковы состав и функции клеточной стенки эукариот?
13. Какие существуют отличия в строении прокариотической и эукариотической клеток?
14. Каков химический состав и функции цитоплазматической мембраны прокариотической и эукариотической клеток?
15. Какую роль выполняют лизосомы в эукариотической клетке?
16. Приведите примеры известных вам одноклеточных организмов.
17. Дайте определение понятиям «фагоцитоз» и «пиноцитоз».

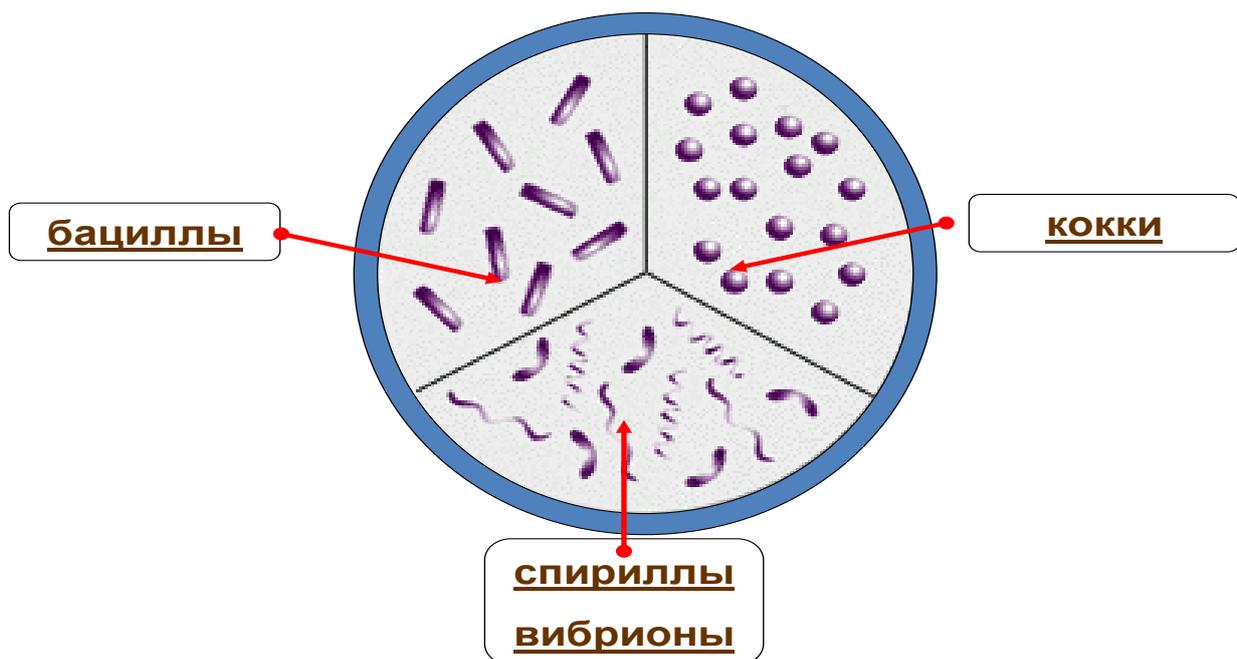
ГЛАВА 2. ПРОКАРИОТЫ

2.1. Морфология бактерий

Бактерии - наиболее широко распространенная и разнообразная в видовом отношении группа микроорганизмов. Величина бактерий измеряется микронами и колеблется от 0,1 до 2-3х15-20 мкм.

Форма бактерий не является абсолютно постоянной, она способна изменяться под влиянием среды обитания. Эти изменения ненаследственные и называются *модификациями*. Однако при определенных условиях микробы обладают способностью сохранять присущие данному виду морфологические свойства, приобретенные ими в процессе эволюции.

По внешнему виду бактерии подразделяются на **3 основные формы**:



Кокками (от греч. «coccus» - ягода) называют сферические или шаровидные бактерии. Различные виды бактерий этой группы различаются между собой:

- *диаметром; диаметр шаровидных бактерий не превышает 1-2 мкм;*
- *взаимным расположением клеток.*

У разных видов бактерий закономерность расположения клеток после деления неодинакова (рис. 3).



Рис. 3 - Взаимные расположения кокков

В зависимости от расположения клеток кокковые формы делятся:

- на *монококки* или *микрোকки* - клетки кокков располагаются поодиночке;
- *диплококки* - кокки располагаются попарно, так как деление клетки происходит в одной плоскости;
- *стрептококки* - кокки располагаются в виде цепочек, напоминающих нити бус, деление клеток происходит в одной плоскости, причем клетки после деления не отделяются друг от друга;
- *стафилококки* - скопления кокков неправильной формы, напоминающих гроздь винограда; деление этих кокков осуществляется в нескольких плоскостях;
- *тетракокки* - образуют скопления из четырех клеток, что обусловлено делением клеток в двух взаимно перпендикулярных плоскостях;

- *сарцины* - имеют вид скоплений кубической формы в результате деления в трех взаимно перпендикулярных плоскостях. Все кокки неподвижны и не образуют спор.

Палочковидные бактерии (рис. 3) имеют форму вытянутого цилиндра и различаются:

- размерами (длиной и толщиной); средняя длина палочковидных бактерий составляет 2-7 мкм при диаметре 0,5-1 мкм; однако есть как значительно более крупные формы, так и очень мелкие, величина которых находится на грани видимости в обычные световые микроскопы (0,1-0,2 мкм);

- взаимным расположением клеток; палочковидные бактерии могут располагаться поодиночке, попарно (*диплобактерии*) и цепочками (*стрептобактерии*);

- палочки бывают спорообразующие и неспорообразующие; спорообразующие палочки делятся на *бациллы* и *кlostридии*. У бацилл размер споры меньше толщины палочки, и поэтому форма клетки не меняется. Споры у кlostридии по диаметру больше толщины клетки, и поэтому при образовании споры форма клетки меняется и приобретает вид веретена (кlostридиальное расположение споры) или барабанной палочки (плектридиальное расположение споры);

- палочковидные бактерии бывают подвижные и неподвижные; клетки подвижных форм палочковидных бактерий снабжены специальными приспособлениями для движения - *жгутиками*.

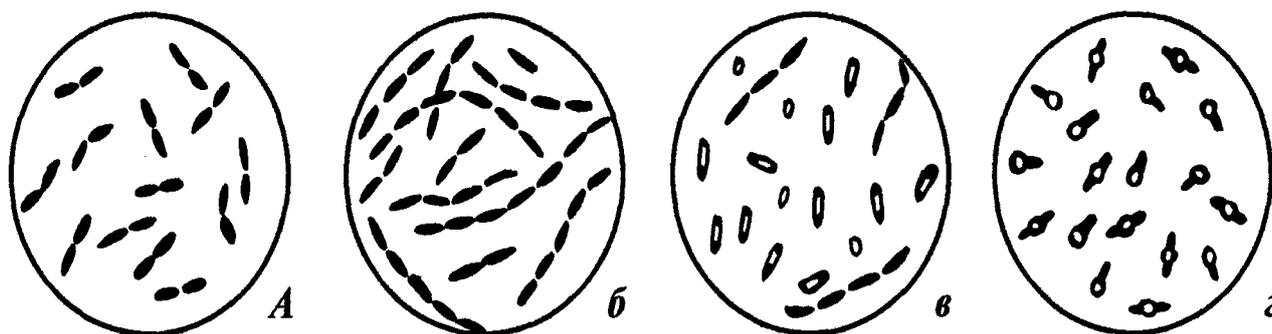
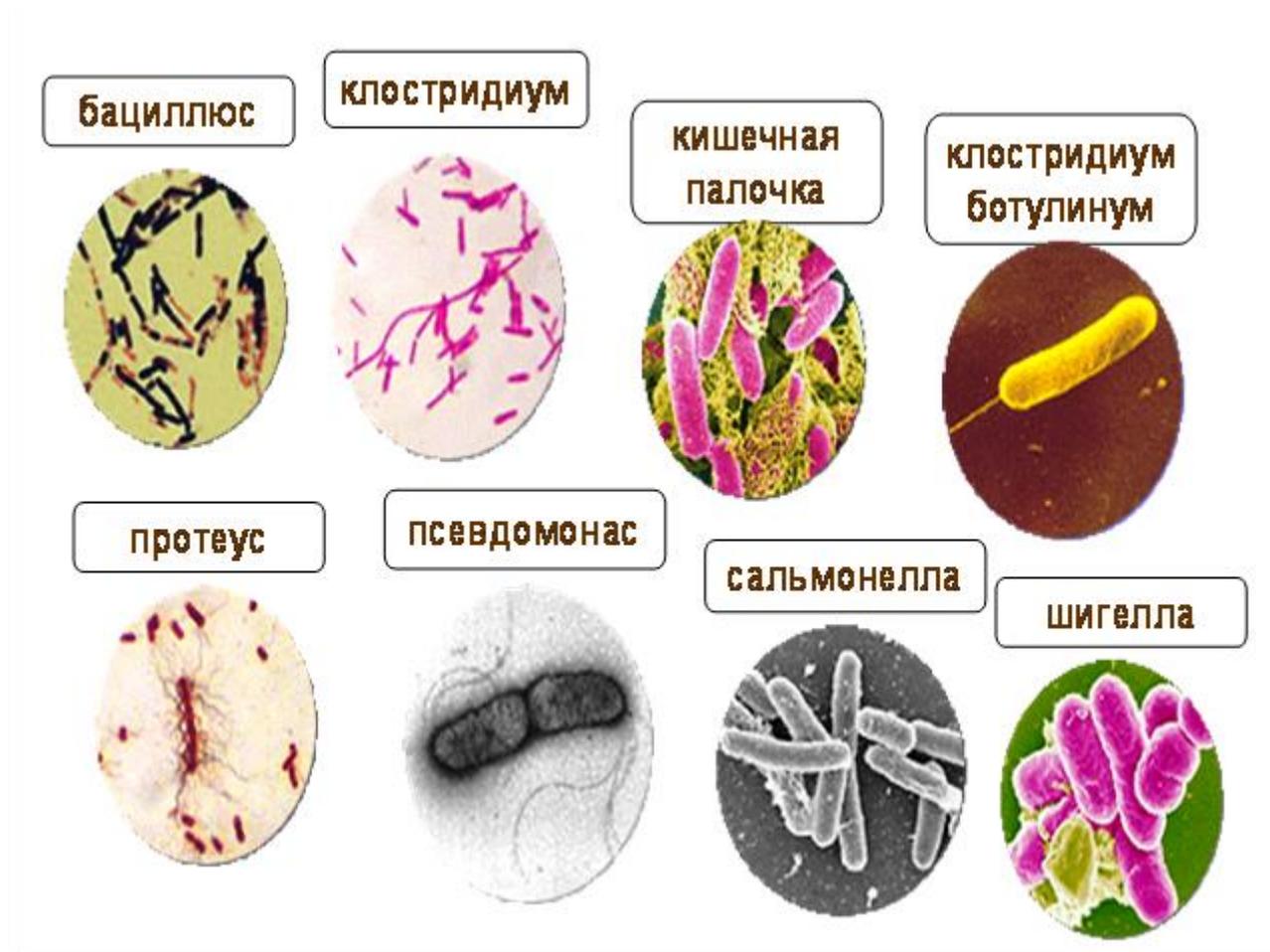


Рис. 3 - Морфология палочковидных бактерий:

а - диплобактерии; *б* - стрептобактерии; *в* - бациллы; *г* – кlostридии.

Бациллы



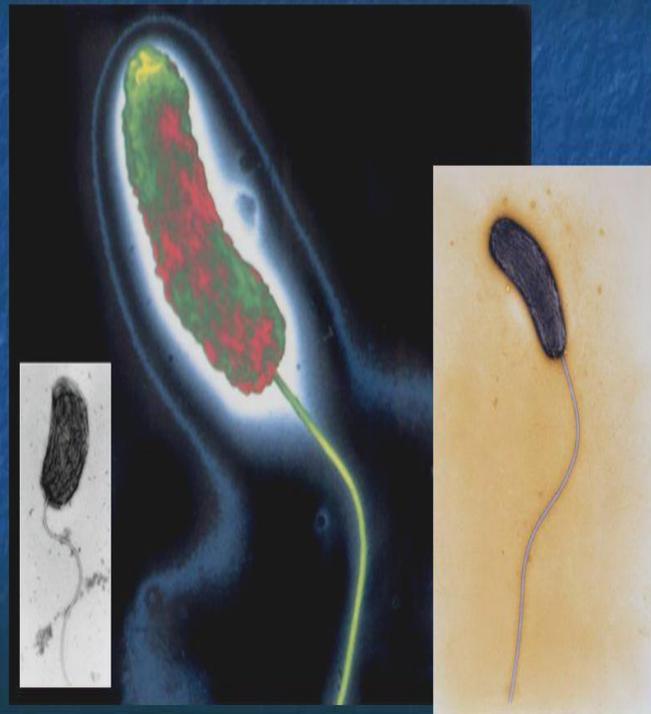
Извитые формы бактерий (рис. 4) в зависимости от степени изогнутости подразделяются на вибрионы, спираиллы и спирохеты.

Вибрионы имеют вид запятой, самые мелкие из извитых форм. Длина клетки вибрионов не превышает 1-3 мкм.

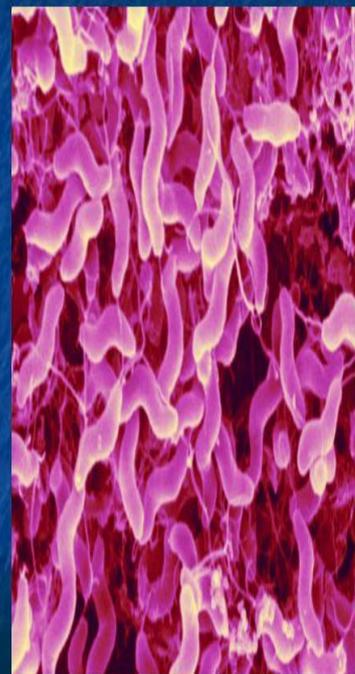
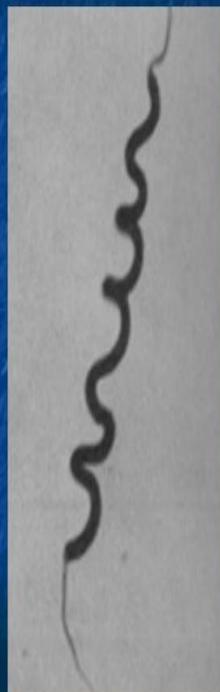
Клетки *спираилл* длиной от 5 до 30 мкм имеют один или несколько завитков.

Характерная особенность *спирохет* - крайне малый диаметр клетки (0,1-0,6 мкм) при относительно большой (5-500 мкм) длине клетки. Клетки спирохет имеют вид штопора, покрыты эластичной оболочкой, позволяющей им винтообразно изгибать тело.

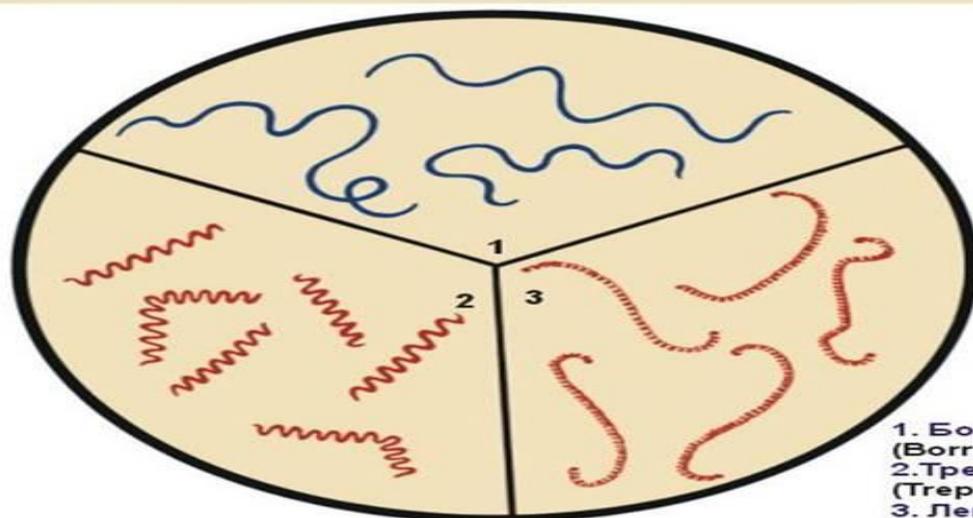
ВИБРИОНЫ



СПИРИЛЛЫ

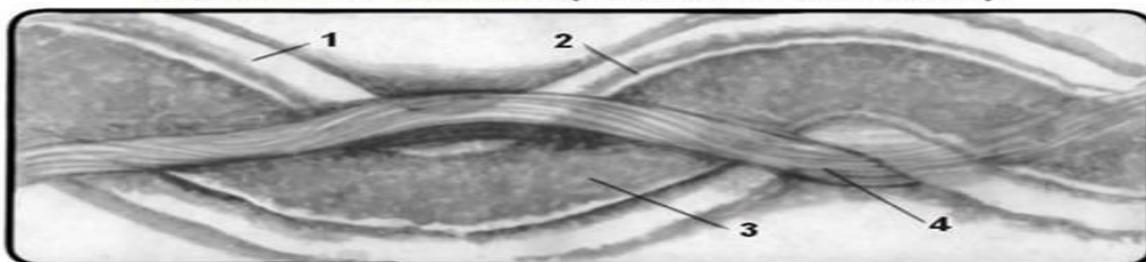


СПИРОХЕТЫ (SPIROCHETES)



1. Борелии (Borrelia)
2. Трепонемы (Treponema)
3. Лептоспиры (Leptospira)

УЛЬТРАСТРУКТУРА (ULTRASTRUCTURE)



1. Клеточная стенка (Cell wall);
2. Цитоплазматическая мембрана (Cytoplasmic membrane);
3. Цитоплазматический цилиндр (Cytoplasmic cylinder);
4. Осевая нить (Axial filament)

Рис. 4 - Морфология извитых бактерий

Все извитые формы подвижны. Движение осуществляется с помощью жгутиков (у вибрионов и спирилл) или за счет сокращения всей клетки (у спирохет).

Актиномицеты (лучистые грибки) представляют собой особую группу бактерий. Род *Actinomycetes* - Ветвящиеся бактерии. Не содержат в клеточной стенке хитина, стенка имеет строение грамположительных бактерий.

Мицелий имеет вид тонких прямых палочек, образуют нити. Характерная особенность актиномицетов — способность образовывать хорошо развитый мицелий. Палочковидные формы, часто с утолщенными концами, в мазке располагаются по одиночке, парами, V- и Y-образно. Все морфологические формы способны к истинному ветвлению, особенно на тиогликолевой полужидкой среде. По Граму окрашиваются плохо, часто образуют зернистые либо четкообразные формы; не кислотоустойчивы. Типовой вид — *Actinomycetes bovis*.

Актиномицеты обладают некоторыми признаками, общими как с бактериями, так и с грибами. Как бактерии они содержат ядро типа нуклеоида, состоят из одной клетки, покрытой оболочкой, грамположительны. В то же время они имеют форму ветвящейся нити, которая характерна для нитевидных грибов. Нити актиномицетов, переплетаясь, как и грибы, образуют видимый глазом мицелий. Часть актиномицетов (стрептомицеты) размножается спорами, поэтому они занимают как бы промежуточное положение между бактериями и грибами. По классификации Берджи актиномицеты выделены в самостоятельную группу, порядок *Actinomycetales*, в который входят три семейства.

Семейство *Actinomycetaceae* (рис. 5). Нитевидные клетки актиномицетов часто распадаются на отдельные фрагменты, напоминающие бациллы. Размножаются они путем фрагментации нитей, спор не образуют. Большинство актиномицетов — сапрофиты, живущие за счет разложения органических веществ в почве. Нокардии могут вызывать сходные с туберкулезом заболевания человека и животных — нокардиозы, а актиномицеты — актиномикозы.

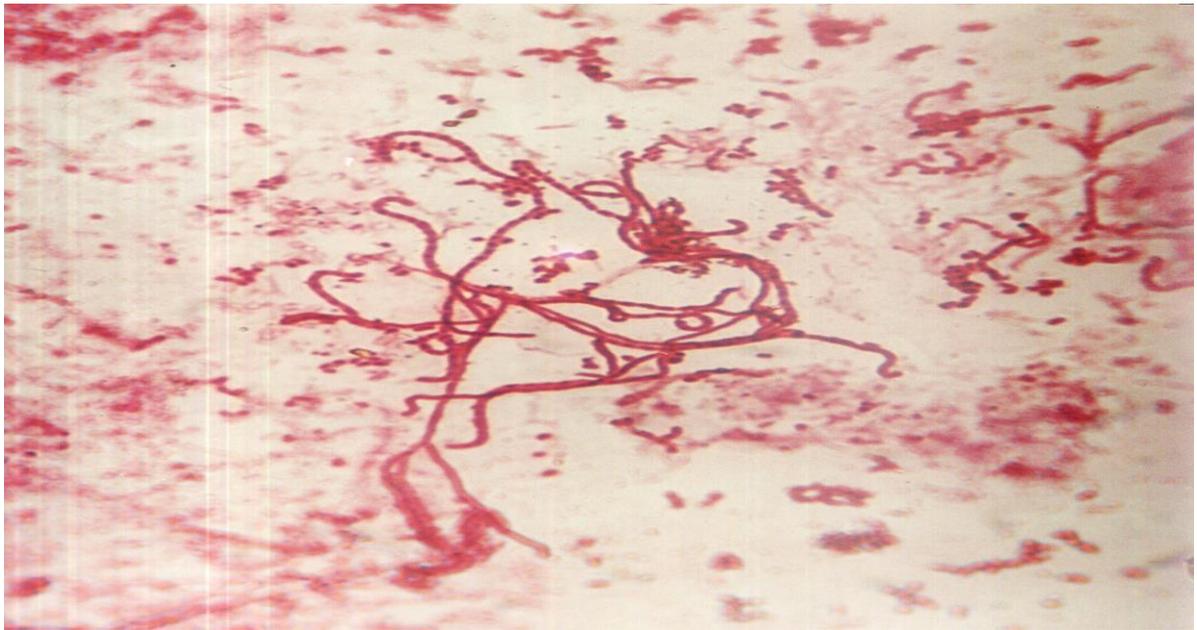


Рис. 5 - Семейство Actinomycetaceae

Семейство Streptomycetaceae (рис. 6). Имеют наибольшее сходство с грибами. Образуют длинный разветвленный воздушный мицелий, состоящий из тонких нефрагментированных нитей. Размножаются спорами-конидиями, которые образуются на вершине отдельных нитей-конидиофоров. Конидии менее термоустойчивы, чем споры бактерий, и гибнут при 65 °С через 10-30 мин. Большинство стрептомицетов играет активную роль в разложении разнообразных органических остатков в почве. Представители стрептомицетов являются продуцентами антибиотика стрептомицина. Некоторые из них вызывают заболевания животных и сельскохозяйственных растений.

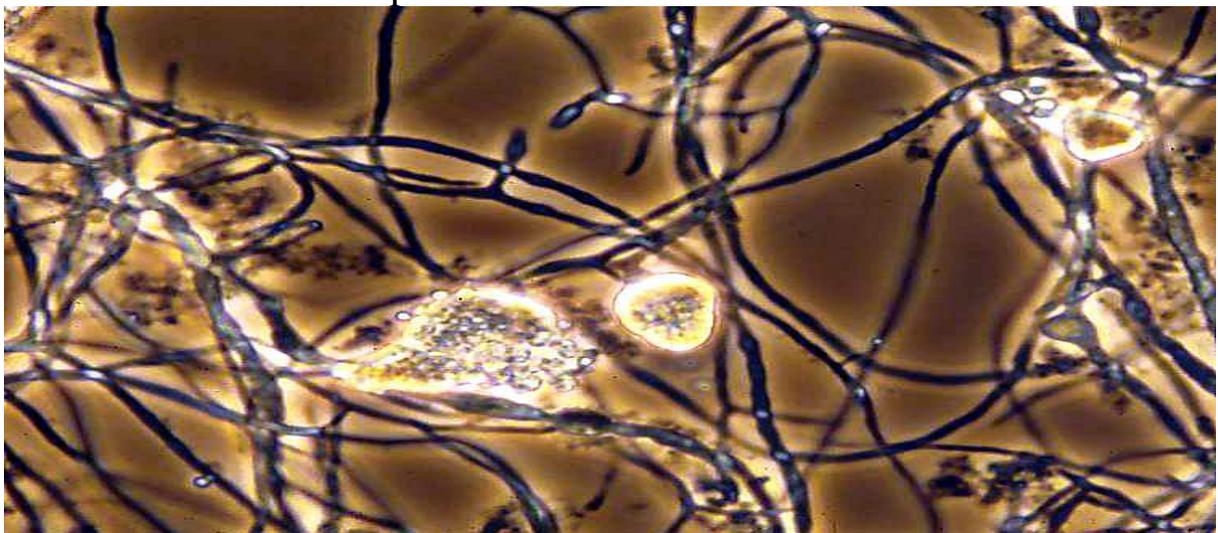


Рис. 6 - Семейство Streptomycetaceae

Семейство *Mycobacterium* (рис.7). В патологии человека наиболее важную роль играют микроорганизмы рода *Mycobacterium*. Микобактерии могут образовывать слабоветвящийся короткий мицелий, склонный к распаду на отдельные фрагменты.

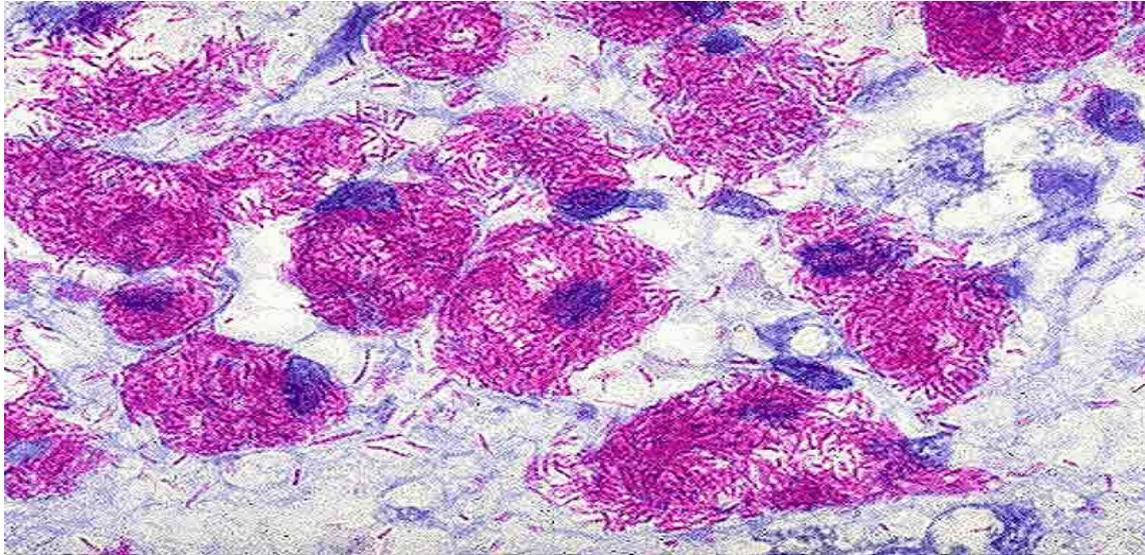


Рис.7 - Семейство *Mycobacterium*

Чаще микобактерии имеют вид палочек, поэтому их относят к истинным бактериям. Размножаются они поперечным делением. Среди микобактерий имеются возбудители очень тяжелых заболеваний человека: туберкулеза и лепры (проказа).

2.2. Спорообразование

Некоторые виды палочковидных бактерий (род *Bacillus* и род *Clostridium*) способны образовывать споры. Спорообразование индуцируется неблагоприятными условиями среды (изменением температуры, недостатком питательных веществ, накоплением токсичных продуктов обмена, изменением pH, понижением содержания влаги и т.д.). Таким образом, спорообразование не является обязательной стадией развития спорообразующих бактерий. В клетке всегда образуется только одна спора.

Основными стадиями спорообразования являются:

1. Подготовительная стадия. Процессу предшествует перестройка генетического аппарата клетки: ядерная ДНК вытягивается в виде нити и концентрируется у одного из полюсов клетки либо в центре в зависимости от вида бактерий. Эта часть клетки называется *спорогенной зоной*.

2. Образование проспоры. В спорогенной зоне происходит обезвоживание и уплотнение цитоплазмы и обособление этой зоны с помощью перегородки, образующейся из цитоплазматической мембраны. *Проспора* - структура, располагающаяся внутри клетки и отделенная от нее двумя мембранами.

3. Формирование оболочек споры. Между мембранами формируется кортикальный слой (кортекс), сходный по составу с клеточной стенкой вегетативной клетки. Помимо пептидогликана - муреина, в кортексе содержится кальциевая соль *дипиколиновой* кислоты, которая синтезируется клеткой в процессе спорообразования. Затем сверху мембраны синтезируется оболочка споры, состоящая из нескольких слоев. Число и строение слоев различны у разных видов бактерий. Оболочка малопроницаема для воды и растворенных веществ и обеспечивает большую устойчивость спор к внешним воздействиям.

4. Выход споры из клетки. После созревания споры разрушается оболочка, и спора выходит наружу.

Процесс спорообразования длится несколько часов.

Таким образом, *спора* - это обезвоженная клетка, покрытая многослойной оболочкой, в состав которой входит кальциевая соль дипиколиновой кислоты. Основной особенностью бактериальных спор является их высокая термоустойчивость.

Попадая в благоприятные условия, спора прорастает. Процесс превращения споры в растущую (вегетативную) клетку начинается с поглощения воды и набухания. При этом происходят глубокие физиологические изменения: усиливается дыхание и активизируются ферменты. В этот же период спора теряет свою термоустойчивость. Затем внешняя оболочка ее разрывается, и из образовавшейся структуры формируется вегетативная клетка (рис. 8).

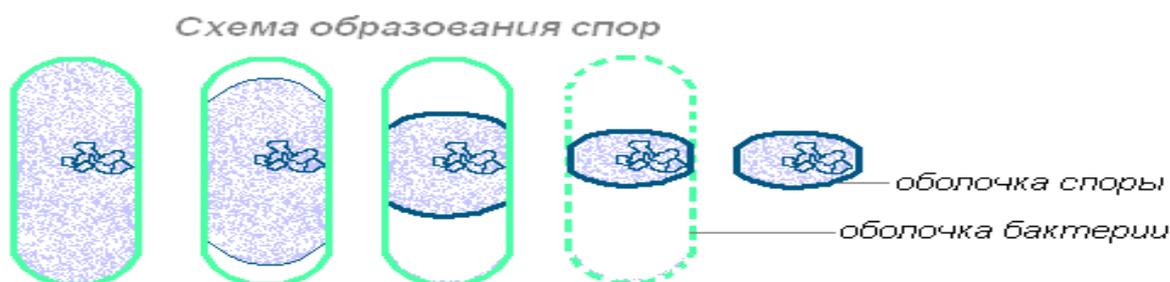


Рис. 8 - Схема спорообразования бактерий

2.3. Движение

Среди бактерий есть подвижные и неподвижные формы. Большинство подвижных бактерий активно передвигается только в жидкой среде. Движение бактерий осуществляется с помощью жгутиков (рис. 9).

Жгутики имеют палочковидные бактерии и некоторые извитые формы. Наличие жгутиков, их расположение являются постоянными для данного вида признаками и имеют диагностическое значение. Некоторые виды бактерий имеют один жгутик (*монотрихи*), у других жгутики располагаются пучками на одном или обоих концах клетки (*политрихи*), у третьих покрывают всю поверхность клетки (*перитрихи*).

Длина жгутиков может во много раз превышать длину клетки бактерий, достигая 10-30 мкм и более. Поперечный размер жгутиков составляет 0,01-0,03 мкм.

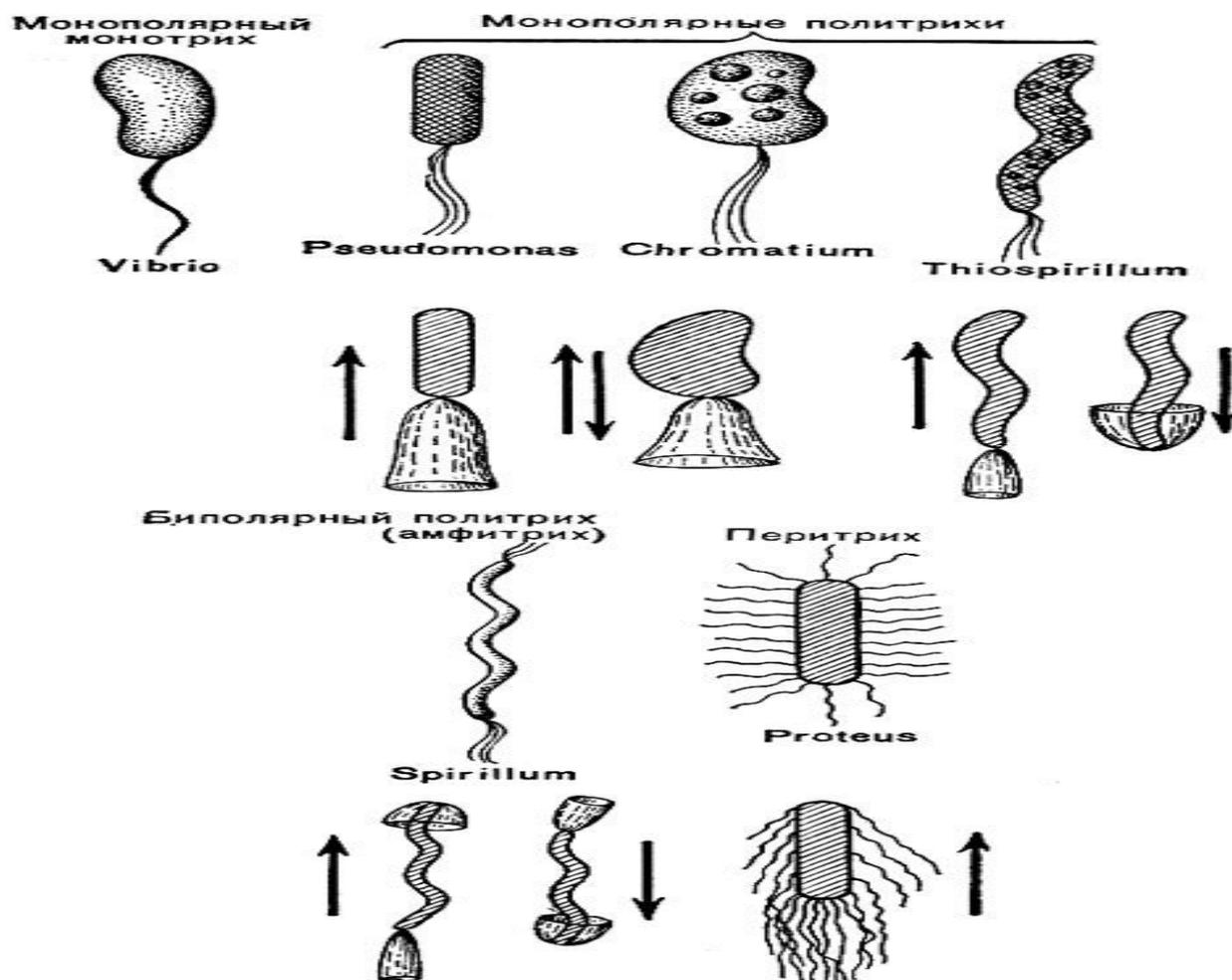


Рис. 9 - Расположение жгутиков

Скорость передвижения бактерий велика. За одну секунду клетка может пройти расстояние, в 20-50 раз превышающее длину ее тела. Происходит движение при вращении жгутиков вокруг своей оси или за счет сокращения жгутиков (рис. 10).

- путем скольжения - характерно для бактерий, имеющих слизистый чехол; за счет слизи клетка скользит по поверхности и передвигается;

- путем ползания - передвижение осуществляется за счет сокращения всей клетки; такой тип движения осуществляют спирохеты;

- реактивным движением - некоторые бактерии для передвижения выбрасывают порции слизи и сами при этом отталкиваются.

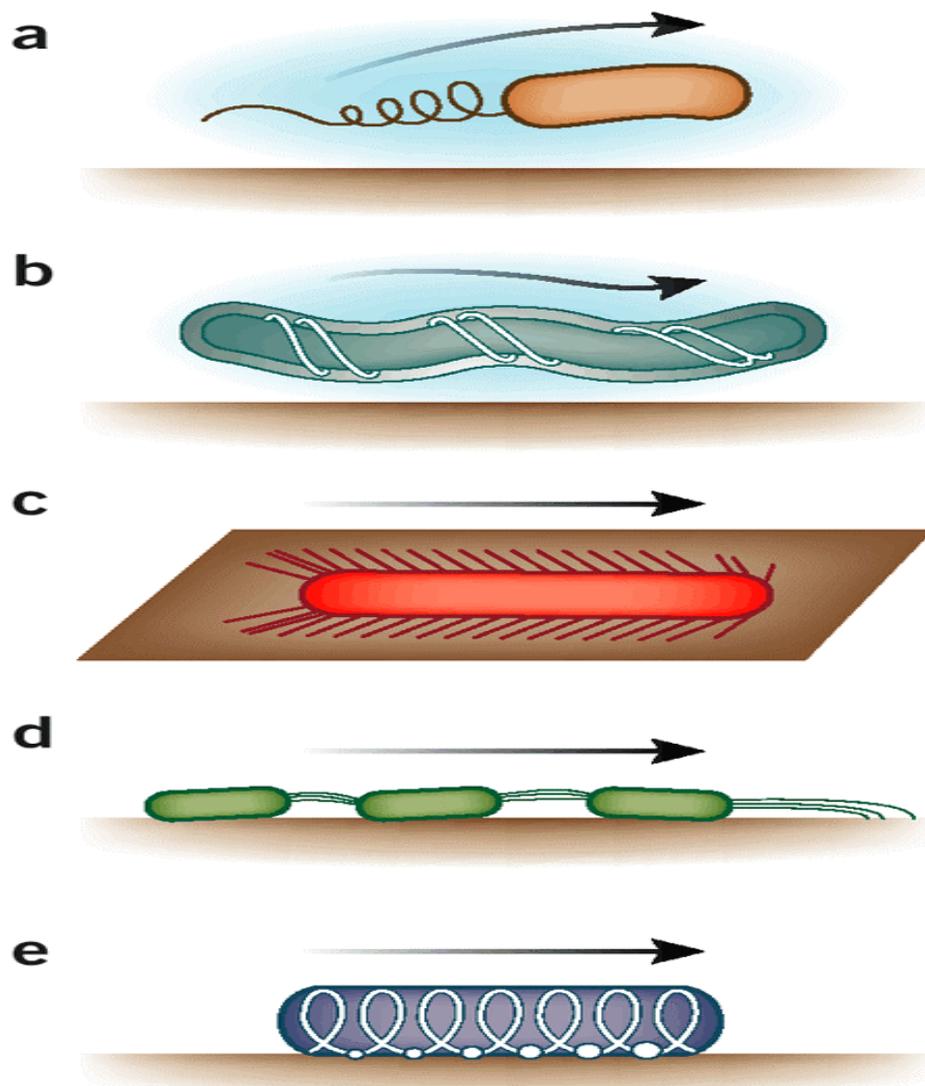


Рис. 10 - Движение бактерий

2.4. Размножение

Для прокариот характерно деление клетки на 2 части (*бинарное деление*).

При делении кольцевая ДНК прикрепляется к цитоплазматической мембране, расшнуровывается. При этом образуются 2 цепочки нуклеотидов, которые комплементарно достраиваются, в результате чего образуются две кольцевые двухцепочные молекулы ДНК (рис. 11).



Рис. 11 – Размножение

У подавляющего числа грамположительных бактерий деление происходит ровно пополам с помощью поперечной перегородки (сеты), которая образуется за счет выпячивания внутрь клетки цитоплазматической мембраны.

У грамотрицательных бактерий деление происходит путем образования перетяжки (цитоплазматическая мембрана и клеточная стенка прогибаются до слияния с противоположной поверхностью клетки).

Незначительная часть бактерий размножается почкованием (стебельковые бактерии) (рис. 12, 13).

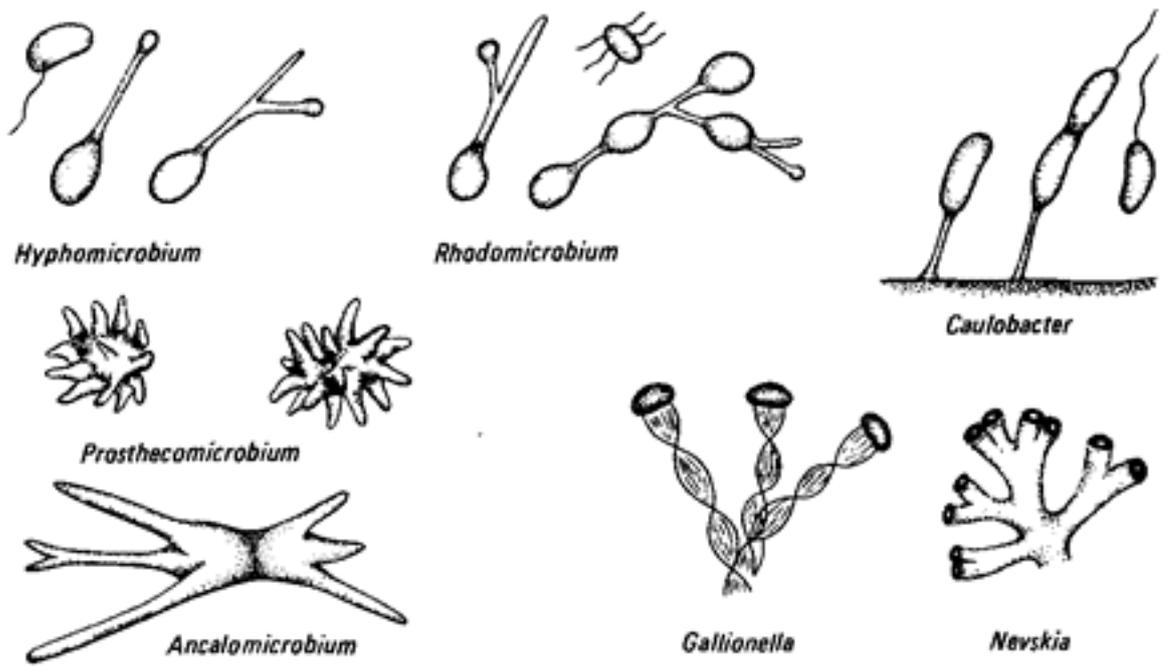


Рис. 12- Стебельковые бактерии

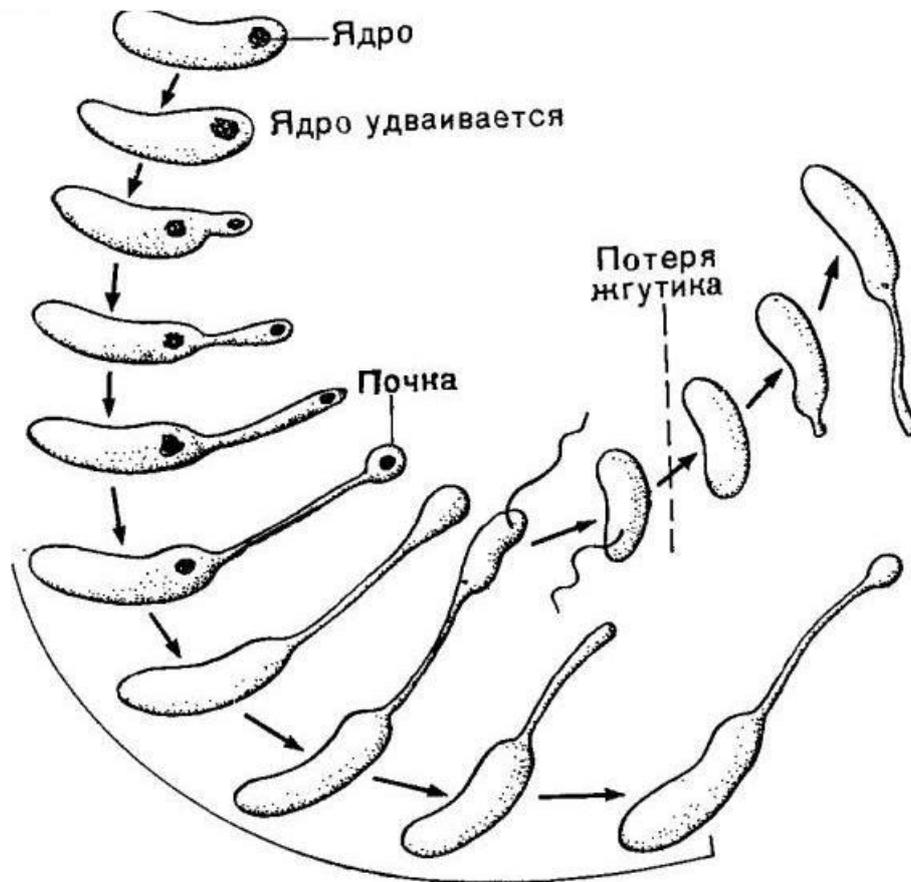
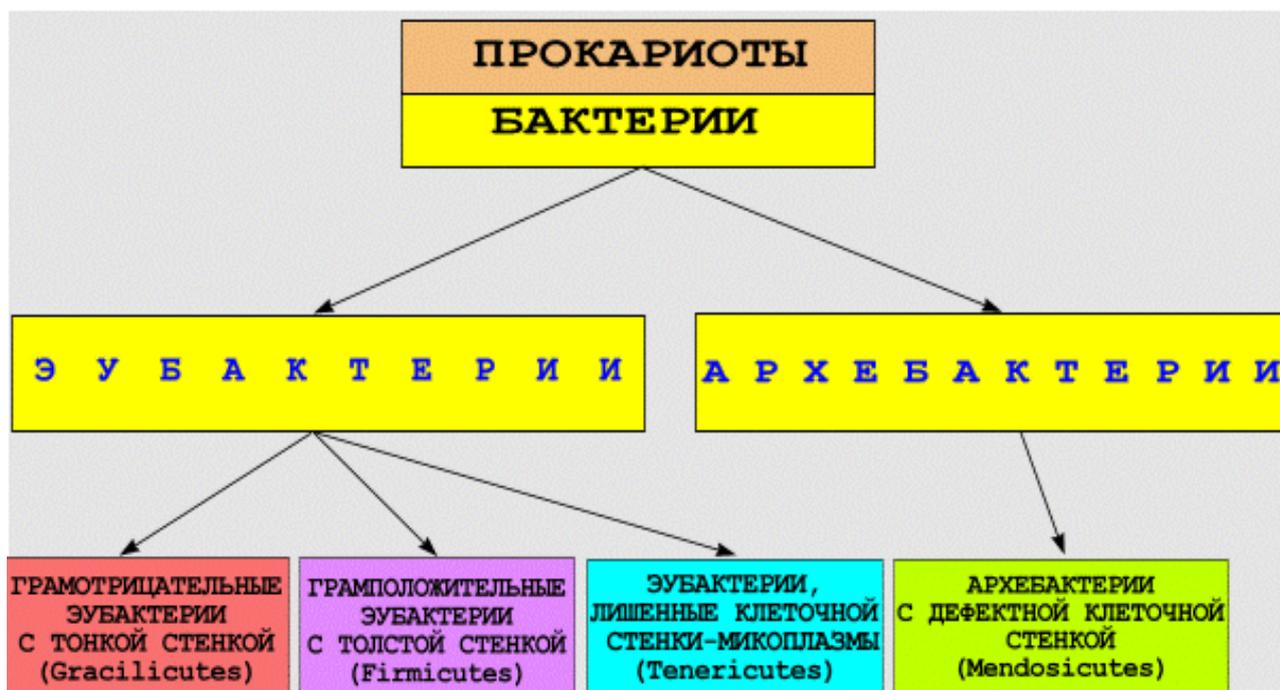


Рис. 13 - Размножение почкованием Hyphomicrobium

2.5. Классификация

В настоящее время существует несколько классификаций бактерий. Наиболее известна и широко используется **классификация бактерий Берги**.

По этой классификации царство прокариот в зависимости от отношения к свету разделено на 2 отдела:



В последние годы получила также признание **классификация бактерий Мюррея**, предложенная в 1978 г. В основу этой классификации положено строение клеточной стенки. Грам "+" бактерии отнесены в отдел Firmacutes. Другой отдел - Gracilicutes - объединяет все бактерии, которые имеют клеточную стенку, характерную для Грам "-" бактерий. Третий отдел объединяет особые формы бактерий, лишенные настоящей клеточной стенки - отдел Mucoplasma.

К отделу Грам "+" бактерий относятся четыре группы; в основу деления на группы положена форма клеток и способность образовывать споры. Это кокки, спорообразующие и неспорообразующие палочки, актиномицеты и родственные микроорганизмы. К неспорообразующим Грам "+" палочкам относится род *Lactobacillus*. Это молочнокислые бактерии, которые используются в производстве кисломолочных продуктов, в сыроделии, при квашении овощей, в хлебопечении.

Все представители Грам "-" бактерий не образуют спор и резко различаются по способности развиваться на свету и без него. В пищевых производствах встречаются Грам "-" бактерии, которые безразличны к свету. Они различаются по форме клеток и способу движения. По числу представителей и значимости в природе и в жизни человека наибольший интерес из них представляют псевдомонады, энтеробактерии, уксуснокислые бактерии.

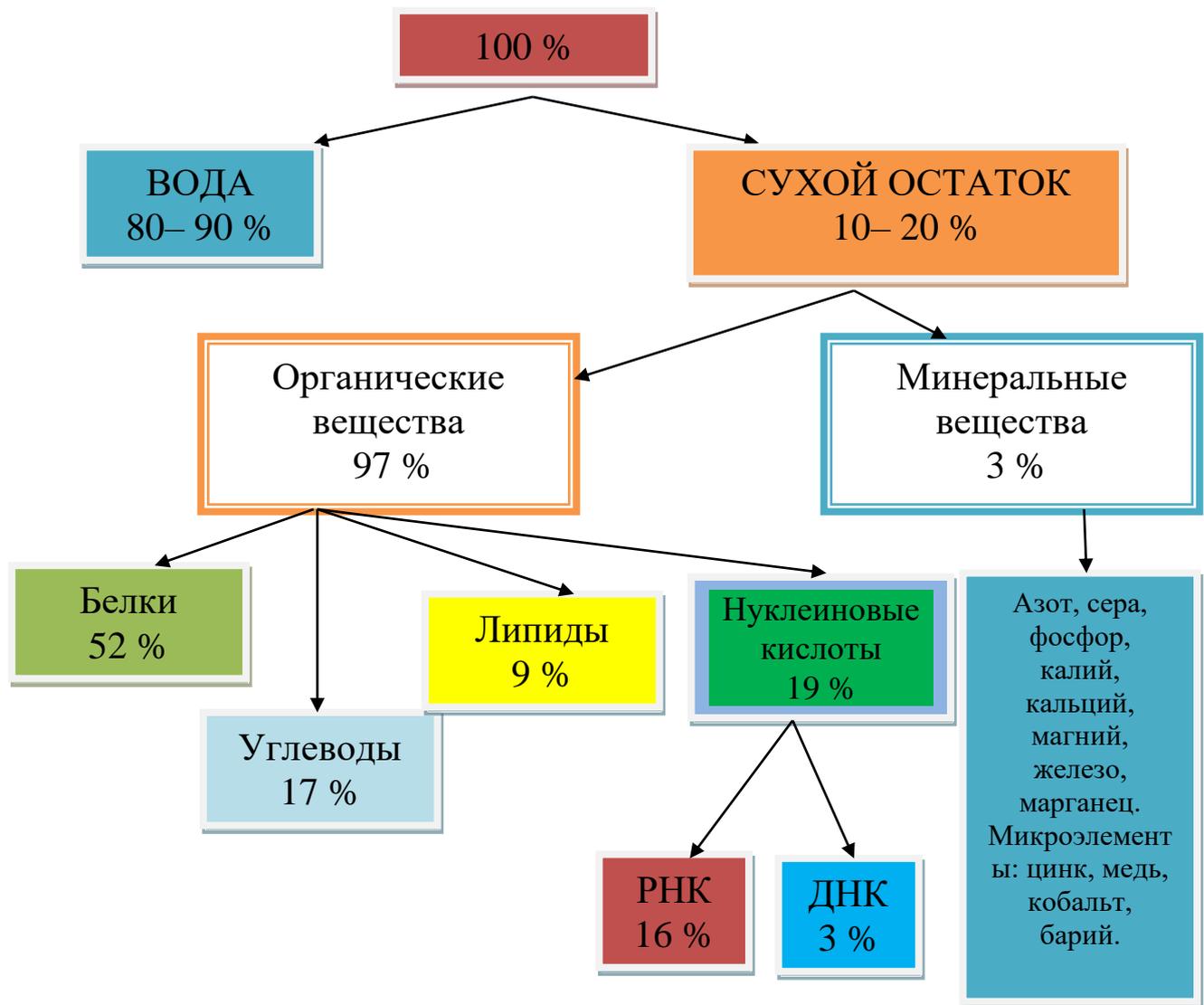
| ТОНКОСТЕННЫЕ, ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫЕ БАКТЕРИИ | | ТОЛСТОСТЕННЫЕ, ГРАМПОЛОЖИТЕЛЬНЫЕ БАКТЕРИИ | |
|--|--|---|--|
| Менингококки | | Пневмококки | |
| Гонококки | | Стрептококки | |
| Вейлонеллы | | Стафилококки | |
| Палочки | | Палочки | |
| Вибрионы | | Бациллы* | |
| Кампилобактерии, Хеликобактерии | | Клостридии* | |
| Спириллы | | Коринебактерии | |
| Спирохеты | | Микобактерии | |
| Риккетсии | | Бифидобактерии | |
| Хламидии | | Актиномицеты | |

*Расположение спор: 1 – центральное, 2 – субтерминальное, 3 – терминальное.

2.6. Химический состав

Клетка - универсальная единица живой материи. По химическому составу существенных отличий прокариотических и эукариотических клеток нет.

Основными химическими компонентами бактериальной клетки являются кислород, водород, углерод, азот, фосфор. В состав бактерий входит 70-90 % воды и 10-30 % сухого остатка.



Вода выполняет роль

1. Растворитель - участвует в обменных процессах (дисперсия белков, углеводов, жиров).
2. Механическая - обеспечивает тургор.

Химические элементы входят в состав различных веществ - воды, белков, липидов, жиров, углеводов, нуклеиновых кислот. Многие вещества бактериальная клетка может получать извне - из окружающей среды или организма хозяина.

Химические элементы, входящие в состав бактерий можно разделить на три основные группы – биогенные, макроэлементы, микроэлементы. На долю биогенных химических элементов приходится 95 % сухого остатка, в т.ч. **50 % - С, 20 % - О, 15 % - N, 10 % - Н.**

На микроэлементы приходятся доли процента, однако они имеют важное значение в обменных процессах.

Белки встречаются во всех структурных элементах клетки. Белки могут быть более простые (протеины), состоящие из аминокислот, и сложные (протеиды), состоящие из аминокислот и других веществ (полисахариды, нуклеиновые кислоты, липиды). Такие сложные белки называют нуклеопротеиды, глюкoпротеиды, липопротеиды.

| | |
|---|-------------------------|
| Биогенные химические элементы – 95 % сухого остатка | C, O, N, H |
| Макроэлементы – 4,99 % | P, S, Cl, K, Mg, Ca, Na |
| Микроэлементы – 0,01 % | Fe, Cu, I, Co, Mo и др. |

Выделяют структурные (структурообразующие) и функциональные (регуляторные) белки. К последним относятся ферменты.

Белки участвуют в обмене веществ (ферменты, резервные белки (запасные вещества), входят в состав структурных компонентов клетки (флагеллин, белки клеточной стенки, пилин и др.).

Белки обуславливают:

- ферментативную активность;
- антигенность;
- иммуногенность;
- вирулентность;
- видовую принадлежность;
- приспособляемость к факторам внешней среды.

В состав белков микроорганизмов входят как обычные для эукариотов аминокислоты, так и оригинальные - *диаминопимелиновая*, *D-аланин*, *D-глутанин*, входящие в состав пептидогликанов и капсул некоторых бактерий.

Только в спорах находится *дипиколиновая кислота*, с которой связана высокая резистентность спор.

Жгутики построены из белка *флагеллина*, обладающего сократительной способностью и выраженными антигенными свойствами.

Пили (ворсинки) содержат особый белок - *пилин*.

Белки входят в состав *пептидогликана* - биополимера, составляющего основу бактериальной клеточной стенки.

Свойства пептидогликана:

- содержит родо- и видоспецифические антигенные детерминанты;
- Запускает классический и альтернативный пути активации системы комплемента;
- тормозит фагоцитарную активность и миграцию макрофагов;
- инициирует развитие гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ);
- обладает противоопухолевым действием;
- оказывает пирогенное действие, т.е. вызывает лихорадку.

Углеводы делятся на простые (моно- и дисахариды) и сложные (полисахариды) - глюкопротеиды, липополисахариды.

Углеводы в бактериальной клетке встречаются чаще в виде *полисахаридов*, которые могут быть экзо- и эндоклеточными.

Среди экзоклеточных полисахаридов выделяют каркасные (входят в состав капсул) и истинно экзополисахариды (выходят из бактериальных клеток во внешнюю среду).

Среди бактериальных полисахаридов многие находят применение в медицине, биотехнологии, молекулярной биологии.

Декстраны - полисахариды с большой молекулярной массой, по виду напоминают слизь.

В 6 % концентрации декстран применяется в качестве кровезаменителя (полиглюкин).

Декстрановый гель *сефадекс* используется в колоночной хроматографии как молекулярное сито.

Эндоклеточные полисахариды - запасные питательные вещества клетки (крахмал, гликоген и др.).

Липополисахарид (ЛПС) - один из основных компонентов клеточной стенки грамотрицательных бактерий, представляет собой соединение липида с полисахаридом. Синонимы ЛПС - эндотоксин, О - антиген.

ЛПС выполняет две основные функции:

- определяет антигенную специфичность бактерий;
- является одним из основных факторов патогенности, т.к.

представляет собой эндотоксин, токсические свойства которого проявляются преимущественно при разрушении бактериальных клеток.

ЛПС запускает синтез более 20 биологически активных веществ, определяющих патогенез эндотоксикоза и обладает пирогенным действием.

Липиды (главным образом фосфолипиды) содержатся в цитоплазматической мембране (липидный бислой), в также в наружной мембране грамотрицательных бактерий.

Микобактерии содержат большое количество липидов (до 40 % сухого остатка).

В состав липидов входят различные *жирные кислоты*, весьма специфичные для разных групп микроорганизмов. Их определение имеет в ряде случаев диагностическое значение, например у анаэробов, микобактерий.

У микобактерий туберкулеза липиды определяют многие свойства:

- устойчивость к кислотам, щелочам и спиртам;
- трудная окрашиваемость красителями (используют раммальные методы окраски, чаще - по Цилю - Нильсену);
- устойчивость к солнечной радиации и дезсредствам;
- патогенность.

Тейхоевые кислоты встречаются в клеточных стенках раммположительных бактерий. Представляют собой водорастворимые линейные полимеры, содержащие остатки глицерина или рибола, связанные фосфодиэфирными связями.

С тейхоевыми кислотами связаны главные поверхностные антигены ряда раммположительных бактерий.

Нуклеиновые кислоты – ДНК и РНК.

ДНК бактерий двух видов:

- в нуклеоиде – хромосомная;
- в плазидах – внехромосомная.

Рибонуклеиновые кислоты (РНК) находятся главным образом в рибосомах (рРНК – 80-85 %).

Количество *транспортных* тРНК составляет – 10 %, *матричных* (информационных) мРНК- 1-2 %.

Вопросы для самопроверки

1. Каковы основные формы клеток у бактерий?
2. Чем отличаются стрептококки от стафилококков?
3. Какое взаимное расположение кокков имеют сарцины?
4. Каким образом дифференцируют палочковидные бактерии?
5. Как осуществляется движение у бактерий?
6. Что такое монотрихи и политрихи?
7. Как протекает процесс спорообразования у бактерий?
8. Какую функцию выполняет спорообразование у бактерий?
9. Какие признаки используются при определении вида бактерий?
10. Каким образом осуществляется размножение бактерий?
11. Какие классификации бактерий вам известны?
12. Охарактеризуйте следующие группы бактерий: стрептококки, диплобактерии, торроиды, спирохеты, вибрионы, простеки, актиномицеты.
13. Какие признаки положены в основу классификации бактерий по Берги?
14. Какие признаки положены в основу классификации бактерий по Мюррею?
15. Что такое «актиномицеты»?
16. Что такое «бациллы» и «кlostридии» и в чем их различия?
17. Что такое «споры»?
18. Все ли бактерии способны к спорообразованию?
19. Перечислите основные стадии спорообразования у бактерий.
20. Какие новые формы бактерий вам известны?
21. Какие взаимные расположения палочковидных бактерий вам известны?
22. Какие извитые формы бактерий вы знаете?

ГЛАВА 3. ЭУКАРИОТЫ

3.1. Микроскопические грибы

Одним из трех царств, относящихся к надцарству эукариот, являются грибы. Ранее считали, что грибы занимают промежуточное положение между царствами растений и животных, так как ряд признаков сближает их как с растениями, так и с животными. В настоящее время грибы выделены в отдельное царство *Mycota*, которое насчитывает около 100 тыс. видов.

Грибы широко распространены в природе. Они обитают в различных климатических зонах. Особенно много их в почве, встречаются они в пресных и соленых водоемах, в местах с повышенной влажностью.

Среди грибов встречаются организмы, развивающиеся за счет органических веществ отмерших организмов; они участвуют в круговороте веществ в природе. Но имеются и такие, которые могут существовать в живых организмах и вызывать заболевания (например, болезни плодов и овощей). Некоторые грибы выделяют ядовитые вещества - *микотоксины*. Многие грибы вызывают порчу пищевых продуктов и повреждение разнообразных изделий и материалов, некоторые могут развиваться, вызывая помутнение линз на оптических поверхностях, где имеется мизерное количество смазки.

С другой стороны, грибы имеют важное практическое значение, так как многие из них употребляются в пищу, используются в производстве этилового спирта, органических кислот, антибиотиков, витаминов, некоторых сортов сыра и т.д.

Признаки сходства с растительными организмами:

1. Наличие клеточной стенки и вакуолей, заполненных клеточным соком.

2. Неспособность к активному перемещению. Обычно грибы, как и растения, прикреплены к питательному субстрату, причем часть вегетативного тела возвышается над поверхностью питательной среды, а часть погружена в субстрат.

Различия:

1. У грибов нет хлорофилла. Это нефотосинтезирующие микроорганизмы, для которых характерен животный тип питания.

Клеточную энергию они получают путем окисления органических веществ в присутствии кислорода воздуха.

2. По сравнению с растениями, имеющими стебли, корни, листья, грибы слабо дифференцированы морфологически, у них почти нет разделения функций между разными частями организма.

3. Грибы отличаются от растений по типу клеточной организации. Это *ценоцитные организмы*, вегетативное тело которых представляет собой многоядерную массу цитоплазмы, заполняющую систему сильно разветвленных трубочек, играющих роль клеточной стенки (табл.2).

Сравнение клеток растений и грибов

Таблица 2

| Признак / Тип клетки | Клетка растений | Клетка грибов |
|----------------------------------|--|-------------------------------------|
| Клеточная стенка | Есть. Основной компонент - целлюлоза | Есть. Основной компонент – хитин |
| Пластиды | Хлоропласты, хромопласты, лейкопласты | Нет. |
| Основной запасной углевод | Крахмал | Гликоген |
| Клеточный центр | Нет у семенных. Есть у водорослей, мхов, папоротникообразных | Есть |
| Вакуоли | В зрелых клетках крупная, как правило, одиночная | Развиваются в старых частях мицелия |

Таким образом, грибы занимают промежуточное положение между царством растений и царством животных надцарства эукариот, что позволило отнести их к самостоятельному царству - царству *Mycota*.

Вегетативное тело грибов называется *мицелием*. Состоит мицелий из множества тесно переплетенных нитей - трубочек, которые называются *гифами*. Гифы растут своими концами (апикально), причем если в среде имеются питательные вещества, то рост мицелия может продолжаться неограниченное время.

В зависимости от строения мицелия грибы делятся на *высшие и низшие*. У высших грибов в гифах имеются поперечные перегородки (*септы*), поэтому мицелий септированный. У низших грибов мицелий несептированный. В центре септ имеются центральные поры, через которые свободно проходит цитоплазма и внутрицитоплазматические органеллы.

Различают поверхностный (воздушный) мицелий, посредством которого осуществляется дыхание и на котором образуются органы размножения, и глубинный (субстратный) мицелий, через который происходит всасывание питательных веществ. Гифы поверхностного мицелия более тонкие, длинные и прямые, глубинного - извилистые, мешковидные.

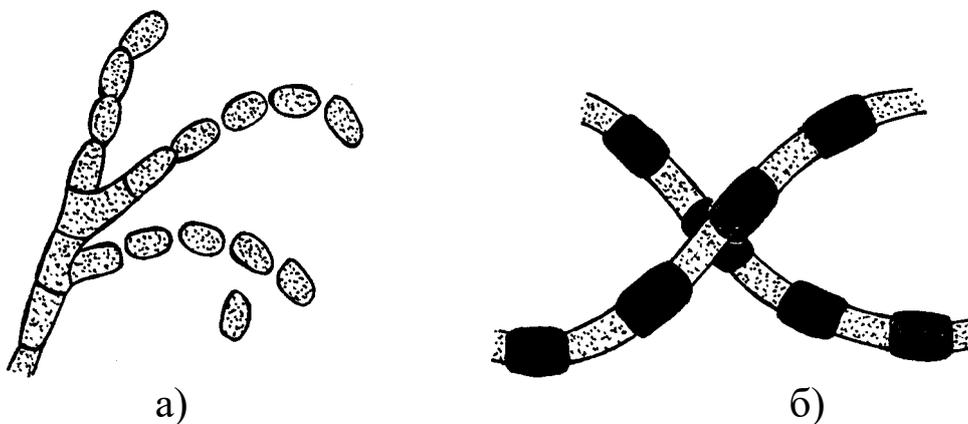
Большинство грибов - сапрофиты, т.е. микроорганизмы, которые перерабатывают органические соединения из отмерших клеток и тканей. Некоторые грибы являются паразитами, т.е. обитают в живых организмах.

3.2. Размножение

Существуют 3 способа размножения грибов:

1. Вегетативное размножение.

Осуществляется кусочком мицелия или отдельными клетками - *оидиями*, образующимися в результате расчленения гиф, и *хламидоспорами* - толстостенными клетками, устойчивыми к неблагоприятным воздействиям. Оидии и хламидоспоры образуют высшие грибы (рис. 14).



а) оидии; б) хламидоспоры

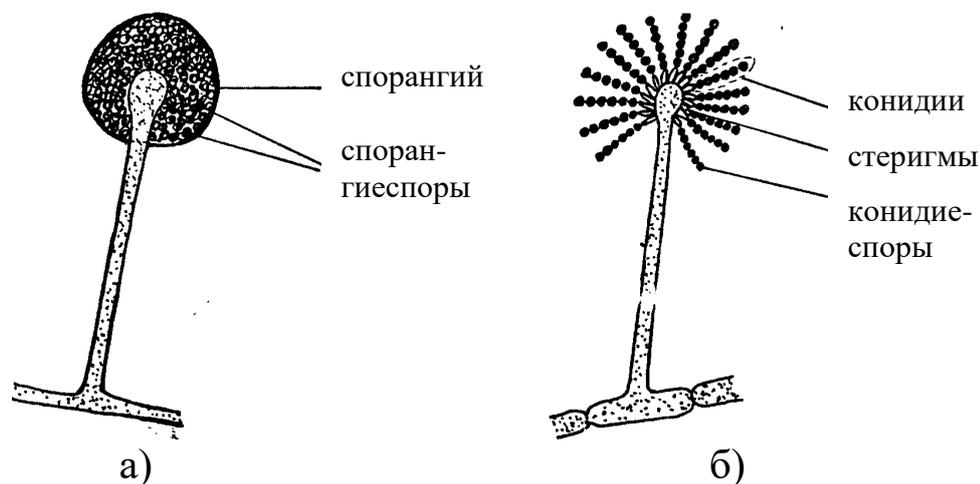
Рис. 14 - Строение высших грибов

2. Бесполое размножение с образованием спор.

В этом случае на определенном этапе вегетативного размножения грибов образуются специальные плодоносящие гифы воздушного мицелия (рис. 15).

У низших грибов споры формируются внутри шаровидных мешочков - *спорангиев*, внутри которых формируются внутренние споры (*эндоспоры*). Плодоносящий гиф, на котором образуются спорангии, называется *спорангиеносцем*.

У высших грибов на кончике плодоносящего гифа образуются специальные вытянутые клетки - *стеригмы*, на которых формируются цепочки из спор - *конидии*. Споры, расположенные на конидиях, находятся снаружи плодоносящего гифа (*экзоспоры*). Плодоносящий гиф, на котором образуются конидии, называется *конидиеносцем*.



а) спорангиеносец; б) конидиеносец
Рис. 15 - Строение плодоносящих гифов

3. Половое размножение.

Половому размножению (митозу) предшествует слияние двух многоядерных гифов мицелия. Состоит половое размножение из трех этапов:

- *плазмогамия* - соединение протопластов двух гифов; возникающая в результате этого клетка имеет два ядра и называется *дикарион*;
- *кариогамия* - слияние двух гаплоидных ядер с образованием диплоидного ядра (ядра с двойным набором хромосом).

• *мейоз* - редукционное деление. Процесс деления ядер состоит из нескольких стадий.

Различают *гомо- и гетероталличные грибы*. У гомоталличных грибов происходит слияние двух одинаковых гифов, у гетероталличных оплодотворение может происходить только между мицелиями разных половых знаков ("+" и "-").

Существуют грибы, которые не способны размножаться половым путем. Такие грибы называют *несовершенными*.

3.3. Классификация

Грибы относятся к царству *Mycota*, которое делится на два отдела в зависимости от наличия жесткой клеточной стенки: отдел *Mухомycota* (слизевики) и отдел *Еumycota* (истинные грибы).

В пищевой промышленности встречаются главным образом представители истинных грибов, *классификация* которых базируется на *трех признаках*:

1. Строение мицелия.
2. Наличие полового способа размножения.
3. Особенности полового размножения.

В зависимости от этих признаков отдел истинных грибов делится на 4 класса:

1. Класс фикомицетов

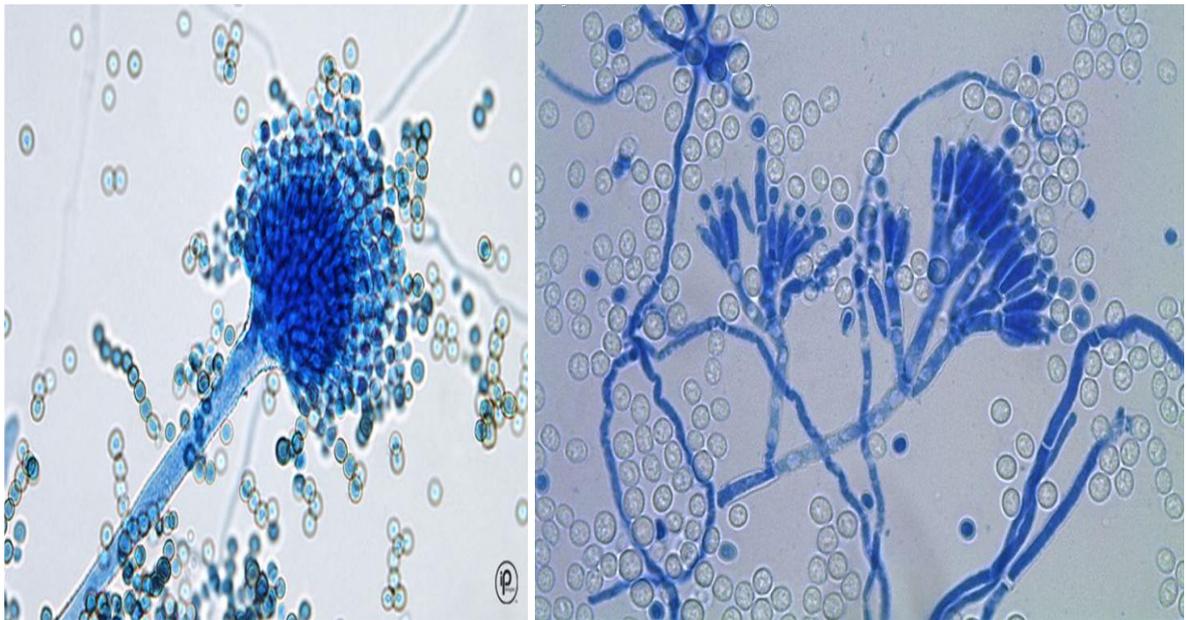
К этому классу относятся низшие грибы, имеющие несептированный многоядерный мицелий. К фикомицетам относятся мукоровые грибы, которые широко распространены в природе. Наибольшее значение имеют представители родов *Mucor* и *Rhizopus*.

Размножаются фикомицеты бесполом и половым путем. При бесполом размножении образуются спорангиоспоры, при половом - в результате слияния двух гиф происходит образование *зиготы* (зигоспоры), которая после периода покоя прорастает и образует короткую гифу со спорангием на конце. При прорастании споры происходит деление ядер.

Многоядерная цитоплазма спорангия распадается на множество спорангиоспор, которые в благоприятных условиях прорастают в мицелий.

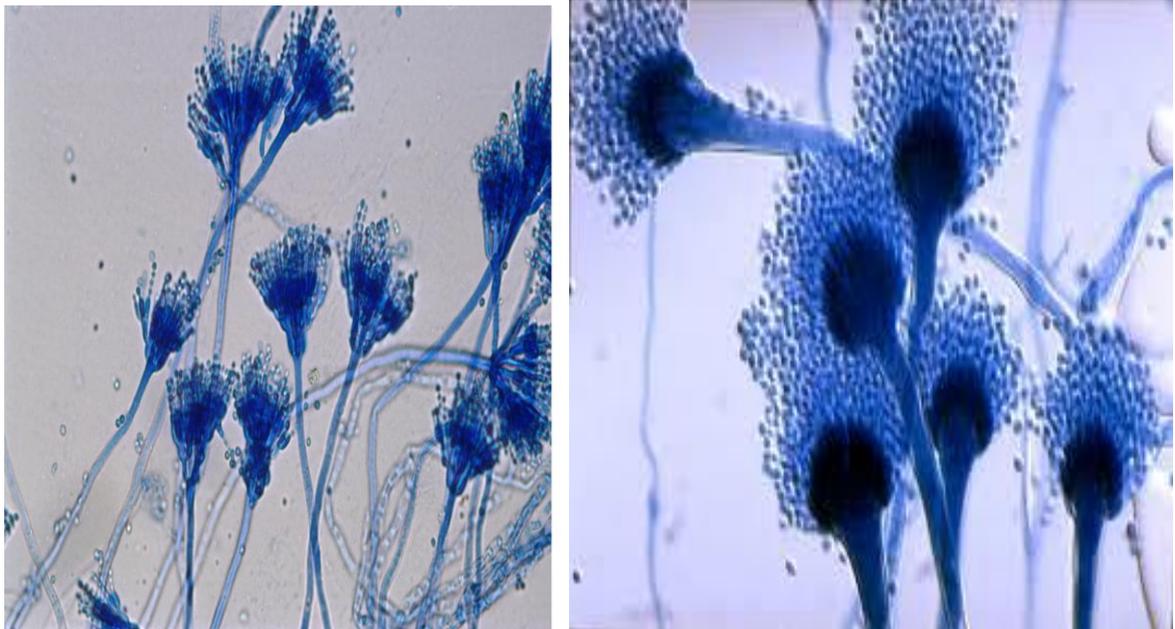
Грибы рода *Mucor* (рис. 16а) вызывают порчу пищевых продуктов. Отдельные представители этого рода нашли применение

как продуценты ферментных препаратов, органических кислот, спиртов, каротиноидов, стероидов.



а

б



в

г

а - Mucor; б - Penicillium; в - Aspergillus; г - Alternaria

Рис. 16 - Морфологические особенности грибов различных классов

Грибы рода *Rhizopus* (рис. 17) вызывают так называемую «мягкую гниль» ягод, плодов и овощей.

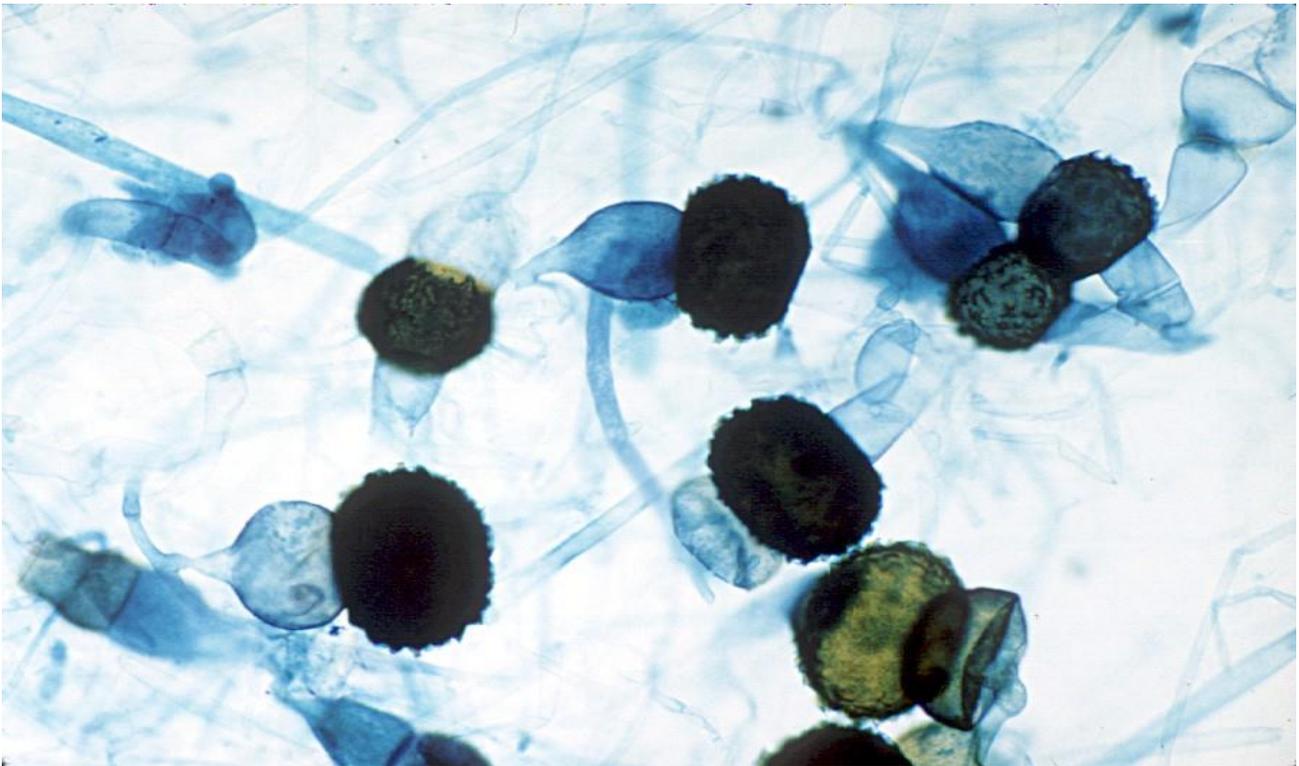


Рис. 17 - Rhizopus

2. Класс аскомицетов

Аскомицеты (сумчатые грибы) являются высшими грибами, т.е. имеют септированный мицелий. При бесполом размножении образуются конидиеносцы с экзоспорами.

При половом размножении образуется аск (сумка) со спорами. Начинается половое размножение с образования *аскогон*, несущих *трихогину* - трубочку, по которой в аскогон попадают мужские ядра. Диплоидное ядро, как правило, претерпевает три деления, в результате образуются 8 аскоспор.

Существуют аскомицеты, у которых аски развиваются на специальных плодовых телах. Такие грибы называют *плодосумчатые*.

В группу плодосумчатых аскомицетов входят грибы родов *Penicillium* (рис. 16, б) и *Aspergillus* (рис. 16, в), которые являются возбудителями порчи различных пищевых продуктов, и в частности плодов и овощей, особенно при хранении (различные гнили). Кроме того, некоторые аспергиллы являются патогенными для человека и животных, вызывают заболевания верхних дыхательных путей, слизистой рта, кожи (аспергиллез). Другие виды аспергиллов, а также гриб спорынья (паразит злаковых растений) выделяют ядовитые вещества, вызывающие пищевые отравления.

Аспергиллы являются продуцентами органических кислот и применяются для промышленного получения лимонной кислоты. Многие аспергиллы используются также для получения ферментных препаратов.

К голосумчатым аскомицетам относятся грибы, аск у которых образуется непосредственно на мицелии. Типичными представителями голосумчатых грибов являются дрожжи.

3. Класс базидиомицетов

К этому классу относятся высшие макроскопические грибы. К базидиомицетам относятся шляпочные съедобные и ядовитые грибы (шампиньоны, сыроежки, поганки), головневые грибы (паразиты злаковых культур), трутовые грибы (разрушители древесины), ржавчинные грибы (паразиты культурных растений).

Характерной особенностью этого класса является преимущественное размножение половым способом - базидиями с базидиоспорами.

Подразделяются базидиомицеты на две группы: с одноклеточными базидиями и с многоклеточными базидиями. Ядро базидиальных клеток делится дважды, в результате чего образуются четыре ядра, а затем четыре базидиоспоры.

4. Класс дейтеромицетов

К этому классу отнесены высшие грибы, половое размножение у которых не обнаружено.

Представители этого класса размножаются вегетативным путем (кусочком мицелия или отдельными клетками - оидиями) и бесполом путем - конидиями. По форме конидии бывают шаровидные, эллипсовидные, нитевидные, серповидные, звездчатые и др.

Несовершенные грибы широко распространены в природе, некоторые являются паразитами культурных растений, вызывают порчу пищевых продуктов, являются возбудителями заболеваний кожи человека.

Грибы рода *Fusarium* (рис. 18) являются возбудителями заболевания плодов и овощей (фузариоз), злаков, вызывают порчу картофеля (сухая гниль), вызывают тяжелые пищевые отравления.

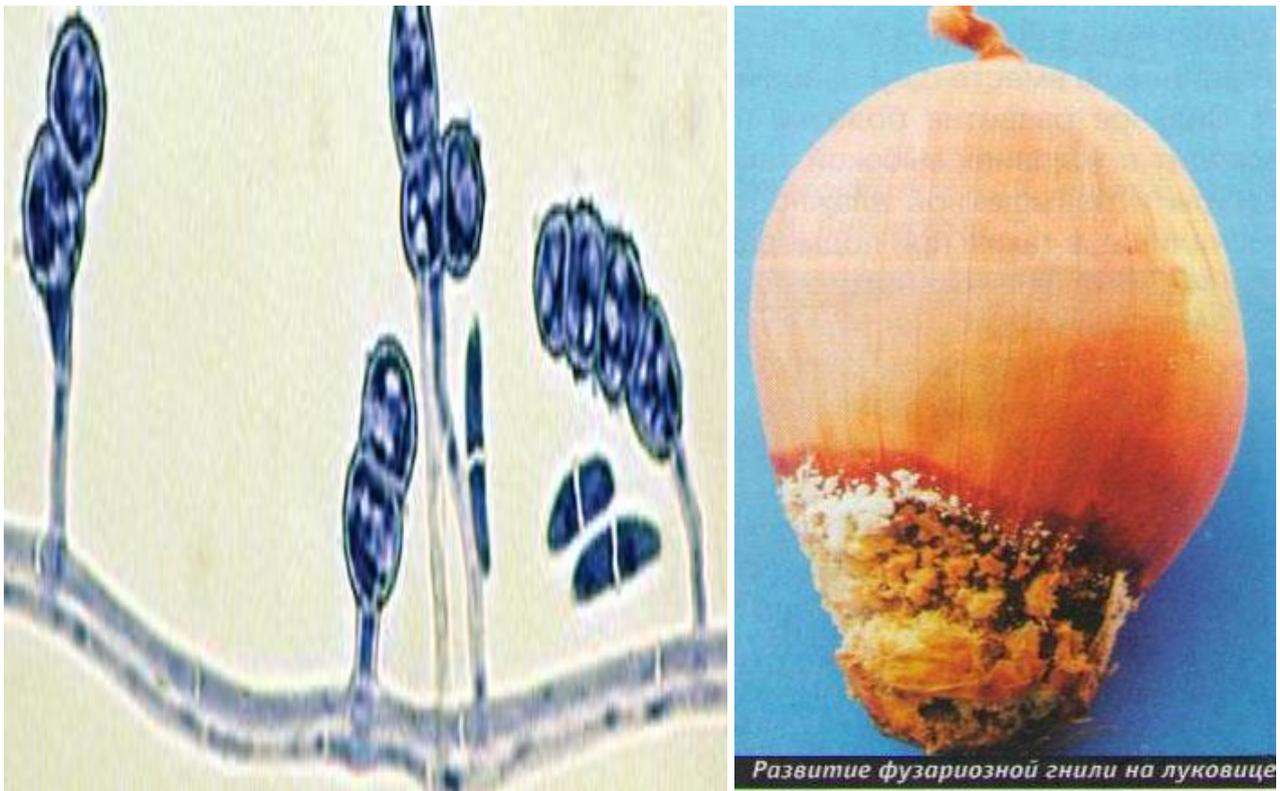


Рис. 18 - Fusarium

Грибы рода *Botrytis* (рис. 19) вызывают порчу лука, капусты, моркови, помидоров, а вместе с другими грибами - кагатную гниль сахарной свеклы.



Рис.19 - Botrytis

Грибы рода *Altenaria* (рис.20) поражают корнеплоды в период хранения (черная гниль).

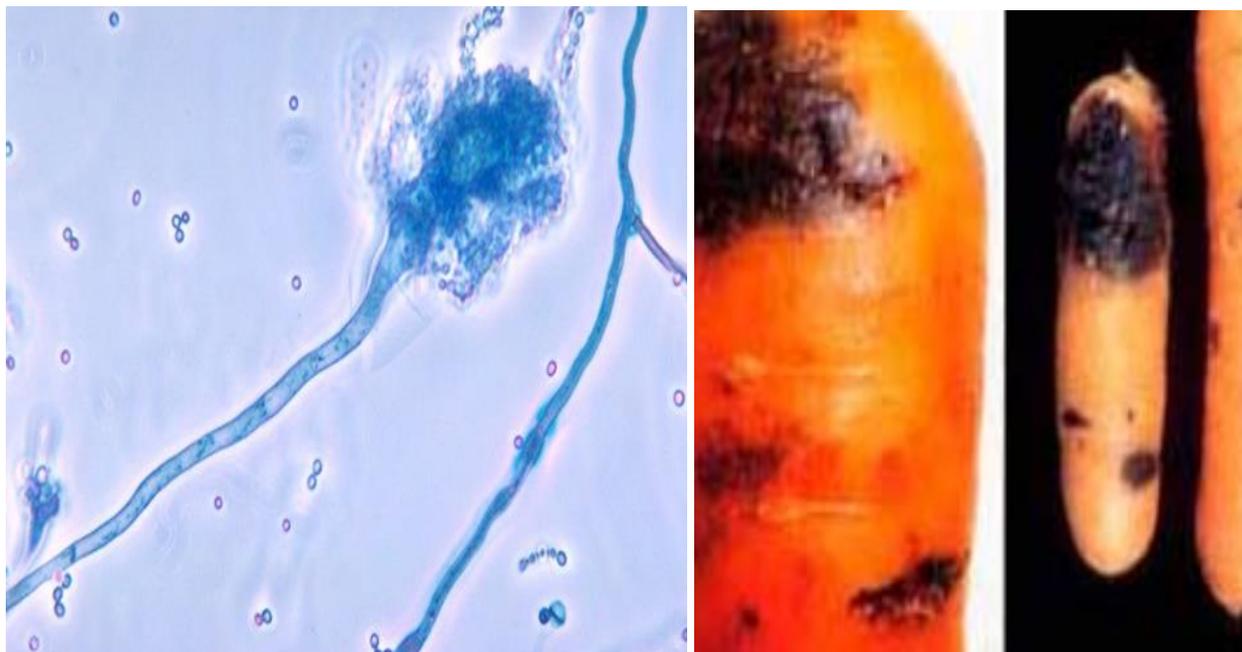


Рис. 20 - *Altenaria*

Представители рода *Cladosporium* (рис. 21) часто обнаруживаются на пищевых продуктах, хранящихся в холодильниках.

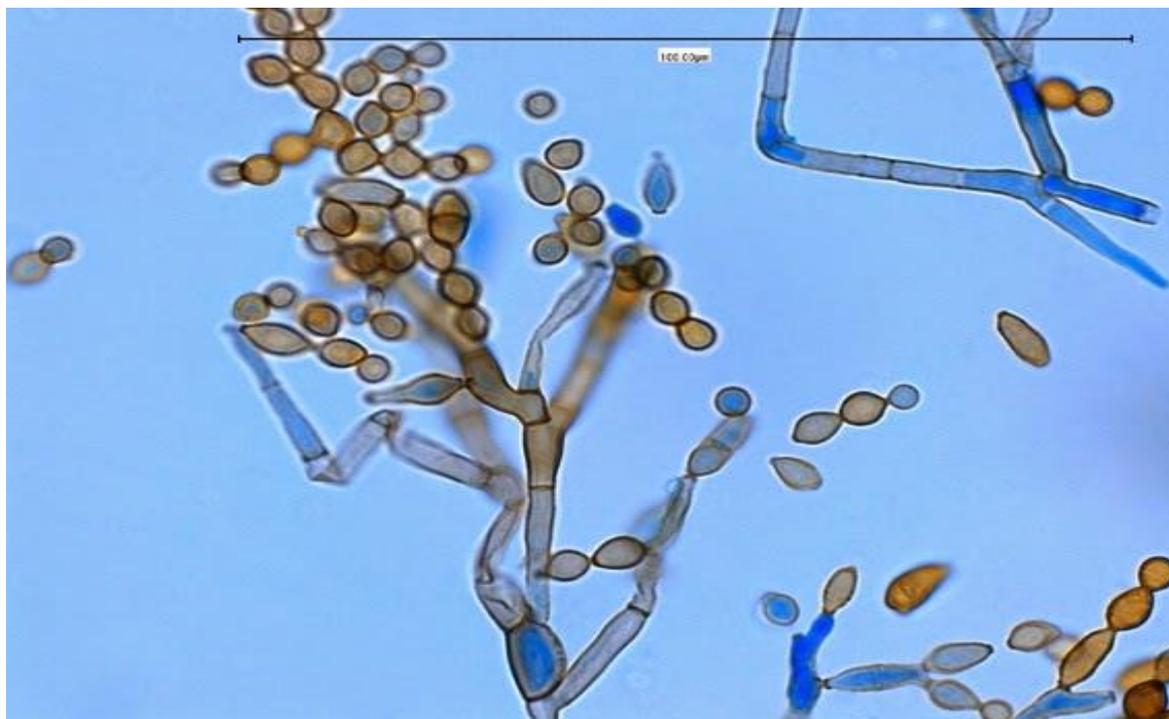
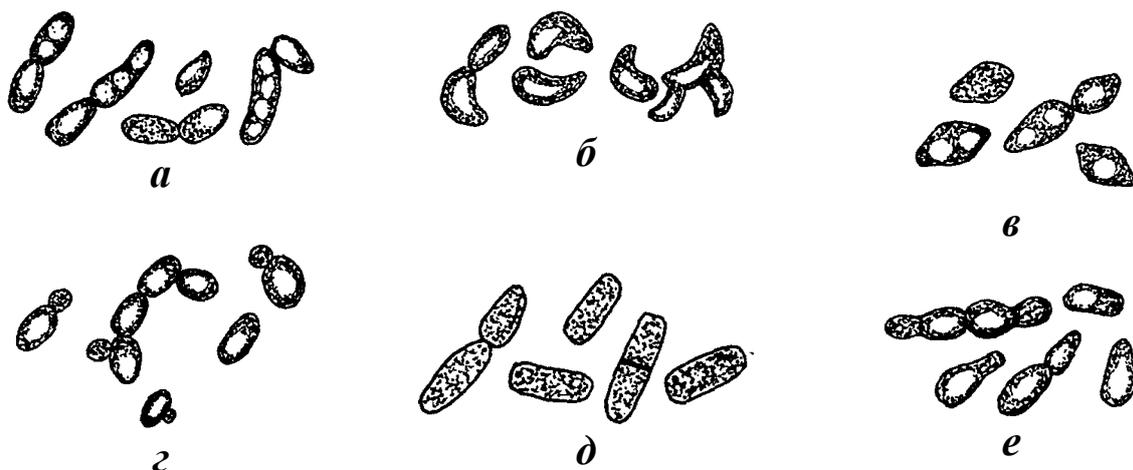


Рис. 21- *Cladosporium*

3.4. Дрожжи

Дрожжи - высшие грибы, утратившие способность образовывать мицелий и превратившиеся в результате этого в одноклеточные организмы.

Клетки дрожжей имеют овальную, яйцевидную и эллиптическую форму (рис. 22). Несколько реже встречаются цилиндрические (палочковидные), грушевидные и лимоновидные дрожжи.



a - стреловидная; *б* - серповидная; *в* - лимоновидная;
г - овальная, яйцевидная; *д* - цилиндрическая; *е* - грушевидная

Рис. 22 - Форма дрожжевых клеток

Размеры клеток дрожжей колеблются от 2,5 до 10 мкм в поперечнике и от 4 до 20 мкм в длину. В среднем масса дрожжевой клетки составляет около $5 \cdot 10^{-11}$ г. Формы, размеры и масса дрожжевых клеток изменяются в зависимости от условий среды, в которой они развиваются, и от возраста клеток.

Размножение дрожжей зависит от условий жизнедеятельности дрожжевой клетки и от вида дрожжей.

1. Вегетативное размножение

Происходит почкованием, реже - делением или почкующимся делением.

Почкование - это процесс образования на клетке маленького бугорка - почки, которая постепенно увеличивается в размерах. В месте соединения почки с материнской клеткой постепенно образуется сужение - перетяжка. Когда почка достигает примерно

одной трети размеров материнской клетки, ядро перемещается в перетяжку и здесь происходит его деление на два ядра. Одно из ядер переходит в почку, а другое остается в материнской клетке. Постепенно перетяжка ограничивает дочернюю клетку от материнской, затем слои перегородки разделяются, оставляя на материнской клетке почковой рубец. Почкованием обычно размножаются дрожжи овальной формы.

Бинарное деление дрожжевой клетки происходит путем возникновения поперечной перегородки, которая, развиваясь, приводит к образованию двух дочерних клеток, идентичных родительской. Делением размножаются дрожжи цилиндрической формы.

Почкующееся деление характерно для дрожжей лимонovidной формы. Вначале на полюсе возникает почка, которая после деления ядра ограничивается от материнской клетки перегородкой.

2. Половое размножение

Этим способом размножаются некоторые виды гаплоидных дрожжей. Перед спорообразованием такие гаплоидные клетки сливаются, в результате образуется диплоидная клетка, ядро которой делится путем мейоза с образованием четырех или восьми аскоспор. Половое размножение дрожжей осуществляется в неблагоприятных условиях.

3.5. Классификация

Дрожжи относятся к царству грибов (Mycota), отделу истинных грибов (Eumycota). В зависимости от того, способны ли дрожжи размножаться половым путем, их можно отнести к двум классам: классу аскомицетов и классу дейтеромицетов. Небольшая часть дрожжей относится к классу базидиомицетов.

Так как дрожжи отличаются по своим культуральным свойствам от грибов, существуют их отдельные классификации.

Так, существует отдельная классификация совершенных (спорогенных) дрожжей - *классификация Кудрявцева*. По этой классификации дрожжи относятся к классу аскомицетов, порядку одноклеточных грибов - дрожжей, который включает три семейства: сахаромицетов, шизосахаромицетов и сахаромикодов. Семейства различаются формой клеток, способом вегетативного размножения.

Семейство сахаромикетов

Представители этого семейства имеют овальную или яйцевидную форму, вегетативно размножаются почкованием. Особо важная роль принадлежит роду *Saccharomyces*. Главным биохимическим признаком этих дрожжей является то, что они сбраживают сахара с образованием этилового спирта и диоксида углерода. Дрожжи, используемые в промышленности, называются *культурными дрожжами*. Так, в хлебопекарном производстве и в производстве спирта используются верховые дрожжи рода *Saccharomyces cerevisiae* (рис. 23). Дрожжи вида *Saccharomyces minor* нашли применение в производстве ржаного хлеба и кваса. В пивоварении используются низовые дрожжи *Saccharomyces carlsbergensis*.

Дрожжи-сахаромикеты имеют овальную форму, вегетативно размножаются почкованием, в неблагоприятных условиях размножаются половым путем аскоспорами.



Рис. 23 - *Saccharomyces cerevisiae*

Культурные дрожжи относятся к ацидофилам, т.е. развиваются в кислой среде, оптимальное значение рН для дрожжей 4,5-5,0. В аэробных условиях они активно растут и размножаются, а в анаэробных - осуществляют спиртовое брожение (эффект Пастера).

Дрожжи чувствительны к высокой концентрации растворенных в среде веществ. При высокой концентрации сахара в среде жизнедеятельность дрожжей прекращается, так как при этом увеличивается осмотическое давление среды и наступает плазмолиз

клеток. Величина предельной концентрации сахара для различных рас дрожжей неодинакова.

Различают дрожжи верхового и низового брожения.

Дрожжи верхового брожения в стадии интенсивного брожения распределяются на поверхности сбраживаемой среды в виде довольно толстого слоя пены и остаются в таком состоянии до окончания брожения. К таким дрожжам относятся спиртовые и хлебопекарные дрожжи.

Дрожжи низового брожения, развиваясь в сбраживаемой жидкости, не переходят в поверхностный слой - пену, быстро оседают по окончании брожения, образуя плотный слой на дне бродильной емкости. К дрожжам низового брожения относятся пивные дрожжи. Такие различия при сбраживании жидких сред дрожжами верхового брожения и дрожжами низового брожения обусловлены тем, что дрожжи верхового брожения принадлежат к *пылевидным дрожжам*, не склеивающимся друг с другом, а дрожжи низового брожения относятся к *хлопьевидным дрожжам*, так как имеют клейкие оболочки, что приводит к агглютинации и быстрому осаждению клеток.

Семейство шизосахаромицетов

Это клетки палочковидной формы, размножаются делением, в неблагоприятных условиях - спорообразованием. Представители этого семейства рода *Schizosaccharomyces* (рис. 24) вызывают спиртовое брожение и используется в странах с жарким климатом для производства пива, кубинского рома.



Рис.24 - *Schizosaccharomyces*

Семейство сахаромикодов

Это клетки лимоновидной формы, размножаются почкующимся делением, а в неблагоприятных условиях - спорообразованием. Дрожжи рода *Saccharomyces* (рис. 25) вызывают спиртовое брожение, но являются вредителями в виноделии, так как образуют продукты, придающие винам неприятный прокисший запах. Такие дрожжи называются *дикими дрожжами*.



Рис. 25 - *Saccharomyces*

По **классификации Ж. Лоддера и Крегера Ван Рия** несовершенные дрожжи, не способные размножаться половым путем, а также утратившие способность к спиртовому брожению, представляют собой почкующиеся или делящиеся клетки, некоторые из них образуют псевдомицелий (вытянутые клетки).

Классификация основана на следующих систематических признаках: способности образовывать ложный мицелий и отношении к сахарам. К аспорогенным относятся дрожжи родов *Candida* (рис. 26), *Torulopsis*, *Rhodotorula* (дикие дрожжи).



Рис. 26 - *Candida*

3.6. Химический состав

Химический состав дрожжей непостоянен: он зависит от физиологического состояния дрожжевой клетки, расы дрожжей, состава питательной среды. Принято считать, что дрожжевые клетки в среднем содержат 67 % воды и 33 % сухого вещества.

Вода с растворенными в ней минеральными и органическими веществами проникает в клетку и, очевидно, все важные жизненные реакции происходят в водном растворе: свободная вода участвует в процессах обмена веществ, связанная вода удерживается белковыми молекулами при помощи водородных связей и, таким образом, являются частью структуры протоплазмы дрожжевой клетки. Распределение влаги в прессованных дрожжах зависит от состава дрожжевых клеток. Так, при наличии 75 % влаги распределение ее в бруске - внутри или вне клеток будет изменяться, причем внеклеточной влаги будет тем меньше, чем больше ее содержится в самих дрожжевых клетках.

Элементарный состав дрожжей с содержанием 55 % белков включает 46 % углерода, 6,9 % водорода, 9,1 % азота, 30 % кислорода в 80 % неорганических веществ, в основном калия и фосфора.

Соотношение белков и углеводов зависит от расы дрожжей и от направленного его изменения в процессе выращивания дрожжей. Азотсодержащие вещества дрожжей представляют собой белковые вещества (63,8 %), нуклеиновые вещества (26,1 %), амиды и пептоны (10,1 %). Белки состоят из аминокислот, число которых достигает 24. Соотношение аминокислот в разных белках различно. Около 64% общего азота дрожжей входит в состав белков. В дрожжах содержится около 0,1% глутатиона (трипептида) состоящего из гликоколя, цистеина и глутаминовой кислоты. Глутатион может находиться в окисленной или восстановленной форме, при этом его сульфгидрильная группа SH активирует протеазы. Ферменты дрожжей.

Непрерывной составной частью протоплазмы дрожжевых клеток являются ферменты, осуществляющие разнообразные биохимические превращения в дрожжевой клетке. Известно, что деятельность ферментов может проявляться внутри клеток - это эндоферменты; ферменты, действующие вне клеток, называются экзоферментами. Особое значение в жизнедеятельности дрожжей имеют оксидоредуктазы - окислительно-восстановительные ферменты,

трансферазы — ферменты, осуществляющие перенос различных групп с одной молекулы на другую, катализирующие взаимопревращения различных сахаров, и гидролазы, гидролизующие ферменты, которые производят расщепление веществ при обязательном участии воды, присоединяющейся к образующимся более простым соединениям. Весь комплекс ферментов дрожжевой клетки обозначают известным в ферментологии термином голоферменты, при этом устойчивый к нагреванию комплекс называют коферментом, а неустойчивый — апоферментом. По этой терминологии процессы брожения будут вызываться в дрожжах голозимазой, состоящей из козимазы и апозимазы. Козимаза тесно связана с апозимазой и является активатором для этой последней. Апозимаза представляет собой термолабильную часть энзимного комплекса, собственно зимазу, сбраживающую сахара. Она включает ряд энзимов, которые и вызывают процессы брожения. Многие из них еще не удалось выделить из дрожжевого сока.

Белки

По данным элементарного анализа, белок дрожжей содержит 15-18 % азота, 6,5-7,3 % водорода, 50-55 % углерода, 21-24 % кислорода, 0-2,4 % серы. Основным показателем состава белка является именно аминокислотный состав макромолекул.

За последние годы состав аминокислот в белке быстро определяется путем гидролиза белков и хроматографического анализа белкового гидролизата, что осуществляется автоматически специальными аппаратами через 2 - 4 ч.

Витамины дрожжей

Известно, что дрожжевые клетки богаты витаминами. Однако только в последние годы благодаря развитию учения о витаминах и усовершенствованию методов их определения выявилось содержание витаминов в дрожжах и их состав. Все дрожжи содержат витамины группы В и эргостерин провитамин D. Соотношение отдельных компонентов витаминов комплекса В в различных дрожжевых грибах неодинаковое. Оно колеблется в широких пределах в дрожжевых грибах разного рода и зависит у одних и тех же дрожжей от условий их культивирования. Установлено, что дрожжевые клетки содержат витамин В₁ - тиамин; витамин В₂ -рибофлавин; витамин В₃ - пантотеновую кислоту; витамин В₅- РР- никотиновую кислоту; витамин В₆ - пиридоксин; витамин Н биотин; инозит;

парааминобензойную кислоту. Некоторые дрожжевые грибы розового цвета содержат бетакаротин — провитамин А. Витамины играют большую роль в биохимических процессах, свойственных дрожжевым клеткам.

Жиры

Жиры дрожжи являются смесью истинных жиров (глицеридов жирных кислот) с фосфолипидами (лецитин, кефалин) и стеролами (эргостерол). Жир дрожжей состоит, главным образом из насыщенных кислот жирного ряда: пальмитиновой 75 % и стеариновой 25 %. Некоторые исследователи находят в дрожжах и другие кислоты лауриновую и олеиновую. В состав жира дрожжей входит также неомыляемый жир - эргостерин - провитамин D.

Углеводы

В дрожжах содержится 35 - 40 % углеводов к массе сухих дрожжей. Они входят в состав протоплазмы и оболочки дрожжевых клеток. В дрожжах содержатся полисахариды гликоген, маннан - дрожжевая камедь - и глюкозан, который считали целлюлозой. Зола

Зола дрожжей составляет около 6 – 10 % общей массы сухого вещества дрожжей. Состав золы колеблется в зависимости от условий их культивирования (табл. 3).

Состав золы дрожжей

Таблица 3

| Зольные вещества | Содержание, % | Зольные вещества | Содержание, % |
|-------------------|---------------|--------------------------------|---------------|
| K ₂ O | 23,33-39,5 | Fe ₂ O ₃ | 0,06-0,7 |
| Na ₂ O | 0,5-2,26 | P ₂ O ₅ | 44,8-59,4 |
| CaO | 1,0-7,58 | SO ₃ | 0,57-6,38 |
| MgO | 3,77-6,34 | SiO ₂ | 0,92-1,88 |

Зола дрожжей состоит примерно наполовину из фосфора; большая часть фосфорной кислоты связана в дрожжах с органическими соединениями. Общее количество P₂O₅ у сахаромецетов колеблется в пределах от 3,2 до 4,4 % к сухому веществу.

Вопросы для самопроверки

1. В чем сходство и различия грибов с растениями?
2. Что такое «мицелий», «гифы»?
3. Какой тип клеточной организации имеют большинство грибов?
4. Чем отличаются между собой высшие и низшие грибы?
5. В чем отличие совершенных грибов от несовершенных?
6. Какие признаки положены в основу классификации грибов?
7. Охарактеризуйте класс аскомицетов. Назовите наиболее важных представителей этого класса.
8. Охарактеризуйте класс дейтеромицетов. Какие из представителей дейтеромицетов являются возбудителями порчи плодов и овощей?
9. Каково строение спорангиеносцев, конидиеносцев?
10. Какие способы размножения грибов вы знаете?
11. Что такое «оидии», «хламидоспоры»?
12. Перечислите основные стадии полового размножения грибов.
13. Что образуется в результате полового размножения у фикомицетов, аскомицетов, базидиомицетов?
14. Чем отличаются голосумчатые грибы от плодосумчатых?
15. Каковы формы и размеры дрожжевых клеток?
16. Каково строение дрожжевой клетки?
17. Как размножаются дрожжи?
18. Какие признаки положены в основу классификации спорогенных дрожжей Кудрявцева?
19. Охарактеризуйте семейство дрожжей - шизосахаромицетов.
20. Какие признаки положены в основу классификации аспорогенных дрожжей Ж. Лоддера и Крегера Ван Рия?
21. Что такое культурные и дикие дрожжи?
22. Охарактеризуйте дрожжи низового и верхового брожения.
23. В каких условиях осуществляется половое размножение дрожжей - аскомицетов?

ГЛАВА 4. БИОТЕХНОЛОГИЯ И БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ

4.1 Биотехнология

Биотехнология – это использование культур клеток бактерий, дрожжей, животных и растений, метаболизм и биосинтетические возможности которых обеспечивают выработку специфических веществ. Или более краткое определение, биотехнология – это производство с помощью объектов живой природы, или технология живого (рис. 27).

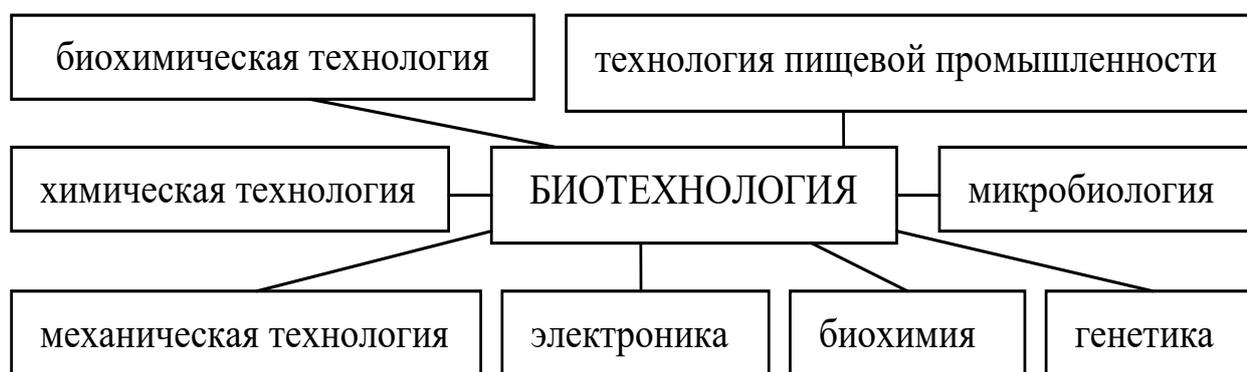


Рис. 27 – Связь биотехнологии с другими науками

Биотехнология возникла на стыке нескольких биотехнологических наук, таких как генетика, бактериология, вирусология, молекулярная биология, микробиология, биохимия, растениеводство. Важную роль сыграло открытие способов модификации ДНК и ее переноса из одних организмов в другие.

Исторически биотехнология возникла на основе традиционных микробиологических производств, таких как производство хлеба, сыра, вина, пива, молочных продуктов. Эти технологии до сих пор имеют большую значимость и постоянно развиваются.

Биотехнологические процессы осуществляются за счет использования бактерий, дрожжей, плесневых грибов, водорослей, культур клеток и тканей растений и животных. В этих процессах используются особенности метаболизма и биосинтетические возможности клеток. Целью процесса может быть наработка клеточной биомассы или продуктов жизнедеятельности клеток – метаболитов.

В настоящее время биотехнология включает в себя: промышленную микробиологию, прикладную микробиологию, генетическую инженерию, клеточную инженерию. Основные направления промышленной микробиологии представлены в табл. 4.

Потребность в биотехнологии обусловлена дефицитом продовольствия, энергии, минеральных ресурсов и необходимостью улучшения состояния здравоохранения и охраны окружающей среды.

Биоиндустрия включает отрасли, в которых биотехнология может заменить широко используемые традиционные методы, и отрасли, в которых она всегда играла ведущую роль.

Основные направления биотехнологии в различных отраслях
Таблица 4

| Отрасль | Область применения |
|--|--|
| Сельское хозяйство | Производство белково-витаминных концентратов. Селекция, клонирование и генетическая инженерия животных и растений. Использование антибиотиков для лечения животных и птиц. Производство вакцин. Производство биоинсектицидов. Применение гормонов и других стимуляторов роста |
| Производство химических веществ и соединений | Производство органических кислот. Получение витаминов, антибиотиков и др. Использование ферментов в составе СМС |
| Контроль за состоянием окружающей среды | Улучшение методов тестирования и мониторинга загрязнений окружающей среды. Использование микроорганизмов для переработки сельскохозяйственных, бытовых и промышленных отходов |
| Медицина | Использование ферментов в диагностике. Использование микроорганизмов при создании и модификации сложных лекарственных средств. Синтез новых антибиотиков, гормонов и интерферонов. Применение в медицинской практике ферментов и штаммов микроорганизмов |
| Энергетика | Производство биогаза. Производство этанола |
| Материаловедение | Выщелачивание руд. |

| | |
|------------------------|--|
| | Изучение и контроль биоразложения |
| Пищевая промышленность | Создание новых методов переработки и хранения пищевых продуктов. Применение пищевых добавок, полученных с помощью микроорганизмов. Использование белка одноклеточных. Применение ферментов. Совершенствование спиртового и молочнокислого брожения |

Транснациональные корпорации инвестируют следующие биотехнологические отрасли: горнодобывающую, нефтехимическую, фармацевтическую. Быстрая отдача происходит в следующих биотехнологических отраслях:

- 1) совершенствование сбраживания;
- 2) производство биогаза;
- 3) производство безопасных и недорогих вакцин;
- 4) биоэнергетика;
- 5) улучшение техники компостирования;
- 6) гидролиз целлюлозы;
- 7) повышение уровня фиксации азота с помощью симбионтов.

4.2. Кинетика роста и развития микроорганизмов

Как известно, микроорганизмы, попав в свежую полноценную питательную среду, начинают размножаться не сразу. Этот период называют лаг-фазой - **I фаза** (рис. 28). В этот период культура как бы привыкает к новым условиям обитания. Активируются ферментные системы, если необходимо, синтезируются новые ферментные системы, клетка готовится к синтезу нуклеиновых кислот и других соединений. Продолжительность этой фазы зависит от физиологических особенностей микроорганизмов, состава питательной среды и условий культивирования. Чем эти различия меньше и чем больше посевного материала, тем короче эта фаза.

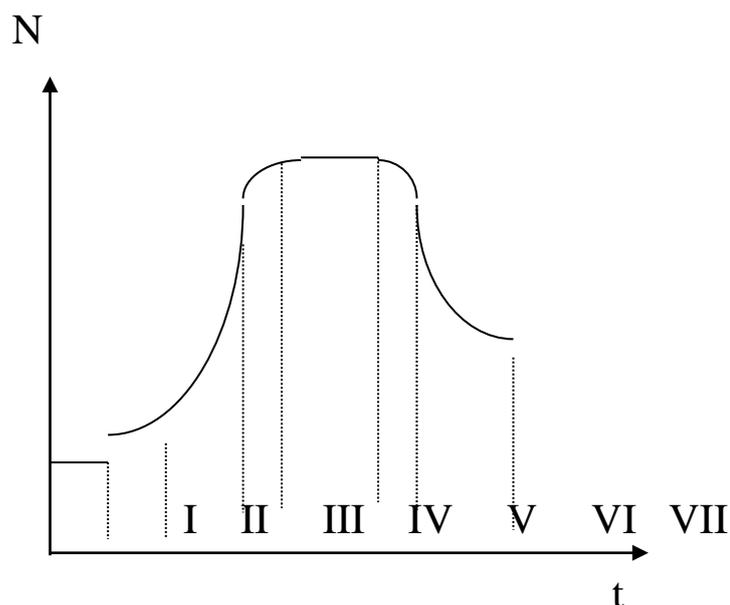


Рис. 28 - Кривая роста микроорганизмов (зависимость количества клеток от времени культивирования); I , II , III , IV , V , VI , VII – фазы роста.

II фаза называется фазой ускоренного роста, она характеризуется началом деления клеток, увеличением общей массы популяции и постоянным увеличением скорости роста культуры; обычно она непродолжительна.

Затем следует логарифмическая, или экспоненциальная фаза роста - **III фаза**. В этот период отмечается максимальная скорость роста культуры, интервалы между появлением предыдущего и последующего поколения постоянны. Логарифм числа клеток линейно зависит от времени.

Вследствие интенсивного роста и размножения культуры запас необходимых питательных веществ в среде уменьшается. Это является основной причиной снижения скорости роста культуры. Кроме того, в среде накапливаются продукты метаболизма, которые в определенной концентрации могут мешать нормальному протеканию биохимических процессов обмена веществ. Иногда в питательной среде образуется так много клеток, что для новых поколений клеток не хватает пространства, а точнее, поверхности. Скорость роста снижается, уменьшается число делений клеток, наступает **IV фаза** – фаза замедления или уменьшения скорости роста.

V фаза называется стационарной (фазой линейного роста). Масса и количество всех живых клеток достигает максимума. Количество вновь образовавшихся клеток на этом этапе равно

количеству клеток, отмерших и автолизированных (разрушенных клеточными ферментами).

В какой-то момент это равновесие нарушается и количество отмерших клеток превышает прирост. Наступает **VI фаза** – фаза ускорения отмирания.

Завершается цикл роста и развития популяции в замкнутом объеме **VII фазой**, характеризующейся отмиранием и автолизом микроорганизмов, которая называется фазой отмирания. На этой стадии биомасса клеток значительно уменьшается, так как запасные вещества клетки исчерпываются.

Кинетика роста микроорганизмов

Для выращивания любой культуры необходимы: 1) жизнеспособный посевной материал; 2) источники энергии и углерода; 3) питательные вещества для синтеза биомассы; 4) отсутствие ингибиторов роста; 5) соответствующие физико-химические условия (температура, pH среды, наличие или отсутствие кислорода и др.).

Если все эти требования выполнены, то скорость роста (увеличения биомассы) одноклеточных микроорганизмов с бинарным делением, размножающихся в условиях хорошо перемешиваемой периодической культуры, будет пропорциональна концентрации микробной массы, то есть:

$$\frac{d x}{d t} = \mu x ,$$

где $d x / d t$ – скорость роста;

μ - коэффициент пропорциональности, обычно называемый удельной скоростью роста;

x – концентрация биомассы (на сухой вес).

Если μ является постоянной величиной, то такой рост культуры микроорганизмов называют экспоненциальным или логарифмическим. Он имеет место тогда, когда состав микробной биомассы и условия окружающей среды остаются постоянными. Это относится и к смешанным культурам, в которых одноклеточные организмы равномерно распределены в культуральной среде.

4.3. Продукты микробного брожения и метаболизма

К продуктам микробного брожения и метаболизма относятся первичные метаболиты, вторичные метаболиты, ферменты и сама клеточная биомасса (так называемые белки одноклеточных микроорганизмов).

Первичные метаболиты – это низкомолекулярные соединения, необходимые для роста микробов; одни из них являются строительными блоками макромолекул, другие участвуют в синтезе коферментов.

Среди наиболее важных для промышленности метаболитов можно выделить *аминокислоты, органические кислоты, пуриновые и примидиновые нуклеотиды, витамины* и др. Исходными штаммами для промышленных процессов служат природные организмы и культуры с нарушениями регуляции синтеза этих метаболитов, так как обычные микробные клетки не производят избытка первичных метаболитов.

Вторичные метаболиты – это низкомолекулярные соединения, образующиеся на более поздних стадиях развития культуры, не требующиеся для роста микроорганизмов. По химическому строению вторичные метаболиты относятся к различным группам соединений. К ним относят *антибиотики, алкалоиды, гормоны роста растений, токсины и пигменты*.

4.4. Питательные среды для биотехнологического производства

Питательная среда обеспечивает жизнедеятельность, рост, развитие биообъекта, эффективный синтез целевого продукта. Неотъемлемой частью питательной среды является вода, питательные вещества, которые образуют истинные растворы (минеральные соли, аминокислоты, карбоновые кислоты, спирты, альдегиды и т.д.) и коллоидные растворы (белки, липиды, неорганические соединения - гидроксид железа). Отдельные компоненты могут находиться в твердом агрегатном состоянии, могут всплывать, равномерно распределяться по всему объему в виде взвеси или образовывать придонный слой.

Сырье для питательных сред в биотехнологическом производстве.

Сырье, используемое для получения целевого продукта, должно быть недефицитным, недорогим, по возможности легко доступным: меласса - побочный продукт производства сахара, компоненты нефти и природного газа, отходы сельского хозяйства, деревообрабатывающей и бумажной промышленности и т.д. Наиболее часто в качестве компонентов питательных сред используются отходы пищевых производств.

Свекловичная меласса – отход производства сахара из свеклы, богата органическими и минеральными веществами, необходимыми для развития микроорганизмов. Она содержит 45-60 % сахарозы, 0,25-2,0 % инвертного сахара, 0,2-3,0 % рафинозы. Кроме того, в мелассе содержатся аминокислоты, органические кислоты и их соли, бетаин, минеральные вещества, а также некоторые витамины. Используется для промышленного производства лимонной кислоты, этанола и других продуктов.

Мелассная барда – отход мелассно-спиртового производства. Химический состав барды зависит от состава исходной мелассы и колеблется в широких пределах. По своему химическому составу мелассная барда является полноценным сырьем для производства кормовых дрожжей, не требующим добавок ростовых веществ, так как содержит достаточное количество витаминов. Содержание сухих веществ в натуральной барде – 8-12 %, в упаренной барде – 53 %.

Зерно-картофельная барда – отход спиртового производства. Содержание растворимых сухих веществ обычно составляет 2,5 - 3,0 %, в том числе 0,2-0,5 % редуцирующих веществ, имеются источники азота и микроэлементы. Применяется для получения микробного белка.

Отходы пивоварения (пивная дробина и солодовые ростки), а также отходы подработки несоложенного ячменя являются подходящим, однако небольшим источником усвояемых углеводов для получения микробного белка. Для производства кормовых дрожжей это сырье соответствующим образом гидролизуют и вводят в питательную среду в соотношении 8:0,2:0,05 (дробина:ростки:отходы ячменя).

Пшеничные отруби – отход мукомольного производства, используется для приготовления питательных сред при твердофазном способе культивирования. Имеют богатый химический состав и

могут использоваться в качестве единственного компонента питательной среды. Так как пшеничные отруби являются дорогим продуктом, их смешивают с более дешевыми компонентами: древесными опилками, солодовыми ростками, фруктовыми выжимками и т.д.

Молочная сыворотка - отход производства сыров, творога и казеина. В связи с этим различают подсырную, творожную и казеиновую сыворотку. По химическому составу и энергетической ценности данный продукт считают «полумолоком». Молочная сыворотка очень богата различными биологически активными соединениями, ее сухой остаток содержит в среднем 70-80 % лактозы, 7-15 % белковых веществ, 2-8 % жира, 8-10 % минеральных солей. Кроме того, молочная сыворотка имеет в своем составе значительное количество гормонов, органических кислот, витаминов и микроэлементов.

Наличие в молочной сыворотке легко усвояемых многими видами микроорганизмов источников углерода, а также различных ростовых факторов, выдвигает ее в ряд наиболее ценных питательных сред для получения продуктов микробного синтеза, например, для производства белковых препаратов в промышленных масштабах. Большое значение имеет и то обстоятельство, что применение молочной сыворотки не требует специальной сложной подготовки, а культуральная жидкость после выращивания микроорганизмов может быть использована в пищевых и кормовых целях без обработки.

Состав питательных сред

Питательные среды могут иметь неопределенный состав, то есть включать биогенные (растительные, животные, микробные) добавки - мясной экстракт, кукурузную муку, морские водоросли и т.д. Применяют также среды, приготовленные из чистых химических соединений в заранее определенных соотношениях - синтетические среды.

В состав практически любой питательной среды входят такие компоненты, как вода, соединения углерода, азота, фосфора и других минеральных веществ, витамины.

Вода

Вода должна отвечать требованиям ГОСТ (чистая, бесцветная, без привкуса, запаха и осадка).

Источники углерода

Легкодоступными считаются сахара: глюкоза, сахароза, лактоза,

за ними следуют многоатомные спирты: глицерин, маннит и др. Далее следуют полисахариды: целлюлоза, гемицеллюлоза, крахмал, которые могут быть источниками углерода либо после превращения их в усвояемые микроорганизмами моно- и низкомолекулярные олигосахариды, либо микроорганизмы должны иметь набор ферментов, гидролизующих эти вещества. Такими микроорганизмами являются плесневые грибы родов *Aspergillus*, *Penicillium*, бактерии рода *Bacillus* и другие.

На практике встречается большое количество микроорганизмов, которые успешно утилизируют органические кислоты, особенно в анаэробных условиях.

Низкомолекулярные спирты: метанол и этанол - относятся к числу перспективных видов сырья. Многие дрожжи родов *Candida*, *Hansenula* и др. способны ассимилировать этанол. Дрожжи родов *Pichia*, *Candida* и другие, бактерии рода *Flavobacterium* используют в качестве единственного источника углерода метанол.

Некоторые виды микроорганизмов (незначительная часть) используют в качестве источника углерода и энергии углеводороды: n-алканы и некоторые фракции нефти.

Источники азота

Азот может содержаться в форме неорганических солей или кислот. Большинство дрожжей хорошо усваивает аммиачные соли, а также аммиак из водного раствора, потребность в нитратах испытывают только некоторые виды дрожжей. Источником азота могут служить и органические соединения: аминокислоты, мочевина и т.д., которые легко усваиваются микроорганизмами.

Известно, что бактерии более требовательны к источникам азота, чем другие микроорганизмы (грибы, актиномицеты и дрожжи).

Источники фосфора

Фосфор является важнейшим компонентом клетки. Он входит в состав АТФ (аденозинтрифосфата), АДФ, АМФ и тем самым обеспечивает нормальное течение энергетического обмена в клетке, а также синтез белков, нуклеиновых кислот и другие процессы биосинтеза. Фосфор вносят в среду в виде солей фосфорной кислоты.

Источники витаминов и микроэлементов

Потребность микроорганизмов в этих соединениях различна, тем не менее, практически все микроорганизмы лучше растут в присутствии витаминов. Эффективной добавкой к питательным средам оказался кукурузный экстракт благодаря наличию в нем

витаминов, аминокислот и минеральных элементов в легко усваиваемых формах. В рецептуры сред включают также дрожжевой автолизат, дрожжевой экстракт, сок картофеля, молочную сыворотку, экстракт солодовых ростков и другие продукты. Микроэлементы в состав питательных сред вводят в микродозах, в противном случае они оказывают ингибирующее действие на микробные клетки.

При составлении питательной среды для конкретного вида микроорганизма подбираются наиболее подходящие источники углерода, азота, фосфора и других веществ.

4.5. Способы культивирования микроорганизмов

Ферментация (культивирование) - это вся совокупность последовательных операций от внесения в заранее приготовленную и термостатированную питательную среду посевного материала (инокулята) до завершения процессов роста и биосинтеза вследствие истощения питательных веществ среды.

Известно множество процессов культивирования микроорганизмов. Они различаются:

- по содержанию кислорода – на аэробные и анаэробные;
- по количеству ферментеров – на одно-, дву- и многостадийные;
- по наличию или отсутствию перемешивания – на динамические и статические;
- по состоянию питательной среды – на поверхностные и глубинные.

При поверхностном культивировании посевной материал высевают на поверхность питательной среды, распределенной небольшим слоем (около 10 см) в металлических кюветах.

При глубинном культивировании погружение клеток микроорганизмов осуществляют за счет постоянного перемешивания в течение всего процесса ферментации. Глубинный способ является более выгодным для промышленности по сравнению с поверхностным способом, так как позволяет осуществлять полную механизацию и автоматизацию процесса, избегать инфицирования технологического процесса посторонней микрофлорой.

Классификация процессов культивирования микроорганизмов по способу действия (*периодический, непрерывный и*

промежуточные) представлена на рис. 29.

1. При периодическом способе культивирования стерильная питательная среда засеивается исходной культурой продуцента, и далее в этой же емкости микроорганизмы при определенных условиях проходят через все стадии роста и развития популяции. Когда процесс культивирования заканчивается, емкость для выращивания освобождают, и цикл возобновляется, начиная от засева питательной среды исходной культурой продуцента. При таком способе культивирования (его можно назвать «закрытой» системой, когда хотя бы один из компонентов не может поступать в нее или выводиться из нее) скорость роста биомассы всегда должна стремиться к нулю либо из-за недостатка питательных веществ, либо из-за накопления в среде токсических метаболитов.

Ранее применялось культивирование на поверхности плотных питательных сред в пробирках, колбах, матрасах, бутылках. Выращиваемая в этих условиях культура гетерогенна (разнородна) в физиологическом отношении, так как клетки на различных участках поверхности и в разных слоях находятся в различных условиях и развиваются неодинаково. Этот способ иногда применяется для наращивания биомассы.

В настоящее время в промышленности используют жидкие питательные среды, применение которых позволило избежать недостатков плотных питательных сред и увеличило выход процесса за счет использования больших емкостей для культивирования (ферментеров). Применение жидких питательных сред потребовало перемешивания культуры с целью выравнивания условий роста микробов в разных частях рабочего сосуда и аэрирования (насыщения кислородом). Для этого используются мешалки, качалки, бутылки с барботажем газа.

Периодический способ выращивания микроорганизмов используется для получения посевного материала на некоторых этапах, а также при микробиологическом производстве аминокислот, в производстве вакцин и т.д.

2. Промежуточные способы культивирования

2.1. Продленный периодический процесс, как и периодический, предусматривает одноразовую загрузку и разгрузку ферментера. Однако цикл развития микроорганизмов в продленном периодическом процессе удлиняется либо за счет подпитки (периодического или непрерывного добавления питательной среды),

либо за счет длительного удержания клеток в системе (диализная культура). В этом случае продлевается экспоненциальная фаза и фаза линейного роста. Суть процесса диализ заключается в том, что культура развивается в пространстве, ограниченном полупроницаемой мембраной, а продукты метаболизма диффундируют во внешний раствор. Наиболее простой диализный метод – культивирование в целлофановых мешках, погруженных в питательную среду.

2.2. Многоциклическими процессами культивирования называют такие, в которых цикл выращивания культуры повторяется многократно без многократной стерилизации емкости. Многоциклическое культивирование может быть различным. Его можно вести в одном ферментере, многократно повторяя полный цикл развития культуры без перерыва на стерилизацию. Способы, осуществляемые в одном ферментере, называют одностадийными. Возможны и многостадийные многоциклические процессы, основанные на принципе повторного и последовательного периодического культивирования, протекающего в нескольких ферментерах, соединенных в батарею, с целью длительного использования культуры. Один из вариантов такого способа заключается в следующем: культура выращивается в одном биореакторе и в то время, когда она проходит в своем развитии



Рис. 29 - Классификация процессов культивирования микроорганизмов по способу действия

экспоненциальную фазу, из нее берется инокулят (посевной материал) для засева следующего реактора. В первом реакторе культура доращивается до необходимой фазы роста. Когда культура во втором реакторе достигает экспоненциальной фазы, из нее также делается пересев в третий реактор и т.д. Поскольку культура все время пересеивается в экспоненциальной фазе, не происходит ее старения и вырождения. Кроме того, отмечается выигрыш во времени, так как одновременно работают несколько ферментеров.

Многоциклические процессы культивирования микроорганизмов применяют как для получения биомассы, так и для производства продуктов микробного синтеза – антибиотиков, внеклеточных ферментов, аминокислот. Применение данного способа позволяет в несколько раз сократить затраты труда на производство продукта по сравнению с периодическим способом.

2.3. В полунепрерывных системах полная загрузка и разгрузка ферментера осуществляются однократно, однако в процессе роста культуры часть культуральной жидкости сливается, а освободившийся объем заливается свежей питательной средой. Таким образом, функционирует сливно-доливная система. Различные варианты полунепрерывных систем используются в производстве дрожжей, водорослей, антибиотиков и лимонной кислоты.

3. При непрерывном способе культивирования микроорганизмы постоянно получают приток свежей стерильной питательной среды, а из аппарата непрерывно отбирается биомасса вместе с образуемыми метаболитами (такой способ культивирования можно назвать «открытой» системой). При непрерывном культивировании микроорганизмы не должны испытывать недостатка в питательном субстрате, так как скорость его притока сбалансирована со скоростью выхода биомассы. Кроме того, культура не отравляется продуктами обмена веществ – в этом большое преимущество непрерывного способа культивирования по сравнению с периодическим, преимущество «открытой» системы по сравнению с «закрытой». Непрерывная ферментация может проходить в гомогенной системе идеального смешения, системе полного вытеснения и ли системе твердожидкостного типа.

3.1. Гомогенные системы идеального смешения. В системе идеального смешения микроорганизмы растут в культуральной среде, постоянной по своему составу, и, следовательно, в каждый данный момент времени находятся в одном и том же физиологическом

состоянии, то есть в состоянии установившегося динамического равновесия. По количеству ферментеров гомогенные системы могут быть одностадийными, двухстадийными и многостадийными.

Для получения высоких концентраций биомассы используют одностадийные системы с возвратом клеток, в которых клетки, отделенные от культуральной жидкости с помощью насоса, возвращают обратно в ферментер. Возврат клеток (рециркуляция) имеет важное значение в тех процессах, в которых за время пребывания в ферментере клетки не успевают реализовать свои потенциальные возможности в отношении синтеза целевого продукта.

Многостадийные системы состоят из ряда последовательно соединенных ферментеров – батареи. Применение многостадийных систем позволяет получать культуру при любой скорости роста – от лаг-фазы до экспоненциальной и стационарной. Многостадийное культивирование применяется при получении молочной кислоты, этилового спирта.

Основным аппаратом для выращивания непрерывной гомогенной системы является ферментер идеального смешения с устройством для потока среды и слива культуры, поддерживающим постоянный уровень среды. Такой процесс называют непрерывно-проточным, обеспечивающим одинаковую концентрацию всех продуктов внутри ферментера и в вытекающей жидкости.

Непрерывно-проточное культивирование дает возможность поддерживать постоянные условия роста микроорганизмов за счет лимитирования (ограничения) какого-то одного фактора среды. В случае, когда лимитирующим рост фактором является химический состав питательной среды, процесс называют хеостатным культивированием. В хеостате (ферментере, где протекает хеостатное культивирование) скорость разбавления питательной среды является постоянной в соответствии с заданной плотностью популяции. Изменяя скорость разбавления, можно получать режимы, обеспечивающие различную скорость роста.

Другой принцип управления процессом – турбидостат. В нем подача питательной среды осуществляется по команде фотоэлектрического элемента, регистрирующего оптическую плотность культуры в ферментере. Скорость разбавления устанавливается автоматически в соответствии с заданной плотностью популяции.

Хотя теоретически взаимосвязь между концентрацией биомассы и скоростью разбавления подчиняется одним и тем же закономерностям в хемостате и турбидостате, методы управления процессами различны.

3.2. Системы культивирования полного вытеснения. Открытая система полного вытеснения отличается от системы идеального смешения тем, что культура в ней не перемешивается, а представляет собой поток жидкости через трубку. Наиболее распространенным аппаратом для культивирования в данном случае является трубчатый ферментер. Он может иметь различную форму (прямую, S-образную, спиральную) и устанавливается горизонтально или вертикально. Система полного вытеснения представляет собой пространственный, проточный вариант периодической культуры. Такая культура за время посева до выгрузки проходит через все стадии периодической культуры, то есть фазы роста распределены не во времени, а в пространстве, причем каждой части ферментера в установившемся режиме соответствует определенный отрезок кривой роста. Этот способ культивирования используется для анаэробных процессов. Посев осуществляется непрерывно на входе в ферментер одновременно с подачей среды. Этот принцип может использоваться на стадии брожения при производстве пива.

3.3. Системы твердожидкостного типа. К системам твердожидкостного типа относят многофазные системы, в которых культура растет на границе разных фаз: жидкость – твердая фаза – газ. В этих системах клетки удерживаются путем прилипания к твердой основе – наполнителю и размножаются на нем, образуя пленку биомассы. Типичным примером является производство уксуса в стружечных аппаратах.

В данной системе лимитирующим фактором для аэробных микробов являются кислород и субстрат (питательные вещества). В тонких пленках каждая из прикрепленных в поверхности клеток полностью обеспечена этими веществами и способна расти и размножаться с максимальной экспоненциальной скоростью. По мере того, как клетки образуют более толстую пленку биомассы, рост их ограничивается (верхним слоям не хватает кислорода, нижним – питательных веществ).

Культивирование микроорганизмов, образующих пленку из биомассы, осуществляется в ферментере типа колонки с наполнителем. В качестве наполнителя может использоваться

макроноситель (кокс, прутья, стружка, стеклянные шарики и т.д.) и микроноситель (амберлитовые смолы, частички сефадекса и т.д.). Клетки, культивируемые таким образом, называют иммобилизованными. Использование иммобилизованных клеток имеет несколько преимуществ.

Во-первых, появляется возможность длительной эксплуатации клеток в случае непрерывной ферментации.

Во-вторых, известны примеры повышения устойчивости клеток к действию различных неблагоприятных внешних факторов (температуры, кислотности, концентрации токсичных веществ и других) в результате иммобилизации.

В-третьих, существенно упрощаются процедуры выделения используемых клеток и культуральной жидкости, содержащей целевой продукт.

В-четвертых, благодаря применению иммобилизации обычно снижаются энергозатраты на процесс в целом: за счет уменьшения (а следовательно, и удешевления) размеров применяемых ферментеров; а также за счет упрощения процедур выделения и очистки конечного продукта.

В промышленной микробиологии системы твердожидкостного типа нашли применение при очистке сточных вод, в производстве органических растворителей и кислот и т.д.

4.6. Культивирование растительных клеток

Особенности культивирования растительных клеток

Культивирование растительных клеток в крупных масштабах было освоено в 1976 г. японскими исследователями, которым удалось получить растительную биомассу в объеме 20 м³. Получение массы растительных клеток обходится намного дороже, чем равное количество бактериальных или дрожжевых клеток. Поэтому ученые стараются избежать разрушения клеток с целью извлечения из них полезных для человека соединений. В связи с этим, растительные клетки иммобилизуют внутри пористых полимеров. Доказано, что в таком состоянии клетки удается поддерживать жизнеспособными в течение нескольких сотен дней. Проблемой остается извлечение метаболитов в том случае, когда они синтезируются внутри клеток, а не выделяются в среду. Культуры растительных клеток применяют для синтеза различных веществ: алкалоидов и других вторичных

метаболитов, фитогормонов (регуляторов роста растений) и т.д.

Использование растительных клеток является перспективным направлением биотехнологии, так как клетки, растущие в культуре, способны синтезировать вещества, которые не обнаруживаются в целом растении.

Вопросы для самопроверки

1. Назовите основные стадии роста микроорганизмов.
2. Что необходимо для выращивания любой клеточной культуры?
3. Какие продукты микробного брожения и метаболизма вы знаете?
4. Какие соединения - первичными или вторичные метаболиты – необходимы для роста микроорганизмов?
5. Перечислите отходы пищевой промышленности, широко используемые в качестве сырья для биотехнологического производства.
6. Назовите компоненты, которые обязательно должны присутствовать в питательной среде.
7. Для чего в состав питательных сред вводят источники азота и фосфора?
8. Что такое ферментация (культивирование)?
9. Перечислите способы культивирования микроорганизмов.
10. В чем особенности периодического способа ферментации?
11. Где применяется данный способ?
12. Каковы особенности промежуточных способов культивирования?
13. В чем преимущество непрерывного способа культивирования?
14. В чем отличие хемостата от турбидостата?
15. Что такое иммобилизованные клетки, и каковы преимущества их применения?
16. Расскажите об особенностях культивирования растительных клеток.

ГЛАВА 5 БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ СХЕМА ПРОИЗВОДСТВА ПРОДУКТОВ МИКРОБНОГО СИНТЕЗА

Процессы биотехнологических производств разнообразны, но все они имеют пять общих основных стадий, которые могут различаться в зависимости от целевого продукта и способа его получения. Основные стадии следующие: *приготовление питательной среды; получение посевного материала; культивирование микроорганизмов; выделение целевого продукта; очистка целевого продукта.*

5.1. Приготовление питательной среды

Задача специалиста, оптимизирующего состав среды для конкретного вида микроорганизма, - выбрать такие источники углерода, азота, фосфора и других веществ, которые наиболее оправданы в экономическом и экологическом отношении.

Принцип составления питательных сред

Каждый конкретный вид микроорганизмов, используемых в биотехнологии, строго избирателен к питательным веществам. Потребность микроорганизма в тех или иных соединениях определяется физиологическими особенностями данного вида микроба, но во всех случаях среда должна быть водным раствором этих веществ и обеспечивать в определенном количестве их приток в клетку.

В самом приближенном виде физиологические потребности микроорганизма в питательных веществах можно выявить, определив химический состав микробной клетки. Однако в этом случае не учитываются количество и состав метаболитов, удаленных клеткой во внешнюю среду, и то обстоятельство, что состав клеточного вещества микроорганизма зависит от состава среды обитания и варьирует в достаточно широких пределах. Но все же, первоначальную ориентировку в выборе оптимального состава питательной среды, исходя из состава клеточного вещества микроба, сделать можно.

Важнейшим условием приготовления питательных сред является соблюдение правил асептики. Для обеззараживания питательных сред применяют, как известно, химическое воздействие (дезинфекцию), воздействие температуры и других физических

факторов (ультразвука, ультрафиолетовых лучей, ультрафильтрации). В биотехнологии широко применяют термические методы обеззараживания питательных сред (автоклавирование, стерилизацию, кипячение и др.). Споры микроорганизмов более устойчивы к высокой температуре, поэтому именно споры бактерий являются лимитирующим фактором, определяющим температурные режимы стерилизации сред.

Для стерилизации воздуха в случае аэробных процессов культивирования используют фильтрование и ультрафиолетовое облучение.

5.2. Получение посевного материала

Поддержание чистой культуры штамма-продуцента - ключевая задача любого биотехнологического производства. Культуры микроорганизмов-продуцентов заводы получают из коллекций в пробирках на агаризованных питательных средах или в ампулах. Чистая культура микроорганизма может постоянно или по мере необходимости использоваться в производстве. При длительном хранении чистых культур могут происходить случайные нерегулируемые мутации. Для избежания мутаций следует не только соблюдать правила хранения и поддержания исходной культуры, но и периодически проводить пересев культуры и проверку ее однородности, как по морфологическим, так и по физиологическим признакам.

Посевным материалом (инокулятом) называют чистую культуру микроорганизма, которую получают путем ее последовательного пересева из пробирки в колбу, а затем в аппараты увеличивающегося объема до количества, необходимого для промышленного производства. Сначала чистую культуру размножают в лаборатории, затем в цехе чистых культур и инокуляции, далее направляют на культивирование. Приготовление посевного материала состоит из следующих стадий:

1. Получение культуры микроорганизма в микробиологической лаборатории завода.
2. Выращивание микроорганизмов в малом посевном аппарате.
3. Выращивание микроорганизмов в большом посевном аппарате.
4. Накопление культуры микроорганизмов в малом ферментере.

Передачу чистых культур из одного аппарата в другой осуществляют в конце логарифмической фазы роста. Качество полученного посевного материала контролируют путем микроскопирования.

В биотехнологии широко применяются плесневые грибы, дрожжи, актиномицеты (грамположительные бактерии, не образующие спор), бактерии и водоросли в виде чистых и смешанных культур. В традиционных процессах ферментации предпочтение обычно отдается смешанным культурам, а в большинстве современных ферментационных процессов – монокультурам (чистым культурам), выращиваемых в асептических условиях. Большинство используемых сегодня культур получено из природных источников, однако затем эти культуры были улучшены или путем выращивания в условиях, характерных для данного процесса (для повышения выхода биомассы и первичных метаболитов), или с помощью мутагенеза или генетической инженерии (для производства вторичных метаболитов).

5.3. Культивирование

Культивирование представляет собой совокупность последовательных операций от внесения в заранее приготовленную и термостатированную питательную среду посевного материала до завершения процессов роста и биосинтеза вследствие исчерпывания питательных веществ среды. Существует два основных типа ферментаций: получение биомассы микроорганизмов и получение ценных веществ (метаболитов), возникающих в ходе роста или на последующих стадиях развития культуры.

На оптимальной питательной среде при благоприятных значениях рН и температуры, при условии подачи требуемого количества воздуха в среду микроорганизмы быстро начинают расти и размножаться, обеспечивая накопление биомассы продуцента и биологически ценных метаболитов в культуральной жидкости.

Для культивирования микроорганизмов в промышленных масштабах применяют ферментеры (или ферментаторы) – реакционные емкости, в которых при определенных условиях находятся микроорганизмы. Основное назначение ферментатора – своевременно обеспечить микробные клетки необходимыми питательными веществами и кислородом (при необходимости) и отвести продукты обмена веществ, создать однородный состав среды

при условии слабого потока культуральной жидкости (при непрерывном культивировании). Для поддержания кислородного режима ферментатор снабжается устройством подвода воздуха, для лучшего перемешивания среды – мешалками различной конструкции. Для поддержания температуры среды предусмотрены системы охлаждения.

5.4. Выделение продукта

Стадия выделения продукта существенно зависит от того, накапливается продукт в клетках или он выделяется в культуральную жидкость, или же продуктом является сама клеточная масса. Разделение биомассы и культуральной жидкости - сепарация - осуществляется несколькими методами.

Если целевым продуктом является биомасса клеток, применяют следующие методы выделения: отстаивание, фильтрация, флотирование, сепарирование и т.д. (механические способы); выпаривание и сушка (физические способы).

Фильтрация – простой и широко применяемый процесс разделения твердых частиц и жидкости, скорость которого зависит от пористости фильтрующего материала и давления. Фильтрование при помощи вакуумных насосов существенно ускоряет процесс.

Флотирование применимо для выделения дрожжевых клеток. Процесс флотирования клеток осуществляется путем вспенивания культуральной жидкости. Вместе с пеной из культуральной жидкости удаляется и основная масса дрожжей.

Сепарирование осуществляют в сепараторах, в которых на клетки действует центробежная сила, отбрасывающая клетки к периферии сосуда, а культуральная жидкость будет собираться в центре сепаратора. Этот процесс протекает гораздо быстрее, чем отстаивание клеток под действием силы тяжести.

Если целевой продукт содержится в самих клетках, то проводят разрушение клеток - дезинтеграцию – физическими, химическими и ферментативными методами.

К физическим методам можно отнести разрушение клеток под действием ультразвука, замораживания-оттаивания, баллистическую дезинтеграцию. Баллистическая дезинтеграция клеток осуществляется в мельницах, куда помещают суспензию клеток и вспомогательные мелющие вещества: песок, стеклянные или

полимерные шарики.

К химическим методам дезинтеграции относят разрушение клеток с помощью толуола, бутанола и других химических соединений.

При использовании ферментативной дезинтеграции клеток используют ферменты, способные разрушать определенные структурные компоненты клеточных стенок микроорганизмов. Например, для разрушения бактериальных клеток применяют лизоцимы яиц, бактерий, актиномицетов или грибов. Для разрушения дрожжей и плесневых грибов используются фосфоманназа и бета-глюконаза или применяют автолиз.

Автолиз – разрушение клеток дрожжей или плесневых грибов под действием собственных гидролитических ферментов. Для этого суспензию клеток инкубируют при 35-45 °С.

Выделение продукта из культуральной жидкости или гомогената разрушенных клеток проводят путем его осаждения, экстракции, кристаллизации или сорбции.

Осаждение в виде нерастворимых солей производят путем добавления химического осадителя в эквимольных количествах. Применяют при получении лимонной, молочной кислоты.

Экстракция – добавление к раствору экстрагента (растворителя), который поглощает целевой продукт. Затем эмульсию разделяют и выделяют целевое вещество. Используют при получении витаминов, антибиотиков.

Кристаллизация – после предварительной обработки культуральной жидкости и выпаривания при охлаждении осуществляют кристаллизацию. Данный метод выделения и очистки используется при получении глутаминовой, итаконовой и других кислот.

Затем выделенный продукт концентрируют центрифугированием, ультрафильтрацией, выпариванием или обратным осмосом.

Центрифугирование – расслоение раствора с частицами бóльшей плотности на осадок и надосадочную жидкость при воздействии центробежной силы.

Ультрафильтрация – обработка раствора на мембранных фильтрах с определенным размером пор (то есть разделение веществ на фракции по размерам их молекул). Применяется для ферментов и других белков.

5.5. Очистка

Эта стадия необходима при получении очищенного целевого продукта, например, ферментных препаратов степени очистки более двухкратной. Эта стадия приводит к росту себестоимости получаемого целевого продукта.

Для очистки ферментов применяют избирательную **сорбцию** (связывание) каолином, трифосфатом кальция, гидроксидом алюминия и другими адсорбентами. Таким образом, проводят сорбцию либо фермента, либо балластных белков, которые затем разделяют центрифугированием. Фермент из сорбента отделяют раствором фосфатного буфера.

На последнем этапе продукт отделяют от примесей, концентрируют и стабилизируют. После стабилизации продукта в зависимости от того, каким должен быть конечный продукт: сухим или жидким, его обезвоживают или сразу упаковывают и отправляют на хранение и далее - потребителю.

Вопросы для самопроверки

1. Перечислите основные стадии биотехнологической схемы получения продуктов микробного синтеза.
2. Как определить физиологические потребности микроорганизмов в питательных веществах?
3. Какие методы применяют для обеззараживания питательных сред в биотехнологическом производстве?
4. Опишите последовательность получения посевного материала для промышленного производства продукта.
5. Основное назначение ферментера.
6. От чего зависит проведение стадии выделения продукта?
7. Какие методы применяют для отделения биомассы клеток от культуральной жидкости?
8. Что такое дезинтеграция, в каких случаях ее осуществляют?
9. Расскажите об основных методах дезинтеграции клеток.
10. В чем отличие сепарирования от центрифугирования?

ГЛАВА 6. БИОТЕХНОЛОГИЯ ПРОИЗВОДСТВА ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ

Ферменты - это высокоактивные соединения белковой природы, являющиеся специфическими катализаторами реакций.

Ферменты катализируют миллионы химических превращений в клетках животных, растений, микроорганизмов и воздействуют на соответствующие субстраты вне клетки. Достоинством применения ферментов перед химическими катализаторами является то, что они действуют при нормальном давлении, при диапазоне температур от 20 до 70 °С, рН от 4 до 9, в большинстве случаев имеют высокую субстратную специфичность, что позволяет в сложной смеси биополимеров направленно воздействовать на определенные соединения.

При помощи ферментов получают ряд пищевых продуктов. Ферменты используют в пищевой, фармакологической, биохимической промышленности и во многих областях деятельности человека.

Следует различать два понятия: ферменты и ферментные препараты. Ферменты находятся практически во всех живых объектах: растениях, животных и микроорганизмах.

Ферментные препараты могут представлять собой смесь ферментов или фермент одного вида, иметь различную степень очистки, могут быть добавлены в сырье или продукт, или использоваться закрепленными на носителе (иммобилизованные ферменты). В качестве источника получения ферментных препаратов биотехнологическим способом используют ткани и органы растений, животных и микроорганизмы.

Производство ферментных препаратов является одним из перспективных направлений развития биотехнологии.

Ферменты являются соединениями белковой природы, поэтому в смеси с другими белками определить их количество практически невозможно. Наличие определенного фермента в данном препарате может быть установлено по результатам той реакции, которую катализирует фермент, то есть по количеству образовавшихся продуктов реакции или уменьшению исходного субстрата.

Активность ферментного препарата Е (по международной классификации) выражается в микромолях субстрата,

прореагировавшего в присутствии 1 мл ферментного раствора или 1 г препарата в заданных условиях за 1 минуту. Число микромолей и будет равно числу стандартных единиц активности.

Необходимо придерживаться определенных условий при установлении активности фермента: вести определение при температуре 30 °С и определять активность по начальной скорости реакции, когда концентрация субстрата достаточна для насыщения фермента.

6.1. Получение ферментных препаратов из растительного сырья

Для получения ферментных препаратов пригодны некоторые растения или отдельные органы растений и животных, способные накапливать значительное количество ферментов. Источники некоторых ферментов приведены в табл. 5.

Источники ферментов растительного происхождения

Таблица 5

| Ферменты | Источник, из которого получают |
|--|---|
| <i>Амилазы</i> | Ячмень |
| <i>Протеазы:</i> папаин фицин бромелаин | Дынное дерево Фиговое дерево Ананас |
| <i>Кислая фосфатаза</i> | Картофель |
| <i>Пероксидаза</i> | Хрен |
| <i>Уреаза</i> | Канавалия мечевидная |

Из ферментов растительного происхождения наиболее широко в пищевой промышленности используют амилазы и папаин. Источником ферментов могут быть пророщенные зерна различных злаков. Условно ферментным препаратом можно считать и ячменный солод, в котором содержится до 1 % амилаз.

Растительная протеаза – папаин – содержится в плодах дынного дерева. Папаин, а также протеазы фицин и бромелаин при контакте с мясом в течение 2 ч при комнатной температуре расщепляют белки соединительной ткани – коллаген и эластин.

Из растительного сырья получают также фосфатазы, пероксидазы, уреазы, гемицеллюлазы и другие ферменты.

6.2. Получение ферментных препаратов с использованием микроорганизмов

По экономическим и технологическим соображениям получать ферменты с помощью микроорганизмов более выгодно, чем из растительных и животных источников. В специально созданных условиях микроорганизмы способны синтезировать огромное количество разнообразных ферментов. Они неприхотливы к составу питательной среды, легко переключаются с синтеза одного фермента на другой и имеют сравнительно короткий цикл роста (16-100 ч). Продуцентами ферментов могут быть различные микроорганизмы: бактерии, грибы, дрожжи, актиномицеты. Для промышленного получения ферментных препаратов используют как природные штаммы микроорганизмов, так и мутантные штаммы. Микроорганизмы могут синтезировать одновременно целый комплекс ферментов, но есть и такие, особенно среди мутантных штаммов, которые являются моноферментными и образуют в больших количествах только один фермент. Микробные клетки содержат или продуцируют более двух тысяч ферментов, катализирующих биохимические реакции, связанные с ростом, дыханием и образованием продуктов. Многие из этих ферментов могут быть легко выделены и проявляют свою активность независимо от того, находятся ли они внутри клетки или в культуральной жидкости.

Производство ферментных препаратов осуществляется и поверхностным, и глубинным способами. При поверхностном способе в качестве продуцентов используются грибы. Питательные среды при этом способе имеют твердую или рыхлую консистенцию. Основой почти всех сред являются увлажненные пшеничные отруби. Для придания среде рыхлой структуры и ее обогащения к пшеничным отрубям добавляются древесные опилки или солодовые ростки. Культивирование проводят в условиях аэрации.

Глубинный способ выращивания принципиальных отличий от поверхностного не имеет. Культивирование проводят в жидких средах, а продуцентами могут быть и бактерии.

При получении внеклеточных ферментов применяют

питательные среды неопределенного состава. В таких средах в качестве источника органического углерода и азота, как правило, используют различные сорта крахмала (картофельный, кукурузный, рисовый), кукурузный экстракт, соевую муку, гидролизаты биомассы дрожжей. Однако такие питательные среды неприменимы при выделении внутриклеточных ферментов, так как биомасса в этом случае содержит нерастворимые компоненты, затрудняющие выделение и очистку целевого продукта.

Замена одного источника углерода на другой коренным образом меняет набор накапливаемых ферментов. Например, *Aspergillus awamori* на средах, содержащих крахмал, преимущественно образует амилазы, при замене крахмала на ксилан синтезирует ксиланазу, а если в качестве источника углерода применяют растительное масло, в культуральной жидкости накапливается липаза.

При получении ферментов высокой степени очистки целесообразно культивировать продуцент в питательной среде строго детерминированного (определенного) состава, что обеспечивает направленный биосинтез нужного фермента.

Ферментные препараты представляют собой жидкости (до 50 % сухих веществ), либо порошки. Часто они содержат не один, а целый комплекс ферментов. Выделение и очистка ферментов очень трудоемкий и дорогой процесс, поэтому в некоторых случаях ферментные препараты применяют неочищенными. Но в пищевой промышленности используют препараты высокой и даже предельной степени очистки. Чем выше очистка, тем выше активность препарата. В целом ряде случаев необходимо иметь ферментные препараты, стандартизованные по активности входящих в их состав ферментов. В этом случае используют различные наполнители: муку, крахмал, соли серной и соляной кислот, бентонит и др.

6.3. Номенклатура ферментных препаратов микробного происхождения

Существует определенная система названия ферментных препаратов, в которой учитываются: основной фермент, источник получения и степень очистки. Подавляющее количество ферментных препаратов является комплексным, содержащим помимо основного фермента еще значительное количество сопутствующих ферментов и белков. Поэтому в технологии ферментов препараты чаще

классифицируют по основному компоненту в смеси ферментов, присутствующих в данном препарате: амилолитические, протеолитические, липолитические и т.д.

Наименование каждого препарата включает сокращенное название основного фермента, затем добавляется видовое название продуцента, заканчивается название препарата суффиксом "ин". Например, амилолитические препараты, получаемые из культур *Aspergillus oryzae* и *Bacillus subtilis*, называются соответственно амилоризин (амилоризин) и амил-о-субтил-ин (амилосубтилин). Мальтаваморин П2х (продуцент *A. awamori* содержит в основном мальтазу). Целловиридин Г3х (продуцент *Trichoderma viride* содержит в основном целлюлолитические ферменты).

Далее ставится индекс, в котором обозначены способ производства и степень очистки фермента от балластных веществ. При глубинном способе культивирования после названия ставится буква Г, а при поверхностном - П. После букв Г или П может стоять цифра, обозначающая степень чистоты препарата. Индекс 2х обозначает жидкий неочищенный концентрат исходной культуры; 3х - сухой ферментный препарат, полученный высушиванием распылением неочищенного раствора фермента (экстракта из поверхностной культуры или культуральной жидкости). Технические ферментные препараты с индексами 2х и 3х чаще используются в легкой промышленности и сельском хозяйстве. Для пищевой промышленности, медицины и научных исследований требуются очищенные и высокоочищенные ферментные препараты. Индекс 10х означает сухие препараты, полученные осаждением ферментов органическими растворителями или методом высаливания; цифрами 15х, 18х, 20х обозначают препараты, частично освобожденные не только от балластных веществ, но и от сопутствующих ферментов; выше 20х - высокоочищенные и даже гомогенные ферментные препараты.

В нашей стране выпускаются следующие ферментные препараты: амилосубтилин и протосубтилин (продуцент - *Bacillus subtilis*), пектофоетидин (*Aspergillus foetidus*), мальтаваморин (*Aspergillus awamori*), амилоризин (*Aspergillus oryzae*), глюконигрин (*Aspergillus niger*) и другие.

6.4. Применение ферментных препаратов в пищевой промышленности

Протеолитические ферменты продуцируются грибами рода *Aspergillus*, *Penicillium*, бактериями рода *Bacillus*, дрожжами рода *Saccharomyces*. Эти ферменты используют при переработке животного сырья в мясной, молочной и рыбной промышленности. Они применяются как размягчители мяса, ускорители созревания мяса и рыбы. При проведении слабого протеолиза с использованием набора специфических ферментов происходит незначительное изменение структуры мяса, но оно становится качественно лучше, значительно мягче. Особенно важным является действие ферментов на белки соединительной ткани. В этом случае оказывается возможным значительно полнее использовать все части туши.

Ввиду нехватки сырья для получения сычужного фермента в последние годы ведутся интенсивные работы по поиску его заменителей ферментами микробного происхождения для сыродельной промышленности. Однако все они уступают ему по свертывающей способности. Хорошими сгустителями являются протеазы, полученные из штаммов микроскопических грибов рода *Mucor* и бактерий родов *Bacillus*, *Pseudomonas* и др. В настоящее время в сыроделии применяется около 10 % реннина микробного происхождения.

В пивоваренном производстве протеолитические ферменты применяют для устранения белковых помутнений, а в хлебопечении - для сокращения времени замеса теста из пшеничной муки с высоким содержанием клейковины. Протеолитические ферменты используют как добавки к моющим средствам, что дает высокий эффект при устранении белковых загрязнений.

Амилолитические ферменты продуцируют грибы рода *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor* и бактерии рода *Bacillus*. Самыми большими потребителями являются спиртовая и пивоваренная промышленности. Амилазы микробного происхождения добавляют при подготовке пивного сусла, при спиртовом брожении, чтобы перевести крахмал в форму, усваиваемую дрожжами. Тем самым можно ускорить или полностью заменить солодование зерна в пивоварении. Кроме того, амилолитические ферменты применяют в хлебобулочном производстве, способствуя улучшению структуры мякиша хлеба.

Целлюлолитические ферменты, участвующие в гидролизе целлюлозы, представляют собой комплекс, состоящий из нескольких ферментов с различной специфичностью действия: эндоглюканазы, экзоглюкозидазы, β -глюкозидазы и др. Целлюлазы и гемицеллюлазы могут быть получены только с помощью микроорганизмов. Целлюлазы, продуцируемые грибами родов *Fusarium*, *Trichoderma*, *Penicillium*, применяют в спиртовой, пищевых концентратной промышленности, где сырьем являются растительные материалы или отходы переработки растений, например, в производстве растворимого кофе.

Пектолитические ферменты продуцируют грибы родов *Aspergillus* (*Aspergillus niger*), *Penicillium*, бактерии *Erwinia caratovora*, *Clostridium* sp. Пектиназы представляют комплекс ферментов, состоящий из полигалактуроназы, пектинметилэстеразы и др. Эти ферменты используют при производстве осветленных соков из плодов и ягод, для осветления вин. Применение пектиназ в производстве соков обусловлено тем, что они катализируют гидролиз пектиновых веществ растительных клеток, тем самым освобождая сок из клеточных структур. Применение пектиназ в виноделии увеличивает скорость фильтрации сусла, способствует его осветлению и стабилизации. При этом возрастает содержание экстрактивных веществ, витамина С, флавоноидов, обладающих Р-витаминной активностью.

В производстве кисло-молочных продуктов используется реннин - ферментный препарат, осуществляющий свертывание молока. Получают его с помощью микроорганизмов *Endothia parasitica* и *Mucor* sp.

Наибольшее распространение получили препараты, в которых ферменты в активной форме прикреплены к нерастворимой основе. Такие ферментные препараты называют иммобилизованными. Преимуществом их применения является возможность многократного использования. В этом случае обрабатываемый раствор пропускают через основу с иммобилизованным ферментом.

Вопросы для самопроверки

1. В чем отличие ферментов от ферментных препаратов?
2. Что такое активность ферментного препарата?
3. Перечислите, какие микроорганизмы применяют для

промышленного производства ферментных препаратов.

4. Какие способы культивирования микроорганизмов используют при производстве ферментных препаратов?

5. Расскажите, по какому принципу составляется название ферментного препарата микробного происхождения.

6. Области применения амилалитических ферментов.

7. В каких отраслях пищевой промышленности используются пектолитические ферменты?

8. Назовите продуцентов и область применения целлюлаз.

9. Что такое иммобилизованные ферменты?

ГЛАВА 7. БИОТЕХНОЛОГИЯ ПИЩЕВЫХ ПРОИЗВОДСТВ

7.1. Микроорганизмы источники белка

Сбалансировать содержание в кормах белка и его аминокислотный состав можно с помощью биомассы микроорганизмов.

Этот белковый источник имеет ряд преимуществ:

- большая скорость роста микроорганизмов (микроорганизмы растут в 500 раз быстрее, чем сельскохозяйственные культуры и в 1000-5000 раз быстрее, чем самые быстрорастущие породы животных);

- высокое содержание белка в биомассе: дрожжи способны накапливать до 40-50 % белка от своей массы, а некоторые бактерии до 60-70 % белка;

- удовлетворительная биологическая ценность белков: по содержанию большинства незаменимых аминокислот (лизина, триптофана и др.) белок многих дрожжей и бактерий соответствует эталону (яичному белку);

- независимость производства от погодных и сезонных условий: биомассу микроорганизмов можно получать круглогодично;

- возможность выращивания биомассы на различных непищевых субстратах и на отходах ряда производств;

- возможность организации производства микробного белка индустриальными методами с применением автоматизации.

Использование того или иного продуцента при производстве белковых препаратов определяется составом питательной среды и назначением белка. Требования менее строги, если белок предназначен для кормовых целей и должны быть высокими, если белковые препараты используются в пищу.

Эффективность применения микроорганизма-продуцента для производственных целей определяется, с одной стороны, скоростью его роста, с другой - степенью использования питательных веществ среды. Продуценты белков должны отвечать следующим требованиям:

- накапливать 40-70 % белка от своей биомассы;

- максимально усваивать питательные вещества среды;

-не являться болезнетворными и не выделять в среду токсических продуктов;

-обладать высокой устойчивостью и выживаемостью в нестерильных условиях выращивания;

-иметь высокую скорость размножения и роста;

-легко отделяться от среды.

Промышленные культуры, используемые для биосинтеза белковых веществ, должны отвечать медико-биологическим требованиям.

Преимуществом дрожжей перед другими микроорганизмами является их технологичность: устойчивость к инфекциям, легкость отделения от среды благодаря крупным размерам клеток по сравнению с бактериями, способность усваивать различные источники углерода, азота и способность расти на простых средах, высокие питательные свойства и приятный запах биомассы. Дрожжевая биомасса представляет собой полноценный белковый продукт с высоким содержанием витаминов, который может найти применение, как для кормовых, так и для пищевых целей.

Преимуществом бактерий является высокая скорость роста, большее, чем у других микроорганизмов, содержание белка и незаменимой аминокислоты метионина в биомассе. По составу аминокислот бактериальный белок приближается к животному и поэтому имеет большую ценность в качестве кормового препарата. Однако при использовании бактерий должен быть тщательно изучен состав их липидов, так как у некоторых из них в липидах могут содержаться токсины. Недостатком бактерий являются маленькие размеры клеток и плотность, близкая к плотности воды, что затрудняет их выделение из культуральной жидкости.

Кроме того, биомасса дрожжей и бактерий имеет высокое содержание нуклеиновых кислот (до 12 % и до 16 % соответственно), что ведет к образованию нежелательных продуктов распада в животном организме.

Водоросли, как и все другие микроорганизмы, водоросли являются перспективным источником получения белка. Они легко отделяются от субстрата, медленнее растут, чем дрожжи и поэтому содержат меньше нуклеиновых кислот в биомассе. Общее содержание белка в водорослях может достигать 70 %. Причем эти белки полноценны по аминокислотному составу.

Грибы. Для получения кормового и пищевого белка можно использовать промышленное выращивание различных видов низших и высших грибов. Некоторые виды микроскопических грибов способны накапливать до 50 % белка.

По содержанию незаменимых аминокислот белок грибов приближается к белку животного происхождения, биомасса богата витаминами, особенно, группы В, содержание нуклеиновых кислот низкое (2,5 %), клеточные стенки тонкие и легко перевариваются в желудочно-кишечном тракте животных.

При выращивании микроскопических грибов на жидкой питательной среде, как правило, на первой стадии культивирования происходит интенсивное образование биомассы. В условиях глубинного культивирования в первые 5-6 часов происходят сложные внутриклеточные преобразования в конидиях, они набухают, и появляются первые гифы. Далее идет быстрое развитие и рост мицелиальной массы гриба. Мицелий может формироваться в виде шариков или кашеобразной массы.

7.2. Промышленное производство микробного белка

Независимо от вида используемого сырья, технологический процесс производства микробных белковых препаратов состоит из следующих основных стадий: подготовка сырья и приготовление питательных сред для выращивания микроорганизмов; культивирование микроорганизмов; выделение биомассы продуцента из культуральной жидкости; плазмолиз клеток; сушка микробных белковых препаратов биомассы; фасовка и упаковка готового препарата.

В качестве питательной среды для производства белковых препаратов в промышленных масштабах используют молочную сыворотку. На молочной сыворотке хорошо растут и накапливают значительное количество белка дрожжи *Kluuveromyces* и *Candida*.

При всестороннем исследовании микробной массы, полученной на молочной сыворотке, была выявлена ее высокая технологическая и экономическая эффективность для мясного и молочного животноводства, птицеводства и целого ряда других направлений.

Для получения белка на гидролизатах растительного сырья наиболее часто используют дрожжи рода *Candida*, реже - дрожжи рода *Trichosporon*. Также дрожжи рода *Candida* способны к синтезу

белка на сульфитных щелоках и жидких углеводородах. Газообразные углеводороды хорошо потребляются бактериями родов *Mycobacterium* и *Pseudomonas*.

Применение биомассы микроорганизмов в качестве белковой добавки в корма требует всестороннего изучения ее состава и свойств, в частности перевариваемости и усвояемости. Испытанию на токсичность должны подвергаться не только живые клетки, но и продукты их метаболизма, а также готовые белковые продукты. Обязательным условием должно быть отсутствие в них живых клеток штамма-продуцента, чтобы не происходил вторичный рост.

В производстве пищевых продуктов рассматриваются три основные формы использования микробного белка:

1. Цельная биомасса (без специального разрушения клеточных стенок).

2. Частично очищенная биомасса (разрушение клеточных стенок и удаление нежелательных компонентов).

3. Выделенные из биомассы белки.

Выделенные белки (изоляты) являются наиболее приемлемыми формами использования белковых препаратов. Однако недостаток их применения связан с тем, что при их выделении используются кислоты и щелочи, высокая температура, давление, что приводит к частичному разрушению аминокислот.

При микробном синтезе белка следует подбирать культуры, у которых состав белка по незаменимым аминокислотам был бы близок к эталону, установленному Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) - яичный белок, белок женского молока.

ВОЗ сделала заключение, что белок микроорганизмов может использоваться в продуктах питания, но допустимое количество нуклеиновых кислот вводимых вместе с микробным белком в диету взрослого человека не должно превышать 2 г в сутки. Испытания на добровольцах показали, что введение микробного белка в пищевой рацион не вызывает отрицательных последствий, но встречается проявление аллергических реакций, желудочные заболевания и т.д.

Вопросы для самопроверки

1. Каковы преимущества микробного белка перед другими источниками?

2. Требования к продуцентам белка.

3. Достоинства и недостатки получения белка с помощью дрожжей, микроскопических грибов, бактерий, водорослей.

4. Основные стадии процесса производства микробных белковых препаратов.

5. Использование молочной сыворотки в качестве питательной среды при производстве белковых препаратов.

Заключение

Микроорганизмы играют огромную роль в природе и в жизни человека. Они совершают круговорот веществ, который все время происходит на нашей планете.

Процессы гниения, разрушающие органическое вещество, невозможны без микроорганизмов.

Микроорганизмы играют важную роль в питании человека. Простокваша, кефир, кумыс, сыр являются результатом жизнедеятельности молочнокислых бактерий. Дрожжи играют основную роль при выпечке хлеба.

Производство спирта, пивоварение, виноделие так же связаны с жизнедеятельностью микроскопических дрожжевых грибов.

В настоящее время все большее внимание начинают приобретать микроорганизмы как источник синтеза антибиотиков, ферментов, витаминов, белков и других веществ.

Многие биотехнические процессы осуществляются с использованием микроорганизмов. Биотехнология играет ведущую роль во многих отраслях – сельском хозяйстве, медицине, пищевой промышленности.

Учебное пособие связанное с лекционным курсом и лабораторными занятиями позволяет лучше усвоить теоретический и практический материал.

Лабораторный практикум



ТРЕБОВАНИЯ К ВЫПОЛНЕНИЮ ЛАБОРАТОРНЫХ РАБОТ И ОФОРМЛЕНИЮ ОТЧЕТА ПО ДИСЦИПЛИНЕ «МИКРОБИОЛОГИЯ С ОСНОВАМИ БИОТЕХНОЛОГИИ»

Для получения допуска к выполнению лабораторной работы необходимо изучить ее содержание. Следует ознакомиться с относящимся к работе оборудованием, изучить материал, изложенный в лабораторном практикуме. Ответив на поставленные вопросы (включая вопросы по технике безопасности) и получив разрешение преподавателя, студенты приступают к выполнению работы. Выполнение работы без разрешения преподавателя категорически запрещается.

Обо всех замеченных неполадках и неисправностях студенты обязаны немедленно ставить в известность преподавателя.

При выполнении лабораторной работы студент обязан:

- знать цель работы;
- изучить правила техники безопасности при проведении работы;
- получить у лаборанта необходимые материалы, приборы, посуду;
- изучить устройство и принцип работы установки, приборов и выполнить работу;
- по окончании работы прибрать рабочее место, сдать лаборанту в чистоте и сохранности приборы, посуду.

Отчет по лабораторной работе, выполняемый в тетради, должен быть грамотно и аккуратно оформлен. Следует указать номер и название работы, указать ее цель, изложить основные теоретические положения, обуславливающие необходимость и условия проведения анализа, представить таблицу опытных и расчетных величин, привести в тексте все необходимые расчеты, дать выводы по работе.

Студент допускается к проведению очередной работы лишь после оформления и защиты отчета предыдущей.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 1

УСТРОЙСТВО МИКРОСКОПА И ПРАВИЛА РАБОТЫ С НИМ. ВИДЫ МИКРОСКОПИИ

Цель работы: изучить устройство светового биологического микроскопа и освоить правила работы с ним. Ознакомиться с различными видами микроскопии.

Объекты исследования: световой биологический микроскоп.

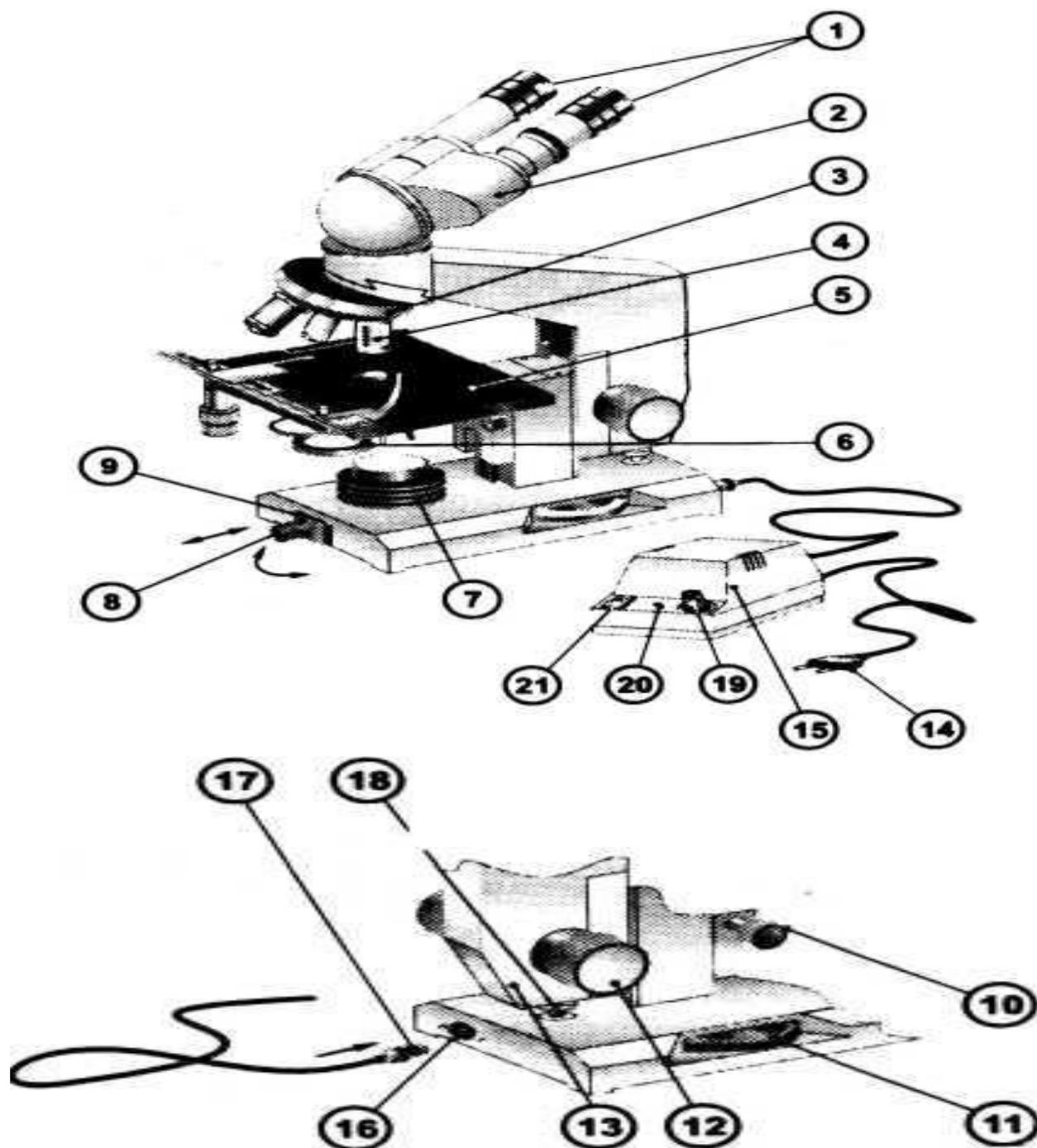
Устройство микроскопа

Микроскоп (от греч. *micro* – малый и *scopio* – смотрю) – это оптический прибор, состоящий из трех основных частей: механической, оптической и осветительной (рис. 30).

Механическая часть или штатив состоит из ножки, основания, тубусодержателя, предметного столика, монокулярной насадки (тубусоревольверного устройства), рукоятки грубой фокусировки (макрометрического винта), рукоятки тонкой фокусировки (микрометрического винта).

Тубус – зрительная труба микроскопа. В верхнее отверстие тубуса свободно вставляется окуляр, на нижнем конце тубуса находится вращающееся вокруг своей оси револьверное устройство (револьвер), в которое ввинчиваются объективы. Вращая револьвер, можно быстро сменить объективы во время работы с микроскопом, подводя любой объектив под тубус. Объектив должен быть центрирован, т.е. установлен на оптическую ось микроскопа. Для этого револьвер поворачивают вокруг своей оси до появления щелчка.

Предметный столик служит для размещения на нем изучаемого препарата. Препарат закрепляют на столике зажимами (клеммами). В центре предметного столика находится отверстие для прохождения лучей света и освещения препарата. В некоторых конструкциях микроскопа предметный столик может передвигаться с помощью винтов, расположенных по периферии предметного столика. Это дает возможность рассмотреть препарат в различных полях зрения



1 – окуляр; 2 – монокулярная насадка (тубус) 3 – револьверное устройство; 4 – объектив; 5 – предметный столик; 6 – конденсор; 7 – корпус коллекторной линзы; 8 – патрон с лампой; 9 – шарнир; 10 – рукоятка перемещения кронштейна конденсора; 11 – рукоятка тонкой фокусировки (микрометрический винт); 12 – рукоятка грубой фокусировки (макрометрический винт); 13 – тубусодержатель; 14 – винт для крепления насадки

Рис. 30 - Схема устройства светового биологического микроскопа

Рукоятки грубой и тонкой фокусировки (макро- и микровинты) служат для перемещения тубуса вверх и вниз, что позволяет установить его на необходимом расстоянии от препарата. При вращении винтов по часовой стрелке тубус опускается, а при вращении против часовой стрелки – поднимается. При вращении макрометрического винта объектив ориентировочно устанавливается на фокус, т.е. на то расстояние от препарата, при котором он делается видимым. Оборот макровинта позволяет переместить тубус на 20 мм. Микрометрический винт служит для точной установки на фокус. Полный оборот его перемещает тубус на 0,1 мм. С микровинтом следует обращаться очень осторожно, допустимо вращение микровинта не более чем на 180° в ту или иную сторону.

Оптическая часть является наиболее ценной частью микроскопа. Она состоит из объективов и окуляра.

Окуляр (от лат. *oculus* – глаз) состоит из двух плосковыпуклых линз, заключенных в общую металлическую оправу. Верхняя линза – глазная (увеличивающая), нижняя – собирающая. Расстояние между линзами равно полусумме их фокусного расстояния. У окуляров с большим увеличением фокус короче, поэтому меньше и длина окуляра. Между линзами имеется диафрагма, ограничивающая поле зрения и задерживающая краевые лучи света. Отечественные микроскопы снабжены тремя сменными окулярами, увеличение которых указано на корпусе окуляра (x7; x10; x15).

Объективы ввинчиваются в гнезда револьверного устройства и состоят из системы линз, заключенных в металлическую оправу. Передняя (фронтальная) линза объектива является самой маленькой и единственной, дающей увеличение. Остальные линзы в объективе только исправляют недостатки полученного изображения (явления сферической и хроматической аберрации) и называются коррекционными.

В гнезда револьверного устройства ввинчиваются четыре объектива, увеличение которых указано на корпусе объектива (x8; x20; x40; x90 или 100). Каждый объектив характеризуется своим фокусным расстоянием (расстоянием между предметным стеклом и фронтальной линзой): объектив x8 имеет фокусное расстояние около 9 мм, объектив x40 – 0,65 мм, объектив x90 – 0,15 мм.

Объективы подразделяются на сухие и иммерсионные.

При работе с сухими объективами (x8, x20, x40) между фронтальной линзой и препаратом находится воздух. В этом случае

лучи света проходят среды с различными показателями преломления (покровное стекло, воздух), часть их отклоняется и не попадает в объектив.

При работе с иммерсионными объективами (x90 или x100) для устранения светорассеяния расстояние между фронтальной линзой объектива и препаратом заполняют иммерсионным (кедровым) маслом, показатель преломления лучей света которого близок к показателю преломления лучей света, проходящего через стекло.

Общее увеличение микроскопа определяется как произведение увеличения объектива на увеличение окуляра. Например, если в работе используют окуляр x15, а под тубусом находится объектив x90, то увеличение рассматриваемого с помощью микроскопа объекта составит x1350.

Осветительная часть микроскопа состоит из двухлинзового конденсора, ирис-диафрагмы и патрона с низковольтной лампочкой накаливания, питающейся через понижающий трансформатор от сети напряжения 120 - 220 В.

Конденсор служит для лучшего освещения препарата. Он собирает световые лучи в пучок и направляет их через отверстие предметного столика на препарат. С помощью рукоятки для перемещения кронштейна конденсора его можно перемещать вверх и вниз, благодаря чему меняется угол сходимости лучей и, следовательно, степень освещения объекта. Чем выше положение конденсора, тем лучше освещен препарат.

Ирис-диафрагма располагается под конденсором и служит для регулировки потока света, поступающего в конденсор. Она состоит из металлических серповидных пластинок. Расширить или сузить отверстие диафрагмы можно с помощью специального рычажка. При вращении его по часовой стрелке отверстие ирис-диафрагмы увеличивается и, следовательно, увеличивается степень освещения объекта.

При работе с иммерсионными объективами степень освещения препарата должна быть максимальной, поэтому шторку ирис-диафрагмы открывают, а конденсор поднимают в крайнее верхнее положение.

При работе с сухими объективами, как правило, рассматривают неокрашенные объекты. Для достижения контрастности конденсор опускают вниз, а отверстие ирис-диафрагмы уменьшают.

Правила работы с микроскопом

1. На рабочем столе микроскоп ставят тубусодержателем к себе на расстоянии 3-5 см от края стола.

2. Включают микроскоп в сеть и устанавливают правильное освещение.

3. На предметный столик помещают исследуемый препарат и закрепляют его клеммами.

4. Под тубус помещают нужный объектив и с помощью макро- и микровинтов устанавливают фокусное расстояние. Так, при работе с иммерсионными объективами на препарат предварительно наносят каплю иммерсионного масла и осторожно опускают тубусодержатель макровинтом до соприкосновения со стеклом. Затем, внимательно смотря в окуляр, очень медленно поднимают тубусодержатель, вращая его против часовой стрелки, до тех пор, пока не увидят изображение. Точную наводку объектива на фокус производят микрометрическим винтом. При работе с сухими объективами препарат вначале рассматривают с объективом х8. Поднимая с помощью макровинта тубусодержатель и внимательно смотря в окуляр, устанавливают фокусное расстояние (около 9 мм) и добиваются четкости изображения, используя микрометрический винт. Далее, двигая предметный столик или предметное стекло, устанавливают в центр поля тот участок препарата, в котором лучше всего виден изучаемый объект. Затем, вращая револьверное устройство вокруг своей оси, под тубус помещают объектив на х20 или х40. При этом под тубус не должен попасть объектив х90. В револьверном устройстве объективы располагаются таким образом, что если найдено изображение с объективом х8, то при рассмотрении препарата с объективами большего увеличения нужно слегка подрегулировать четкость изображения с помощью макро- и микрометрических винтов.

5. Во время микрокопирования необходимо держать оба глаза открытыми и пользоваться ими попеременно.

6. После окончания работы следует убрать препарат с предметного столика, опустить вниз конденсор, поставить под тубус объектив х8, удалить мягкой тканью или марлей, смоченной в спирте, иммерсионное масло с фронтальной линзы объектива х90, под объектив положить марлевую салфетку, опустить тубусодержатель.

Виды микроскопии

Основными характеристиками микроскопа являются общее увеличение и разрешающая способность.

Общее увеличение не характеризует качества изображения, которое может быть четким и нечетким. Четкость получаемого изображения определяется разрешающей способностью микроскопа, т.е. той наименьшей величиной объектов или их деталей, которые можно увидеть с помощью этого прибора. Разрешающая способность зависит от длины проходящего через объект света, показателя преломления оптической среды (показатель преломления воздуха равен 1,0; иммерсионного масла – 1,516; стекла – 1,520) и апертурного угла объектива. Эту зависимость вывел немецкий физик Эрнст Аббе во второй половине XIX века:

$$d = \lambda / 2 n \sin \alpha,$$

где: d – минимальное расстояние между двумя точками, видимыми раздельно;

λ - длина волны света, проходящего через исследуемый объект;

$n \sin \alpha$ - числовая апертура,

n – показатель преломления светом оптической среды,

α - апертурный угол объектива.

Микроскопия в темном поле

Используется для исследования слишком малых и слабоконтрастных живых объектов. При микроскопии этим методом используют специальный конденсор темного поля, центр которого затемнен. Поэтому центральный пучок световых лучей не попадает в объектив и поле зрения микроскопа остается темным. Объект освещается только лучами, попадающими на него под углом. Рассеиваясь на объекте, часть лучей изменяет направление и попадает на объектив. Объект становится видимым как светящаяся точка на темном фоне. Метод темного поля позволяет получить представление о внешней форме живых неокрашенных объектов и их движении.

Микроскопия в темном поле позволяет увеличить разрешающую способность объектива примерно в 10 раз и рассматривать объекты, размеры которых находятся за пределами обычного микроскопа.

Повышение разрешающей способности достигается за счет увеличения апертурного угла.

Фазово-контрастная микроскопия

Дает возможность изучать живые объекты без окраски и фиксирования. Глаз человека реагирует на изменения амплитуды световой волны (интенсивность, контрастность) и ее длины (цвет), но не воспринимает различий по фазе. В биологических препаратах чередуются места, которые в разной степени поглощают свет. Проходя через них, световые волны изменяют свою амплитуду. Такие участки объекта называют амплитудными и под микроскопом выглядят более темными. Прозрачные в видимом свете структурные элементы объектов пропускают лучи одинаковой длины и амплитуды, но смещают их фазу. Величина смещения зависит от толщины и показателя преломления структур, но видимых изменений практически не дает. Такие препараты являются неконтрастными.

С помощью фазово-контрастного устройства фазовые изменения световых волн, проходящих через прозрачные объекты, превращаются в амплитудные, благодаря чему детали рассматриваемых объектов становятся видимыми и контрастными.

Фазово-контрастное устройство дает возможность изучать структуры клеток: жгутики и оболочки бактерий, ядра и митохондрии дрожжей и грибов.

Таким образом, хотя разрешающая способность при использовании фазово-контрастной микроскопии не меняется при сравнении со светопольной, качество изображения улучшается за счет повышения контрастности.

Люминесцентная микроскопия

Люминесцентная микроскопия позволяет изучать клетки в живом виде, выявлять мембранные структуры и получать высококонтрастные цветные изображения микроорганизмов.

Сущность явления люминесценции заключается в том, что некоторые молекулы структурных элементов клетки (пигменты, витамины, алкалоиды и др.) способны поглощать часть энергии падающего света определенной длины волны, переходить в электронно-возбужденное состояние и испускать свет с другой длиной волны. Источником возбуждения могут быть

ультрафиолетовые лучи (300-400 нм) и видимый свет коротковолновой области спектра (400-460 нм).

Клетки микроорганизмов обладают слабой собственной (первичной) люминесценцией. Ее можно усилить предварительным окрашиванием препаратов нетоксическими красителями – флуорохромами (акридин оранжевый, нейтральный красный, аурамин, флуоресцин и др.). В результате возникает вторичная люминесценция. Для ее возбуждения достаточно использовать синевioletовую часть спектра. В результате возникает высококонтрастное цветное изображение рассматриваемого объекта.

Таким образом, при использовании люминесцентной микроскопии разрешающая способность микроскопа возрастает по сравнению со светопольной микроскопией за счет уменьшения длины волны проходящего через объект света.

Электронная микроскопия

Максимальная разрешающая способность оптических микроскопов составляет около 0,2 мкм и зависит от длины волны используемых лучей света. Увеличить разрешение в 100 и более раз можно, если вместо световых или ультрафиолетовых лучей применять поток движущихся электронов, обладающих волновыми свойствами (длина волны около 0,04 нм).

Поток электронов движется в безвоздушном пространстве от источника электронов (раскаленная нить вольфрамовой пушки) по направлению к флуоресцентному экрану и вызывает равномерное свечение его. Если же на пути электронов поместить какой-либо объект, то в зависимости от его плотности электроны будут больше или меньше задерживаться, а соответствующие места на экране окажутся более или менее затемненными. Этот простой принцип работы современного электронного микроскопа дополнен принципом отклонения электронных лучей в магнитном поле подобно тому, как световые лучи отклоняются увеличивающими стеклянными линзами. При этом используются электромагнитные линзы.

Высокая разрешающая способность современных электронных микроскопов позволяет наблюдать и изучать объекты, невидимые в оптических микроскопах: вирусы и фаги, микоплазмы, строение клеток прокариотов и эукариотов, их макро- и микроструктурные элементы. Препараты для электронной микроскопии готовят в виде очень тонких срезов на специальных ультрамикротомегах или на

тончайших пленках – подложках из коллодия. Следовательно, в электронных микроскопах микроорганизмы исследуют не в живом состоянии, а в виде фиксированных препаратов.

Вопросы к защите лабораторной работы

1. Каково устройство биологического микроскопа?
2. Из каких частей и механизмов состоит механическая часть микроскопа?
3. Назовите основные характеристики микроскопа?
4. Что понимают под разрешающей способностью микроскопа? Как она определяется?
5. Что составляет оптическую систему микроскопа?
6. Объективы бывают сухие и иммерсионные. Что это значит?
7. Как определяется общее увеличение микроскопа?
8. Что входит в состав осветительной системы микроскопа?
9. Как следует настроить осветительную систему при работе с иммерсионным объективом?
10. Какие существуют правила работы с микроскопом?
11. Какие особенности устройства и принципы работы темнопольного, фазово-контрастного, люминесцентного и электронного микроскопов?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 2

ИЗУЧЕНИЕ СТРОЕНИЯ РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКИ

Цель работы: изучить растительные клетки (эпидермиса лука, клубней картофеля); уметь распознавать эукариотические клетки на основе знаний общего строения клетки, идентифицировать в клетках ядро, цитоплазму, наружную мембрану.

Объекты исследования: луковица, клубень картофеля.

Оборудование и реактивы: световой микроскоп, покровные и предметные стекла, ножницы, скальпель, пинцет, раствор Люголя.

Изучение клеток эпидермиса лука

Ход работы: Для того чтобы изготовить временный препарат, пинцетом или препаровальной иглой снимите эпидерму с выпуклой поверхности чешуи лука. Затем отрежьте ножницами кусочек пленки

размером несколько квадратных миллиметров. Положите этот кусочек в каплю воды на предметном стекле, наберите пипеткой раствор йода, капните каплю йода на пленку лука и накройте покровным стеклом.

Рассмотрите препарат сначала на малом увеличении. Потом участок из одного слоя клеток с ясно заметными ядрами и цитоплазмой. На препарате хорошо видна группа вытянутых, почти прямоугольных клеток. Крупные округлые ядра в клетках окрашены йодом в желто-коричневый цвет.

Переведите объективы микроскопа на увеличение $\times 40$ и найдите двухконтурную оболочку клетки. Стенки клеток остаются бесцветными. Обратите внимание на их толщину. При внимательном рассмотрении видна зернистая структура цитоплазмы. В молодых клетках округло-овальное ядро обычно располагается в центральной части и окружено цитоплазмой, оно, как правило, содержит одно или два ядрышка. Между тяжами цитоплазмы расположены вакуоли, заполненные клеточным соком. В старых клетках ядро лежит в пристенном слое цитоплазмы, а всю центральную часть занимает большая вакуоль.

Зарисуйте несколько клеток. На рисунке должны быть обозначены: 1) оболочка; 2) цитоплазма; 3) ядро; 4) вакуоли (если они видны).

Изучение клеток клубня картофеля

Скальпелем сделайте соскоб с поверхности куска клубня картофеля. На предметное стекло нанесите каплю воды. Поместите туда соскобленные клетки, накройте их покровным стеклом. Рассмотрите препарат на малом увеличении микроскопа. При большом увеличении видны крупные, многоугольные прозрачные клетки с тонкими двухконтурными оболочками. В этих клетках найдите крахмальные зерна. Зерна могут быть различной величины с четко выраженной сферической слоистостью. Нанесите на край покровного стекла каплю раствора Люголя. Крахмальные зерна окрасятся в синий цвет. При этом их слоистость будет более заметна.

Зарисуйте 3 или 4 клетки. На рисунке должны быть обозначены: 1) оболочка; 2) крахмальные зерна.

Вопросы к защите лабораторной работы

1. Отличие клеток эпидермиса лука от картофеля?
2. Зернистая структура цитоплазмы характерна как для лука, так и для картофеля?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 3

ВЛИЯНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ РАСТВОРОВ НА РАСТИТЕЛЬНУЮ КЛЕТКУ

Цель работы: изучить влияние растворов различных концентраций на растительную и животную клетку.

Объекты исследования: клетки эпидермиса лукавицы.

Оборудование и реактивы: микроскоп, покровные и предметные стекла, ножницы, скальпель, пинцет, 5%-ный и 10%-ный растворы NaCl.

Плазматическая мембрана не только ограничивает внутреннюю среду клетки от внешней и поддерживает эти различия на протяжении всей жизни, но и обладает жизненно важным свойством — полупроницаемостью, т.е. избирательного пропускания в клетку и выхода из нее различных молекул и ионов. Благодаря этому в клетке создается и поддерживается соответствующая концентрация ионов и осуществляются осмотические процессы.

Осмоз — это диффузия воды через полупроницаемую мембрану, вызванная разностью концентраций в клетке и вне ее. Если клетку поместить в гипотонический раствор, то создается градиент водного потенциала: снаружи концентрация воды будет значительно выше, чем внутри. В силу этого вода поступает внутрь клетки по градиенту своей концентрации и при этом мембрана избирательно пропускает только молекулы воды. В гипертоническом растворе (более концентрированном извне) вода под действием осмотических сил выходит из клетки. Например, эритроциты в таком растворе сморщиваются, а в растительной клетке наблюдается уменьшение вакуоли и цитоплазма отстает от клеточной стенки. Это называется явлением плазмолиза. Если после этого добавить обычную воду, то гипертонический раствор превратится в гипотонический. Вода начнет поступать в цитоплазму, которая в результате займет прежний объем.

Это явление называется деплазмолизом. После деплазмолиза клетка придет в состояние нормального тургора.

Так как концентрация ионов и молекул различных соединений в растительной клетке выше, чем в окружающей среде (например, почве), то в клетке развивается сосущая сила, которая приводит к поглощению воды извне. В результате клетка набухает и создает внутреннее гидростатическое давление, направленное на клеточную стенку. Этому давлению, называемому тургорным давлением, противостоит равное ему по величине механическое давление клеточной стенки, направленное внутрь клетки. По мере поступления воды в клетку осмотическое давление (Р) клеточного сока и сосущая сила (S) уменьшаются, а тургорное (Т) давление вырастает до тех пор, пока они не уравновесят друг друга. После этого поглощение воды прекращается: $S=P-T$.

При полном плазмолизе тургор равен нулю, а сосущая сила клетки равна всей величине ее осмотического давления. В случае полного насыщения клетки водой тургорное давление равно осмотическому: $T=P$, вследствие чего сосущая сила будет равна нулю ($P-T=0$), и поступление воды в клетку прекращается.

Ход работы: приготовьте временный препарат из эпидермиса лука (см. работу №2).

В приготовленном препарате необходимо заменить воду гипертоническим раствором NaCl. Чтобы замена прошла постепенно, нанесите на один край покровного стекла каплю 10%-ного раствора NaCl, а с противоположной стороны положите полоску фильтровальной бумаги, которая впитает часть воды. Наблюдайте за состоянием цитоплазмы в клетках при большом увеличении микроскопа. Вода из цитоплазмы клеток будет переходить в окружающую гипертоническую среду, объем цитоплазмы при этом уменьшится, и она начнет отходить от клеточных стенок. Постепенно цитоплазма полностью отойдет от стенок клетки, приобретет форму шара, то есть произойдет плазмолиз.

Если после этого под покровное стекло добавить обычную воду, то гипертонический раствор превратится в гипотонический. Вода начнет поступать в цитоплазму, которая в результате займет прежний объем. То есть будет наблюдаться деплазмолиз. После деплазмолиза клетка придет в состояние нормального тургора.

Зарисуйте несколько клеток в состоянии плазмолиза и деплазмолиза.

Вопросы к защите лабораторной работы

1. Назовите основные органоиды растительной клетки.
2. Дайте определения осмоса, плазмолиза, деплазмолиза.
3. Что такое изотонический, гипотонический, гипертонический раствор?
4. Дайте определение тургорного давления.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 4

ТЕХНИКА ОТБОРА ЧИСТЫХ КУЛЬТУР МИКРООРГАНИЗМОВ

Цель работы: освоить технику отбора чистых культур микроорганизмов и методику приготовления живых и фиксированных препаратов клеток бактерий и грибов.

Объекты исследований: чистые культуры *Staphylococcus albus*, *Sarsina flava*, *Esherichia coli*, *Bacillus subtilis* из естественных мест обитания микроорганизмов (кефира, зубного налета). Культуры грибов родов *Mucor*, *Aspergillius*, *Penicillium*, *Altenaria*.

Оборудование и реактивы: микроскоп, бактериологические петли, предметные и покровные стекла, спиртовка; иммерсионное масло; фильтровальная бумага; краска Муромцева; фуксин; лоток с рельсами; промывалка, 96%-ный этиловый спирт.

Техника отбора чистых культур микроорганизмов

Отбор проб чистых культур бактерий и дрожжей, которые вырастают на поверхности плотной среды в виде мажеобразного налета или в жидкой среде ведут в следующей последовательности:

1. Зажигают спиртовку.
2. Пробирку с культурой помещают в левую руку между большим и указательным пальцем в наклонном положении. Поверхность с налетом микроорганизмов должна быть обращена вверх и хорошо видна.
3. Петлю держат вертикально в пламени горелки и прокалывают докрасна, затем наклоняют и обжигают примыкающую к ней часть петледержателя.

4. Мизинцем и безымянным пальцем правой руки прижимают к ладони наружную часть ватной пробки, вынимают ее из пробирки и держат в таком положении, не касаясь окружающих предметов.

5. Края открытой пробки обжигают в пламени горелки.

6. Осторожно вводят стерильную петлю в пробирку с культурой и охлаждают ее о стенки пробирки или прикоснувшись к питательной среде, свободной от микроорганизмов. Немного отстранив пробирку с культурой от пламени горелки, легким движением осторожно отбирают небольшое количество микробной массы с поверхности среды или каплю жидкости с клетками. Вынимая петлю из пробирки, следят за тем, чтобы отобранный материал не касался стенок, и петля не оказалась над пламенем горелки.

7. Снова обжигают в пламени горелки край пробирки, затем, легким круговым движением, обжигают ватно-марлевою пробку и закрывают пробирку.

8. Пробирку с культурой ставят в штатив, а извлеченный материал используют для приготовления препарата.

9. Клетки микроорганизмов, оставшиеся на петле, сжигают в пламени горелки.

Отбор чистых культур микроскопических грибов ведут с использованием препаровальной иглы в той же последовательности, что и отбор одноклеточных организмов. Из пробирки отбирают кусочек мицелия, слегка погружая иглу в питательную среду таким образом, чтобы не нарушить структуру мицелия.

Оформление и анализ результатов исследований

В отчете студенты должны кратко законспектировать теоретический материал. Наблюдаемые под микроскопом картины нужно зарисовать и сделать заключение о морфологии исследованных чистых культур, а также микрофлоры кефира и зубного налета. Под рисунками необходимо указать увеличение и подписать название изучаемого объекта.

Вопросы к защите лабораторной работы

1. Как проводится отбор проб чистой культуры микроорганизма?

2. Методы приготовления препаратов «живых» клеток?
3. Особенности окрашивания простыми методами?
4. Перечислите основные этапы приготовления фиксированного окрашенного препарата?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 5

ИЗУЧЕНИЕ МОРФОЛОГИИ БАКТЕРИЙ. ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ ОКРАСКИ БАКТЕРИЙ

Цель работы: ознакомиться с морфологическим разнообразием бактерий и основными признаками, используемыми при их идентификации. Изучить различные сложные и дифференциальные методы окраски бактерий и их структур и разобраться в сущности этих методов и цели их использования. Освоить технику окраски бактерий по Граму и спор бактерий по Шефферу-Фултону.

Объекты исследований: чистые культуры бактерий: *Staphylococcus albus*; *Sarsina flava*; *Escherichia coli*; *Vacillus subtilis*.

Оборудование, материалы: микроскоп; бактериологические петли; предметные стекла; спиртовка; иммерсионное масло; фильтровальная бумага; набор красок для окраски по Граму (фильтровальные бумажки с генцианвиолетом, растворы Люголя и фуксина рабочего) и окраски спор по Шефферу-Фултону (растворы бриллиантовой зелени и сафранина); 96 %-ный этиловый спирт; лоток с рельсами для предметных стекол; промывалка.

Определение систематической принадлежности микроорганизмов – сложная задача, требующая длительных наблюдений, значительного количества специфических исследований и биохимических анализов. При идентификации микроорганизмов учитывают:

☐ морфолого-цитологические признаки. К ним относятся строение, форма и размеры клеток, их взаимное расположение, тинкториальные свойства (особенности при окрашивании различными красителями), способность к образованию спор и капсул, подвижность, наличие жгутиков, образование в клетках некоторых включений, особенности размножения;

☐ физиолого-биохимические признаки. При изучении физиолого-биохимических признаков устанавливают отношение микроорганизмов к различным источникам углерода и азота,

потребность в кислороде, температурные границы роста, солеустойчивость, чувствительность к антибиотикам, ферментативные тесты;

□ культуральные признаки. К таким признакам относятся особенности роста микроорганизмов на плотных и жидких питательных средах.

При идентификации бактерий рекомендуется также учитывать дополнительные признаки: серологические свойства, фагоустойчивость, химический состав клеточных стенок, содержание отдельных нуклеотидов в нуклеоиде (единственной хромосоме бактерий – молекуле ДНК, состоящей из двух спирально закрученных цепочек нуклеотидов, замкнутых в кольцо).

Чем больше у различных микроорганизмов общих признаков, тем ближе они находятся друг к другу по степени родства.

Основными признаками, позволяющими распределить микроорганизмы на группы, являются морфологические признаки, которые легко и достаточно быстро можно определить с помощью микроскопа.

Морфологические признаки бактерий

Бактерии объединяют обширную группу в основном одноклеточных микроорганизмов, разнообразную по форме, размерам и обмену веществ. Они являются прокариотными микроорганизмами.

При дифференциации бактерий путем микроскопии учитывают размеры и формы клеток, их взаимное расположение, химический состав и строение клеточных стенок, способность образовывать споры и капсулы, подвижность.

Основными формами бактерий, которые присутствуют в пищевом сырье, а также в продуктах растительного и животного происхождения, являются сферические бактерии (кокки) и палочковидные бактерии (палочки).

К основным морфологическим признакам кокков относятся их размеры (диаметр кокков в среднем составляет 1-2 мкм) и взаимное расположение. Взаимное расположение кокков определяется направлением образования перегородок при делении клеток. Если после деления клетки расходятся и располагаются поодиночке, то такие формы называются монококками или микрококками. Если при делении образуются скопления, напоминающие виноградные грозди,

их относят к стафилококкам. Кокки, остающиеся после деления в одной плоскости связанными парами, называются диплококками, а образующие разной длины цепочки – стрептококками. Сочетания из четырех кокков, появляющиеся после деления клетки в двух взаимно перпендикулярных плоскостях, представляют собой тетракокки. Если кокки делятся в трех взаимно перпендикулярных плоскостях, то они образуют скопления кубической формы ☐ сарцины.

Основными морфологическими признаками палочковидных бактерий, которые определяются путем микроскопии, являются размеры палочек (средняя длина палочек составляет 2-7 мкм, диаметр в поперечнике равен 0,5-1 мкм), взаимное расположение клеток, способность образовывать споры, подвижность.

Палочковидные бактерии могут располагаться поодиночке, попарно (диплобактерии) и цепочками (стрептобактерии).

При микроскопии легко можно определить спорообразующие и не спорообразующие формы палочковидных бактерий. Вегетативные клетки хорошо адсорбируют красители на своей поверхности и полностью окрашиваются. Оболочка споры малопроницаема, краски в них почти не проникают и под микроскопом споры имеют вид округлых или овальных блестящих зерен. Палочки, образующие споры, называются бациллами и клостридиями. У бацилл размер споры не превышает ширину клетки и поэтому при образовании споры форма клетки не меняется. У клостридий диаметр споры больше толщины клетки и поэтому при созревании споры клетка приобретает форму веретена (если спора располагается в центре клетки) или барабанной палочки (если спора располагается на одном из полюсов клетки).

При идентификации палочек диагностическое значение имеет также расположение спор в клетках бацилл и клостридий, наличие и расположение жгутиков, способность образовывать капсулы.

Дифференциальные методы окраски бактерий

Различают простые, сложные и дифференциальные методы окраски бактерий. При простой окраске используют один краситель и прокрашивают всю клетку. Сложное окрашивание предусматривает применение двух или нескольких красителей (например, при определении отношения бактерий к окраске по Граму). Дифференциальное окрашивание основано на индивидуальном отношении биологических структур клетки к различным красителям

(окраска спор, оболочки, капсул, метакроматина и др.). При этом так же, как и в сложных методах, как правило, используется несколько красителей.

Сложные методы окраски позволяют распределить бактерии на группы, что имеет важное диагностическое значение при их идентификации. Среди сложных методов наиболее широкое применение нашел метод окраски бактерий по Граму, позволяющий разделить бактерии в зависимости от химического состава и структуры клеточной стенки на две основные группы – грамположительные (грам "+"; G^+) и грамотрицательные (грам "-"; G^-). Грамположительные бактерии по этому методу окрашиваются в сине-фиолетовый цвет, а грамотрицательные – в розовый. К сложным методам относится и метод окраски по Цилю-Нильсену, позволяющий дифференцировать бактерии на две группы по кислотоустойчивости. Этот метод позволяет выявить туберкулезную палочку, бактерии паратуберкулезного энтерита крупного рогатого скота и другие кислотоустойчивые микроорганизмы.

При использовании дифференциальных (специальных) методов можно окрасить споры, определить наличие в клетках запасных питательных веществ, выявить клеточные структуры.

При окраске спор, например, можно использовать различные методы (методы Шеффера-Фултона, Пешкова, Златогорова, Меллера и др.), основанные на разрыхлении малопроницаемой для красителей оболочки спор различными способами (путем нагревания, обработки препарата кислотами, щелочами) с одновременным или дальнейшим их окрашиванием концентрированным красителем. После такой обработки препарат промывают водой (при этом клетки обесцвечиваются, а споры остаются окрашенными) и докрашивают вегетативные клетки красителем контрастного цвета.

Большое значение с диагностической точки зрения имеет окрашивание капсул. Капсульные вещества слабо окрашиваются и при простом методе окраска выступает в виде бледной каймы бесцветного или слабоокрашенного ореола вокруг микробной клетки. Для того чтобы лучше рассмотреть капсулы, используют методы Михина, Муромцева, Ольта, Бурри-Гинса и др. В этих методах используют один или несколько красителей. Так, для окраски капсул по Бурри-Гинсу, суспензию слизеобразующих бактерий смешивают на краю предметного стекла с каплей туши и с помощью другого предметного стекла распределяют тонким слоем по поверхности.

Далее препарат фиксируют над пламенем горелки и окрашивают фуксином или сафранином. При микроскопии такого препарата на темном фоне отчетливо выделяются окрашенные в красный цвет бактерии, окруженные бесцветными капсулами.

С другими специальными методами, позволяющими определить наличие и содержание запасных веществ в клетках (определение гликогена и волютина), студенты ознакомятся при исследовании качества производственных дрожжей.

Ход работы: на занятии студенты знакомятся с основными признаками, которые учитываются при идентификации микроорганизмов, обращают внимание на морфологические признаки кокков и палочек, диагностическое значение сложных и дифференциальных методов окраски бактерий. Осваивают технику окраски бактерий по методу Грама. Определяют, какие из представленных для исследования бактерии относятся к грамположительным, а какие к грамотрицательным. Готовят фиксированный мазок из чистой культуры спорообразующих бактерий *Bacillus subtilis* и окрашивают его по Шефферу-Фултону.

Приготовление препаратов живых клеток

Микроорганизмы в живом состоянии рассматривают в препаратах «раздавленная капля» и «висячая капля». Оба метода применяют для выявления подвижности клеток, изучения размеров, определения запасных питательных веществ клетки.

Для получения любых микроскопических препаратов важно правильно подготовить предметные стекла. Они должны быть чистыми и тщательно обезжиренными. Для этого стекла, бывшие в употреблении, выдерживают 1–2 часа в хромовой смеси (в 1 л воды вносят 50 г бихромата калия и 100 г технической серной кислоты), после чего ополаскивают теплой водой и спиртом. Можно также кипятить стекла в течение 15 мин в растворе соды или мыльной воды. Для проверки чистоты стекла на его поверхность наносят каплю воды, которая при достаточном обезжиривании равномерно растекается по стеклу. Стекла берут пинцетом или аккуратно за края, т.к. пальцы оставляют на поверхности жирные пятна.

Препарат «раздавленная капля». На обезжиренное предметное стекло наносят небольшую каплю воды. В нее вносят петлей или иглой культуру или другой исследуемый материал, после чего хорошо размешивают до получения слабомутой суспензии. При

рассмотрении микроорганизмов в жидких средах каплю воды на предметное стекло можно не наносить.

Каплю накрывают покровным стеклом, обратным концом петли прижимают покровное стекло к предметному. Излишек воды убирают фильтровальной бумагой. Препарат немедленно исследуют во избежание высыхания. Микроскопируют с объективами на х8, х10, х20 и х40.

Препарат «висячая капля». Для приготовления препарата используют предметные стекла с круглым отшлифованным углублением в лункой. Края лунки смазывают вазелином. На середину обезжиренного покровного стекла наносят маленькую каплю суспензии микроорганизмов, переворачивают его каплей вниз и осторожно прижимают к вазелиновому кольцу. Капля должна располагаться в центре лунки, не касаясь ее краев и дна.

В препарате «висячая капля» микроорганизмы находятся в герметически закрытой камере, что позволяет изучать их в течение нескольких дней, наблюдая за ростом и размножением микроорганизмов, образованием и прорастанием спор, подвижностью клеток.

Приготовление препаратов фиксированных клеток

Фиксированными считают клетки микроорганизмов, в которых прерваны жизненные процессы, но полностью сохранена тонкая структура.

Для получения фиксированных препаратов важно правильно подготовить предметные стекла. Они должны быть чистыми и тщательно обезжиренными. Для этого стекла, бывшие в употреблении, выдерживают 1–2 часа в хромовой смеси (в 1 л воды вносят 50 г бихромата калия и 100 г технической серной кислоты), после чего ополаскивают теплой водой и спиртом. Можно также кипятить стекла в течение 15 мин. в растворе соды или мыльной воды. Для проверки чистоты стекла на его поверхность наносят каплю воды. При достаточном обезжиривании капля растекается равномерно и не собирается в выпуклые, медленно высыхающие пузырьки. Берут стекла пинцетом или аккуратно за грани, так как пальцы оставляют на поверхности жирные пятна.

Приготовление фиксированных препаратов ведут в следующей последовательности:

1. На середину чистого обезжиренного предметного стекла стерильной петлей наносят небольшую каплю воды. В нее вносят исследуемый материал. Полученную суспензию равномерно распределяют по поверхности стекла тонким слоем таким образом, чтобы препарат распределился на площади примерно 2...3 см².

2. Полученный мазок высушивают при комнатной температуре на воздухе.

3. Производят фиксацию мазка. Для этого стекло с высохшим мазком проводят 3 – 4 раза над пламенем горелки той стороной, где мазок отсутствует. Цель фиксации:

4. Умертвить клетки микроорганизмов и сделать их безопасными (что особенно важно при работе с патогенными микроорганизмами);

5. Зафиксировать (закрепить) мазок на стекле (чтобы он не смывался при окрашивании);

6. Улучшить окрашивание, поскольку мертвые клетки лучше адсорбируют на своей поверхности различные красители.

Приготовление фиксированных препаратов из естественных мест обитания микроорганизмов проводится так же, как и из чистых культур.

Помимо термической обработки, применяют также фиксацию химическими веществами: погружают предметное стекло с мазком в мензурку с 96%-ным этанолом на 15 – 20 мин, с ацетоном на 5 мин, со смесью 96%-ного этанола и 40%-ного формалина (соотношение 95:5) на 2 мин. и др.

Окраска фиксированных препаратов микроорганизмов простыми методами

Фиксированные препараты нельзя рассмотреть под микроскопом, так как они являются бесцветными и пропускают световые лучи. Поэтому их окрашивают, используя простые или сложные методы.

При окрашивании фиксированных мазков простыми методами используют один краситель (фуксин, краска Муромцева, генцианвиолет, метиленовая синь и др.).

Последовательность окрашивания мазка простыми методами следующая:

1. На фиксированный препарат наносят несколько капель красителя таким образом, чтобы он покрывал всю поверхность мазка

и выдерживают в течение определенного времени. Так, при окраске фуксином на мазок наносят несколько капель красителя и выдерживают его на мазке 2-3 мин. При окрашивании препарата из кефира на него краску Муромцева наносят на мазок через полоску фильтровальной бумаги на 3-5 мин.

2. Краску смывают с мазка слабой струей до бесцветной смывной воды. При этом стекло держат в наклонном положении над лотком.

3. Мазок подсушивают фильтровальной бумагой, которую осторожно прикладывают к стеклу, и досушивают на воздухе.

4. На окрашенный мазок наносят каплю иммерсионного масла и рассматривают препарат с объективом x90 или x100.

Окраска бактерий по методу Грама

Сущность метода заключается в различии химического состава и строения клеточной стенки грамположительных и грамотрицательных бактерий.

Клеточная стенка «грам+» бактерий толстая, но однослойная, содержит много пептидогликана – муреина, а также тейховые кислоты, которые образуют прочное соединение с красителями генцианвиолетом и йодом и поэтому остаются окрашенными после обработки мазка спиртом. Таким образом, грам+ бактерии по методу Грама окрашиваются в сине-фиолетовый цвет.

У «грам-» бактерий клеточная стенка тонкая, но двухслойная. Муреина мало, причем он содержится во внутреннем слое клеточной стенки, тейховые кислоты отсутствуют. Внешний слой клеточной стенки содержит, главным образом, вещества, обладающие гидрофобными свойствами – липополисахариды и липопротеиды. Эти вещества не образуют прочного комплекса с красками генцианвиолетом и йодом и поэтому клетки обесцвечиваются после обработки 96%-ным этиловым спиртом и после дополнительной окраски красителем фуксином окрашиваются в бледно-розовый цвет.

Техника окраски по Граму

1. На предметном стекле готовят фиксированный мазок исследуемой чистой культуры.

2. Мазок окрашивают красителем генцианвиолетом через полоску фильтровальной бумаги. Можно также использовать заранее приготовленные фильтровальные бумажки, смоченные 1%-ным

спиртовым раствором кристаллвиолета и высушенные (метод Грама в модификации А.В. Синева). В этом случае бумажки помещают на фиксированный мазок и смачивают несколькими каплями воды. Окраску препарата проводят в течение 2 - 3 мин.

3. Фильтровальную бумагу снимают с мазка, краску сливают и наносят на мазок раствор Люголя на 2 мин.

4. Раствор Люголя сливают с мазка и обрабатывают 96 %-ным спиртом в течение 30 - 60 сек. Затем препарат промывают водой и подсушивают фильтровальной бумагой.

5. Мазок окрашивают красителем фуксином 2...3 мин, второй раз промывают водой и подсушивают фильтровальной бумагой.

Затем на стекло наносят каплю иммерсионного масла и рассматривают препарат с объективом x90 или x100 при максимальном освещении.

Окраска спор бактерий по Шефферу-Фултону

Сущность метода заключается в комбинированном действии концентрированного раствора красителя бриллиантового зеленого и температуры на малопроницаемую оболочку спор с дальнейшим обесцвечиванием цитоплазмы вегетативной клетки и ее контрастным докрасиванием сафранином. Таким образом, споры окрашиваются в зеленый цвет, а клетки – в красный.

Техника окраски по Шефферу-Фултону

1. На краю предметного стекла (на расстоянии примерно 1,5 ÷ 2,0 см от края) готовят густой нефиксированный мазок из чистой культуры спорообразующих бактерий.

2. На раствор наносят водный раствор бриллиантовой зелени, и мазок с краской нагревают над пламенем горелки до появления пара. Нельзя допускать прикипания краски к мазку. Поэтому препарат периодически отстраняют от пламени. Нагревание мазка с краской проводят в течение 3 мин.

3. Краску сливают, препарат быстро промывают водой и просушивают фильтровальной бумагой;

4. Окрашивают мазок раствором сафранина 2...3 мин, затем краску сливают, мазок вторично промывают водой и подсушивают фильтровальной бумагой.

Далее на мазок наносят каплю иммерсионного масла и рассматривают под объективом на x90 или x100 при максимальном освещении.

Оформление и анализ результатов исследований

В отчете студенты кратко конспектируют теоретический материал и переписывают сущность и технику окраски бактерий по Граму и спор бактерий по Шефферу-Фултону. Зарисовывают микроскопические картины исследованных чистых культур бактерий с учетом морфологических особенностей каждого микроорганизма. Под каждым рисунком подписывают латинское название микроорганизма, отношение его к окраске по Граму, увеличение исследованного объекта.

Вопросы к защите лабораторной работы

1. Какие признаки учитывают при идентификации микроорганизмов. Какие признаки являются основными при дифференциации бактерий?
2. Как провести дифференциацию кокковых форм бактерий по их взаимному расположению?
3. Каким образом можно провести дифференциацию палочковидных бактерий по их внешнему виду?
4. Каково назначение сложных методов окраски бактерий? Какие сложные методы окраски бактерий Вам известны?
5. Для чего используются дифференциальные (специальные) методы окраски бактерий? Привести примеры.
6. В чем заключается сущность метода окраски бактерий по Граму?
7. Каким образом проводят окрашивание фиксированных препаратов бактерий по методу Грама?
8. В чем заключается сущность метода окрашивания бактериальных спор по Шефферу-Фултону?
9. Какова техника окраски спор бактерий по методу Шеффера-Фултона?
10. Какими методами можно выявить капсулы у бактерий? Как осуществляют окраску капсул по Бурри-Гинсу?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 6

ИЗУЧЕНИЕ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ И КУЛЬТУРАЛЬНЫХ ПРИЗНАКОВ МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ГРИБОВ

Цель работы: ознакомиться с морфологическими особенностями грибов встречающихся при производстве пищевых продуктов. Освоить технику микроскопического исследования грибов и дрожжей в препаратах «раздавленная капля».

Объекты исследований: культуры грибов родов *Mucor*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*.

Оборудование, материалы: микроскоп; препаровальные иглы и бактериологические петли; предметные и покровные стекла; фильтровальная бумага; спиртовка; лоток с рельсами для предметных стекол.

Морфология и культуральные признаки микроскопических грибов

Микроскопические грибы относятся к надцарству эукариот, царству грибов, отделу истинных грибов и являются представителями трех из четырех классов: фикомицетов, аскомицетов и дейтеромицетов. Представители царства грибов являются аэробными микроорганизмами и по типу питания относятся к хемоорганогетотрофам. Большинство грибов – сапрофиты, но некоторые вызывают заболевания и являются паразитами.

Вегетативное тело грибов называется мицелием. Мицелий состоит из множества переплетающихся нитей-трубочек, называемых гифами. Диаметр гифов колеблется от 5 до 50 мкм. В зависимости от строения мицелия грибы делятся на высшие и низшие. У высших грибов гифы разделены перегородками (септами), в центре которых имеется большая пора. В класс фикомицетов объединяются низшие грибы, представители классов аскомицетов и дейтеромицетов являются высшими грибами.

Грибы – это циноцитные микроорганизмы. Это значит, что они растут и при этом происходят деления ядер, но не происходит клеточных делений. Таким образом, вегетативное тело гриба представляет собой одну большую многоядерную клетку.

Все микроскопические грибы могут размножаться вегетативно кусочком мицелия.

При бесполом размножении у фикомицетов образуются спорангиеносцы, а у аскомицетов – конидиеносцы. Дейтеромицеты могут размножаться многоклеточными конидиями.

Фикомицеты и аскомицеты являются совершенными грибами. Это значит, что представители этих классов могут размножаться половым путем. Дейтеромицеты относятся к несовершенным грибам.

Культуральные признаки микроскопических грибов

Колонии микроскопических грибов по размерам во много раз превосходят колонии одноклеточных организмов (бактерий, грибов) и нередко разрастаются по всей поверхности питательной среды в чашках Петри. Консистенция грибных колоний различная. Чаще образуются войлокообразные и кожистые колонии, реже крошковатые. Поверхность колоний может быть пушистой, как вата, бархатистой, мучнистой, паутинообразной, нитевидной, кожистой или гладкой. При росте на плотных и жидких средах часть гифов врастает в питательную среду, образуя субстратный мицелий, а другая часть гифов образует воздушный мицелий в виде пушистого налета, видимого невооруженным глазом. Мицелий может быть также бесцветным (белым, сероватым) или окрашенным (черным, бурым, зеленым, желтым и т.д.). Пигментирован только плодоносящий мицелий.

Характеристика микроскопических грибов различных классов

Род *Mucor* относится к классу фикомицетов. Эти грибы имеют несептированный мицелий. Они могут размножаться бесполом и половым путем с образованием спорангиеносцев. Снаружи спорангий покрыт тонкими шипами из кристаллов щавелевокислого кальция. При созревании спорангий разрывается, спорангиеспоры высвобождаются и разносятся воздушными потоками. На спорангиеносце после освобождения спорангия от спор остается колонка, а в нижней ее части – воротник. Цвет мицелия мукоровых грибов вначале белый, затем серовато-оливковый, вид – войлокоподобный.

Мукоровые грибы растут на поверхности влажного зерна, солода, корнеплодов, на пищевых продуктах, на стенах сырых

помещений в виде сероватого пушистого налета. *Mucor nigricans* является возбудителем кагатной гнили сахарной свеклы. Многие мукоровые грибы используются в промышленности для производства различных органических кислот и спирта (грибы видов *Mucor javanicus*, *Mucor racemosus*), ферментных препаратов, каротиноидов, стероидов.

Представители родов *Aspergillus* и *Penicillium* относятся к классу аскомицетов, который объединяет высшие микроскопические совершенные грибы. При бесполом размножении с помощью спор эти грибы образуют конидиеносцы. Аспергиллы и пенициллы относятся к плодосумчатым грибам. Это значит, что при половом размножении у них на специальных плодовых телах образуются аски (сумки), в которых находятся 8 аскоспор.

К роду *Penicillium* относится около половины всех плесневых грибов. Они широко распространены в почве, в воздухе плохо проветриваемых помещений и вызывают порчу различных продуктов и материалов. Этот гриб имеет ветвящийся септированный мицелий (диаметр гифов – 2-3 мкм) и септированные конидиеносцы (напоминают кисточки), которые на конце разветвляются в виде отростков – стеригм. От них отходят конидии, состоящие из цепочек спор. В зависимости от вида конидии могут быть разного цвета (белые, зеленые и др.). Многие пенициллы используются в промышленности для получения различных ценных продуктов. Среди выделенных штаммов этого рода 25 % обладают антибиотической активностью, а такие виды как *Penicillium notatum*, *Penicillium chrysogenum* используются как продуценты пенициллина. Некоторые виды пенициллов используются как продуценты ферментов и липидов. В производстве мягких сыров рокфор и камамбер используются благородные плесени *Penicillium roqueforti* и *Penicillium camamberti*.

Грибы рода *Aspergillus* насчитывают более 200 видов. Эти грибы имеют хорошо развитый ветвящийся мицелий с многочисленными септами. Конидиеносцы несептированы, верхние их концы грушевидно или шаровидно расширены в виде небольшой головки. На головке располагаются кеглеобразные стеригмы с цепочками конидий, которые напоминают струйки воды, выливающиеся из лейки. Отсюда возникло название «леечная плесень» (*aspergere* по латыни – поливать, опрыскивать). Конидии аспергиллов при созревании приобретают различную окраску, что

наряду с другими признаками определяет их видовую принадлежность.

Так же как и пенициллы, представители рода *Aspergillus* широко распространены в природе и играют важную роль в минерализации органических веществ. Они вызывают плесневение многих пищевых продуктов. Эти грибы являются продуцентами многих ценных веществ и широко используются в промышленности. Так, *Aspergillus niger*, применяют в промышленности для производства лимонной кислоты; *Aspergillus terreus* – итаконовой кислоты *Aspergillus flavus* и *Aspergillus terricola* образуют наиболее активный комплекс протеолитических ферментов; *Aspergillus oryzae* и *Aspergillus awamori* являются лучшими продуцентами амилолитических ферментов.

Грибы рода *Alternaria* относятся к классу несовершенных грибов – дейтеромицетов. Это высшие грибы. Они имеют септированный мицелий и короткие несептированные конидиеносцы, на которых находятся многоклеточные конидии грушевидной или лимоновидной формы (рис. 5). Гриб является возбудителем черной гнили – болезни корнеплодов и плодов, а также возбудителем порчи пищевых продуктов.

Изучение морфологических признаков микроскопических грибов в препаратах «раздавленная капля»

Отбор чистых культур микроскопических грибов ведут с использованием препаровальной иглы в той же последовательности, что и отбор одноклеточных организмов:

1. Прокалить препаровальную иглу над пламенем спиртовки и отобрать небольшое количество мицелия из пробирки или чашки Петри, соблюдая правила асептики.

2. Мицелий аккуратно поместить в каплю жидкости на предметное стекло и с помощью двух препаровальных игл осторожно распределить материал тонким слоем в капле.

3. Препарат накрывают покровным стеклом и слегка придавливают. Излишки воды удаляют фильтровальной бумагой.

4. Микроскопировать препарат сначала с объективом х8, а затем х40 в затемненном поле зрения (конденсор опущен, шторка ирис-диафрагмы прикрыта).

При отборе и микроскопии препаратов грибов необходимо учитывать следующие рекомендации:

- гриб рода *Mucor* ? отбирают черновато-серый пушистый воздушный мицелий, при микроскопии обращают внимание на гифы с заполненными спорами спорангиями и колонки, которые образуются при освобождении спорангия;

- гриб рода *Aspergillus* ? отбирают немного пушистого мицелия с окрашенными конидиями, слегка углубляясь иглой в питательную среду, обращают внимание на несептированные конидиеносцы;

- гриб рода *Penicillium* ? при отборе стараются взять молодой мицелий (на границе окрашенного и белого мицелия), углубляясь иглой в среду, обращают внимание на септированные гифы с кисточками;

- гриб рода *Alternaria* ? берут грибницу в черных участках, углубляясь в нее иглами, обращают внимание на септированный мицелий, слабо развитые конидиеносцы и крупные конидии, имеющие вид округлых или заостренных многоклеточных образований, напоминающих «гранаты-лимонки».

Оформление результатов исследований

В отчете студенты кратко конспектируют теоретический материал. Описывают культуральные свойства изучаемых грибов. Зарисовывают микроскопические картины исследованных культур грибов с учетом морфологических особенностей каждого микроорганизма. Под каждым рисунком подписывают латинское название и увеличение препарата.

Вопросы к защите лабораторной работы

1. Каковы особенности строения микроскопических грибов?
2. Каковы особенности культуральных свойств микроскопических грибов?
3. Каковы способы размножения грибов?
4. Какие микроскопические грибы являются низшими и высшими, совершенными и несовершенными?
5. Какие грибы используются в промышленности для получения органических кислот, ферментов, антибиотиков и других ценных продуктов?
6. Как готовятся препараты микроскопических грибов?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 7

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ

Цель работы: ознакомиться с методами получения накопительных и чистых культур микроорганизмов. Освоить технику посева микроорганизмов на плотные и жидкие питательные среды и методики выделения чистых и накопительных культур из различных объектов окружающей среды. Научиться описывать культуральные свойства микроорганизмов.

Объекты исследований: сырое молоко; гниющее мясо; бактериальная смесь №1 (состоящая, например, из чистых культур стафилококка и кишечной палочки) и бактериальная смесь №2 (состоящая из чистых культур бактерий рода *Bacillus* и бактерий, не образующих спор).

Оборудование и материалы: спиртовка; бактериологическая петля и препаровальная игла; пробирки со свежеприготовленным скошенным мясопептонным агаром (МПА); чашки Петри с МПА; пробирки со стерильным обезжиренным молоком с добавлением 5 %-ного этилового спирта; микроскоп; иммерсионное масло; фильтровальная бумага; набор красок для окраски по Граму (фильтровальные бумажки с генцианвиолетом, растворы Люголя и фуксина рабочего); 96 %-ный этиловый спирт: лоток с рельсами для предметных стекол; промывалка.

Питательные среды

Разнообразные питательные вещества, в которых нуждаются микроорганизмы и которые используются ими для синтеза основных компонентов клетки, роста, размножения и для получения энергии, называются питательными веществами, а среда, содержащая питательные вещества, является питательной средой.

По типу питания микроорганизмы, которые встречаются в пищевых продуктах, относятся к хемоорганогетеротрофам. Это значит, что органические вещества, содержащиеся в питательной среде, являются источником углерода, энергии и электронов. Потребности микроорганизмов в тех или иных органических веществах зависят от их видовой принадлежности, и, следовательно, от наличия в клетках и активности соответствующих ферментных систем.

В качестве источника углерода микроорганизмы используют углеводы, органические и аминокислоты, спирты, липиды и т.д. Как правило, лучше усваиваются низкомолекулярные органические соединения. Высокомолекулярные органические вещества могут быть использованы для питания только теми микроорганизмами, которые способны синтезировать соответствующие гидролитические экзоферменты. Органические вещества и вода являются также основными источниками водорода и кислорода.

Источником азота для хемоорганогетеротрофов могут быть различные органические и минеральные соединения: белковые вещества, пептоны, аминокислоты, соли аммония, нитраты.

В среде обязательно должны присутствовать макроэлементы (P, S, Ca, Mg, K, Fe, Na, Cl), которые вносятся в питательную среду в виде катионов питательных солей.

Макроэлементы чаще всего нет необходимости специально вносить в среду, так как большинство микроэлементов является примесью солей макроэлементов, или попадают в среду с частицами пыли, из стеклянной посуды или в составе водопроводной воды.

Для многих микроорганизмов нужны в малых дозах факторы роста. Факторы роста обязательно вносят в среды для культивирования ауксотрофных микроорганизмов (микроорганизмов, которые не способны синтезировать сами те или иные органические вещества, которые необходимы для роста и развития), а также добавляют в питательные среды в малых количествах для ускорения роста микроорганизмов, способных эти вещества синтезировать самостоятельно. К факторам роста относятся отдельные аминокислоты, пуриновые и пиримидиновые основания, жирные кислоты, витамины и др., а также природные субстраты, содержащие эти соединения (морковный сок, кукурузный экстракт, автолизат дрожжей, гидролизаты растительного сырья и т.д.).

Питательные среды имеют исключительное значение в микробиологии. Правильный подбор питательной среды обеспечивает возможность выделения микроорганизмов из мест обитания, получения накопительных и чистых культур, изучения их морфологии и биохимических особенностей, способствует быстрой и правильной диагностике инфекционных заболеваний, дает возможность для количественного учета микроорганизмов в различных объектах (в пищевых продуктах, в воздухе, в воде, почве). С помощью питательных сред получают также биомассу полезных

для народного хозяйства микроорганизмов и биологически активные целевые продукты.

Требования, предъявляемые к питательным средам

1. В среде должны быть все необходимые для роста и развития химические элементы.

2. Среда должна быть сбалансирована по химическому составу. Это значит, что соотношение химических элементов питательной среды и главным образом соотношение органогенных элементов $C:N$ должно примерно соответствовать этому соотношению в клетке.

3. Среда должна иметь достаточную влажность, обеспечивающую возможность диффузии питательных веществ в клетку. Для грибов эта влажность обеспечивается содержанием влаги в субстрате не менее 12 %, для бактерий – не менее 20 %.

4. Среда должна иметь определенное значение рН среды. Среди микроорганизмов различают ацидофилы (кислотолюбивые микроорганизмы), алкалофилы (щелочелюбивые микроорганизмы) и нейтрофилы (лучше всего растут в нейтральной среде с рН около 7,0). К ацидофилам относятся грибы и дрожжи. Большинство бактерий – нейтрофилы, для которых активная кислотность среды около 4 ед. рН является губительной. Следует помнить, что при стерилизации среды и в процессе культивирования микроорганизмов, кислотность среды может сильно изменяться. Во избежание изменения рН в среду добавляют буферные системы (например: фосфатный буфер), $CaCO_3$ (для нейтрализации образующихся в результате культивирования органических кислот), вещества органической природы, обладающие буферными свойствами (например: аминокислоты, полипептиды, белки) и др.

5. Среда должна быть изотоничными для микробной клетки, т. е. осмотическое давление в среде должно быть таким же, как внутри клетки.

6. Среда должна обладать определенным окислительно-восстановительным потенциалом (r_{h_2}), определяющим насыщение ее кислородом. По шкале от 0 до 41 этим индексом можно обозначить любую степень аэробности: насыщенный кислородом раствор обозначают $r_{h_2}=41$, насыщенный водородом $r_{h_2}=0$. Облигатные анаэробы размножаются при r_{h_2} не выше 5, аэробы – не ниже 10.

7. Среды должны быть стерильными, что обеспечивает рост чистых культур микроорганизмов.

Классификация питательных сред

По консистенции питательные среды делятся на жидкие, плотные и сыпучие.

Жидкие среды применяются для накопления биомассы или продуктов обмена микроорганизмов, для обновления долго хранящихся культур, для поддержания и хранения тех чистых культур, которые плохо растут на плотных средах.

Плотные среды необходимы для выделения и описания культуральных свойств чистых культур микроорганизмов, так как на них можно получить изолированные колонии (колония \square популяция микроорганизмов, выросших из одной клетки). Плотные питательные среды используются также для количественного учета микроорганизмов в пищевых продуктах, других объектах внешней среды и для хранения чистых культур.

Плотные среды готовятся из жидких путем добавления гелеобразующих веществ: агар-агара, желатина, геля кремнекислого (силикагеля).

Лучшим гелеобразующим веществом является агар-агар, получаемый из водорослей. Это сложный полисахарид, который образует гель с точкой плавления $96 \square 100^{\circ}\text{C}$ и температурой застывания около 40°C . Поэтому на агаризованных средах можно культивировать почти все микроорганизмы. Кроме того, агар-агар очень редко используется микроорганизмами в качестве питательного субстрата. Для уплотнения жидкой среды в нее вносят в зависимости от степени очистки от 1,5 до 2,5% агар-агара.

В отличие от агар-агара желатин – это вещество белковой природы, которое получается из костей и хрящей животных при их вываривании, поэтому многие микроорганизмы используют желатин в качестве питательного субстрата и к концу культивирования среда с желатином разжижается. Ограниченное использование желатина в качестве уплотнителя для плотных питательных сред связано также с тем, что по сравнению с агар-агаром он образует менее прочный гель, который плавится при $23-25^{\circ}\text{C}$ и застывает при 20°C , в то время как большинство микроорганизмов развивается при температуре от 25 до 37°C .

Если требуется получить плотные среды, не содержащие органических компонентов, или синтетические среды с определенным количественным и качественным составом, то в качестве уплотнителя применяют кремневокислый гель. Получают его путем смешивания равных объемов соляной кислоты с удельной массой 1,1 и жидкого стекла (Na_2SiO_3 или K_2SiO_3) с последующей разливкой по 25 ÷ 30 мл в чашки Петри и выдержкой 1 ÷ 2 ч.

Сыпучие среды применяют в основном в промышленной микробиологии. К таким средам относятся разваренное пшено, отруби, кварцевый песок, смоченный питательным раствором. Такие среды используются для культивирования аэробных микроорганизмов.

По происхождению и составу питательные среды делятся на натуральные (естественные), синтетические (искусственные) и полусинтетические.

Натуральные среды готовятся из продуктов животного и растительного происхождения. Они содержат все ингредиенты, необходимые для роста и развития микроорганизмов. Основным недостатком этих сред является то, что они имеют сложный и непостоянный состав. Натуральные среды используют для выращивания микроорганизмов, накопления биомассы, хранения чистых культур, но они мало пригодны для изучения обменных процессов микроорганизмов. Такими средами являются отвары злаков, трав, овощные и фруктовые соки, различные экстракты, мясной бульон, автолизат дрожжей, молоко, молочная сыворотка, гидролизаты из растительного сырья и т.д. Наиболее часто применяемыми натуральными питательными средами являются мясопептонный агар (МПА) и мясопептонный бульон (МПБ), предназначенные для культивирования бактерий, а также не охмеленное пивное сусло и сусло-агар, используемые для выращивания и накопления биомассы грибов и дрожжей.

Синтетические среды имеют в своем составе химически чистые органические и неорганические соединения в строго указанных концентрациях. По набору компонентов синтетические питательные среды могут быть сложными (среды для выращивания молочнокислых бактерий) и довольно простыми. Такие среды применяются для исследования обмена веществ, выяснения закономерностей роста или биосинтеза какого-либо метаболита и т.д. Наиболее часто в практической работе используют синтетическую

среду Чапека для выращивания грибов и среду Ридера для дрожжей. Основным недостатком синтетических сред является то, что на таких средах микроорганизмы очень долго растут.

Полусинтетические среды в своем составе содержат химически чистые органические и неорганические вещества, (как и в синтетических средах) и вещества растительного или животного происхождения в качестве факторов роста для ускорения роста и развития микроорганизмов. Цель использования полусинтетических сред та же, что и синтетических. Так как натуральные компоненты вносятся в небольших количествах, то их химический состав не учитывается при изучении обменных процессов тех или иных микроорганизмов.

По назначению среды делятся на универсальные (основные), избирательные (накопительные, элективные) и дифференциально-диагностические.

Универсальные среды используются для выращивания многих видов микроорганизмов. К универсальным средам, используемым для выращивания бактерий, относятся мясопептонный агар и бульон (МПА, МПБ), среда для определения количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (среда для определения КМАФАнМ). Грибы и дрожжи хорошо растут на неохмеленном пивном сусле, сусло-агаре (СА), среде Сабуро.

Избирательные среды обеспечивают развитие только определенных микроорганизмов или группы родственных видов и непригодны для роста других. В такие среды, как правило, добавляют вещества, избирательно подавляющие развитие сопутствующей микрофлоры. Избирательные среды применяют для выделения определенных микроорганизмов из мест их естественного обитания и для получения накопительных культур. В качестве накопительных питательных используют, например жидкие среды Кесслера (используется для накопления бактерий группы кишечной палочки), Мюллера и Кауфмана (для выявления сальмонелл). Элективными средами могут быть плотные питательные среды, такие как молочно-солевой агар (МСА) и желточно-солевой агар (ЖСА) – для выявления и количественного учета в пищевых продуктах коагулазоположительных стафилококков, кровяной агар – для выявления гемолитических стрептококков, агар с гидролизованым молоком и мелом – для количественного учета молочнокислых бактерий.

Дифференциально-диагностические среды используются для определения видовой принадлежности исследуемого микроба, основываясь на особенностях его обмена веществ. Состав этих сред позволяет четко выделить наиболее характерные свойства изучаемого микроорганизма. Примером таких сред является плотная среда Эндо, применяемая для определения бактерий группы кишечной палочки, в состав которой входит лактоза, насыщенный спиртовой раствор фуксина, обесцвеченного перед добавлением в среду 10%-ным водным раствором сульфата натрия (образуется бесцветная фуксин-сернистая кислота. Кишечная палочка на такой среде ферментирует лактозу с образованием альдегидов, вследствие чего бесцветная фуксин-сернистая кислота переходит в фуксин-сернистое соединение с образованием фуксина, который окрашивает колонии кишечной палочки в красный цвет с металлическим блеском.

Методы стерилизации питательных сред, посуды, инвентаря

Стерилизацией или обеспложиванием (*sterilis* – бесплодный) называется полное уничтожение микроорганизмов в питательных средах, посуде и других объектах.

Стерилизация должна обеспечивать уничтожение всей микрофлоры, патогенной и непатогенной, присутствующей в данном объекте. Она не должна приводить к порче материала или изменению его физического или химического состояния. Поэтому в зависимости от физических свойств стерилизуемых объектов и цели стерилизации применяют различные методы обеспложивания: горячие (влажная, дробная, сухая стерилизация) и холодные (механическая стерилизация, ионизация, стерилизация ультразвуком, ультрафиолетовыми лучами). Основное значение имеет тепловое воздействие на объект.

Методы, основанные на термической обработке стерилизуемых объектов

Губительное действие высокой температуры обусловливается повреждением коллоидного состояния плазмы, денатурацией белка с последующей коагуляцией его, а также нарушением ферментных систем микроорганизмов. Различают влажные и сухие способы тепловой стерилизации.

Влажные способы используются, главным образом, для стерилизации питательных сред. К таким способам относятся

стерилизация паром под давлением, стерилизация текучим паром (дробная стерилизация) и тиндализация.

Стерилизация паром под давлением – самый эффективный в бактериологической практике способ стерилизации питательных сред и посуды, так как с его помощью быстро достигается полное и надежное обеспложивание. Этот способ стерилизации основан на том, что образующийся при кипячении воды пар не выходит наружу, а, скапливаясь в замкнутом пространстве, повышает давление. При создании избыточного давления возрастает температура кипения воды и температура пара. Стерилизацию паром под давлением осуществляют в паровых стерилизаторах.

Стерилизация текучим паром используется для сред, которые нельзя нагревать выше температуры 100 °С. Стерилизация проводится при 100 °С (температура парообразования) по 30...60 минут в течение 3 дней с промежутками в 18 и 20 часов, во время которых материал выдерживается в термостате или при комнатной температуре. Поэтому этот способ называют еще дробной стерилизацией. В основу способа дробной стерилизации положен следующий принцип: при нагревании до 100 °С в течение 30 - 60 минут погибают все вегетативные клетки, а споры остаются жизнеспособными. В промежутке между стерилизацией споры прорастают в вегетативные клетки. Через сутки проводят повторную стерилизацию. Обычно после третьей стерилизации достигается полное обеспложивание объекта. Стерилизацию текучим паром осуществляют в аппаратах Коха или текучепаровых аппаратах (кипятильниках Коха).

Тиндализация – это дробная стерилизация при низкой температуре – 56 - 58 °С. Применяют этот способ при стерилизации сред, которые нельзя нагревать до 100 °С. Такие среды подвергают нагреванию в течение 5 - 6 дней подряд по 1 ч ежедневно (в 1-й день – в течение 2 ч). В промежутках между прогреванием стерилизуемая жидкость хранится в термостате. При этом оставшиеся в живых споры прорастают в вегетативные клетки, которые погибают при последующем нагревании. Тиндализацию проводят в специальных приборах с терморегулятором или на водяных банях.

Сухие способы. При работе в микробиологической лаборатории из сухих способов термической стерилизации используются следующие:

Прокаливание на огне (фламбирование) очень быстрый и надежный способ стерилизации бактериологических петель, препаровальных игл перед посевами. Этим способом можно стерилизовать также мелкие металлические предметы (пинцеты, скальпели) и предметные стекла. Осуществляют прокалывание над пламенем горелки.

Стерилизация сухим жаром (сухим нагретым воздухом) используется для стерилизации микробиологической посуды (пипеток, чашек Петри), песка. Осуществляют стерилизацию сухим жаром при температуре 150 ÷ 170⁰С в течение 1...1,5 часов в печах Пастера или в сушильных шкафах.

Методы холодной стерилизации

Механическая стерилизация (фильтрование). Этот способ применяется для стерилизации сред в тех случаях, когда их нельзя подвергать нагреванию. При механической стерилизации стерилизуемые жидкости фильтруют через специальные фильтровальные приборы, которые имеют настолько мелкие поры, что на своей поверхности задерживают взвешенные в жидкости частицы, в том числе и микробы. Для фильтрации в микробиологической практике применяют различные фильтровальные приборы (фильтры Зейтца, свечи Шамберлана, Мандлера, Беркефельда и др.).

Химическая стерилизация. Этот вид стерилизации в практике приготовления питательных сред имеет ограниченное применение. В лабораторной практике используют некоторые химические вещества, такие как толуол, хлороформ, эфир и другие, для предупреждения бактериального загрязнения питательных сред. Для освобождения от консерванта среду нагревают на водяной бане при 56⁰С.

Химическая стерилизация используется также для дезинфекции оборудования, помещений, использованной посуды и отработанного микробиологического материала. В качестве дезинфицирующих веществ широкое применение нашли химические соединения, содержащие активный хлор (хлорамин, хлорная известь).

Стерилизация ультрафиолетовыми лучами. Этот способ стерилизации используется для стерилизации воздуха в микробиологическом боксе и в лаборатории перед проведением микробиологических исследований.

Стерилизацию ультрафиолетовыми лучами проводят с помощью бактерицидных ламп.

Ход работы. Студенты знакомятся с принципами составления и классификацией питательных сред, методами стерилизации питательных сред, посуды, инвентаря, изучают устройство парового стерилизатора и принцип его работы и кратко конспектируют изложенный в теоретической части материал. Затем готовят посуду, питательные среды и ватно-марлевые пробки для проведения микробиологического анализа.

Приготовление посуды для проведение микробиологического анализа

Для проведения микробиологического анализа используют чашки Петри, которые герметично упаковываются в пергаментную бумагу и стерилизуются. Пипетки на 1 см³ закрывают ватными тампонами и также заворачивают в бумагу. Колбы закрывают ватно-марлевыми пробками и сверху делают колпачки из пергаментной бумаги.

Стерилизация посуды осуществляется в автоклаве при избыточном давлении 0,1 МПа в течение 30 – 40 минут или сухим жаром в сушильном шкафу или печи Пастера при 165 – 170⁰С в течение 1 – 1,5 часа. Стерильную посуду следует хранить в плотно закрывающихся шкафах или ящиках с крышками в течение не более 30 суток.

Приготовление питательных сред из промышленно-выпускаемых сухих сред заключается в растворении определенного количества порошка в воде, доведении полученной смеси до кипения и кипячении в течение 5 минут. Далее (при необходимости) среда фильтруется через ватно-марлевый фильтр и разливается в пробирки или колбы, которые закрываются ватно-марлевыми пробками. Далее среды стерилизуют в стерилизаторе. С использованием сухих сред готовят мясопептонный бульон (МПБ), мясопептонный агар (МПА), среду Сабуро, среду Кесслера, среду для определения мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (среда для определения КМАФАнМ), среду Эндо и др.

Приготовление питательных сред из отдельных компонентов проводится по методикам, описанным в приложении 2 данного лабораторного практикума.

Понятие о чистой и накопительной культуре микроорганизмов

Культивирование – выращивание микроорганизмов на питательных средах. При культивировании на питательных средах вырастают культуры микроорганизмов. Рост культуры – физиологический процесс, в результате которого увеличивается биомасса – масса клеточного вещества данного микроорганизма.

Чистой культурой микроорганизма называют культуру микроорганизмов одного вида, представленную потомством одной клетки. Для выделения чистой культуры используют, как правило, плотные питательные среды, на которых каждая клетка вырастает в виде изолированной колонии – потомства микроорганизмов, образовавшееся из одной клетки.

Выделение чистой культуры микроба является основой бактериологической работы, так как чаще всего исследуемый материал содержит смесь различных видов микробов. Чистые культуры нужны для изучения свойств микроорганизмов и установления их видовой принадлежности. Кроме того, чистые культуры микроорганизмов (дрожжей, микроскопических грибов, молочнокислых, уксуснокислых, пропионовокислых и других бактерий) обладают промышленно ценными свойствами и нужны для получения различных продуктов и веществ, нашедших применение в пищевой промышленности и других отраслях народного хозяйства.

Перед выделением чистой культуры из различных объектов окружающей среды (пищевого продукта, с поверхности плодов и овощей, из почвы, воды и др.), в которых находится множество микроорганизмов, вначале получают накопительные культуры, проводя культивирование в элективных условиях [2] условиях, способствующих развитию одной культуры и ограничивающих развитие сопутствующих микроорганизмов. Обеспечить элективные условия для микроорганизмов можно только в том случае, если известны особенности обмена веществ выделяемого микроорганизма. Так как различные микроорганизмы используют различные источники питания, то элективные условия легче всего обеспечить, подбирая определенный состав питательных сред. Можно создать элективные условия, обеспечивая соответствующую температуру, рН, освещение и др.

Накопительные культуры состоят преимущественно из клеток микроорганизмов одного вида. Для получения накопительных

культур используют жидкие накопительные питательные среды, различные методы обработки материала, содержащего смесь микробов, а также учитывают другие особенности выделяемых из объекта микроорганизмов.

Для выделения чистых и накопительных культур из различных объектов в лабораториях используют методы посева и пересева. Посевом называется внесение части исследуемого материала в стерильную питательную среду, пересевом – перенос части выросшей на питательной среде культуры микроорганизмов на другую свежую питательную среду.

Методы выделения накопительных культур микроорганизмов

К таким методам относятся методы обогащения, метод нагревания исследуемого материала для выделения спорообразующих бактерий, метод выделения подвижных форм бактерий (метод Шукевича) и др.

Методы обогащения

Их часто применяют для выделения чистых культур микроорганизмов (например, бактерий группы кишечной палочки (БГКП), сальмонелл и др.) из материалов, в которых мало выделяемых микроорганизмов, но содержится большое количество сопутствующей микрофлоры. Для увеличения численности выделяемого вида микроорганизмов вначале делают посев исследуемого материала в накопительные питательные среды, которые содержат вещества, стимулирующие его рост и угнетающие или задерживающие размножение сопутствующей микрофлоры. Например, для выделения сальмонелл проводят посев в среды обогащения Кауфмана, Мюллера и др., для выделения БГКП – на среду Кесслера. При выделении культур молочнокислых бактерий из почвы, сырого молока или растений посева делают на стерильное обезжиренное молоко, содержащее 5%-ный этиловый спирт для подавления роста гнилостных бактерий.

Метод нагревания

Применяют для выделения чистых культур споровых форм бактерий (бацилл, клостридий). В этом случае перед посевом исследуемый материал прогревают на водяной бане при температуре

75...85⁰C в течение 20...30 мин. Вегетативные формы погибают во время прогревания, а споры микробов остаются живыми и при последующих посевах на плотную среду прорастают, формируя колонии.

Метод выделения подвижных форм бактерий (метод Шукевича)

Заключается в посеве исследуемого материала в конденсационную воду скошенного мясопептонного агара. При размножении подвижные формы микроорганизмов из конденсационной воды распространяются на агаре, как бы вползая на его поверхность.

Методы выделения анаэробных микроорганизмов основаны на выращивании микроорганизмов в средах с низкой концентрацией кислорода или в бескислородной среде, что достигается:

- посевом исследуемого материала в среды, содержащие редуцирующие и легко окисляемые вещества (антиоксиданты). В качестве таких веществ чаще всего используют тиогликолят натрия, солянокислый цистеин, кусочки животных и растительных тканей;

- посевом исследуемого материала в глубину плотных питательных сред. Посев делается уколом препаровальной иглой в пробирку со столбиком плотной среды или в расплавленную плотную или полужидкую питательную среду с последующим перемешиванием;

- механическим удалением воздуха из сосудов при выращивании анаэробных микроорганизмов (создают вакуум);

- культивированием анаэробных микроорганизмов в жидких средах под слоем масла;

- культивированием анаэробных микроорганизмов в атмосфере инертного газа, диоксида углерода, азота.

Методы выделения чистых культур микроорганизмов

Метод Пастера (метод предельных разведений) заключается в том, что из исследуемого материала делают ряд последовательных разведений в жидкой питательной среде. Для этого каплю посевного материала вносят в пробирку со стерильной жидкой средой, из нее каплю переносят в следующую пробирку и так засевают до 8...10 пробирок. С каждым разведением количество микробных клеток, попадающих в среду, будет уменьшаться и можно получить такое

разведение, в котором во всей пробирке со средой будет находиться только одна микробная клетка, из которой разовьется чистая культура микроорганизма. Так как в жидких средах микробы растут диффузно, т.е. легко распределяются во всей среде, то изолировать одну микробную клетку от другой трудно. Таким образом, метод Пастера не всегда обеспечивает получение чистой культуры. Поэтому в настоящее время этот метод используется, главным образом, для предварительного уменьшения концентрации микроорганизмов в материале перед посевом его в плотную среду для получения изолированных колоний.

Вопросы к защите лабораторной работы

1. Что такое питательные среды?
2. Микроорганизмы, которые встречаются в пищевых продуктах, являются хемоорганогетеротрофами. Что это значит?
3. Охарактеризуйте пищевые потребности хемоорганогетеротрофов.
4. Какие требования предъявляются к питательным средам?
5. Каким образом готовятся плотные питательные среды и для чего они используются?
6. Почему в качестве уплотнителя для питательных сред лучше использовать агар-агар, а не желатин?
7. На какие группы делятся питательные среды по происхождению и составу?
8. Что такое синтетические среды и в каких случаях они применяются?
9. Для каких целей используются универсальные, избирательные и дифференциально-диагностические среды?
10. Приведите примеры универсальных, избирательных и дифференциально-диагностических питательных сред.
11. Что такое стерилизация? Какие методы стерилизации Вам известны?
12. Какими способами можно стерилизовать посуду?
13. Какими из известных Вам способов можно стерилизовать питательные среды?
14. Как готовятся питательные среды и посуда для стерилизации?

15. Каково устройство и принцип работы парового стерилизатора?

16. Что такое «чистые культуры» микроорганизмов и для чего их выделяют из объектов окружающей среды?

17. Каким образом создаются селективные условия при выделении накопительных культур микроорганизмов?

18. Какие микроорганизмы можно выделить методом нагревания?

19. Как можно выделить накопительные культуры подвижных форм бактерий?

20. Каким образом можно выделить накопительную культуру анаэробных бактерий?

СПИСОК РЕКОМЕНДУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бекер М.Е. Биотехнология. / М.Е. Бекер, Г.К. Лиепиньш, Е.П. Райпулис – М.: Агропромиздат, 1990. – 334 с.
2. Бирюков, В.В. Основы промышленной биотехнологии [Текст] / В. В. Бирюков. - М.: КолосС, 2004. - 296 с.
3. Варфоломеев, С.Д. Биотехнология: Кинетические основы микробиологических процессов [Текст]: учебное пособие для биологических и химических специальностей вузов / С. Д. Варфоломеев, С. В. Калюжный. - М.: Высшая школа, 1990. - 296 с.
4. Волова, Т.Г. Биотехнология [Текст] / Т. Г. Волова. - Новосибирск: Издательство Сибирского отделения РАН, 1999. - 252 с.
5. Глик, Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение [Текст] / Б. Глик, Д. Пастернак; пер. с англ. Н. В. Баскаковой [и др.] ; под ред. Н. К. Янковского. - М. : Мир, 2002. - 589 с.
6. Голубев, В.Н. Пищевая биотехнология. / В.Н. Голубев, И.Н. Жиганов. – М.: Делипринт, 2001.– 123 с.
7. Гореликова, Г.А. Основы современной пищевой биотехнологии: учебное пособие / Г.А. Гореликова - Кемеровский технологический институт пищевой промышленности. – Кемерово, 2004. – 100 с.
8. Грязнева, Т.Н. Физиология микроорганизмов / Т.Н. Грязнева.- М.: ФГОУ ВПО МГАВМиБ.- 2011. - 23 с.
9. Джеймс, М. Джей. Современная пищевая микробиология (Modern Food Microbiology) / Джеймс М. Джей, Мартин Дж. Лёсснер, Дэвид А. Гольден; [пер. с англ. Е. А. Барановой и др.]. - М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2012. - 887 с.
10. Егорова, Т.А. Основы биотехнологии [Текст]: учебное пособие для студентов высших учебных заведений/ Т. А. Егорова, С. М. Клунова, Е. А. Живухина. - М.: Академия, 2003. – 207 с.
11. Ерёмина, И.А. Микробиология продуктов растительного происхождения: учебное пособие / И.А. Еремина, Н.И. Лузина, О.В. Кригер. Кемеровский технологический институт пищевой промышленности.- Кемерово, 2003.- 87 с.

12. Ерёмина, И.А. Микробиология: учебное пособие / И.А. Ерёмина. - Кемеровский технологический институт пищевой промышленности. - Кемерово, 2007. - 112 с.

13. Еремина, И.А. Лабораторный практикум по микробиологии: Учебное пособие. - / Еремина И.А., Кригер О.В. Кемеровский технологический институт пищевой промышленности. – Кемерово, 2005. - 112 с.

14. Иванова, Л.А. Пищевая биотехнология: [учебник для студентов высших учебных заведений, обучающихся по специальности 240902 "Пищевая биотехнология"] / Л. А. Иванова, Л. И. Войно, И. С. Иванова. - Москва: КолосС, 2008 - Кн. 2: Переработка растительного сырья / под ред. И. М. Грачевой. - 2008. – 471 с.

15. Ильященко, Н.Г. Микробиология пищевых производств / Н. Г. Ильященко [и др.; ред. М. В. Калинкина]. – М.: КолосС, 2008. – 411 с.

16. Казаков, Е.Д. Биохимия зерна и хлебопродуктов: учебное пособие для студентов высших учебных заведений / Е. Д. Казаков, Г. П. Карпиленко. - 3-е издание, переработанное и дополненное. - Санкт-Петербург: Гиорд, 2005. - 510 с.

17. Кислухина, О. Биотехнологические основы переработки растительного сырья. / О. Кислухина, И. Кюдюлас. – Каунас: Технология, 1997. – 183 с.

18. Кошелев, Ю.А. Краткий курс биотехнологии: учебное пособие / Ю.А. Кошелев, Е.А. Скиба, Е.В. Аверьянова; Алт. гос. техн. ун-т им. И.И. Ползунова, БТИ. – Бийск: Изд-во Алт. гос. техн. ун-та, 2009. – 77 с.

19. Кухаренко, А.А. Безотходная биотехнология этилового спирта [Текст] / А. А. Кухаренко, А. Ю. Винаров. - М. : Энергоатомиздат, 2001. - 272 с.

20. Матвеева, И.В. Биотехнологические основы приготовления хлеба [Текст]: учебное пособие / И. В. Матвеева, И. Г. Белявская. - М.: ДеЛи принт, 2001. - 150 с.

21. Машанов, А.И. Биоконверсия растительного сырья: учебное пособие / А.И. Машанов, Н.А. Величко, Е.Е. Ташлыкова. – Краснояр. гос. аграр. ун-т. - Красноярск: КрасГАУ, 2014. - 223 с.

22. Машанов, А.И. Биохимия микроорганизмов с основами биотехнологии: учебное пособие / А.И. Машанов, Н.А. Величко, О.С. Федорова. – Краснояр. гос. аграр. ун-т. - Красноярск: КрасГАУ, 2010. - 232 с.

23. Мудрецова-Висс, К.А. Микробиология, санитария и гигиена: Учебник для вузов / К.А. Мудрецова-Висс, А.А.Кудряшова, В.П.Дедюхина.- Владивосток: Изд-во ДВГАЭУ, 1997.- 312 с.

24. Неверова, О.А. Пищевая биотехнология продуктов из сырья растительного происхождения [Текст]: учебник для студентов вузов, обучающихся по направлению 240900 "Биотехнология", специальности 240902 "Пищевая биотехнология" / О. А. Неверова, Г. А. Гореликова, В. М. Позняковский. - Новосибирск: Сибирское университетское издательство, 2007. - 414 с.

25. Нецепляев, С.В. Лабораторный практикум по микробиологии пищевых продуктов животного происхождения / С.В. Нецепляев, А.Я. Панкратов.– М.: Агропромиздат, 1990.– 223 с.

26. Хоулта, Дж. Краткий определитель бактерий Берги: Учебник для специалистов, работающих во всех областях микробиологии / Дж. Хоулта. перевод с англ. С.Ш. Тер-Казарьяна, под редакцией Г.А. Заварзина. – М.: Мир, 1980. – 444 с.

27. Калунянц, К.А. микробные ферментные препараты (технология и оборудование) / К.А. Калунянц, Л.И. Голгер. – М.: Пищевая промышленность, 1979. – 297 с.

28. Скуратова, Е.В. Биология дрожжей и их использование : учебно-методическое пособие / Е.В. Скуратова, Е.В. Юшкова, А.И. Машанов.– Краснояр. гос. аграр. ун-т. - Красноярск: КрасГАУ, 2003. - 38с.

29. Саттон Д. Определитель патогенных и условно патогенных грибов. / Д. Саттон, А. Фотергилл, М.Ринальди. - М.: Мир, 2001. 486 с.

ПРИЛОЖЕНИЕ

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Приготовление растворов некоторых красителей

Фуксин основной спиртовой раствор – насыщенный

Фуксин основной кристаллический – 10 г

Этиловый спирт, 96% ☐ 100 мл.

Фуксин растворяют в 100 мл 96%-ного этанола. Раствор может храниться долгое время в бутылке из темного стекла с притертой пробкой.

Фуксин основной карболовый – фуксин Циля

Фуксин основной кристаллический – 1 г

Карболовая кислота (фенол) ☐ 5 г

Этиловый спирт, 96% ☐ 10 мл

Дистиллированная вода ☐ 100 мл

При приготовлении раствора предварительно взвешивают определенное количество (1 г) фуксина основного кристаллического, вносят в фарфоровую ступку и растирают с определенным количеством (5 г) карболовой кислоты, добавляя спирт небольшими порциями и дистиллированную воду до полного растворения кристаллов, после чего приливают оставшуюся воду. Приготовленный краситель ставят в термостат при 37°C на двое суток. Затем отфильтровывают через складчатый бумажный фильтр.

Фуксин основной карболовый устойчив и может храниться долго. Хранить следует в бутылке из темного стекла с притертой пробкой.

Фуксин основной карболовый можно приготовить другим способом:

Вначале готовят два раствора.

1-й раствор

Фуксин основной кристаллический – 1 г

Этиловый спирт, 96% ☐ 10 мл

Смесь растирают в фарфоровой ступке до полного растворения кристаллов фуксина.

2-й раствор

Карболовая кислота ☐ 5 г

Дистиллированная вода – 95 мл

Воду подогревают до 50°C для лучшего растворения карболовой кислоты. Второй раствор вливают в первый, хорошо взбалтывают и фильтруют через складчатый бумажный фильтр.

Фуксин основной, водный (фуксин Пфейффера)

Карболовый фуксин Циля – 10 мл

Дистиллированная вода ☐ 90 мл

Водный фуксин нестойкий, его лучше готовить непосредственно перед употреблением. Раствор водного фуксина может храниться не более 10 дней.

Карболовый генциановый фиолетовый

Генциановый фиолетовый (кристаллы) – 1 г

Этиловый спирт, 96% ☐ 10 мл

Карболовая кислота ☐ 5 г

Дистиллированная вода ☐ 100 мл

Техника приготовления карболового генцианового фиолетового такая же, как карболового фуксина Циля. При приготовлении карболового генцианового фиолетового можно также готовить предварительно два раствора.

1-й раствор

Генциановый фиолетовый – 1 г

Этиловый спирт, 96% ☐ 10 мл

2-й раствор

Карболовая кислота – 5 г

Дистиллированная вода – 95 мл

Последовательность и способ приготовления первого и второго растворов такие же, как и при приготовлении карболового фуксина Циля.

Приготовление красящих бумажек генцианвиолета (по Синеву)

Для приготовления бумажек фильтровальную бумагу предварительно испытывают на пригодность. Для этого полоску фильтровальной бумаги погружают в спиртовой раствор красителя (карболового генцианового фиолетового), высушивают на воздухе. Хорошая бумага окрашивается равномерно без пятен. Если небольшой кусок такой бумаги положить на стекло с несколькими каплями воды, он сразу же пропитается водой и краситель через несколько секунд перейдет в раствор. Бумагу для пропитывания

нарезают полосками (шириной 2,5 ± 3,0 см, длиной 30 см) и погружают в краситель так, чтобы смачивались обе поверхности. Затем полоски вынимают, высушивают на воздухе при комнатной температуре или в термостате при 37°C.

Пропитывать красящиеся бумажки можно также спиртовым раствором генцианвиолета следующего состава:

Генциановый фиолетовый (кристаллы) – 1 г

Спирт этиловый, 96% ± 100 мл

Глицерин ± 5 мл

Метиленовый синий (насыщенный спиртовой раствор)

3 г метиленового синего растворяют в 100 мл 96%-ного этанола. Раствор выдерживают 2-3 дня, периодически взбалтывая. Затем фильтруют через бумажный фильтр. Раствор устойчив.

Раствор бриллиантовой зелени (раствор малахитового зеленого)

Водный насыщенный раствор готовится путем растворения 10 г малахитового зеленого в 10 мл дистиллированной воды. СпиртОВО-водный раствор: 10 г малахитового зеленого смешивается с 80 мл дистиллированной воды и 20 мл 96%-ного этанола.

Метиленовый синий 1:40

1 мл насыщенного спиртового раствора метиленового синего смешивают с 40 мл дистиллированной воды.

Метиленовый синий, щелочной раствор (по Леффлеру)

К 100 мл дистиллированной воды прибавляют 30 мл насыщенного спиртового раствора метиленового синего и 1 мл 1%-ного водного раствора гидроксида калия.

Метиленовый синий по Финку

Отдельно взвешивают 0,9 г гидрофосфата натрия, 13,6 дигидрофосфата калия и 0,1 г метиленового синего. Каждую навеску растворяют в 500 мл дистиллированной воды. Смешивают 0,25 мл первого раствора с 99,75 мл второго и 100 мл третьего (рН 4,6).

Сафранин (водный)

10 мл 2,5%-ного раствора сафранина в 96%-ном этаноле смешивается со 100 мл дистиллированной воды.

Раствор Люголя (в модификации Грама)

В ступку вместимостью 30 и 50 мл помещают 1 г кристаллического йода и 2 г йодида калия, растирают смесь пестиком, добавляют 1 мл дистиллированной воды, продолжают растирать кристаллы и добавляют еще 5 мл воды. При этом йод растворяется в йодиде калия. Раствор количественно переносят в склянку и доводят общий объем до 300 мл. Раствор годен не более 30 дней, хранят его в прохладном месте, в темноте, лучше в посуде оранжевого цвета.

Раствор Люголя для выявления гликогена и гранулезы

Кристаллический йод – 1 г

Йодид калия и 3 г

Вода дистиллированная – 300 мл

Раствор готовят так же, как и предыдущий.

Для обнаружения гликогена можно также использовать крепкий раствор йода

Кристаллический йод – 7 г

Йодид калия и 20 г

Вода дистиллированная – 100 мл

Краска Муромцева

Готовят два раствора:

1-й раствор

Фуксин основной – 0,15 г

Спирт, 96% и 20 мл

Кристаллическая карболовая кислота – 10 г

2-й раствор

Метиленовый синий – 2,5 г

Дистиллированная вода – 200 мл

Оба раствора смешивают и фильтруют через бумажный фильтр.

Раствор туши для выявления капсул

Смешивают 10 мл жидкой натуральной туши с 90 мл дистиллированной воды. Затем раствор центрифугируют 15 и 20 мин. Верхний слой переносят в пробирку и автоклавируют 30 мин (0,05 МПа, температура 110⁰С). После автоклавирования раствор отстаивают две недели, после чего его можно использовать.

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

СЛОВАРЬ ТЕРМИНОВ

Биотехнология – это использование культур клеток бактерий, дрожжей, животных и растений, метаболизм и биосинтетические возможности которых обеспечивают выработку специфических веществ.

Вторичные метаболиты – это низкомолекулярные соединения, образующиеся на более поздних стадиях развития культуры, не требующиеся для роста микроорганизмов.

Дезинтеграция - разрушение клеток физическими, химическими и ферментативными методами. Если целевой продукт содержится в самих клетках.

Идентификация - распознавание микроорганизмов.

Клеточная стенка - придает форму клетке, предохраняет клетку от внешних воздействий (является механическим барьером клетки), защищает клетку от проникновения в нее избыточного количества влаги.

Многоклеточность - сложный тип клеточной организации.

Номенклатура - присвоение микроорганизму названия после подробного его изучения.

Одноклеточность - наиболее простой тип клеточной организации.

Первичные метаболиты – это низкомолекулярные соединения, необходимые для роста микробов; одни из них являются строительными блоками макромолекул, другие участвуют в синтезе коферментов.

Посевной материал (инокулят) - называют чистую культуру микроорганизма, которую получают путем ее последовательного посева из пробирки в колбу, а затем в аппараты увеличивающегося объема до количества, необходимого для промышленного производства.

Суспензионная культура - выращивание отдельных клеток или небольших групп их во взвешенном состоянии в жидкой среде при использовании аппаратуры, обеспечивающей их аэрацию и перемешивание.

Ферментация (культивирование) - это вся совокупность последовательных операций от внесения в заранее приготовленную и

термостатированную питательную среду посевного материала (инокулята) до завершения процессов роста и биосинтеза вследствие истощения питательных веществ среды.

Ферментные препараты - могут представлять собой смесь ферментов или фермент одного вида, иметь различную степень очистки, могут быть добавлены в сырье или продукт, или использоваться закрепленными на носителе (иммобилизованные ферменты).

Ферменты - это высокоактивные соединения белковой природы, являющиеся специфическими катализаторами реакций.

Цитоплазма - внутриклеточное содержимое, полужидкий коллоидный раствор. Здесь содержится до 70-80 % воды от массы клетки, ферменты, субстраты питания и продукты обмена веществ клетки. В цитоплазме располагаются все компоненты прокариотической клетки.

Фильтрация – простой и широко применяемый процесс разделения твердых частиц и жидкости, скорость которого зависит от пористости фильтрующего материала и давления. Фильтрация при помощи вакуумных насосов существенно ускоряет процесс.

Флотирование применимо для выделения дрожжевых клеток. Процесс флотирования клеток осуществляется путем вспенивания культуральной жидкости. Вместе с пеной из культуральной жидкости удаляется и основная масса дрожжей.

Сепарирование осуществляют в сепараторах, в которых на клетки действует центробежная сила, отбрасывающая клетки к периферии сосуда, а культуральная жидкость будет собираться в центре сепаратора. Этот процесс протекает гораздо быстрее, чем отстаивание клеток под действием силы тяжести.

Автолиз – разрушение клеток дрожжей или плесневых грибов под действием собственных гидролитических ферментов. Для этого суспензию клеток инкубируют при 35-45 °С.

Осаждение в виде нерастворимых солей производят путем добавления химического осадителя в эквимолярных количествах. Применяют при получении лимонной, молочной кислоты.

Экстракция – добавление к раствору экстрагента (растворителя), который поглощает целевой продукт. Затем эмульсию разделяют и выделяют целевое вещество. Используют при получении витаминов, антибиотиков.

Кристаллизация – после предварительной обработки культуральной жидкости и выпаривания при охлаждении осуществляют кристаллизацию. Данный метод выделения и очистки используется при получении глутаминовой, итаконовой и других кислот.

Центрифугирование – расслоение раствора с частицами бóльшей плотности на осадок и надосадочную жидкость при воздействии центробежной силы.

Ультрафильтрация – обработка раствора на мембранных фильтрах с определенным размером пор (то есть разделение веществ на фракции по размерам их молекул). Применяется для ферментов и других белков.

ПРИЛОЖЕНИЕ 3

УКАЗАТЕЛЬ ЛАТИНСКИХ НАЗВАНИЙ
МИКРООРГАНИЗМОВ

| | | |
|----------------------------------|------------------------------------|--------------------------|
| A | <i>Acetobacter aceti</i> | Ацэтобактэр ацэти |
| | <i>Achromobacter</i> | Ахромобактэр |
| | <i>Alternaria</i> | Альтэрнария |
| | <i>Aspergillus</i> | Аспергилус |
| B | <i>Bacillus aerothermophilus</i> | Бацилус аэротермофилус |
| | <i>Bacillus cereus</i> | Бацилус цэрэус |
| | <i>Bacillus circulans</i> | Бацилус циркуланс |
| | <i>Bacillus coagulans</i> | Бацилус коагуланс |
| | <i>Bacillus megaterium</i> | Бацилус мегатэриум |
| | <i>Bacillus mesentericus</i> | Бацилус мезантэрикус |
| | <i>Bacillus mycoides</i> | Бацилус микоидэс |
| | <i>Bacillus polymyxa</i> | Бацилус полимикса |
| | <i>Bacillus stearothermophilus</i> | Бацилус стеаротермофилус |
| | <i>Bacillus subtilis</i> | Бацилус субтилис |
| C | <i>Botrytis</i> | Ботритис |
| | <i>Candida guilliermondii</i> | Кандида гуилирмондии |
| | <i>Candida lipolytica</i> | Кандида липолитика |
| | <i>Candida pseudotropicalis</i> | Кандида псевдотропикалис |
| | <i>Candida utilis</i> | Кандида утилис |
| | <i>Citrobacter</i> | Цитробактэр |
| | <i>Cladosporium</i> | Кладоспориум |
| | <i>Clostridium botulinum</i> | Клостридиум ботулиnum |
| | <i>Clostridium butyricum</i> | Клостридиум бутирикум |
| | <i>Clostridium perfringens</i> | Клостридиум перфрингенс |
| <i>Clostridium putrificum</i> | Клостридиум путрификум | |
| <i>Clostridium sporogenes</i> | Клостридиум спорогенэс | |
| <i>Clostridium subterminalis</i> | Клостридиум субтэрминалис | |
| D | <i>Debaryomyces</i> | Дебаромицэс |
| E | <i>Enterobacter</i> | Энтэробактэр |

| | | |
|----------|--|--|
| | Enterobacteriaceae Erwinia Escherichia coli | Энтэробактэриацея Эрвиния Эширихия коли |
| F | Flavobacterium Fusarium Fusarium sporotrichiella Fusarium graminearium | Флавобактэриум Фузариум Фузариум споротрихиэла Фузариум граминэариум |
| G | Gluconobacter | Глюконобактэр |
| H | Hansenula | Ганзэнула |
| I | Iersinia | Иерсиния |
| K | Klebsiella | Клебсиэла |
| L | Lactobacillus acidophilus Lactobacillus brevis Lactobacillus bulgaricus Lactobacillus delbrueckii Lactobacillus fermentum Lactobacillus helveticus Lactobacillus lactis Lactobacillus plantarum Leuconostoc cremoris Leuconostoc dextranicum Leuconostoc mesenteroides Listeria monocytogenes | Лактобацилус ацидофилус Лактобацилус брэвис Лактобацилус булгарикус Лактобацилус дэльбрюки Лактобацилус ферментум Лактобацилус хельветикус Лактобацилус лактис Лактобацилус плантарум Лейконосток креморис Лейконосток декстрианикум Лейконосток мезэнтэроидэс Листерия моноцитогенес |
| M | Monilia Mycobacterium tuberculosis Mycoderma Mucor | Монилия Микобактэриум туберкулозис Микодэрма Мукор |
| O | Oidium lactis | Оидиум лактис |
| P | Penicillium candidum | Пеницилиум кандидум |

| | | |
|----------|--|---|
| | <i>Penicillium camamberti</i> <i>Penicillium roqueforti</i> <i>Propionibacterium shermanii</i> <i>Proteus mirabilis</i> <i>Proteus vulgaris</i> <i>Pseudomonas aerogenosa</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> | Пеницилиум самамбэрти Пеницилиум рокфорти Пропионибактэриум шэрмани Протэус мирабилис Протэус вулгарис Псевдомонас аэрогеноза Псевдомонэс флуоресценс |
| R | <i>Rhodotorula</i> | Родоторула |
| S | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Saccharomyces fragilis</i> <i>Saccharomyces lactis</i> <i>Saccharomycoides</i> <i>Salmonella</i> <i>Sarcina</i> <i>Schizosaccharomyces</i> <i>Serratia</i> <i>Shigella dysenteriae</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus acetoinicus</i> <i>Streptococcus cremoris</i> <i>Streptococcus diacetylactis</i> <i>Streptococcus faecalis</i> <i>Streptococcus lactis</i> <i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Streptomyces</i> | Сахаромицэс цэревизиа Сахаромицэс фрагилис Сахаромицэс лактис Сахаромикоидэс Сальмонэла Сарцина Шизосахаромицэс Сератиа Шигела дизентерия Стафилококус аурэус Стрептококус ацетоиникус Стрептококус креморис Стрептококус диацетилактис Стрептококус фекалис Стрептококус лактис Стрептококус термофилус Стрептомицэс |
| T | <i>Torula</i> <i>Trichoderma</i> | Торула Триходэрма |
| V | <i>Vibrio cholerae</i> | Вибрио холерия |
| X | <i>Xantomonas</i> | Ксантомонэс |
| Z | <i>Zygosaccharomyces</i> | Зигосахаромицэс |

ПРИЛОЖЕНИЕ 4

ИЛЛЮСТРАЦИИ

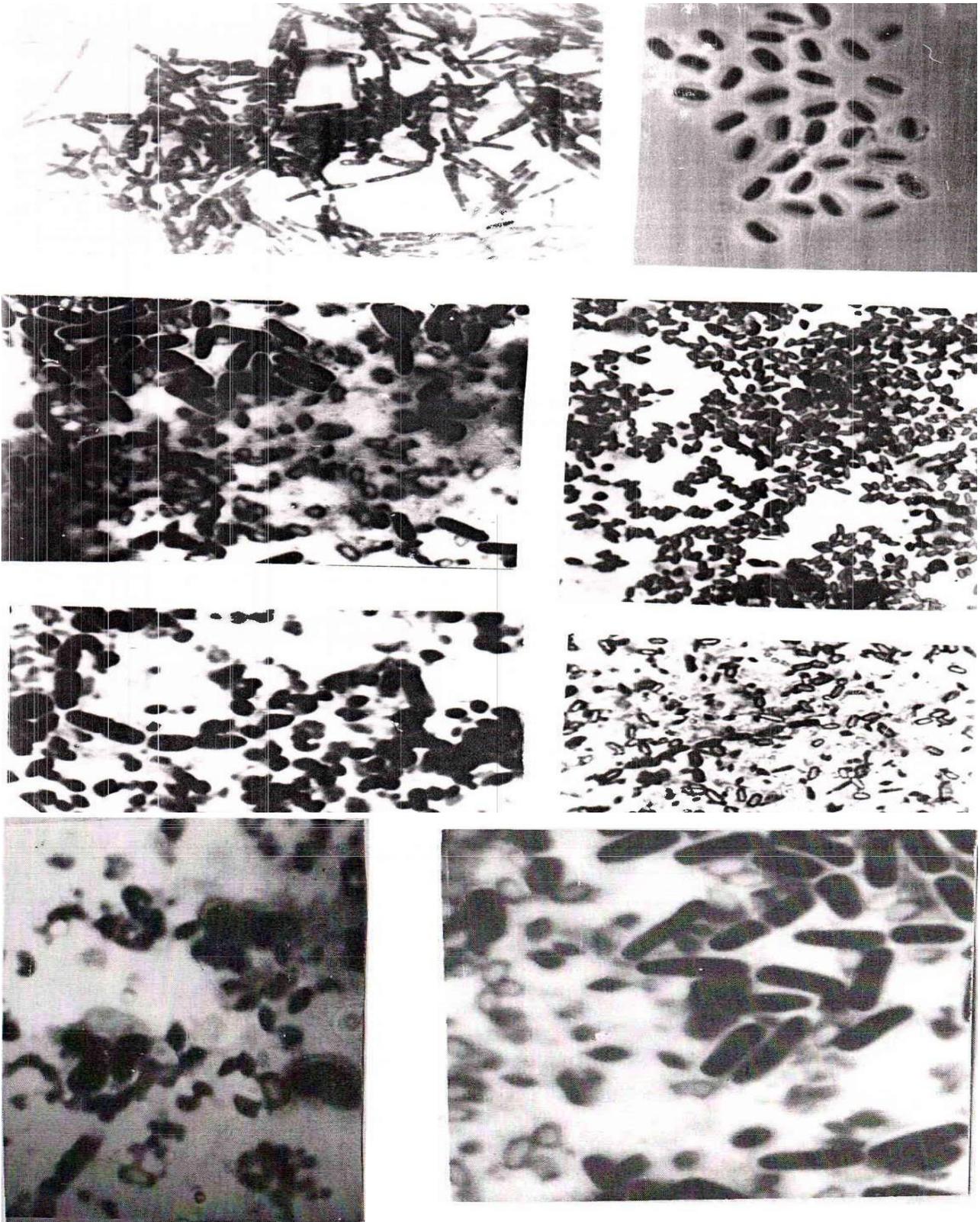


ФОТО 1. Морфология бактерий. Микрофотография (Машанов А.И.)

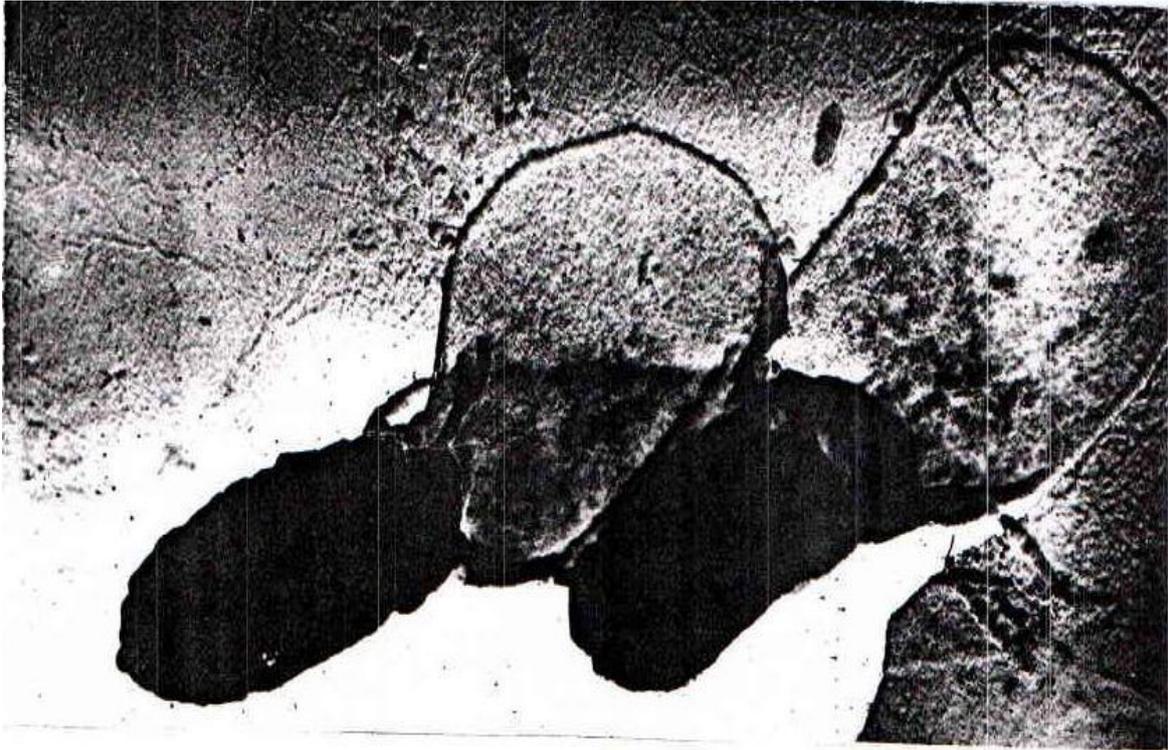


ФОТО 2. Оболочка бактериальной клетки.
Микрофотография(Машанов А.И.)

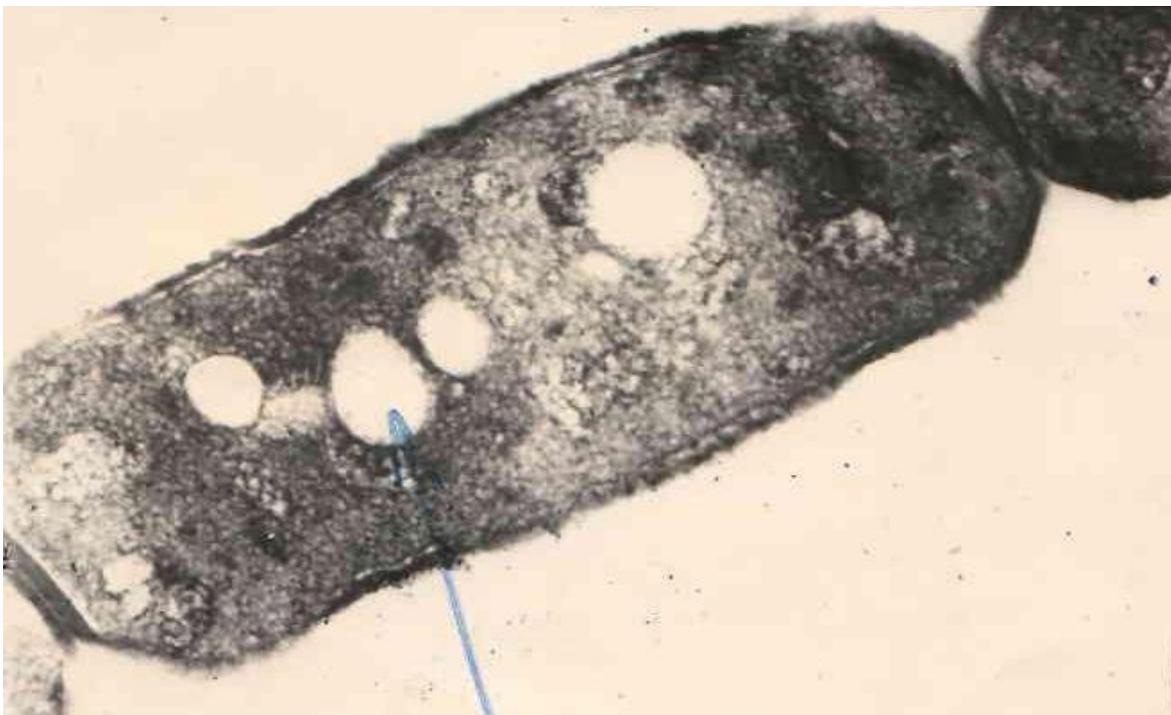


ФОТО 3. Вакуоли бактериальной клетки. Под электронным
микроскопом (Машанов А.И.)



ФОТО 4. Жгутики монотрих. Под электронным микроскопом(Машанов А.И.)



ФОТО 5. Жгутики палочковидных бактерий - лофотрих. Под электронным микроскопом (Машанов А.И.)



ФОТО 6. Жгутики палочковидных бактерий - перетрих. Под электронным микроскопом(Машанов А.И.)

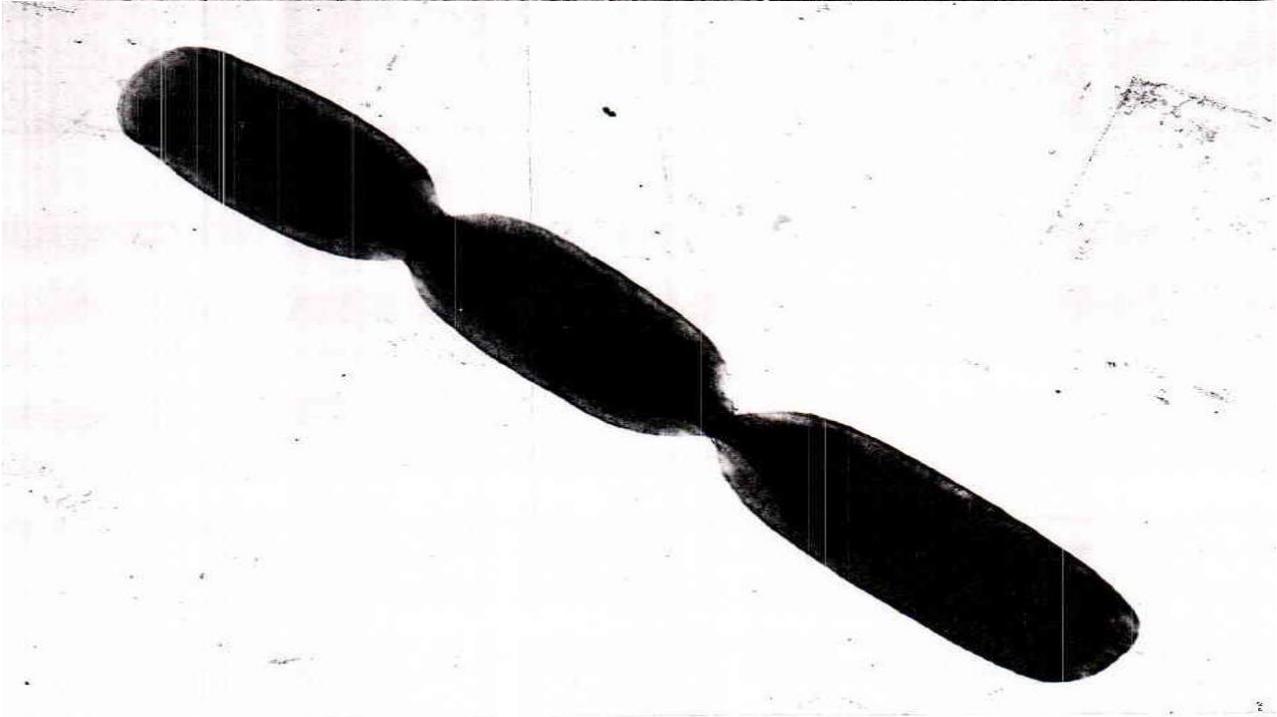


ФОТО 7. Деление бактериальной клетки. Под электронным микроскопом (Машанов А.И.)

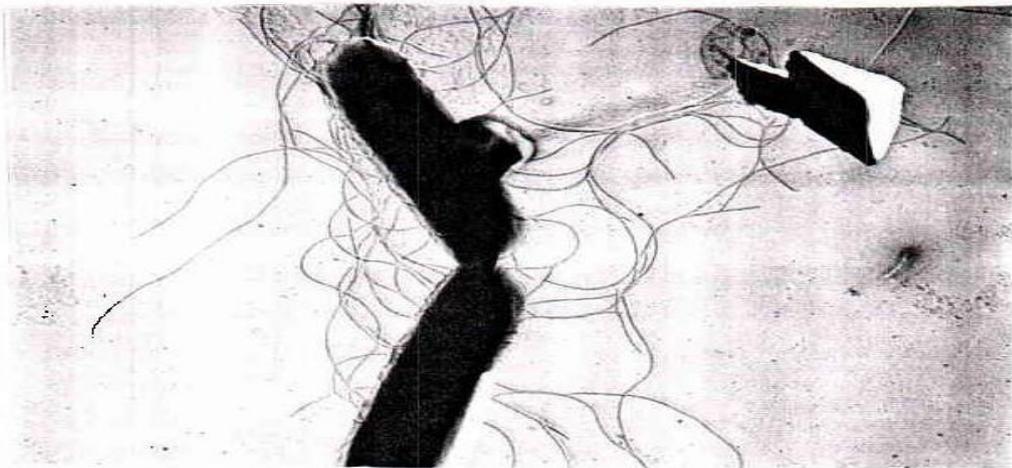
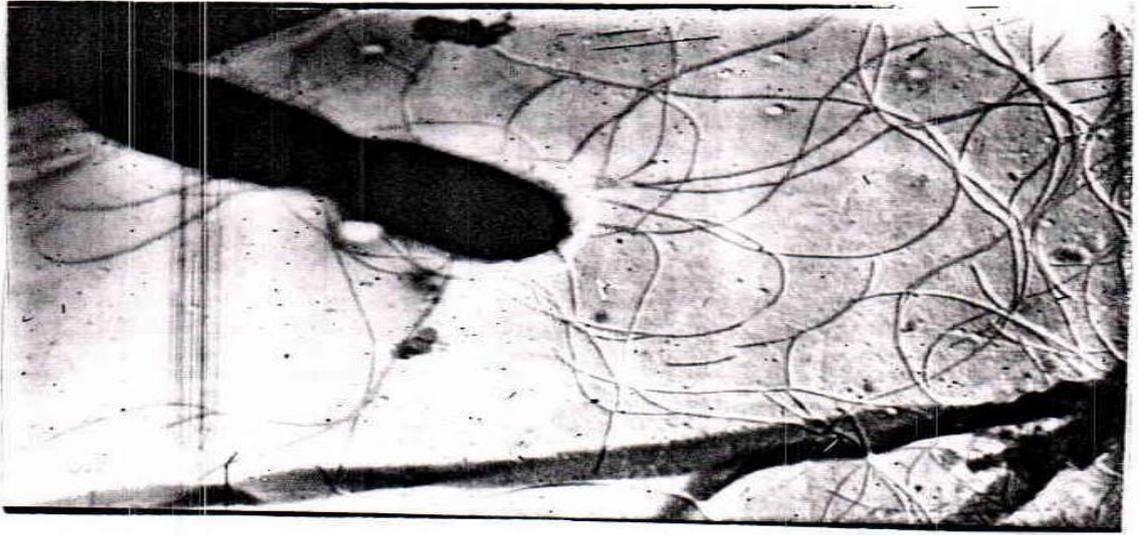


ФОТО 8. Деление бактериальной клетки. Под электронным микроскопом(Машанов А.И.)

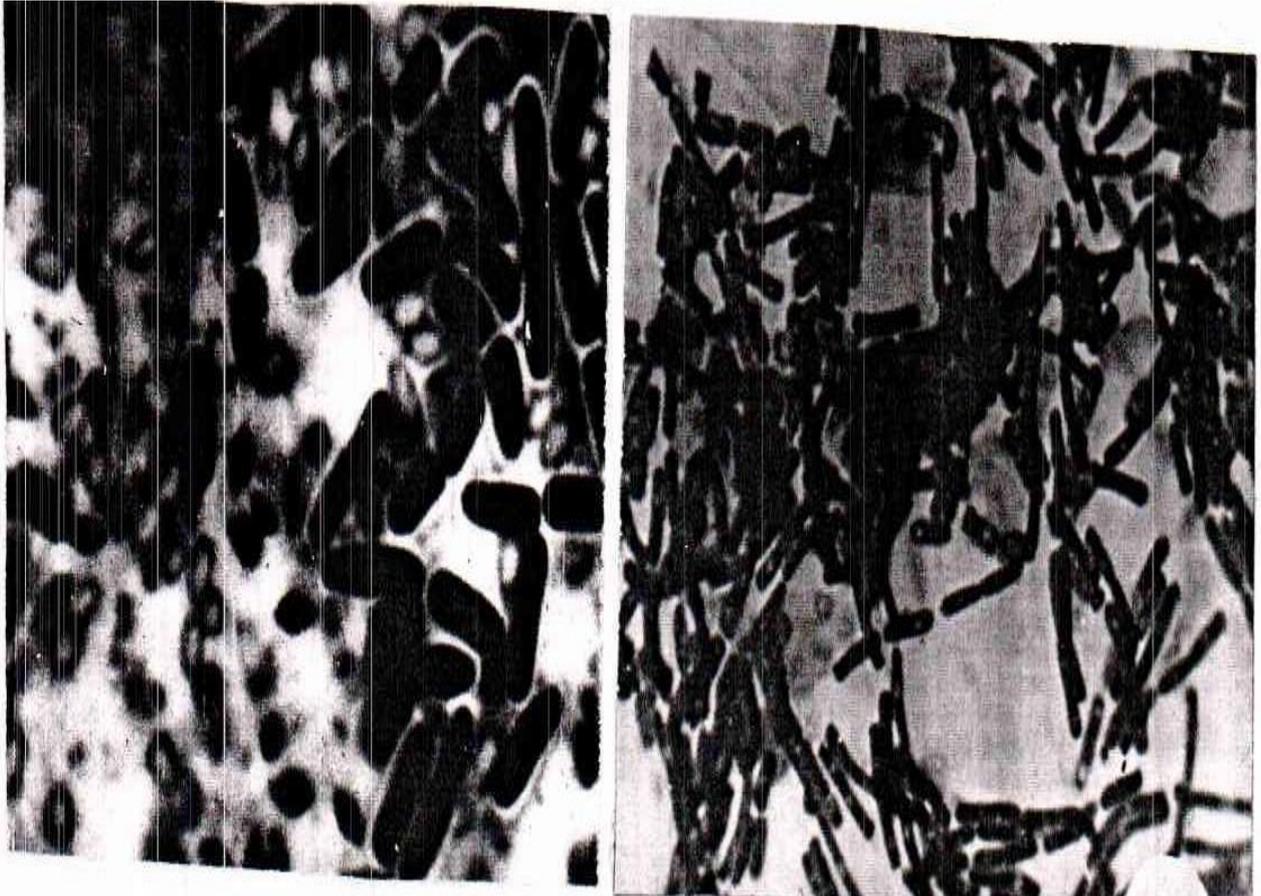


ФОТО 9. Спорообразующие бактерии.
Микрофотография(Машанов А.И.)



ФОТО 10. Спорообразование. Микрофотография (Машанов А.И.)

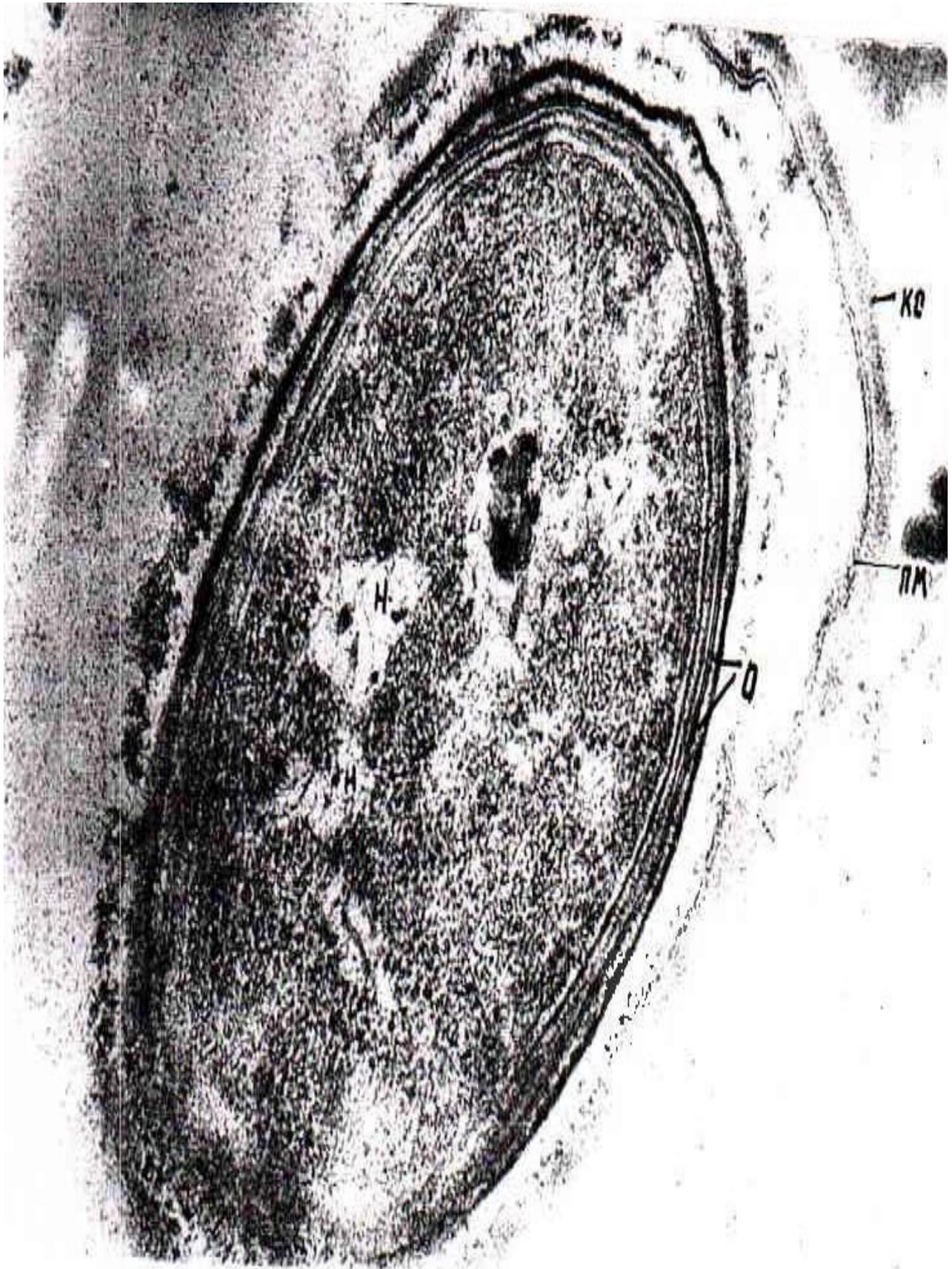


ФОТО 13. Спора (оболочки). Микрофотография (Машанов А.И.)

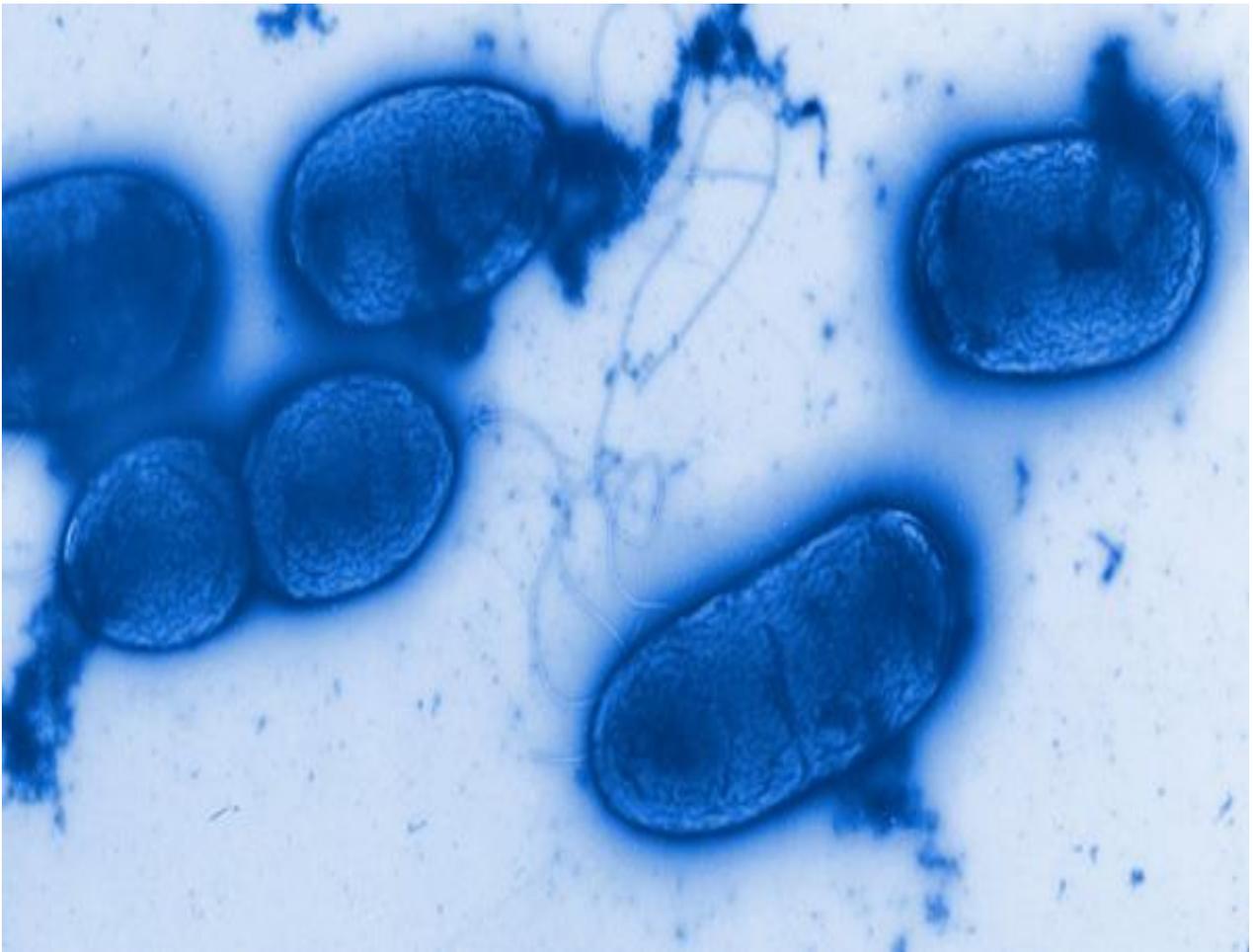


ФОТО 14. *Pseudomonas*. Электронная микрофотография

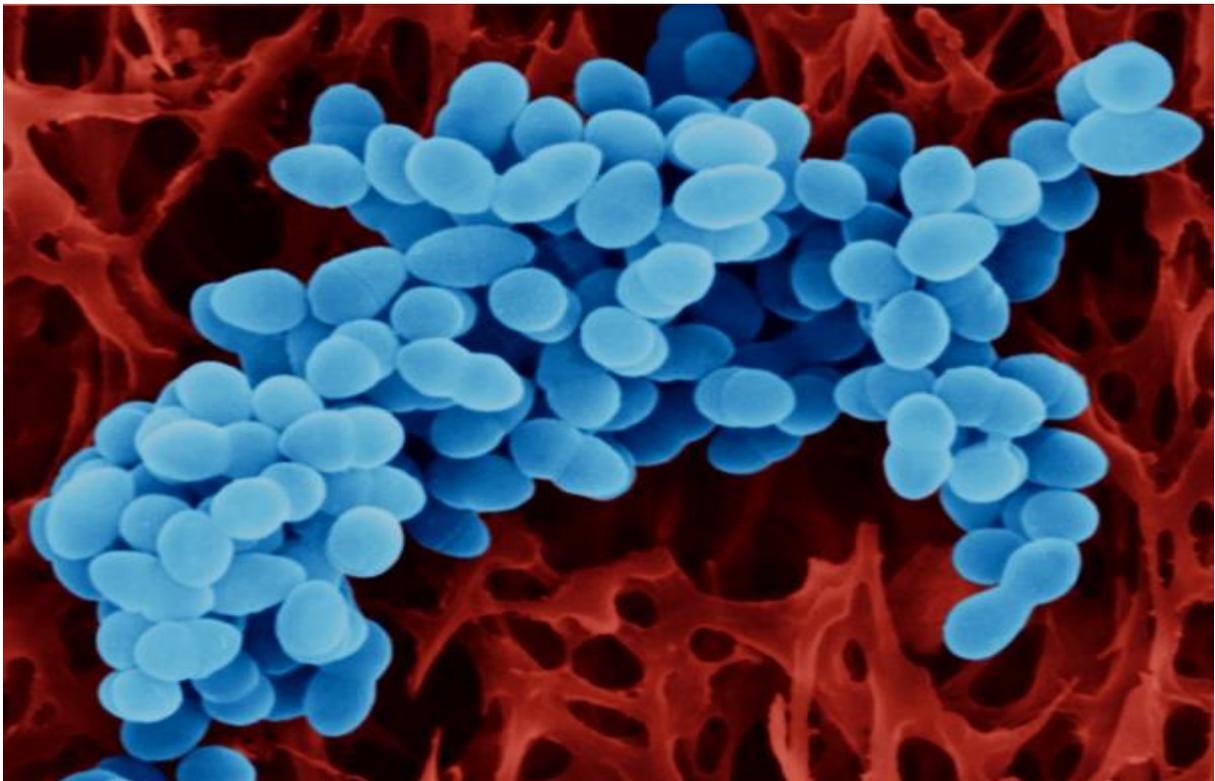


ФОТО 15. *Staphylococcus aureus*. Электронная микрофотография



ФОТО 16. *Escherichia coli*. Под электронным микроскопом

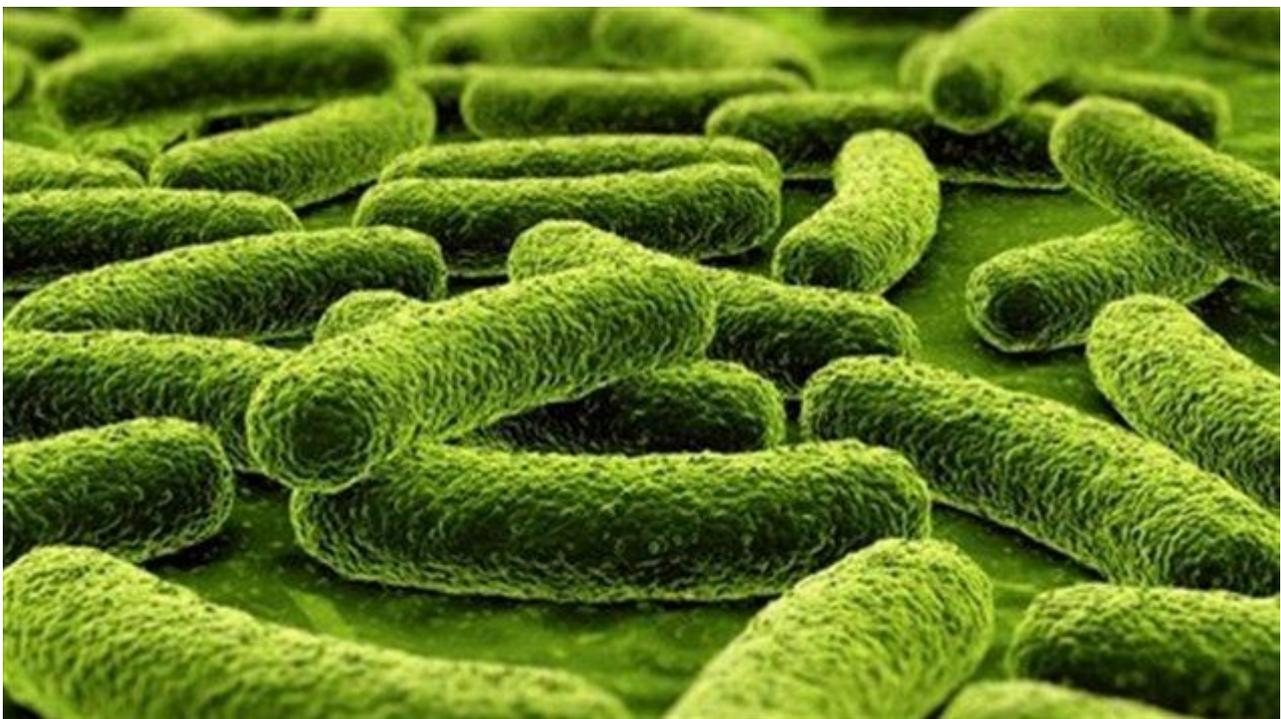


ФОТО 17. *Lactobacillus*. Под электронным микроскопом



ФОТО 18. *Streptomyces*. Под электронным микроскопом

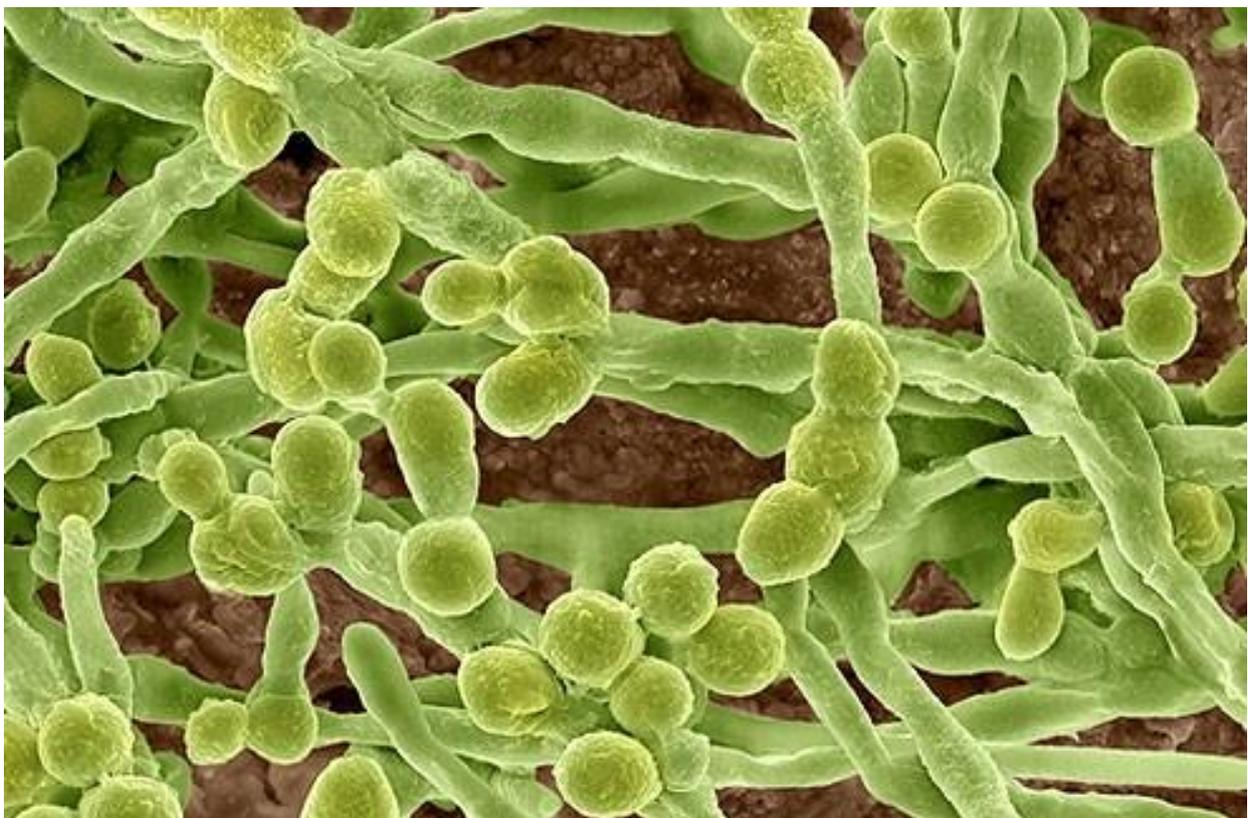


ФОТО 19. *Cladosporium*. Под электронным микроскопом

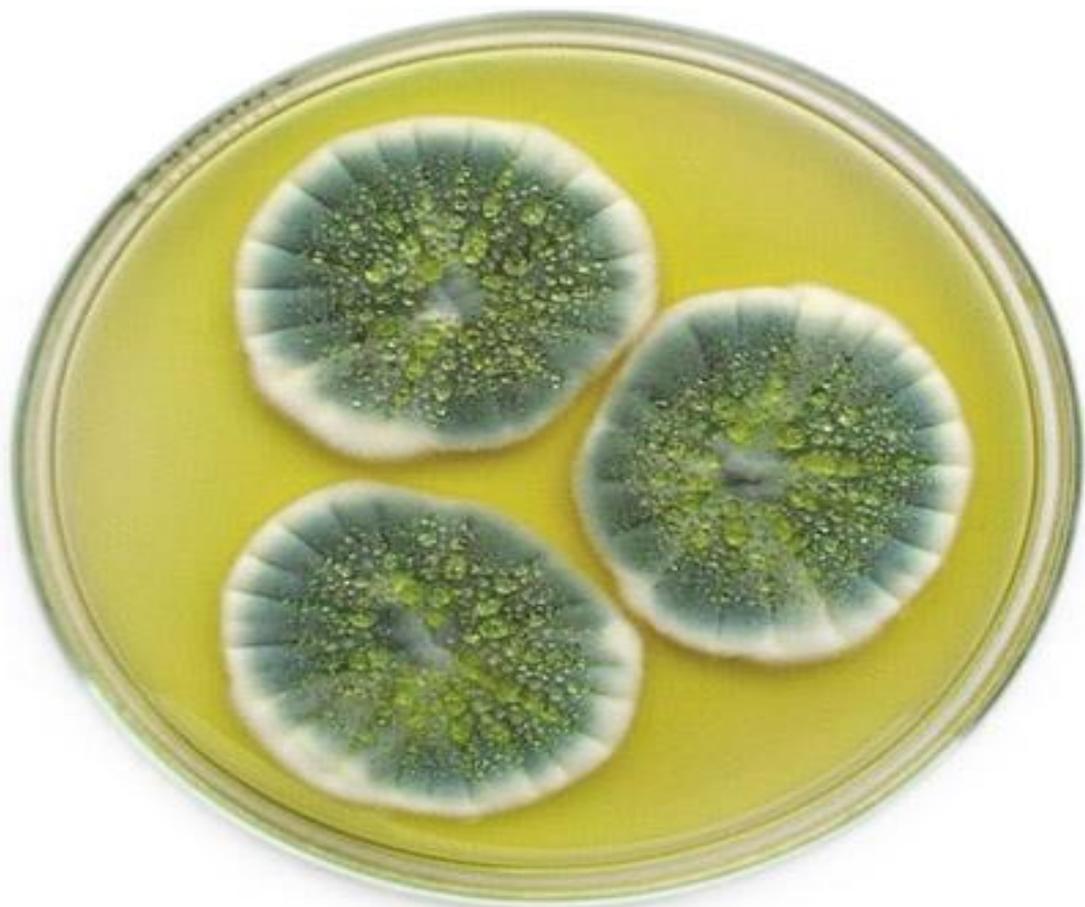


ФОТО 20. *Penicillium*. Морфология грибов на питательной среде

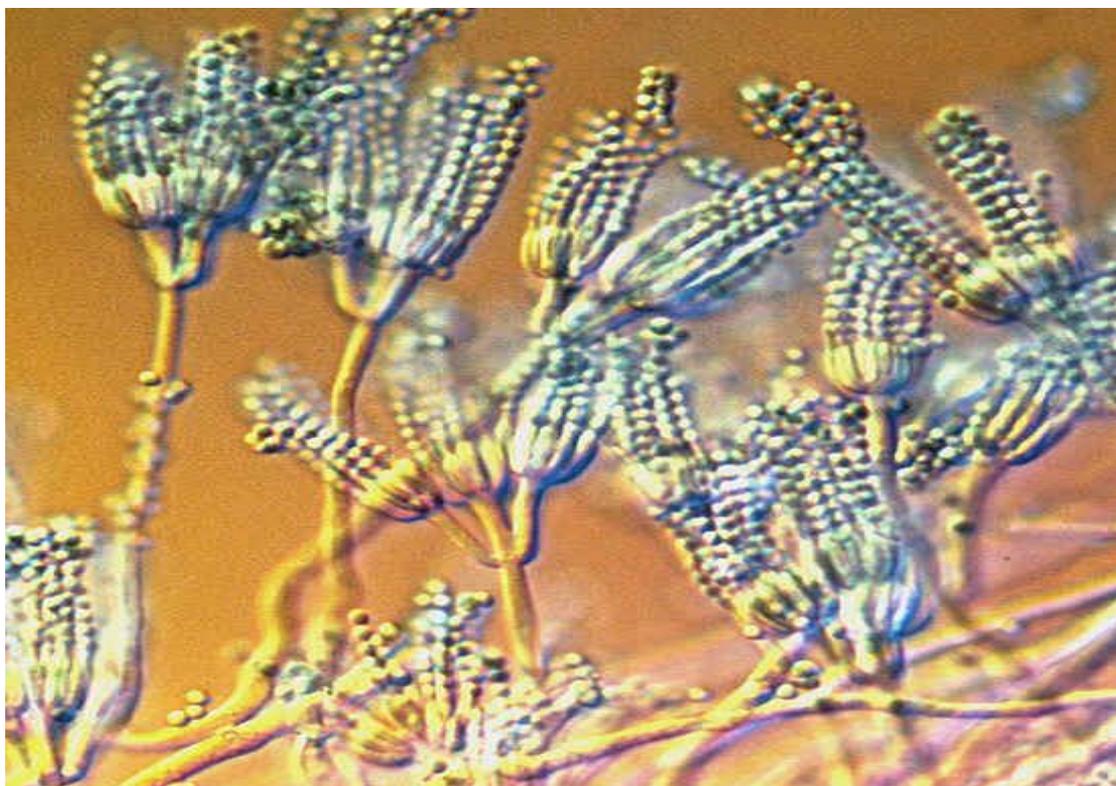


ФОТО 21. *Penicillium*. Спороносные структуры

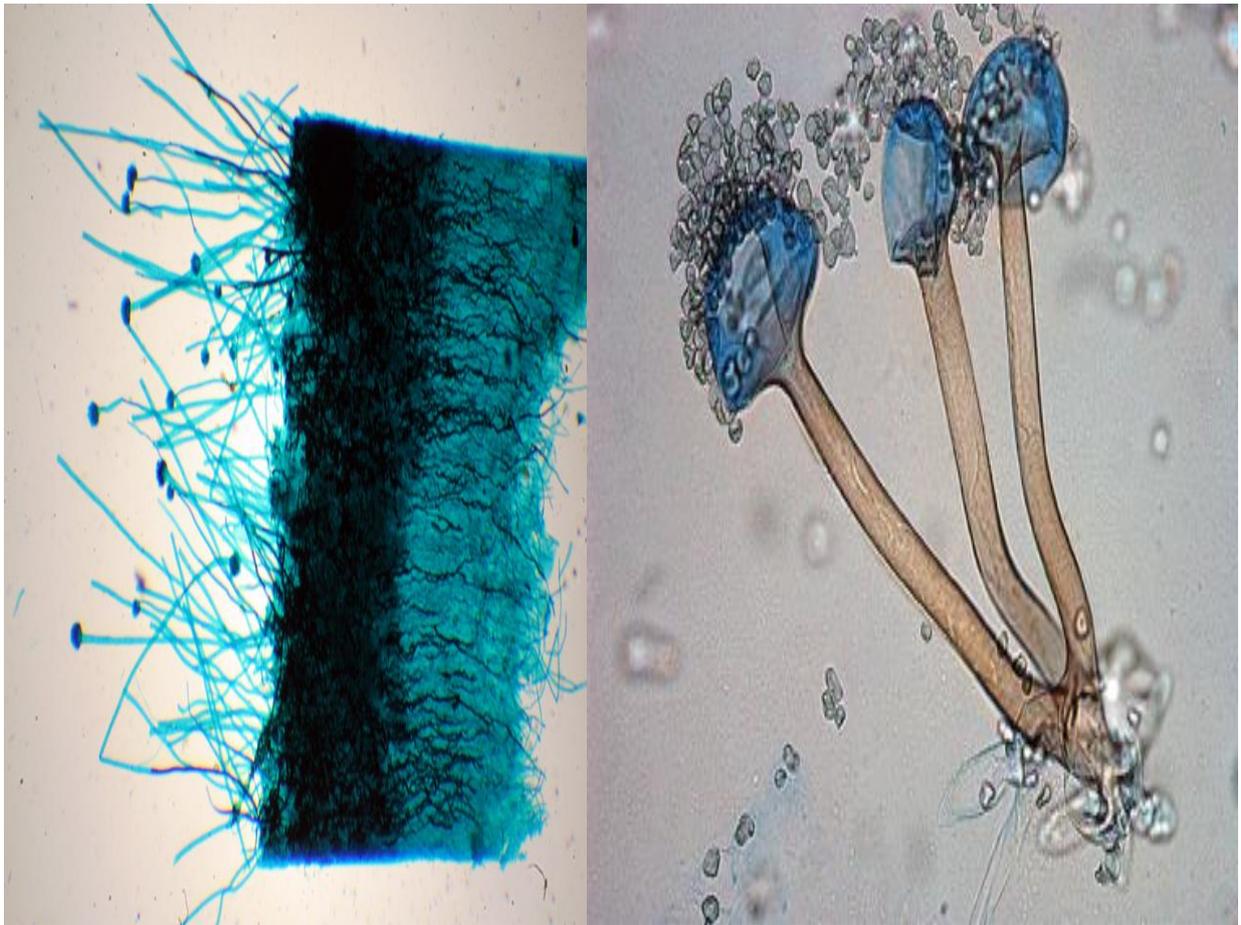


ФОТО 22. – Мисор. Спорангиспоры



ФОТО 23. – *Candida albicans* бластоконидии

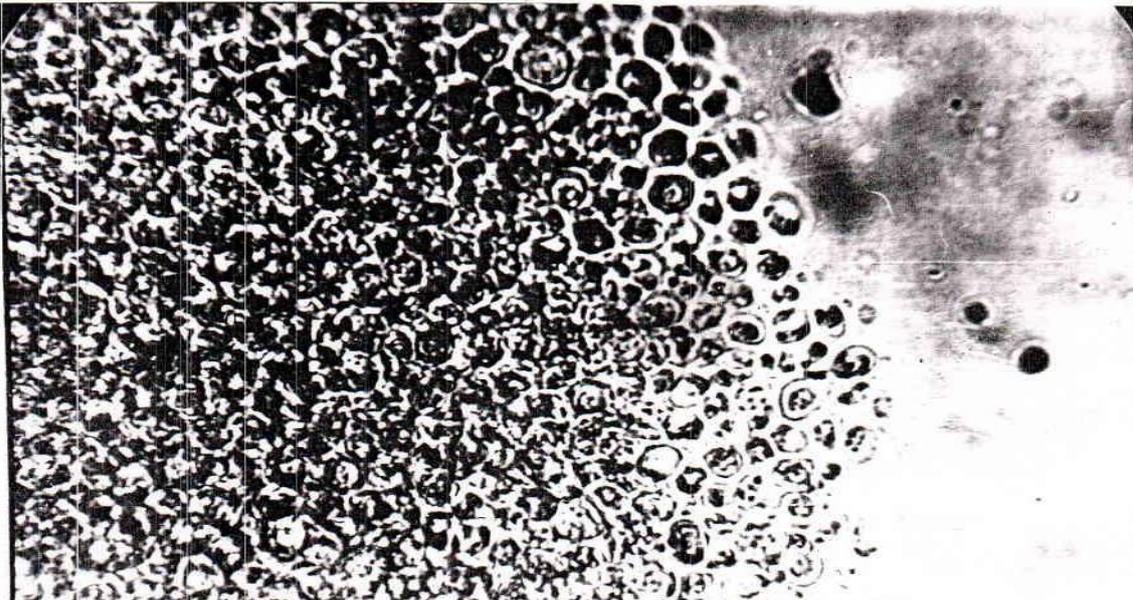
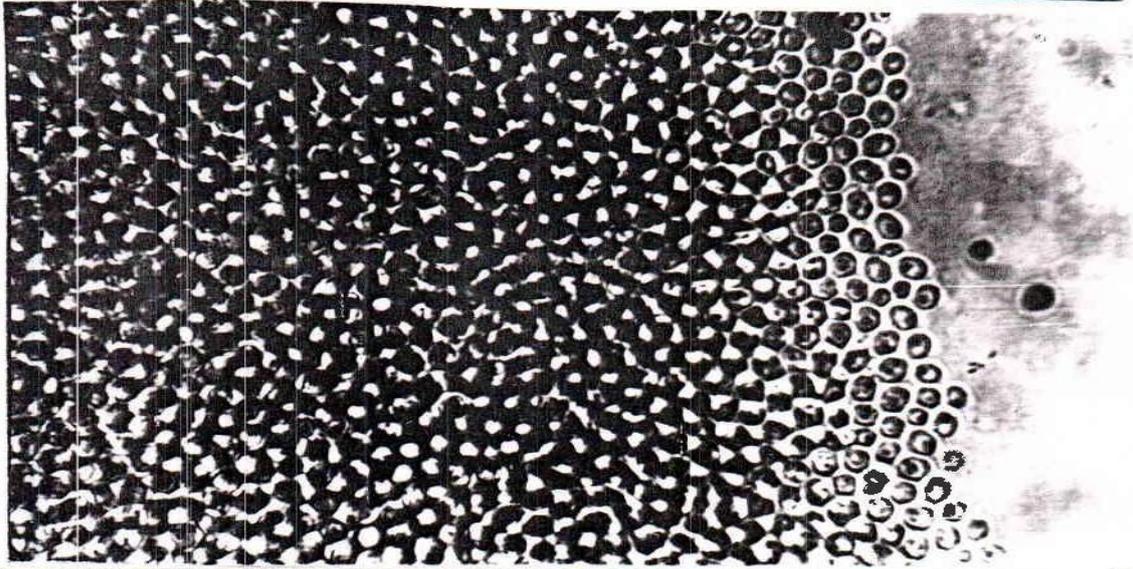
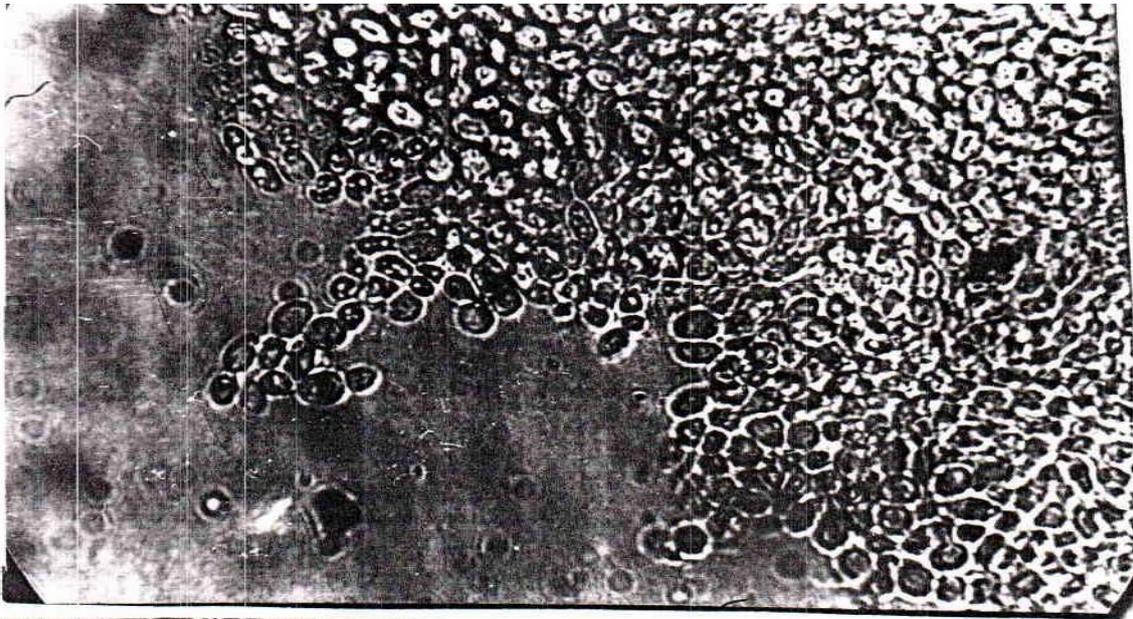


ФОТО 24. Дрожжи. Под электронным микроскопом (Машанов А.И.)



РИС. 31. – Анатомия бактериофага

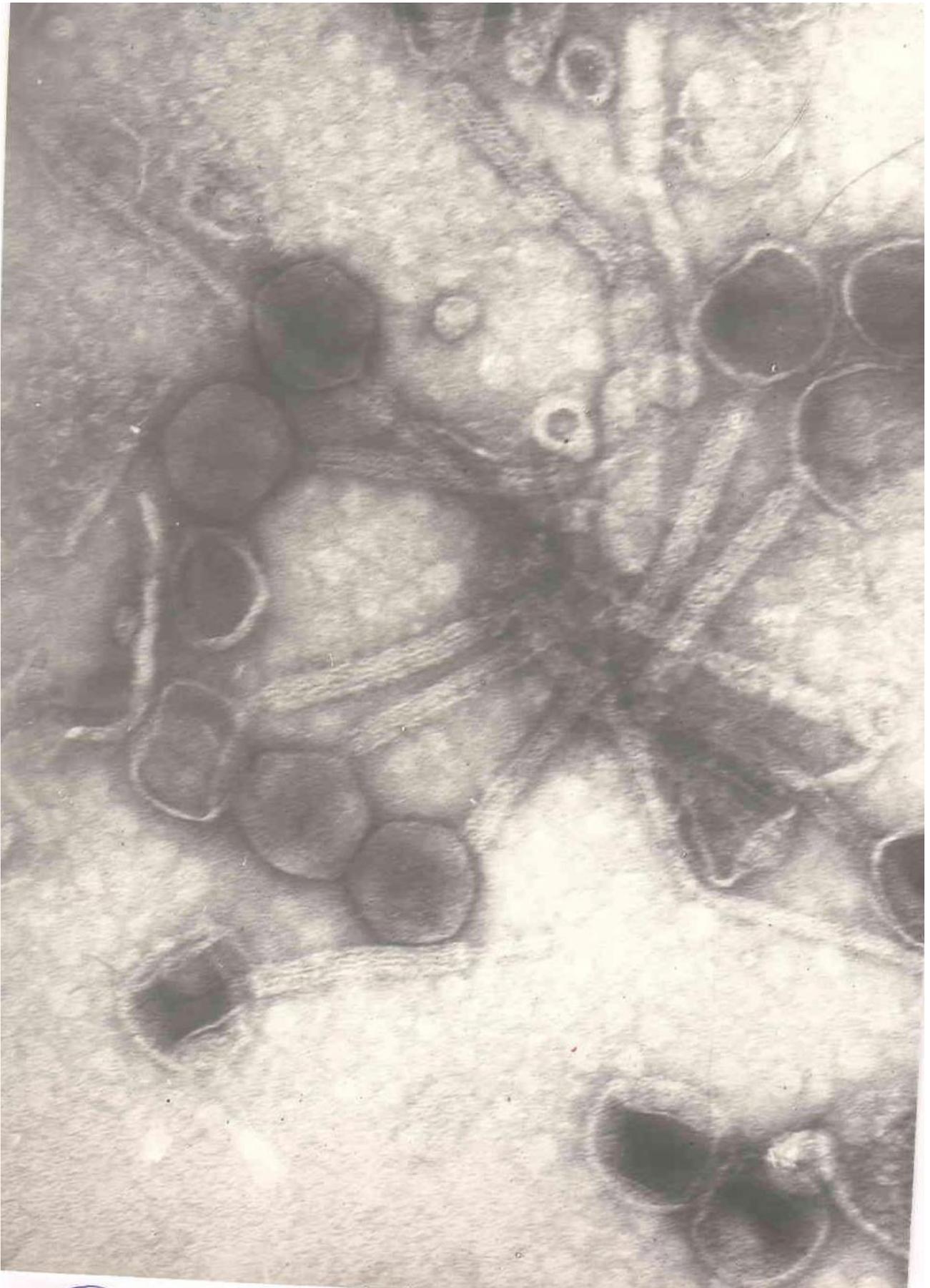


ФОТО 25. Бактериофаг. Под электронным микроскопом
(Машанов А.И.)

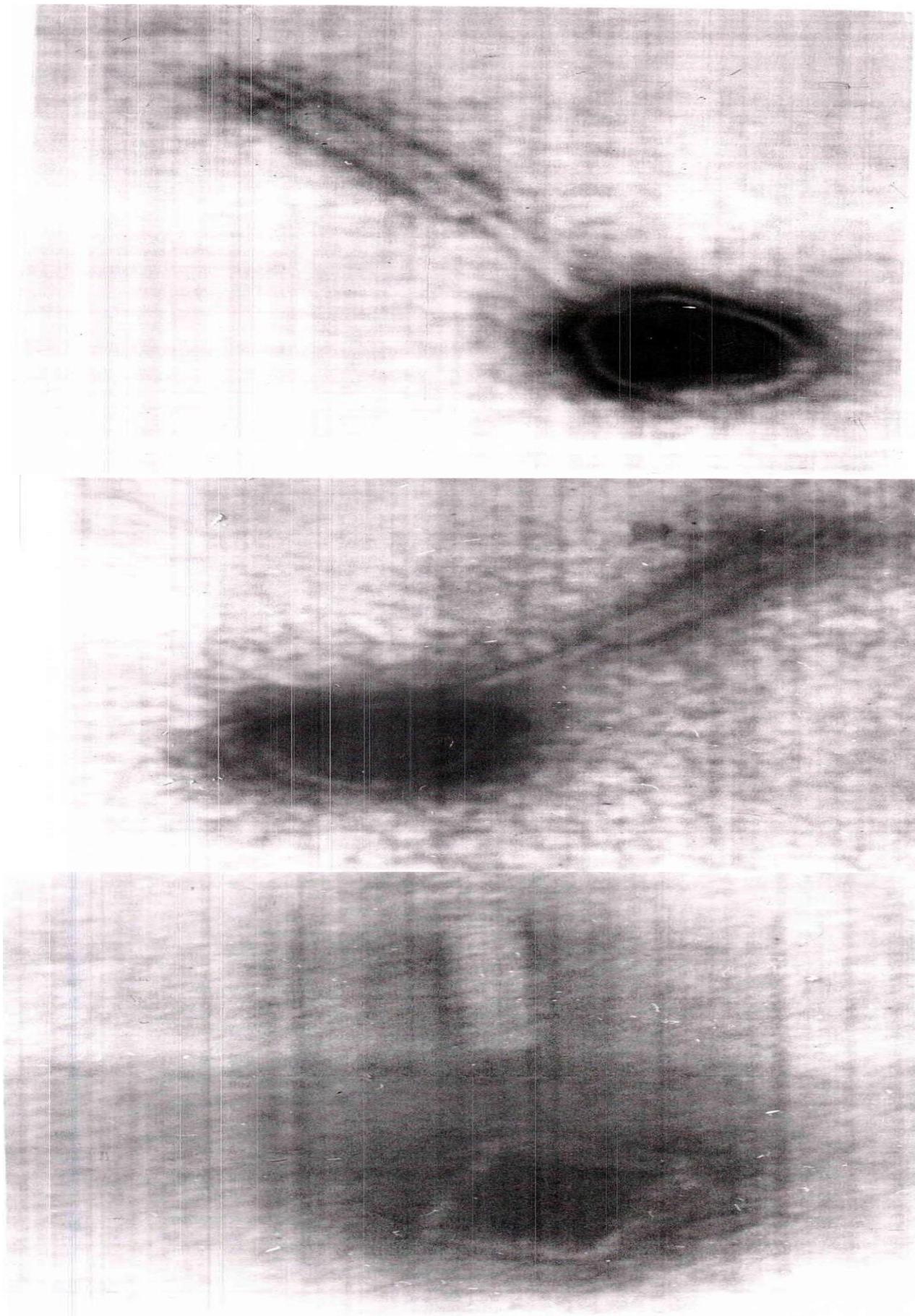


ФОТО 26. Формы головок бактериофага. Под электронным микроскопом (Машанов А.И.)

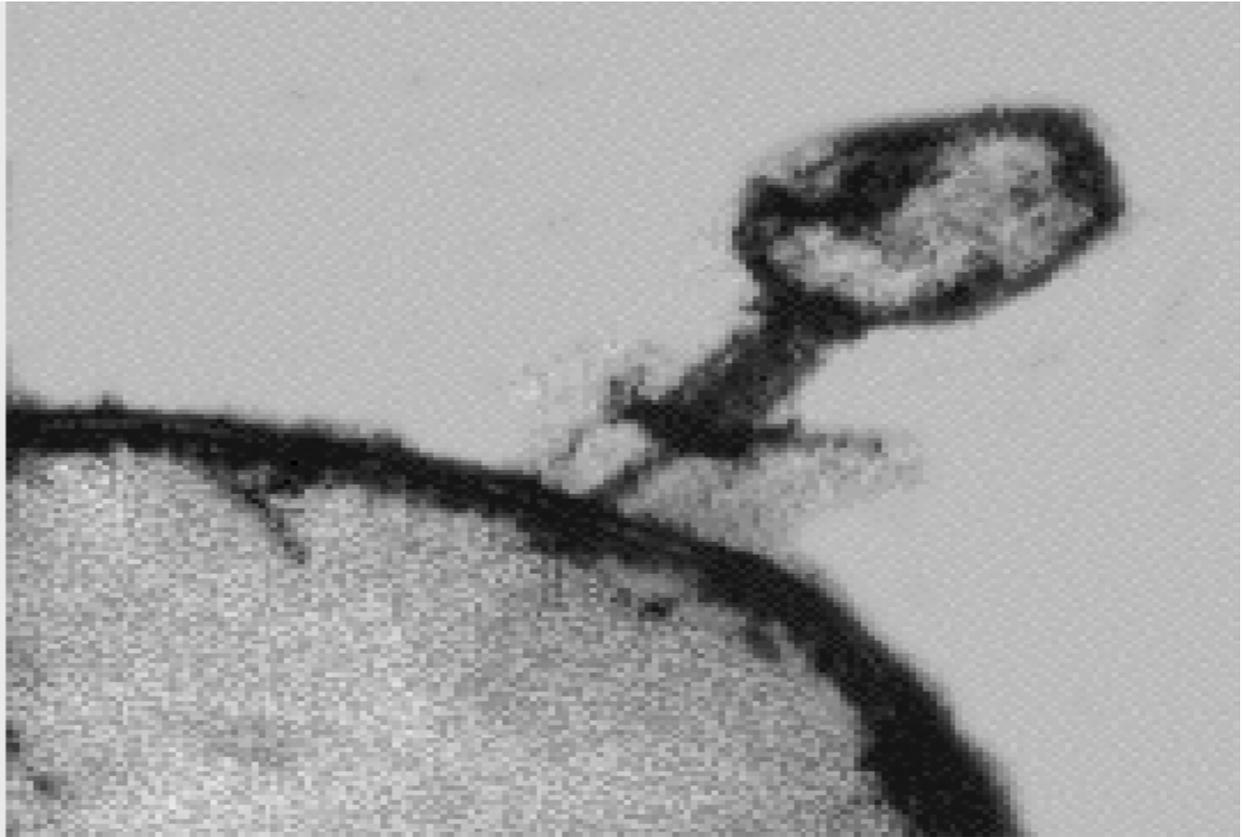


ФОТО 27. Адсорбция бактериофага на бактериальную клетку. Под электронным микроскопом

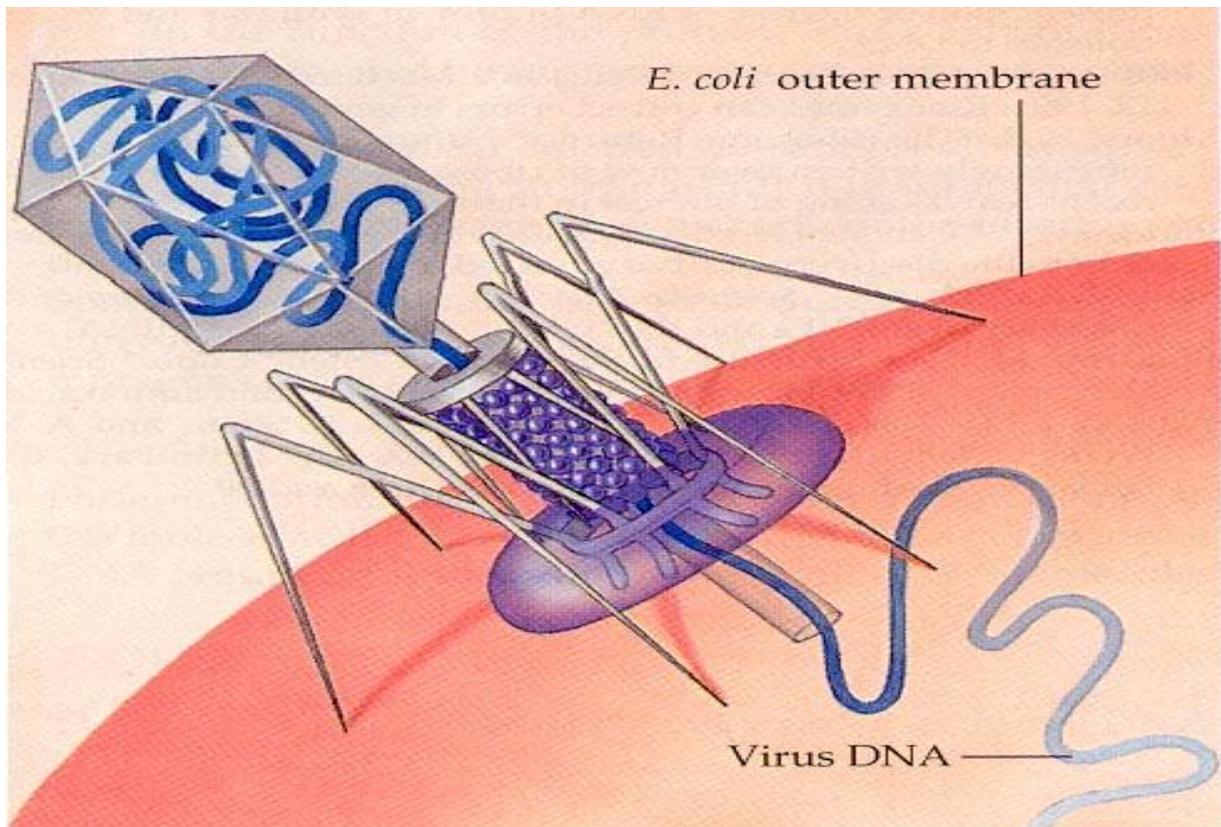


РИС 32. – Проникновение бактериофага в бактериальную клетку



ФОТО 28. Бактериофаг