***Лабораторная работа №1-2***

**Тема**: «Знакомство с питательными средами, методами их приготовления и стерилизации».

**Цель**: Познакомиться с методами стерилизации и приго­товления питательных сред на примере МПА.

**Материалы и оборудование:** стерильные чашки Петри, сте­клографы, технохимические весы с разновесами, плитка, дис­тиллированная вода, стеклянные палочки, сушильный шкаф, термостат, химический стакан, полусинтетический МПА.

**ХОД РАБОТЫ**

1. Познакомиться с основными средами, методами стери­лизации посуды.

2. Приготовить питательную среду из готового полусинте­тического порошка МПА.

3. Посеять микрофлору воздуха в различных вариантах опыта.

**Основные сведения о питательных средах**

Различные питательные среды используют для выделения, выращивания и длительного сохранения микроорганизмов в культурах [1, 4].

Основные требования к питательным средам следующие:

• достаточное количество питательных веществ;

• определенная реакция среды, являющаяся оптимальной для изучаемых микроорганизмов;

• абсолютная стерильность, обеспечивающая возможность получения в среде чистых культур изучаемых бактерий.

По физическому состоянию питательные среды бывают плотные, жидкие и полужидкие. В состав плотных питатель­ных сред входит агар-агар или желатин. Затвердевает при температуре 30 °С.

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

Натуральные среды готовят из продуктов животного или растительного происхождения (мяса, рыбы, молока, овощей, фруктов и др.), поэтому точный состав этих сред неизвестен. Их используют в том случае, когда хотят вырастить различ­ные виды микроорганизмов.

Состав синтетических питательных сред точно известен, и их используют при изучении характерных особенностей обмена веществ у различных микроорганизмов.

Чаще всего обычно используют полусинтетические среды. В их состав, кроме веществ известной химической природы, входят продукты растительного и животного происхожде­ния. Примером таких сред могут быть мясопептонные сре­ды, в которые, кроме мясного экстракта и пептона, входят: поваренная соль, фосфат калия. Полусинтетические среды хороши для выращивания определенных групп микроорга­низмов, а также для выделения из среды продуктов их жиз­недеятельности: антибиотиков, витаминов.

Для выращивания определенного вида микроорганизмов используют элективные питательные среды. В них создаются благоприятные специфические условия для разведения опре­деленного вида организмов. В такой среде интенсивно растет приспособленный к ней микроорганизм и угнетается раз­множение других видов. Например, в среде Виноградского развиваются только нитрифицирующие бактерии.

**Методы стерилизации посуды и питательных сред**

Стерилизация – важнейший этап и главное условие полу­чения чистых культур микроорганизмов. Стерилизуют посу­ду, инструменты и сами питательные среды, используемые в работе. Существует термическая и холодная стерилизация.

**Термическая стерилизация** осуществляется горячим воз­духом, насыщенным под давлением паром, прокаливанием на огне, кипячением и др.

1. Прокаливание на огне: в пламени горелки или спиртов­ки обычно стерилизуют петли и иглы для посева, предмет­ные стекла, инструмент.

2. Кипячение – в течение 30 мин.: обычно кипятят шпри­цы, иглы, пищевые продукты и др. При этом могут сохра­няться споры бактерий.

3. Стерилизация сухим жаром – в специальном сушиль­ном шкафу, как правило, стерилизуют хорошо вымытую по­суду: колбы, пробирки и др.; обычно каждый предмет завер­тывают в бумагу. При температуре 160–170 °С погибают не только все микроорганизмы, но и их споры.

4. Стерилизация паром проводится при температуре 100–120 °С, так как во влажной атмосфере микроорганизмы по­гибают быстрее при более низкой температуре.

Существует два способа стерилизации паром:

а) стерилизация насыщенным паром под давлением (при­мерно в 1 атм.) обычно осуществляется в автоклаве при тем­пературе около 120 °С. Микроорганизмы и их споры погиба­ют через 30–40 мин. Этот способ не приемлем для тех сред, которые содержат в своем составе белки или другие веще­ства, разрушающиеся при высокой температуре;

б) стерилизация текучим паром в аппарате Коха при тем­пературе 100 °С в течение 30–40 мин. Если его нет, можно использовать простую кастрюлю, наливая в нее небольшой слой воды. Однако следует помнить, что споры бактерий не погибают при однократном нагревании. Поэтому для полно­го обеспложивания текучим паром применяют повторные стерилизации, всего три-четыре раза с интервалом через сутки. В период между нагреваниями жизнеспособные спо­ры прорастают, а при повторном нагревании развивающиеся молодые клетки погибают. Такой метод называют тиндали­зацией, или дробной стерилизацией.

***Лабораторная работа №3-6. 12-15***

**СПОСОБЫ ДЛИТЕЛЬНОГО СОХРАНЕНИЯ ШТАММОВ МИКРООРГАНИЗМОВ**

**Цель занятия**

1. Ознакомление с основными положениями и требованиями по вопросам биобезопасности работы со штаммами-продуцентами.
2. Изучить традиционные и современные методы хранения про-мышленных штаммов.
3. Описать оборудование, реактивы и питательные среды для соз-дания благоприятных условий при хранении штаммов-продуцентов.
4. Освоить практические навыки по хранению промышленных штаммов.

**Оборудование**:холодильник,морозильная камера,сосуды Дюара,лиофилизатор, ламинарный бокс, настольный бокс, источники УФ-излучения, спецодежда (халаты, маски, чепчики, перчатки), водяная ба-ня, автоклав; одноразовая пластиковая и стеклянная посуда, пакеты био-безопасности, питательные среды и реактивы.

Раздаточный материал, интернет-сайты.

**Литература**

1. Практикум по микробиологии. Н.И. Асонов, Р.В. Белоусова, Э.А. Преображенская. – М.: Агропромиздат. 1989. С. 79-115.
2. Кухар Е.В., Киян В.С. Биотехнология грибов. Уч.пособие. – Ас-

тана, 2012. – 289 с.

1. Шевелуха В.С., Калашникова Е.А., Воронин Е.С. и др. Сельско-хозяйственная биотехнология. Под ред. В.С. Шевелухи. – М.: Высшая школа, 2003. – 469 с.

**Задание для студентов**

Задание 1. Изучить методы хранения штаммов-продуцентов с раз-работкой презентации или стендового доклада по каждому методу.

Задание 2. Приготовить голодные питательные среды, подготовить землю, воду, опилки, растительный материал для хранения продуцентов.

Задание 3. Провести пересев продуцентов и закладку на хранение. Задание 4. Составить протокол хода работы в рабочей тетради.

**Контрольные вопросы**

1. Какие существуют классические методы хранения штаммов-продуцентов?
2. Какие современные методы хранения штаммов-продуцентов существуют?
3. Опишите технологию приготовления голодных питательных сред, земли, воды, опилок, растительного материала для хранения про-дуцентов.
4. Какие требования предъявляются к проведению пересевов про-дуцентов и их хранению?

**Методы хранения микробных культур**

Необходимым условием успешной работы с микроорганизмами является правильное поддержание их в целях сохранения не только жизнеспособности клеток, но и таксономических, а также любых других, важных для исследователя свойств. Микроорганизмы разных систематических групп и даже различные штаммы и варианты одного вида отличаются чувствительностью к способу их хранения. Поэтому общего метода, одинаково пригодного для хранения многочисленных и разнообразных групп микроорганизмов, пока не существует. В крупных коллекциях разные группы микроорганизмов сохраняются индивидуальными методами. Кроме того, чтобы исключить возможность потери микроорганизма, каждый штамм сохраняется не одним, а несколькими способами.

Известно, что при хранении микроорганизмов в результате их популяционной изменчивости, обусловленной гетерогенностью популяции, изменяются их физиолого-биохимические особенности и, в частности, снижается антибиотическая или ферментативная активность. В процессе хранения, так же как при культивировании бактерий в различных условиях, может происходить диссоциация, т.е. расщепление однородной популяции бактерий на варианты, различающиеся генетическими, физиолого-биохимическими и морфологическими свойствами. Поэтому в некоторых случаях целесообразно подбирать условия хранения, оптимальные для определенного варианта, например для варианта, обладающего наибольшей биосинтетической активностью.

К числу наиболее распространенных способов хранения микроорганизмов относятся периодические пересевы на свежие питательные среды, сохранение культур на питательной среде под вазелиновым маслом, хранение клеток в лиофилизированном состоянии. Значительно реже микроорганизмы сохраняют при низких или сверхнизких температурах, в дистиллированной воде или 1%-м растворе хлористого натрия, а также на адсорбентах в высушенном со­стоянии. Выбор метода хранения во многом зависит от целей, для которых используются микроорганизмы, а также от имеющегося в распоряжении ис­следователя оборудования.

*1. ПЕРИОДИЧЕСКИЕ ПЕРЕСЕВЫ НА ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ*

Этот способ был одним из первых приемов длительного сохранения микро­организмов в лабораторных условиях и до настоящего времени широко ис­пользуется в практике микробиологических работ. Аэробные микроорганизмы пересевают чаще всего на поверхность скошенной агаризованной среды, микроаэрофилы — в полужидкую среду, содержащую 0,2 — 0,3 % агара, анаэробы — в толщу плотной среды или в жидкую среду, соблюдая принципы техники Р. Хангейта. Культуры пересевают на свежие среды в 2 пробирки (колбы). В дальней­шем микроорганизмы из одной пробирки используют для работы, а культуру во второй пробирке оставляют для хранения и следующего пересева.

Частота пересева на свежую среду различных микроорганизмов неодинако­ва и в большей степени определяется их свойствами. Многие микроорганизмы можно пересевать один раз в 1 —2 мес, хотя другие, например молочнокислые бактерии, нуждаются в более частых пересевах. Хранение культур в холо­дильнике при 4 —6 °С позволяет увеличить время между пересевами.

Поддержание культур микроорганизмов регулярными пересевами имеет ряд существенных недостатков. Основной из них - возможная утрата некоторых морфологических и физиологических признаков. Кроме того, частые пересевы нередко снижают биохимическую активность культур, повышают опасность инфицирования ее посторонними микроорганизмами. При частых пересевах, особенно на жидкие среды, велика вероятность возникновения спонтанных мутантов и их селекция.

*2. ХРАНЕНИЕ ПОД МИНЕРАЛЬНЫМ МАСЛОМ*

Хранение под минеральным маслом широко используется для бактерий и микроскопических грибов. Этот метод обеспечивает довольно длительное со­хранение жизнеспособности и стабильности таксономических и других при­знаков у микроорганизмов различных систематических групп. Масло пред­отвращает высыхание среды, замедляет процессы метаболизма и позволяет увеличить время между пересевами.

Микроорганизмы выращивают на благоприятной агаризованной питатель­ной среде; аэробные микроорганизмы — на поверхности коротко скошенной (под углом 45°) среды, микроаэрофилы и факультативные анаэробы — в полу­жидкой среде, анаэробы — в толще среды (посев уколом или в расплавленную среду с перемешиванием). Хорошо развившиеся культуры заливают маслом. Как правило, аспорогенные бактерии заливают через 2— 7 сут после посева в зависимости от скорости роста микроорганизма, бациллы и актиномицеты — в стадии сформировавшихся покоящихся форм. Дрожжи рекомендуется заливать маслом через 4—10, мицелиальные грибы — через 7 —12 сут. Наиболее пригод­но для заливки культур микроорганизмов высокоочищенное медицинское вазе­линовое масло с плотностью 0,8 — 0,9. Предварительно масло стерилизуют 1 ч в автоклаве при 1 ати, а затем для удаления влаги прогревают в течение 1 ч в сушильном шкафу при температуре не выше 150 ° С или оставляют на двое-трое суток при комнатной температуре. Культуры заливают маслом так, чтобы его слой не превышал 1 см над средой или верхним краем скошенной среды, и сохраняют при комнатной температуре либо в холодильнике при 4 — 6 °С.

Для пересева клетки из-под масла отбирают петлей и, удалив излишек мас­ла проведением петли по стенке пробирки, переносят на свежую питательную среду. Рекомендуется использовать среду того же состава, на которой культуру хранили. Многие микроорганизмы в первом пассаже после хранения под мас­лом развиваются медленнее, однако при последующих пересевах скорость их роста восстанавливается.

Метод хранения микроорганизмов под вазелиновым маслом прост, удобен в обращении, может быть использован в любой лаборатории. К недостаткам его можно отнести возможность инфицирования помещения микроорганиз­мами за счет разбрызгивания масла при обжигании петли, а также необходи­мость специальной очистки посуды от масла.

*3. ХРАНЕНИЕ В ЛИОФИЛИЗИРОВАННОМ СОСТОЯНИИ*

Хранение лиофильно высушенных клеток — широко распространенный метод длительного сохранения микроорганизмов. Лиофилизацией называют процесс высушивания под вакуумом замороженных клеток. Лиофильно-высушенные клетки сохраняют в ампулах, запаянных под вакуумом или в струе стерильного газа (чаще всего азота). Применение этого метода позволяет в те­чение 10 — 20 лет и более сохранить без заметных изменений жизнеспособность, морфологические, культуральные, физиологические свойства, а также биохимическую активность клеток.

Микроорганизмы, подлежащие лиофилизации, выращивают в оптималь­ных условиях до начала стационарной фазы роста или окончания формирова­ния покоящихся форм.

Рис. 4. Последовательность (1—6) вскрытия двухкамерной ампулы с лиофильно высушенными клетками микроорганизмов (а) и различных однокамерных ампул (б)

Затем клетки, или соответственно, покоящиеся формы суспендируют в специальных жидкостях, получивших название защитных сред. В состав защитных сред входят различные вещества, которые предохраняют клетки от повреждений в период замораживания и высушивания.

Ниже приведены рецепты некоторых защитных сред, используемых при лиофилизации клеток различных микроорганизмов:

• желатин — 1 г, сахароза — 10 г, вода дистиллированная — 100 мл;

• молоко обезжиренное — 100 мл, глюкоза — 7 г;

• молоко обезжиренное — 100 мл, NH4Cl— 0,5 г, аскорбиновая кислота - 0,5 г, тиомочевина — 0,5 г;

• лошадиная сыворотка — 75 мл, мясной бульон — 25 мл, глюкоза — 7,5 г.

Для успешной лиофилизации плотность микроорганизмов в защитной среде должна быть как можно более высокой: 109— 1010клеток в 1 мл. Полученную суспензию разливают в ампулы из нейтрального стекла по 0,5 — 1,0 мл, замо­раживают при температуре от -20 до -70 °С, затем высушивают и запаивают под вакуумом. Остаточная влажность лиофилизированных клеток колеблется от 1 до 6 % и определяется составом защитной среды и режимом высушивания. В различных лабораториях режимы замораживания и высушивания заметно варьируют и во многом зависят от имеющегося оборудования. Ампулы с лиофильно высушенными клетками рекомендуется сохранять в темноте при тем­пературе 4 —6°С. Хранение при более высокой температуре, особенно превы­шающей 25 — 30 °С, заметно снижает выживаемость клеток. Для реактивации к лиофилизированным клеткам добавляют по каплям стерильную дистиллированную или водопроводную воду в количестве 0,5 — 1,0 мл (рис. 4). После регидратации (от 10 мин до 2 ч) клетки высевают на более богатые питательные среды.

Лиофилизацию широко применяют для длительного хранения различных микроорганизмов. Тем не менее этот метод нельзя считать универсальным. Следует отметить, что к лиофилизации более устойчивы грамположительные, чем грамотрицательные бактерии. Очень плохо переносят ее фототрофные и хемолитотрофные бактерии, микоплазмы, многие облигатные анаэро­бы. Выживаемость спор после лиофилизации заметно выше, чем вегетатив­ных клеток. Дрожжи с мелкими клетками и аскоспорами родов PichiaиLipomycesвыдерживают лиофилизацию лучше, чем слабоспорулирующие или неспорулирующие крупные клетки дрожжей родовSaccharomyces,Kluyveromyces,Rhodotorula.

*4. ХРАНЕНИЕ ПРИ НИЗКИХ И СВЕРХНИЗКИХ ТЕМПЕРАТУРАХ*

Хранение микроорганизмов в замороженном состоянии при низких и сверх­низких температурах по сравнению с другими методами характеризуется наи­большей универсальностью. Однако этот метод требует специального оборудо­вания и большой осторожности в работе с жидким азотом, поэтому использу­ется лишь для сохранения микроорганизмов, не выдерживающих лиофили­зацию.

Клетки замораживают в широком диапазоне температур (от -10 до -196 °С) и при различных скоростях замораживания. Для защиты от повреждающего действия низких температур клетки предварительно суспендируют в растворах криопротекторов. Чаще других применяют 10 — 20%-й раствор глицерина, 7 — 10%-й раствор диметилсульфоксида или 20%-й раствор сахарозы. Суспензию клеток с высокой плотностью (109—1010клеток в 1 мл) разливают в ампулы или флаконы с завинчивающейся крышкой. Ампулы запаивают и помещают в холодильник с температурой -70 °С (скорость охлаждения 1°С/с), а затем переносят в жидкий азот, где и сохраняют при -196 °С. Оттаивание замороженных клеток должно быть как можно более быстрым. Поэтому ампулы погружают на 2 мин в водяную баню с температурой 35— 45оС. Клетки из ампул высевают на богатые питательные среды.

При температуре хранения от -20 до -40 °С хорошо выживают немногие микроорганизмы; значительно эффективнее хранение при -70 °С в твердой углекислоте и особенно в условиях сверхнизких температур: при -196 °С (жидкий азот) или при -210°С (газовая фаза жидкого азота).

*5. ХРАНЕНИЕ В ГЛИЦЕРОЛЕ*

Одним из самых удобных методов хранения микроорганизмов является их содержание при низких температурах (-20 °С) в растворах глицерола, который служит криопротектором. Данный способ широко распространен, однако не все микроорганизмы выдерживают такую обработку. Поэтому считается, что для клеток, подвергаемых замораживанию в глицероле, необходимы предва­рительные эксперименты по определению степени их выживаемости. Наиболь­шее распространение этот способ консервации микроорганизмов получил при хранении суспензий различных спор.

Для проведения экспериментов по хранению готовят 50%-й раствор глице­рола в дистиллированной воде и стерилизуют его при 1 ати в течение 30 мин. Клетки из выросших культур (обычно из середины экспоненциальной фазы роста), предназначенные для хранения, смешивают в пропорции 1:1 с 50%-м глицеролом, перемешивают и ставят в морозильник. Хранить суспензии удоб­но в стерильных пробирках Эппендорф, а для их приготовления использовать автоматические пипетки со стерильными наконечниками и готовить смеси в ламинарном шкафу. Из сохраняемых клеток периодически (2 — 6 раз в год) отбирают пробы для проверки на выживаемость. В зависимости от результатов проверки рассчитывают схемы консервации той или иной культуры и перио­дичности их пересева.

Для культур микроорганизмов с твердых сред перед смешиванием с глице­ролом готовят суспензии в жидкой среде или в оптимальном для хранения буферном растворе (проверяется экспериментально). Можно также суспенди­ровать клетки с твердых сред непосредственно в 25%-м стерильном глицероле.

*6. ХРАНЕНИЕ В ДИСТИЛЛИРОВАННОЙ ВОДЕ ИЛИ 1%-м РАСТВОРЕ ХЛОРИДА НАТРИЯ*

Этот метод не требует специального оборудования и доступен любому экс­периментатору.

Микроорганизмы предварительно выращивают в оптимальных условиях, При необходимости центрифугируют, после чего клетки суспендируют в дис­тиллированной воде или 1%-м растворе хлорида натрия. Успешному сохране­нию клеток способствует высокая плотность суспензии: не менее 108— 109кле­ток в 1 мл.

Суспензию разливают в стерильные пробирки или флаконы и сохраняют в холодильнике или при комнатной температуре. Рекомендуется оставлять на хранение клетки начала стационарной фазы роста культуры или сформировав­шиеся покоящиеся формы — споры, цисты.

Допустимые сроки хранения некоторых микроорганизмов этими методами в холодильнике при 4 — 6 °С варьируют от 6 до 12 мес. в зависимости от вида бактерий.

*7. ХРАНЕНИЕ В ВЫСУШЕННОМ СОСТОЯНИИ НА АДСОРБЕНТАХ*

Этот метод применяют главным образом для актиномицетов, микроскопи­ческих грибов и анаэробных бактерий, образующих споры. В качестве адсор­бентов используют почву, кварцевый песок, силикагель, вату, фильтроваль­ную бумагу. Разработанной стандартной техники этот способ не имеет. В самом общем виде он сводится к тому, что стерильный адсорбент, помещенный в ампулы, смешивают с густой суспензией клеток и высушивают под вакуумом или при комнатной температуре. Имеются данные, что у актиномицетов после хранения в почве или кварцевом песке восстанавливаются некоторые таксоно­мические признаки (окраска воздушного и субстратного мицелия), которые были утрачены в процессе длительного культивирования в лаборатории.

*8. ОЦЕНКА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ ПОСЛЕ ДЛИТЕЛЬНОГО ХРАНЕНИЯ*

Жизнеспособность микроорганизмов после различных сроков хранения определяют путем высева их на богатые питательные среды с последующим подсчетом выросших колоний. Процент выживаемости микроорганизмов находят по отношению числа сохранившихся клеток к первоначальному числу жизнеспособных клеток (до начала хранения), принятому за 100 %.

***Лабораторная работа № 7-9***

Тема: **Изучение морфологии клеток дрожжевых грибов и определение подъемной силы *Saccharomyces cerevisia.***

**Теоретические пояснения:**

Дрожжи - все высшие грибные организмы, находящиеся в одноклеточной форме в ростовой фазе и размножающиеся почкованием или делением. Важным следствием одноклеточного существования является повышение метаболической активности, интенсификация обмена с окружающей средой в результате увеличения отношения поверхности клетки к ее объему.

Наиболее типичным способом бесполого размножения является почкование; бинарное деление наблюдается редко. Клетки, получающиеся в результате почкования, могут оставаться соединенными, образуя псевдомицелий. Клетки мицелия могут быть одинаковыми либо разных размеров. В таком случае различают простой или дифференцированный ложный мицелий. Почкование начинается с появления на поверхности клетки небольшого сферического выроста, который увеличивается в размерах и отшнуровывается от материнской клетки, оставляя на ней шрам или почечный рубец. Почки возникают одновременно (множественное почкование) или же всегда на одном и том же месте (по полюсам). Иногда при отделении почки от материнской клетки в перешейке закладывается перегородка – *септа*. Такой способ называется почкующимся делением (Рис.22).



Рис. 22. *Saccharomyces cerevisia*: колонии на сусловом агаре *(слева)*, почкующиеся клетки *(справа),(Прудникова, 2008)*

Дрожжи используются в заквасках для получения хлеба и кисломолочных продуктов, при изготовлении пива и вина, сидра, виноградных и ягодных вин, спирта и крепких напитков, получение липидов и полисахаридов, белков и многоатомных спиртов, органических кислот, витаминов, ферментов. Дрожжевые препараты находят применение в медицине, фармакологии и в качестве кормовых добавок в рационах сельскохозяйственных животных. Разрушение дрожжами сложных природных и неприродных соединений – важное свойство, которое используется для очистки сточных вод промышленных предприятий.

Осмофильные дрожжи лучше растут при высоких концентрациях сахара в среде (50 % и выше) – *Zygosaccharomyces* - встречаются в пчелиных ульях, являются причиной порчи меда, варенья, джема, вызывают скисание вин. Некоторые виды дрожжей – *Pichia*, *Hansenula* – ассоциированы с насекомыми-ксилофагами (короедами) и встречаются в местах их обитания. Они используют в качестве питательных веществ целлобиозу и ксилозу. Некоторые дрожжи, такие как *Candida*, могут быть возбудителями тяжелых заболеваний (Рис.23).

****

Рис.23. *Candida albiens* (слева), *Zygoccharomyces* (по центру) и *Pichia* (справа), *Прудникова, 2008)*

Термин «дрожжи» таксономического значения не имеет. Филогенетические связи обнаруживаются как с сумчатыми, так и с базидиальными грибами. Дрожжи, у которых половой процесс не обнаружен, относят к несовершенным грибам (р. *Candida*). У дрожжей из класса аскомицетов в результате полового процесса образуются сумки с аскоспорами (33 рода, наиболее изучен р. *Saccharomyces*). Базидиомицетовые дрожжи при половом процессе образуют базидии, на которых формируются экзогенные половые споры – споридии (р. *Filobasidium, Filobasidiella*). Еще более упрощенными формами следует считать аспорогенные дрожжи. Только некоторые из них образуют мицелий; большинство размножается исключительно почкованием (р. *Torulopsis*).

**Цель работы:** изучить морфологию клеток дрожжевых грибов и определить подъемную силу *Saccharomyces cerevisia.*

**Материалы и оборудование:** микроскоп, предметные стекла, покровные стекла, пинцет, бактериологическая петля, спиртовка, спички, карандаш по стеклу, пипетки объемом 1 и 2 см3 , дистиллированная вода, чистые культуры дрожжей, красители (метиленовый синий, основной фуксин, фуксин Циля, генцианвиолет), раствор Люголя, этиловый спирт, иммерсионное масло для микроскопии, мука, 2,5 % раствор хлорида натрия.

**Ход работы:**

1. Приготовьте фиксированный препарат из чистой культуры дрожжей. Окрасьте по Грамму. Полученный препарат рассмотрите под иммерсией. Зарисуйте в альбом.

2. Приготовьте препарат типа «раздавленная капля». Рассмотрите под иммерсией и зарисуйте форму клеток и их строение: цитоплазму, вакуоли и включения запасных питательных веществ. Цитоплазма более темная зернистая масса, вакуоли имеют вид светлых просвечивающихся пятнышек, капли жира светлые, блестящие, включения имеют вид плотных зернышек. Найти и зарисовать почкующиеся клетки. Окрасить препарат раствором метиленовой сини до темно-голубого цвета. Отметить наличие живых (почкующихся) клеток и окрашенных в синий цвет (мертвых).

3. Определить подъемную силу дрожжей:

- Отвесить навеску дрожжей 0,31 г.

- Добавить 4,8 мл раствора поваренной соли, нагретого до 35⁰С. Тщательно перемешать.

- Добавить 7 г муки. Скатать шарик из теста.

- Опустить шарик в стакан с водой 35⁰С и ставят в термостат при 35⁰С. Заметить время и дождаться всплывания шарика на поверхность воды.

- Подъемная сила (g)=t \* 3,5 (мин), где t – время всплывания шарика, 3,5 – эмпирический коэффициент.

- Результаты занести в альбом.

**Вопросы для самоконтроля:**

1. Почему термин «дрожжи» не имеет таксономического значения?

2. Как осуществляется размножение дрожжей?

3. Что называется почкующимся делением?

4. Какое применение находят дрожжи в промышленности?

**Лабораторная работа №10-11**

**Тема:** «Виды брожений. Уксуснокислое брожение».

**Цель:** знакомство с химизмом процесса брожения, мор­фологией микроорганизмов.

**Материалы и оборудование:** кислое пиво, чайный гриб, 10-процентный р-р соды, 10-процентный р-р хлорного же­леза (FeCl3), р-р йода, р-р люголя, фуксин, спирт, генцианви­олет, полоски фильтровальной бумаги, предметные стекла, спиртовки.

**ХОД РАБОТЫ**

1. Рассмотреть и описать микроорганизмы, зарисовать их с живых и фиксированных препаратов. Живые препараты приготовить методом раздавленной капли и висячей капли из пленки и р-ра чайного гриба, кислого пива, подкрасить р-ром йода, люголя. Мазки окрасить по Граму.

2. Сделать качественную реакцию на уксусную кислоту.

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

С2Н5ОН + О2 = СН3СООН + Н2О = Е(494 кДж).

При этом выделяется значительное количество энер­гии. Различные продукты, содержащие алкоголь (спирт, вино, пиво), являются благоприятным субстратом для развития уксуснокислых бактерий, попадающих сюда из воздуха.

Эти бактерии встречаются повсеместно в природе, пыли, на фруктах, овощах. Уксуснокислые бактерии объединены в род Асetоbасtег. На поверхности растворов бактерии об­разуют пленки, состоящие из полисахаридов. Типовой вид Асetоbасtеr aceti представлен слабоподвижными палочковид­ными эллиптическими клетками, одиночными, в парах или цепочках с размерами 0,6–0,8 х 1,0–3,0 мкм.

Это бесспоровые грамотрицательные палочки, облигат­ные аэробы, они растут и размножаются на поверхности пи­тательных сред, образуя тонкие пленки. Нередко образуют инволюционные формы в виде раздутых, разветвленных или нитевидных образований. Асetоbасtеr aceti образует гладкую слизистую пленку, желтеющую от раствора йода. Палочка активно развивается при температуре около 34 °С, выносит концентрацию уксусной кислоты до 6 %. Асetоbасtеr xylinum образует в культуре грубую, морщинистую, слизистую плен­ку значительной толщины. Клетки окрашиваются йодом в синий цвет. Бактерии живут в пленке чайного гриба, в со­обществе с дрожжами. Такой симбиоз взаимовыгоден: дрож­жи сбраживают сахар до спирта, а уксуснокислые бактерии окисляют спирт до уксусной кислоты.

Acetobacter pasteurianum образует сухую морщинистую пленку, поднимающуюся по стенкам колбы и окрашиваю­щуюся от йода в синий цвет. Форма бактерий морфологиче­ски близка к Ас. aceti. Развивается на алкогольных напитках [1, 4, 9, 12].

**Проведение качественной реакции**

**на уксусную кислоту**

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

Содержимое колб анализируют, описывают характер об­разовавшихся пленок, микроскопируют окрашенные мазки, делают качественную реакцию на СНЗСООН. Для этого к 5 мл скисшего пива в пробирку добавляют 2 мл 10-процент­ного р-ра соды и немного хлорного железа (3) той же концен­трации. Смесь нагревают. При наличии уксусной кислоты появляется красное окрашивание вследствие образования ацетата железа:

3СН3СООNa + FeCl3 → (СН3СОО)3Fe + 3NaCl

по­