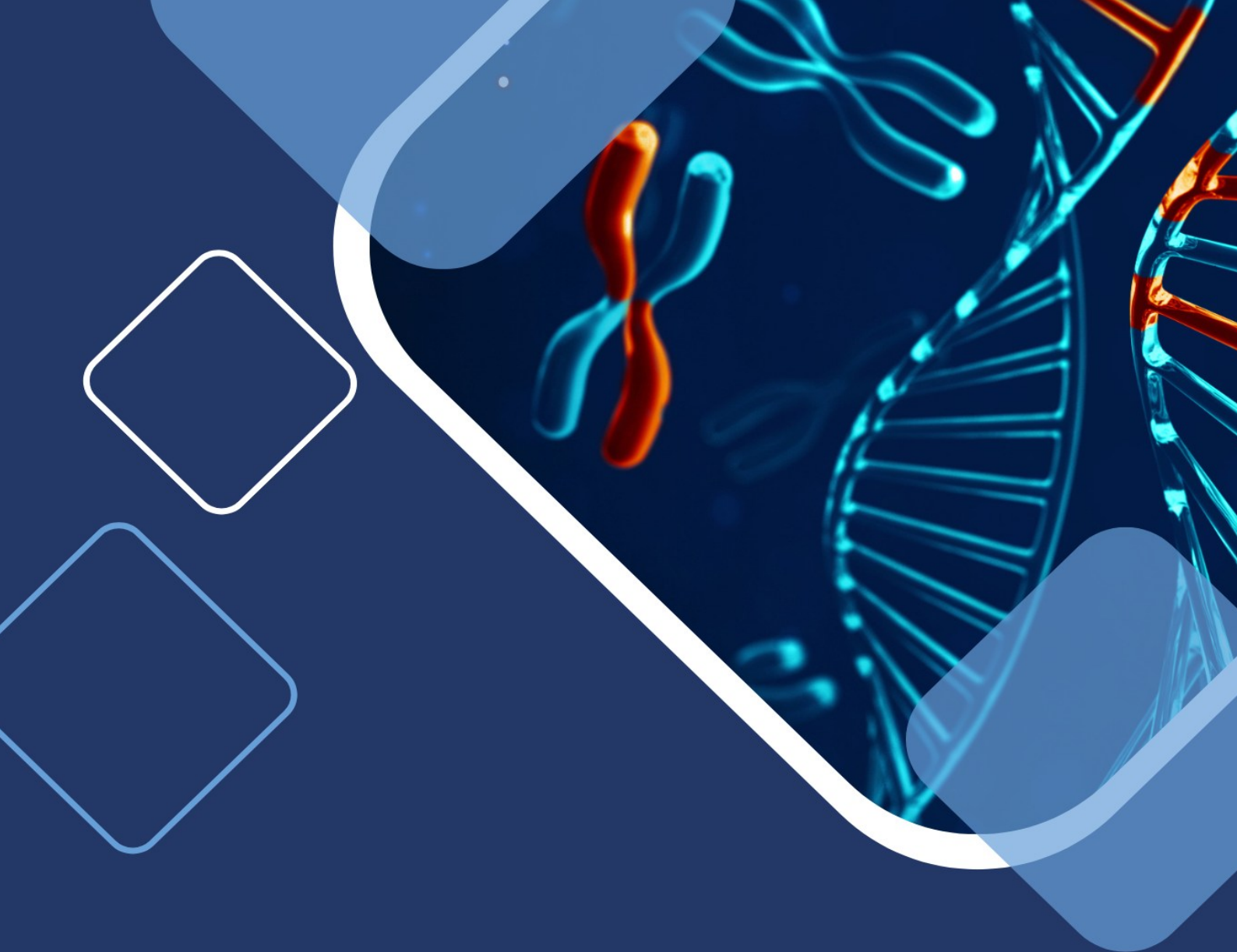




ПРИКЛАДНАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ

ПРАКТИКУМ

НАПРАВЛЕНИЕ ПОДГОТОВКИ 19.03.01 – БИОТЕХНОЛОГИЯ
(ПРОФИЛЬ БИОТЕХНОЛОГИЯ)

РАЗУМКОВА Г.М.,
РЕШЕТНИКОВА О.В.



www.scipro.ru

ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
ЛЕНИНГРАДСКОЙ ОБЛАСТИ
«ЛЕНИНГРАДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени А. С. ПУШКИНА»
ЛУЖСКИЙ ИНСТИТУТ (ФИЛИАЛ)

ПРИКЛАДНАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ

Практикум
направление подготовки 19.03.01 – Биотехнология
(профиль Биотехнология)

Разумкова Г.М., Решетникова О.В.

Нижний Новгород
2025

УДК 60
ББК 28.087
П75

Главный редактор: Краснова Наталья Александровна – кандидат экономических наук, доцент,
руководитель НОО «Профессиональная наука»

Технический редактор: Канаева Ю.О.

Рецензенты:

Кулёв Д.Х. - докт. техн. наук, профессор кафедры биотехнологии, технологии производства и переработки сельскохозяйственной продукции Лужского института (филиала) ЛГУ им. А.С. Пушкина

Ивахнюк Г.К. - докт. хим. наук, профессор, зав. кафедрой инженерной защиты окружающей среды
Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования
Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет), СПбГИ (ТУ)

Составители:

Разумкова Г.М., Решетникова О.В.

Прикладная биотехнология. Практикум. Направление подготовки 19.03.01 – Биотехнология (профиль Биотехнология) [Электронный ресурс]: учебник – Эл. изд. - Электрон. текстовые дан. (1 файл pdf: 56 с.). - Разумкова Г.М., Решетникова О.В. 2025. – Режим доступа: http://scipro.ru/conf/biotechnology11_25.pdf. Сист. требования: Adobe Reader; экран 10".

ISBN 978-5-908003-17-9

Практикум предназначен для студентов, обучающихся по направлению 19.03.01 «Биотехнология» очной формы обучения. В практикуме представлены лабораторные работы по дисциплине «Прикладная биотехнология», техника безопасности при работе в биотехнологической лаборатории, контрольные вопросы по каждой лабораторной работе, список литературы, требования к оформлению лабораторных работ. Практикум составлен в соответствии с требованиями ФГОС ВО. Представленные материалы могут быть использованы для подготовки бакалавров на кафедре биотехнологии, технологии производства и переработки сельскохозяйственной продукции Лужского института (филиала) ЛГУ имени А.С. Пушкина.

Рассмотрено и одобрено на заседании кафедры биотехнологии, технологии производства и переработки сельскохозяйственной продукции Лужского института (филиала) ЛГУ имени А.С. Пушкина протокол № 3 от 24.10. 2025 г.

ISBN 978-5-908003-17-9



© Разумкова Г.М., Решетникова О.В. 2025
© Ленинградский государственный университет (ЛГУ)
имени А. С. Пушкина, Лужский институт (филиал), 2025
© Оформление: издательство НОО Профессиональная наука. 2025

Содержание

Введение.....	5
Правила техники безопасности в лаборатории.....	6
Раздел 1. Культивирование клеток промышленных микроорганизмов-продуцентов белка.....	16
Лабораторная работа № 1. Культивирование микроорганизмов.....	16
Лабораторная работа № 2. Определение чувствительности микроорганизмов к антибиотикам.....	21
Лабораторная работа № 3. Выделение молочнокислых бактерий.....	22
Лабораторная работа № 4. Основные приемы микроскопирования микроорганизмов.....	23
Лабораторная работа № 5. Описание морфологических свойств выделенных микроорганизмов.....	26
Лабораторная работа № 6. Составление питательных сред для выращивания дрожжей <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	28
Лабораторная работа № 7. Оценка состояния культуры дрожжей	29
Лабораторная работа № 8. Выделение из почвы микроорганизмов, продуцирующих гидролитические ферменты	31
Лабораторная работа № 9. Выделение актиномицетов, продуцирующих антибиотики.....	37
Лабораторная работа № 10. Исследование метода накопительных культур для выделения микроорганизмов разных физиологических групп	39
Раздел 2. Комплексная переработка биологического сырья	43
Лабораторная работа № 11. Глубинное культивирование бактерий <i>Escherichia coli</i> в лабораторном ферментере.....	43
Лабораторная работа № 12. Комплексная переработка микробного сырья с получением продуктов белковой и нуклеотидной природы.....	45
Лабораторная работа № 13. Образование лимонной кислоты грибом <i>Aspergillus niger</i>	48
Лабораторная работа № 14. Экстракционное извлечение липидов из биомассы.....	49
Список литературы	53
Приложение.....	55

Введение

Биотехнология – использование культур клеток бактерий, дрожжей, животных или растений, метаболизм и биосинтетические возможности которых обеспечивают выработку специфических веществ. Согласно определению Европейской биотехнологической федерации, созданной в 1978 г., биотехнология на основе применения знаний и методов биохимии, микробиологии, генетики и химической техники позволяет извлекать выгоду в технологических процессах из свойств микроорганизмов и клеточных структур. Она создает возможность получения с помощью легко доступных и возобновляемых ресурсов тех веществ и соединений, которые важны для жизни и благосостояния людей. На сегодняшний день биотехнология стремительно выдвигается на передний край научно-технического прогресса.

Методы исследования, которые используются в биотехнологии, включают весь богатый арсенал методов органической, физической, аналитической, общей химии, а также генетики, микробиологии и других направлений научной деятельности человечества.

Данный практикум направлен на ознакомление студентов, изучающих биотехнологию, с основными методами и технологическими приемами, применяемыми при комплексной переработке растительного, животного и микробного сырья; исследованию процессов глубинного культивирования микроорганизмов с целью получения биологически активных веществ; рассмотрению ключевых аспектов медицинской биотехнологии.

Правила техники безопасности в лаборатории

Биотехнологические лаборатории размещаются в нескольких помещениях, которые в зависимости от объема работы и целевого назначения имеют определенную площадь, строение и оснащение.

В каждой биотехнологической лаборатории предусмотрены:

а) комнаты для работы с химическими реактивами и для приготовления питательных сред, буферных растворов и реактивов, где имеются лабораторные столы, шкафы вытяжные, шкафы для хранения реактивов и посуды, аналитические весы, рН-метр, электроплитки, водяные бани, магнитная мешалка, холодильники и шкафы (стеллажи) для хранения растворов, реактивов и готовых сред;

б) помещения для стерилизации инструментов, посуды и питательных сред, в которых расположены сухожаровые шкафы, автоклавы, стеллажи и столы для размещения сред, инструментов и посуды (причем стерильные и нестерильные материалы размещаются отдельно), аппараты для получения дистиллированной и бидистиллированной воды;

в) моечные комнаты, оснащенные мойками с горячей и холодной водой, аппаратами для получения дистиллированной воды, сосудах с дистиллированной и бидистиллированной водой, сушильными шкафами и стеллажами для хранения посуды;

г) боксы (ламинарные боксы) или комната для проведения работ с отдельными группами биообъектов (растения, клетки, ткани, бактерии) – посев на питательные среды, выделение нуклеиновых кислот;

д) культуральные комнаты, состоящие из двух отделений:

– световое отделение, где регулируются температура и влажность воздуха, интенсивность освещения, предназначено для выращивания растительных культур на стеллажах с фиксированными и/или передвижными полками или суспензионных культур на шейкерах, роторных установках;

– темновое отделение, оснащённого тем же оборудованием, что и световое, исключая источники освещения (можно использовать и термостаты);

е) лабораторные помещения для изучения биообъектов, например, растительных культур, где имеются весы, микроскопы, растворы красителей, предметные стекла и другое необходимое оборудование;

ж) помещение с холодильно-морозильными установками для сохранения культур растений, бактерий, выделенных нуклеиновых кислот;

з) оранжереи и теплицы, в которых выращивают растительный материал, необходимый для исследований, или высаживают растения, полученные в ходе экспериментов;

и) ПЦР - лаборатория, которая обязательно должна быть разделена на три зоны по числу технологических операций: зона подготовки реакционной смеси («чистая зона»), зона подготовки проб и электрофоретическая комната. Перемещение

пробирок, штативов и других необходимых приборов должно производиться только в одном направлении, при этом потоки не должны пересекаться.

Все производственные комнаты должны быть снабжены необходимым оборудованием и расходными материалами, в том числе халатами, закрепленными за соответствующими помещениями.

к) желательно предусмотреть отдельные помещения для переодевания и хранения верхней одежды, приема пищи, складское помещение для лабораторных материалов.

Так как большая часть работ по прикладной биотехнологии выполняется в стерильных условиях (ламинар-бокс, боксовые помещения), то необходимо соблюдать следующие требования:

1) полы в лаборатории подлежат ежедневной влажной уборке с применением 1 % раствора хлорамина;

2) в начале и в конце рабочего дня боксовые помещения и предбоксы облучают бактерицидной лампой в течение 40–60 мин;

3) перед началом и по окончании работ поверхность стола обрабатывают тампонами, смоченными 96 % этиловым спиртом.

Запрещается входить в бокс при включенной бактерицидной или ртутно-кварцевой лампе. Работу можно начинать только спустя 30–40 мин после выключения ламп.

В боксе и предбоксе не должно быть лишних предметов и оборудования, не предназначенных для работы, загораживающих выход из них и доступ к средствам пожаротушения.

Работать в боксе необходимо в спецодежде (халат, шапочка, сменная обувь, иногда – марлевая повязка).

Запрещается использовать спецодежду, предназначенную для работы в боксе, если на ней имеются следы от пролитых легковоспламеняющихся или горючих жидкостей.

Запрещается иметь в боксе легковоспламеняющиеся и горючие жидкости при работе со спиртовкой, а также исключается использование нательного белья из синтетических материалов.

Прежде чем зажечь спиртовую горелку, необходимо убедиться, что в ней нет неисправностей, поблизости нет горючих жидкостей (спирт, эфир др.). Зажигать спиртовку можно только спичкой. Для тушения пожара, возникшего от загорания спирта (спиртовки), можно использовать воду или ткань, обильно смоченную водой.

Работы в боксе осуществляются при наличии одновременно не менее двух сотрудников.

При работе на автоклавах необходимо руководствоваться правилами эксплуатации и техники безопасности:

- к обслуживанию автоклава могут быть допущены лица, достигшие 18 лет, прошедшие специальный инструктаж по безопасному обслуживанию автоклавов и

имеющие удостоверение о сдаче технического минимума по их устройству и эксплуатации;

- автоклавы с электрическим нагревом должны быть заземлены. Пол стерилизационного помещения у рабочих мест изолируется резиновыми ковриками или деревянными решетками;

- персонал, обслуживающий автоклавы, должен вести рабочий журнал, в котором записываются дата, время, режим стерилизации, кто проводил стерилизацию;

- открывание крышки автоклава, а также его ремонт разрешается только при полном отсутствии давления в автоклаве;

- во время открытия крышки автоклава обслуживающий персонал должен находиться в стороне от крышки;

- при выгрузке из автоклава или сушильного шкафа стеклянной посуды следует пользоваться матерчатыми рукавицами или трикотажными перчатками.

Работы с использованием электрооборудования и электроприборов (шейкеры, электроплитки, водяные бани, микроволновые печи и др.) должны проходить под наблюдением лаборанта.

При неисправности в работе электроприбора (например, подсветка в микроскопе) необходимо обратиться к преподавателю (лаборанту). Чинить самостоятельно приборы запрещается.

Необходимо ставить электронагревательные приборы не на деревянную поверхность стола, а только на теплоизоляционный слой (асбест и др.).

Нельзя ставить на электроплитку мокрые колбы и стаканы для нагревания, а также на разогретую плитку холодные колбы и другую стеклянную посуду (даже термостойкую).

Во избежание ожогов при нагревании и прокаливании никогда не следует брать голыми руками нагретые колбы, стаканы, чашки и др. посуду, их необходимо обернуть полотенцем. Также следует принимать меры предосторожности при вытаскивании колбы с кипящей агарозой из микроволновой печи, так как при встряхивании колба может резко вскипеть, что приведет к ожогу.

При работе с водяной баней нельзя пробовать степень нагрева воды рукой, необходимо следить за тем, чтобы в ней всегда была вода и выставлена нужная температура.

Шейкер должен быть заземлен и установлен на ровной горизонтальной поверхности в отдельном помещении. Включать шейкер следует после правильного и прочного закрепления колб в гнездах, балансирования ее правильной установкой колб. Необходимо убедиться в исправности шейкера, осмотрев при этом все узлы и крепежные детали. По окончании работы следует: отключить шейкер-качалку от электросети и снять колбы; произвести запись в рабочем журнале о замеченных отклонениях в работе.

Запрещается: устанавливать колбы без амортизационных колец; производить запуск шейкера без проверки масла в подшипниках; работать на неисправном и незаземленном шейкере; устанавливать число оборотов выше указанного в паспорте.

Перед тем как проводить центрифугирование, необходимо обратить внимание, какие пробирки подходят к установленному ротору и какие адаптеры нужно установить. Прежде чем поместить центрифужные пробирки в центрифугу, их необходимо уравновесить. Не следует останавливать ротор центрифуги рукой.

Работы с химическими реактивами и соблюдение правил техники безопасности.

Опыты с ядовитыми веществами и веществами, которые имеют сильно выраженный запах, можно проводить только в вытяжном шкафу.

Работа с горючими и легковоспламеняющимися веществами, горючими жидкостями должна проводиться в вытяжном шкафу и только при включенной вентиляции и при выключенных электроприборах и газовых горелках.

Перегонять и нагревать низкокипящие огнеопасные вещества (ацетон, бензол, эфиры, спирты и т. д.) необходимо в круглодонных колбах, изготовленных из тугоплавкого стекла на водяных или масляных банях, пользуясь при этом обратным холодильником в зависимости от температуры кипения данного вещества.

Отработанные горючие жидкости собирают в специально герметично закрывающуюся тару, которую в конце рабочего дня должны выносить из лаборатории для регенерации или уничтожения этих жидкостей. Для этих целей должны быть разработаны инструкции. Спуск горючих жидкостей в канализацию запрещается!

В случае разлива огнеопасных жидкостей необходимо немедленно выключить нагревательные приборы. Жидкость следует засыпать песком, который затем убрать деревянным совком и лопатой.

Все работающие с концентрированными едкими щелочами и кислотами по приготовлению растворов фенола, формалина, перекиси водорода, хлорамина и др. обязаны пользоваться защитными очками, резиновыми перчатками, прорезиненным фартуком и сапогами.

Запрещается ходить по лаборатории с концентрированными кислотами и щелочами, наливать их нужно только в отведенном для этого месте необходимо внимательно следить за тем, чтобы реактивы не попадали на лицо, руки и одежду.

При приготовлении растворов серной, азотной и других кислот их необходимо вливать в воду тонкой струйкой при непрерывном помешивании. Доливать воду в кислоту запрещается!

При разбавлении концентрированной серной кислоты, смешивании концентрированных серной и азотной кислот и вообще при смешивании веществ, сопровождающемся выделением тепла, пользоваться только толстостенной химической или фарфоровой посудой. Расфасовка кислот производится с применением специальных сифонов и насосов.

Недопустимо набирать кислоту в пипетку ртом. Для наполнения пипеток следует пользоваться резиновой грушей или другим приспособлением.

Растворять твердые щелочи следует путем медленного добавления их небольшими кусочками к воде при непрерывном перемешивании. Кусочки щелочи нужно брать только щипцами.

Отработанные кислоты и щелочи собираются в специальную посуду, после нейтрализации сливаются в канализацию или в специально отведенное место. Минеральные кислоты нейтрализуют окисью магния или порошкообразной гашеной известью. Отработанные растворы минеральных кислот и едких щелочей допустимо дегазировать путем их смешивания, прибавляя небольшими порциями более концентрированный раствор к менее концентрированному раствору. Средствами для нейтрализации пролитой щелочи служит борная кислота или уксусная эссенция (одна часть эссенции на восемь частей воды), для кислот – 5 % раствор соды.

Разлитые кислоты или щелочь необходимо немедленно засыпать песком или нейтрализовать, после чего провести влажную уборку.

При переливании жидкости нужно использовать воронки. На всех банках, склянках и на любой другой посуде, в которой хранятся вещества, должны быть указаны их химическое название, молекулярная формула, данные фирмы-производителя, условия хранения, дата, до которой продукт годен к употреблению.

Не следует оставлять открытыми банки с реактивами. Не загрязнять реактивы во время работы (не путать пробки от склянок, содержащих разные реактивы; избыток взятого реактива не выливать обратно в склянку; пользуясь пипеткой, набирать каждый реактив только предназначенной для этого пипеткой, ни в коем случае не путать их).

Категорически запрещается пробовать химические вещества на вкус. Нюхать вещества можно лишь осторожно, не вдыхая полной грудью, не наклоняясь над сосудом, а направляя к себе пары или газ движением руки.

Сухие реактивы брать с помощью лопаток, пластмассовых или металлических шпателей. Шпатель должен быть всегда сухим и чистым. После расходования следует его тщательно обтереть. Если реактив «слежался», чтобы его извлечь из банки, используют шпатель (вымытый и прокалённый).

Нельзя держать в руках банку или стакан с реактивом, ее надо поставить на лабораторный стол и только после этого открывать.

При наливании реактивов нельзя наклоняться над сосудом, предотвращая попадания брызг на лицо или одежду.

Если к работе не дано указаний относительно дозировки реактивов, то брать их для проведения опытов необходимо в возможно меньшем количестве.

Для взвешивания химических веществ нужно учитывать диапазон и точность весов. С весами нужно обращаться всегда очень осторожно. Без нужды не следует переставлять весы с места на место.

Весы и место около них всегда должны быть чистыми. Если при взвешивании весы случайно окажутся загрязненными, надо немедленно вытереть их (ни в коем случае не сдувать!). Нужно аккуратно снять чашку (и, если надо, верхний кожух весов); кожух вымыть и насухо протереть; весы протереть влажной тряпкой/салфеткой, насухо вытереть.

Для взвешивания всегда надо пользоваться какой-либо тарой или калькой. Нельзя насыпать непосредственно на чашку весов никаких веществ.

Легколетучие реактивы (такие как РНК-азы, ДНК-азы, протеиназы, бактериальные среды, SDS) взвешиваются с предосторожностями только под тягой, чтобы не загрязнить «окружающую среду».

Особая предосторожность и аккуратность необходимы при работе с ферментами, так как это самый уязвимый компонент реакции, требующий определённых pH, концентрации солей и температуры. Поэтому он вносится в последнюю очередь, когда все остальные компоненты уже добавлены и смешаны! В реакцию нужно брать точно указанное (или только чуть большее) количество ферментов. Слишком большие количества ферментов опасно брать в реакцию, так как все ферменты содержат примеси, и иногда избыток фермента не только бесполезен, но и вреден.

Работать нужно с небольшими аликвотами ферментов, а не с исходными пробирками (если с ферментом что-то случится (загрязнение, инактивация), то будет потеряна лишь часть).

Пробирки с растворами ферментов следует хранить в надёжном морозильнике, извлекать из морозильника непосредственно перед внесением и как можно быстрее убирать обратно.

Пробирку с ферментом следует держать пальцами с боков на том уровне, на котором раствора фермента нет. На время проведения работ 0,2–0,5 мл эппендорф с ферментом можно помещать в охлаждённый эппендорф большего объема (например, 1,5 мл) и использовать его как адаптер или помещать в криостатив (можно обыкновенный штатив для эппендорфов ставить на лед).

Перед тем как открыть пробирку, нужно кратковременным (~2–5 мин) центрифугированием на vortexe сбросить её содержимое на дно.

Для проведения работ в биолaborаториях используют стеклянную и пластиковую посуду.

Пластиковая посуда (чашки Петри, наконечники для автоматических пипеток-дозаторов, пробирки-эппендорфы, центрифужные пробирки и т.д.) выпускается из пластика разного типа, поэтому нужно обращать внимание на маркировку, чтобы знать, какие химические вещества, реагенты и агрессивные смеси данный пластик выдерживает.

Стеклянная посуда всегда должна быть чисто вымыта и ополоснута дистиллированной водой.

Запрещается пользоваться разбитой или треснувшей посудой, ставить ее непосредственно на огонь и убирать битое стекло незащищенными руками. Битое стекло следует складывать в специально отведенную емкость.

Все работы со стеклянной посудой необходимо проводить в защищенных очках. При работе со стеклом руки защищают полотенцем или куском материи во избежание травмирования.

При смешивании или разбавлении веществ, сопровождаемых выделением тепла, следует пользоваться термостойкой стеклянной или фарфоровой посудой. Нагретый сосуд нельзя закрывать притертой пробкой до тех пор, пока он не охладится.

Во избежание ожогов при нагревании и прокаливании никогда не следует брать голыми руками нагретые колбы, стаканы, чашки и пр., их необходимо обернуть полотенцем. Нагретые колбы нельзя ставить на холодную (мокрую, металлическую) поверхность. Переноса сосуды с горячей жидкостью, надо держать их двумя руками: одной – за дно, другой – за горловину, используя при этом полотенце (чтобы избежать ожогов кистей и пальцев рук).

Размешивать реакционную смесь в сосуде стеклянной палочкой или шпателем надо осторожно, не допуская разлома сосуда, при этом необходимо держать сосуд за горловину.

Любая посуда (пробирки, колбы, стаканы, чашки Петри и пр.), с которой проводятся работы, должна быть подписана. Чаще всего чашки Петри подписываются только снизу (со стороны агар-агара), чтобы не перепутать их, если приходится работать одновременно с двумя чашками. Обычно чашка Петри подписывается два раза.

Первый раз при заливке указываются: среда; гормоны, антибиотики и другие добавки; дата (число и месяц).

Второй раз при высева культуры (каллусной культуры растений, бактерий) указываются: название культуры, микроорганизмов, плазмиды или библиотеки; дата посева.

Все три зоны лаборатории должны быть изолированными комнатами, снабженными предбоксниками и устройством фильтрации воздуха.

При наличии специальных боксов допускается объединение зоны подготовки реакционной смеси и зоны пробоподготовки, но комната для проведения электрофореза должна размещаться как можно дальше от двух других зон и иметь не связанную с другими зонами систему вентиляции. Это является одним из наиболее категорических требований при организации ПЦР-лаборатории.

Подготовку реакционной смеси следует проводить в ПЦР-боксе, снабженном электрическими розетками, лампами дневного и ультрафиолетового света. Запрещается внесение пробирок с положительными контролями как до, так и после обработки в комнату подготовки реакционной смеси («чистую зону»).

Изучаемый материал необходимо как можно быстрее обработать в комнате пробоподготовки. В эту же комнату должны поступать пробирки реакционной смесью из «чистой зоны» для внесения в них препаратов ДНК.

Оказание первой помощи при несчастных случаях.

Меры первой помощи при ожогах.

При термических ожогах на обожженное место нужно положить ватку, смоченную слабым раствором перманганата калия.

Меры первой помощи при порезе.

В случае пореза стеклом нужно сначала внимательно осмотреть рану извлечь из нее осколки стекла, если они есть, а затем обмыть раневую поверхность 2 % раствором перманганата калия, смазать йодом и завязать бинтом или заклеить лейкопластырем.

Меры первой помощи при отравлениях неорганическими веществами.

Азотная кислота. Свежий воздух, покой, тепло. Вдыхание кислорода. Сульфадимезин или иной сульфаниламидный препарат (2 г), аскорбиновая кислота (0,5 г), кодеин (0,015 г). Искусственное дыхание. Консультация врача.

Серная кислота. Свежий воздух. Промыть верхние дыхательные пути 2 % раствором пищевой соды. В нос – 2-3 капли 2 % раствора эфедрина. Теплое молоко с содой, кодеин (0,015 г) или дионин (0,01 г). При попадании в органы пищеварения смазать слизистую рта 2 % раствором дикаина. Промывание желудка большим количеством воды. Внутрь принять: столовую ложку оксида магния на стакан воды каждые 5 мин, яичный белок, молоко, крахмальный клейстер, кусочки сливочного несоленого масла, кусочки льда. Нельзя вызывать рвоту и применять карбонаты. Консультация врача. При попадании на кожу или одежду кислоты надо смыть ее большим количеством воды, а затем 3-5 % раствором пищевой соды или разбавленным раствором аммиака.

Щелочи. Вдыхание теплого водяного пара (в воду добавить немного лимонной кислоты). Внутрь – теплое молоко с медом, кодеин (0,015 г) или дионин (0,01 г). Горчичники. При попадании в органы пищеварения смазать слизистые оболочки рта и горла 1 % раствором новокаина.

Внутрь – по столовой ложке 1 % раствора лимонной кислоты каждые 3-5 мин, крахмальный клейстер с добавлением лимонной или уксусной кислоты, 2-3 столовые ложки растительного масла, кусочки льда. Консультация врача.

При попадании на кожу или одежду щелочи, после смывания ее большим количеством воды, нужно провести обработку 2-3 % раствором борной, лимонной или уксусной кислот.

Меры первой помощи при отравлениях органическими веществами.

При отравлении эфиром, хлороформом, спиртом: свежий воздух; внутрь 0,03 г фенамина, или 0,1 г коразол, или 30 капель кордиамина, или 0,5 г камфоры. Искусственное дыхание и вдыхание кислорода.

Меры первой помощи при поражении электрическим током.

Если пострадавший находится в соприкосновении с токоведущими частями, необходимо немедленно выключить ток с помощью пускателя, или вывернуть охранную пробку, или перерубить токопроводящий провод изолированным инструментом. Пострадавшего, пока он находится под током, нельзя касаться незащищенными руками (без резиновых перчаток). Если пострадавший потерял сознание, после выключения тока нужно немедленно, не дожидаясь врача, делать искусственное дыхание.

Правила проведения и сдачи лабораторных работ.

Обучающиеся допускаются к работе в лаборатории только после инструктажа по технике безопасности, после чего они обязаны расписаться в журнале. Это означает, что они ознакомлены с правилами техники безопасности и обязуются их выполнять.

Перед началом работы необходимо внимательно ознакомиться с устройством и принципом работы установки и порядком выполнения работы (методикой расчета). Работу начать с разрешением преподавателя или лаборанта.

На лабораторном столе должны выполняться опыты, которые не представляются опасными для окружающих. В вытяжном шкафу выполняются все опыты с токсичными веществами.

При работе с электроприборами обращать внимание на их исправность, правильную изоляцию контактов, не использовать приборы с оголенными контактами, неисправными вилками и т.п.

Выполнять все меры предосторожности при работе с аппаратами с движущимися частями (электрическая мешалка, центрифуга и т.д.).

При проведении опытов нельзя отвлекаться и оставлять приборы без наблюдения.

Общие требования к проведению работ:

- Необходимо рационально строить свою работу.
- Все работы проводить точно и аккуратно.
- Работать следует быстро, но без спешки, которая неизбежно приводит к порче поставленного опыта.
- Лабораторный стол нужно содержать в чистоте и не загромождать лишней посудой, реактивами, посторонними предметами.
- Выполнять работы в специально отведенных помещениях и на специальном оборудовании.
- По окончании работы необходимо привести в порядок лабораторный стол.
- Реактивы необходимо расходовать экономно.
- Не принимать пищу в лабораторных помещениях и из лабораторной посуды.
- Работу с легковоспламеняющимися химическими веществами следует проводить в резиновых перчатках, прорезиненных фартуках и защитных очках, защитной маске.

- Во всех лабораториях всегда должны быть ящики с песком, огнетушители и противопожарные одеяла.

- Прежде чем приступить к работе, нужно ознакомиться с методикой выполнения и с соответствующими специальными правилами по эксплуатации оборудования или приборов.

- Категорически запрещается оставлять действующие приборы без наблюдения.

Запрещается входить в лабораторию в верхней одежде. Работать в биохимической лаборатории допускается только в специальном халате.

Требования к отчету по лабораторной работе.

Лабораторные записи необходимо вести аккуратно, поэтапно, в соответствии с порядком выполнения лабораторной работы.

Заносить тему, цель, материалы и оборудование, необходимые в лабораторной работе, основные этапы проведения опытов и результаты в виде тезисов, либо в табличном или графическом виде, а также с необходимыми рисунками, фото.

После проведения работы студент оформляет и сдает отчет, который должен содержать следующие разделы:

- тема работы;
- цель работы;
- список оборудования и принадлежности;
- исходные данные;
- порядок проведения работы или методика расчета;
- экспериментальная и расчетная часть;
- выводы и ответы на контрольные вопросы (в письменной форме).

После оформления студент защищает отчет по лабораторной (расчетной) работе.

Студент не допускается к следующей работе, если им не сданы две предыдущие работы (без уважительных причин).

При пропуске занятия студент отрабатывает пропущенное занятие в назначенное время.

Раздел 1. Культивирование клеток промышленных микроорганизмов-продуцентов белка

Лабораторная работа № 1. Культивирование микроорганизмов

Цель работы: освоить методы культивирования микроорганизмов в жидкой питательной среде.

Задачи изучить:

- глубинное культивирование в жидкой питательной среде;
- поверхностное культивирование на агаризованной питательной среды в чашке Петри;
- культивирование на поверхности скошенной агаризованной питательной среды.

Теоретическое обоснование. Культивирование микроорганизмов - это выращивание микроорганизмов в искусственных условиях (in vitro). Для культивирования микроорганизмов необходимы особые субстраты - питательные среды. На средах микроорганизмы осуществляют все жизненные процессы (питаются, дышат, размножаются и т. д.), поэтому их ещё называют «средами для культивирования».

Существуют два режима культивирования микроорганизмов в жидкой питательной среде: периодическое и непрерывное (проточное). Культивирование микроорганизмов основано на знании метаболизма микроорганизмов и понимании значения физико-химических условий среды, необходимых для их жизнедеятельности.

Методы культивирования микроорганизмов.

Стационарный способ: питательные среды сохраняются постоянными, с ними никаких дополнительных манипуляций не производят.

Метод глубинного культивирования с аэрацией: для выращивания применяют специальные устройства - реакторы, которые постоянно продуваются стерильным воздухом и перемешивают среду.

Метод использования проточных сред: позволяет создать условия, при которых клетки имеют возможность длительное время находиться в определённой фазе роста (экспоненциальной) при постоянной концентрации питательных веществ и в одних и тех же условиях, обеспечивающих непрерывный рост культуры.

Методы получения непрерывных культур: в аппарат, где растут клетки, непрерывно добавляют свежую питательную среду и одновременно из него удаляют соответствующее количество бактерий.

Параметры культивирования бактерий.

Питательные потребности: простые бактерии растут на универсальных питательных средах, а сложные - на специальных.

Температура культивирования:

+3 - 45 °C - мезофилы;
-6 - 20 °C - психрофилы;
+40 - 80 °C - термофилы.

Реакция среды (pH):

кислая - ацидофилы;
нейтральная - большинство патогенных бактерий;
щелочная - алкалофилы.

Условия аэрации:

не принимают во внимание - факультативные анаэробы;
↓ O₂ - микроаэрофилы;
↑ CO₂ - капнофилы;
без доступа воздуха - анаэробы;

Для культивирования бактерий используют питательные среды, к которым предъявляется ряд требований:

Питательность. Бактерии должны содержать все необходимые питательные вещества.

Изотоничность. Бактерии должны содержать набор солей для поддержания осмотического давления, определённую концентрацию хлорида натрия.

Оптимальный pH (кислотность) среды. Кислотность среды обеспечивает функционирование ферментов бактерий; для большинства бактерий составляет 7,2-7,6.

Оптимальный электронный потенциал, свидетельствующий о содержании в среде растворённого кислорода. Он должен быть высоким для аэробов и низким для анаэробов.

Прозрачность (чтобы был виден рост бактерий, особенно для жидких сред).

Стерильность.

Классификация питательных сред.

По происхождению: естественные (молоко, желатин, картофель и др.); искусственные - среды, приготовленные из специально подготовленных природных компонентов (пептона, аминокислоты, дрожжевого экстракта и т. п.); синтетические - среды известного состава, приготовленные из химически чистых неорганических и органических соединений.

По составу: простые - мясопептонный агар, мясопептонный бульон; сложные - это простые с добавлением дополнительного питательного компонента (кровяного, шоколадного агара): сахарный бульон, желчный бульон, сывороточный агар, желточно-солевой агар, среда Китта - Тароцци.

По консистенции:

твёрдые (содержат 3–5 % агар-агара);

полужидкие (0,15–0,7 % агар-агара);

жидкие (не содержат агар-агара).

По назначению: общего назначения - для культивирования большинства бактерий (мясопептонный агар-агар, мясопептонный бульон, кровяной агар-агар); специального назначения: элективные - среды, на которых растут бактерии только одного вида (рода), а род других подавляется; дифференциально-диагностические - среды, на которых рост одних видов бактерий отличается от роста других видов по тем или иным свойствам, чаще биохимическим; среды обогащения - среды, в которых происходит размножение и накопление бактерий-возбудителей какого-либо рода или вида

Приготовление питательной среды для бактерий. Налить воду в ёмкость известного объёма. Засыпать в чашку агар-агар из расчёта 20,0 г/л. Добавить агар-агар из расчёта, чтобы его доля в растворе была около 1–2 %. Вскипятите смесь, чтобы агар-агар растворился, а затем дайте ей остыть. Добавить в раствор глюкозу из расчёта 360 мг на 100 мл. Можно добавить дрожжевой экстракт: в нём есть факторы роста, нужные некоторым бактериям. Нагреть смесь до 80 °С. Перед тем, как наносить среду на поверхность чашки, необходимо её простерилизовать, с обязательным доступом воздуха -облигатные аэробы.

Виды культивирования микроорганизмов. Промышленное культивирование микроорганизмов – выращивание микроорганизмов в специальных биореакторах, обеспечивающих поддержание условий, необходимых для получения биомассы клеток и продуктов их метаболизма в промышленных объемах.

Основные виды культивирования. По типу и объёму среды: глубинное, поверхностное. По продолжительности роста культуры: периодическое, непрерывное, полупериодическое.

Опыт 1. Глубинное культивирование в жидкой питательной среде

Материалы и оборудование: спиртовка, спички, бактериологическая петля, стерильные стеклянные пипетки на 5 или 10 мл, штатив со стерильными стеклянными пробирками на 10 - 15 мл, колба с 10 мл жидкой полноценной питательной средой – питательный бульон (ПБ), чашка Петри с засеянной культурой бактерий *Escherichia coli*, бактериологическая петля, стакан для использованных пипеток, маркер по стеклу, термостат 37 °С.

Ход работы. На первой пробирке отмечают название засеваемой культуры - *E. coli* (опыт), на второй пробирке - *K* (контроль стерильности работы). На столе помещают спиртовку, пенал с пипетками кладут возле правой руки. Зажигают спиртовку, открывают пенал со стерильными стеклянными пипетками. Все манипуляции с пробирками проводят вблизи пламени спиртовки. Пипеткой набирают 5 мл ПБ и добавляют 2,5 мл в первую пробирку, а оставшийся объем среды вносят во

вторую пробирку. Бактериологическую петлю стерилизуют прокаливанием в пламени спиртовки, остужают о незасеянную область агаризованной среды в чашке Петри или о внутреннюю стерильную поверхность крышки чашки Петри. Стерильным концом бактериологической петли снимают одну изолированную колонию бактерий и переносят в первую пробирку, тщательно ресуспендируют. В контрольную пробирку засев бактерий не производят. Пробирки ставят в штатив и помещают в термостат (37 °C) для инкубирования в течение 18-24 ч. Проводят учет результатов, оценивая наличие роста бактериальной культуры по помутнению питательной среды. Если рост бактерий наблюдается только в опытной пробирке, следовательно, эксперимент был выполнен правильно.

Опыт 2. Поверхностное культивирование на агаризованной питательной среде в чашке Петри

Материалы и оборудование: спиртовка; пенал со стерильными стеклянными пипетками на 1 или 2 мл, стерильная чашка Петри с агаризованной полноценной питательной средой, пробирка с культурой, стакан со спиртом ректификатом для стерилизации инструментов, шпатель Дригальского, бактериологическая петля, стакан для использованных пипеток, пипетки, маркер по стеклу, термостат 37 °C.

Ход работы. На дне чашки Петри подписывают название бактериальной культуры - *E. coli*. Бактериальную культуру набирают пипеткой и 0,1 мл наносят на поверхность среды в чашке Петри. Шпатель стерилизуют методом обжигания в пламени спиртовки, остужают о внутреннюю поверхность крышки чашки Петри, после чего используют для засева бактериальной культуры на поверхность ПА. Чашку инкубируют в термостате (37 °C). Через 24 часа выявляют наличие роста бактерий на поверхности агаризованной питательной среды.

Опыт 3. Культивирование микроорганизмов на поверхности скошенной агаризованной питательной среды

Материалы и оборудование: спиртовка, спички, чашка Петри с засеянной культурой бактерий *E. coli*, флакон с расплавленным агар-агаром, бактериологическая петля, штатив со стерильными стеклянными пробирками, фольга, термостат 37 °C, пенал со стерильными стеклянными пипетками на 5 или 10 мл, маркер по стеклу.

Ход работы. На пробирке подписывают название культуры бактерий, с помощью пипетки вносят 5 мл расплавленной и охлажденной до 50 °C питательной среды, после чего пробирку укладывают в наклонном положении на специальную подставку и дают среде застыть. Через 20–30 мин засевают бактериальную культуру простерилизованной и охлажденной бактериологической петлей на всю поверхность скошенной среды, делая частые зигзагообразные движения, начиная со дна пробирки. Пробирку ставят в штатив, который помещают в термостат (37 °C) на 24 ч, после чего анализируют рост бактерий по штриху.

Опыт 4. Получение чистых культур

Отобранные колонии засевают методом истощающего штриха (рис. 1) на среды такого же состава, как и для получения соответствующих накопительных культур.

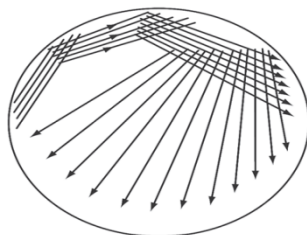


Рисунок 1. Техника посева, порядок нанесения бактериальной культуры на поверхность агаризованной питательной среды в чашке Петри методом истощающего штриха

Выводы:

Контрольные вопросы:

1. Какие существуют методы культивирования микроорганизмов?
2. Требования к питательным средам.
3. Классификация питательных сред.
4. Приготовление питательной среды для бактерий.
5. Характеристика метода культивирования бактерий на поверхности скошенной агаризованной питательной среды.
6. Характеристика глубинного культивирования в жидкой питательной среде.
7. Характеристика поверхностного культивирования на агаризованной питательной среде в чашке Петри.
8. Как анализируют рост бактерий при их культивировании на поверхности скошенной агаризованной питательной среды?
9. Через какое время выявляют рост бактерий при поверхностном культивировании на агаризованной питательной среде в чашке Петри?
10. Когда проводят контрольный засев пробирки при глубинном культивировании в жидкой питательной среде?
11. Условия и параметры для культивирования микроорганизмов.

Лабораторная работа № 2. Определение чувствительности микроорганизмов к антибиотикам

Цель работы: определить чувствительность микроорганизмов к разным антибиотикам

Задачи: изучить действие антибиотиков на микроорганизмы.

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

Предпочтительнее использовать антибиотики тетрациклинового комплекса, широко применяемые при выпаивании телят, кормлении взрослых животных.

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

Материалы и оборудование: чашки Петри с мясо-пептонным агар-агаром, микробиологические петли, диски фильтровальной бумаги, пропитанные различными растворами антибиотиков, стеклянный шпатель; пипетки; спиртовка, чистые культуры микроорганизмов *Bacillus subtilis*, *Starcina lutea*, *Bacillus cereus*.

Ход работы. В стерильные, предварительно просушенные чашки Петри разливают по 10 мл мясо-пептонного агар-агара. На поверхность среды высевают суспензию суточной культуры микроорганизмов. Пипеткой берут 0,02 мл этой суспензии (одна капля) и стерильным шпателем растирают досуха на питательной среде в чашке Петри у пламени горелки. Затем стерильным пинцетом раскладывают диски фильтровальной бумаги диаметром 8 мм, предварительно пропитанные разными антибиотиками (не менее четырех - пяти дисков). Чашки Петри выдерживают 30 мин при комнатной температуре для диффузии препаратов в среду. Затем чашки помещают в термостат при 37 °С на 18 - 24 ч. При оценке результатов опыта измеряют диаметр задержки роста микроорганизмов вокруг дисков с антибиотиками, включая диаметр самих дисков. Отсутствие зоны задержки роста микроорганизма означает, что испытуемый штамм устойчив к данному препарату. Зоны диаметром до 10 мм указывают на малую чувствительность, зоны диаметром более 10 мм - на чувствительность микроорганизма.

Результаты опыта записать в таблицу.

Выводы о чувствительности различных микроорганизмов к антибиотикам.

Контрольные вопросы:

1. Как попадают антибиотики в окружающую среду?
2. Реакция микроорганизмов на антибиотики.
3. В чем заключается опасность резистентности микроорганизмов к антибиотикам?

Лабораторная работа № 3. Выделение молочнокислых бактерий

Цель работы: освоить методы выделения молочнокислых бактерий.

Задачи: изучить свойства молочнокислых бактерий.

Теоретическое обоснование. Основная черта метаболизма молочнокислых бактерий – образование молочной кислоты, приводящее к закислению культуральной среды. Данные микроорганизмы принадлежат к филогенетически разнородной группе, непатогенны, относятся к группе GRAS-организмов. Среди молочнокислых бактерий есть представители родов *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Bifidobacterium*.

Промышленное производство твердых и мягких сыров, йогуртов, сметаны, кефира, простокваши не обходится без молочнокислых бактерий. Эта группа микроорганизмов важна и при производстве сухих колбас, поскольку молочная кислота необходима для придания вкуса и для подавления развития патогенной микрофлоры. В практике хлебопечения издавна используют способствующие поднятию теста закваски, включающие штаммы молочнокислых бактерий. Природные штаммы этой группы бактерий принимают активное участие при квашении капусты, яблок, солении огурцов, предохраняя их от порчи. Бактерии рода *Lactobacillus* применяют при силосовании (биологическом консервировании) различных сельскохозяйственных культур (кормовых злаков, кукурузы, люцерны), которые широко используются в качестве корма для скота. Молочнокислые бактерии могут быть выделены из почвы, где они концентрируются в ризосфере дикорастущих и культурных растений, с поверхности листьев, цветов, стеблей растений, овощей и фруктов. Для выделения бактерий этой группы используют среды, обеспечивающие их питательные потребности и угнетающие рост посторонних микроорганизмов. Характерное свойство молочнокислых бактерий – высокая спиртоустойчивость: некоторые виды могут расти на средах с 15–18 % этилового спирта, а единичные – даже при 24 %.

Материалы и оборудование: спирт ректификат, молочнокислые продукты, пробирки с жидкой питательной средой, 1 % дрожжевой экстракт, 1 % раствор пептона, 2 % раствор глюкозы, 10 % этиловый спирт, 10 мг циклогексимида, отвар моркови и капусты 100 мл, агар-агар, колбы плоскодонные, вата, пипетки, палочки стеклянные, чашки Петри, измельченный мел, петля бактериальная, весы, термостат 28 °С, микроскопы, предметные стекла.

Ход работы. Исследуемый образец в количестве 2 г помещают в пробирку с 10 мл жидкой питательной среды, содержащей 10 % растительного (капустного, морковного) отвара, 1 % дрожжевого экстракта, 1 % пептона, 2 % глюкозы, хорошо ресуспендируют и инкубируют при 28 °С. Для ингибирования роста дрожжей можно добавить 10 мг циклогексимида на 1 л питательной среды. Через сутки в пробирку с выросшей культурой вносят 10 % этилового спирта и инкубируют еще 2 суток. Из жидкой среды производят высев культуры в чашки Петри, смешивая 0,1 мл культуры с 20 мл расплавленной и охлажденной до 50 °С агаризованной питательной среды того же состава с 4 % измельченного мела. Инкубируют при 28 °С в течение трех суток. Анализируют морфологические характеристики бактериальных колоний. Молочнокислые бактерии при росте на такой среде вокруг колоний будут образовывать зоны просветления за счет выделения молочной кислоты, превращающей нерастворимый карбонат кальция в растворимый лактат кальция.

Выводы:

Контрольные вопросы

1. Представители рода молочнокислых бактерий.
2. Конечные продукты метаболизма молочнокислых бактерий.
3. Применение молочнокислых бактерий в промышленности.
4. Использование природных штаммов молочнокислых бактерий.
5. Источники для выделения молочнокислых бактерий.
6. Морфологические характеристики бактериальных колоний молочнокислых бактерий.

Лабораторная работа № 4. Основные приемы микроскопирования микроорганизмов

Цель работы: освоить основные приемы микроскопирования микроорганизмов.

Задачи: изучить

- методы приготовления живых препаратов микроорганизмов (метод раздавленной капли, метод висячей капли);
- методы приготовления фиксированных препаратов микроорганизмов;
- методы окраски бактерий по Граму.

Опыт 1. Приготовление живых препаратов микроорганизмов

Метод раздавленной капли.

Материалы и оборудование: дрожжи, H₂O дистиллированная, метиленовый синий, фуксин, Люголь, генцианвиолет, раствор йода спиртовой, набор красителей по Граму, спирт ректификат, предметные стекла, стекла с углублением, покровные

стекла, пипетки, бактериологическая петля, спиртовка, фильтровальная бумага, стаканчики химические, стеклянные палочки, спички, промывалка, микроскопы.

Ход работы. В центр предметного стекла пипеткой наносят исследуемый материал – каплю суспензии с микроорганизмами. Если взвесь густая, то нужно предварительно разбавить ее дистиллированной водой. Покровное стекло ставят на ребро у края капли и постепенно опускают на нее таким образом, чтобы между стеклами не оставалось пузырьков воздуха. Капля должна быть небольшой, чтобы после раздавливания жидкость не выступала за края покровного стекла, излишки жидкости следует убрать фильтровальной бумагой. Препарат из-за высыхания не может долго храниться. Изучать препарат в светлом и темном поле, использовать иммерсионный объектив.

Метод висячей капли.

Ход работы. На чистое покровное стекло нанести каплю суспензии микробов, наложить на него предметное стекло с углублением, плотно прижимая, перевернуть их. Капля должна висеть на покровном стекле над углублением предметного стекла, то есть в закрытой камере. Висячую каплю рассматривают, пользуясь зеркалом, диафрагму при этом суживают при малом и расширяют при большом увеличении. Метод дает возможность наблюдать микроорганизмы длительное время и следить за делением клеток.

При работе с живыми препаратами микроорганизмов для лучшего видения каплю суспензии можно слегка подкрасить раствором нейтрального красного, а при отсутствии его слабым раствором йода, метиленовым синим или фуксином. Небольшие концентрации красителей не влияют на жизнедеятельность клеток, сохраняющих свою подвижность. При работе с живыми препаратами микроорганизмов для лучшего видения каплю суспензии можно слегка подкрасить раствором нейтрального красного, а при отсутствии его слабым раствором йода, метиленовым синим или фуксином. Небольшие концентрации красителей не влияют на жизнедеятельность клеток, сохраняющих свою подвижность.

Опыт 2. Приготовление фиксированных препаратов микроорганизмов

Для более детального изучения микробов применяют фиксированные препараты. Этот процесс складывается из следующих операций: приготовление мазка, высушивание препарата, его фиксация и окраска.

Техника приготовления мазка.

1. На центр чистого предметного стекла нанести каплю суспензии микроорганизмов (если взвесь слишком густая, необходимо разбавить дистиллированной водой).

2. Той же пипеткой равномерно, очень тонким слоем распределить суспензию на 1/3 центральной части поверхности предметного стекла.

3. Дать мазку высохнуть (на воздухе, под лампой или высоко над пламенем горелки).
4. Зафиксировать мазок сухим жаром: закрепив предметное стекло держателем мазком вверх, проводят его сквозь пламя спиртовки плавными круговыми движениями три-пять раз. При этом микроорганизмы убиваются и прочно прикрепляются к стеклу. После охлаждения на стеклянном штативе окрасить мазок: пипеткой наносят на поле мазка краситель на одну-две минуты или более согласно методу окрашивания.
5. После этого краску с мазка смывают на штативе струей воды, излишки воды с нижней поверхности стекла снимают фильтровальной бумагой. Мазок подсушивают под лампой, препарат готов к рассмотрению с помощью иммерсии. Примечание: при работе с фиксированными препаратами микробов кедровое масло наносят непосредственно на предметное стекло, поскольку бактерии прочно закреплены на нем.

Опыт 3. Окраска бактерий по Граму

Теоретическое обоснование. Способ окраски бактерий по Грамму позволяет дифференцировать сходные по форме и размерам микроорганизмы, относящиеся к разным видам. Метод основан на способности некоторых форм бактерий образовывать в клетке прочное соединение основных красителей – генцианвиолета и йода, которое не обесцвечивается при последующей обработке спиртом, в результате чего эти бактерии сохраняют сине-фиолетовую окраску и называются грамположительными – грам(+). Другие бактерии не обладают свойством удерживать окраску и при работе спиртом обесцвечиваются. Это грамотрицательные бактерии – грам(-). Отношение к окраске по Граму служит одним из основных признаков бактерии в ее характеристике. Способность бактериальных клеток окрашиваться по Граму зависит главным образом от химического состава и структуры клеточных стенок. У грам(+) бактерий клеточная стенка на 95 % состоит из муреина (пептидогликана) и тейхоевой кислоты. В состав клеточной стенки грам(-) бактерий входят липопротеиды, липополисахариды, фосфолипиды, незначительное количество (5 %) муреина. Окраска по Граму связана также с возрастными особенностями культуры: лучше красятся бактерии в молодых двух-, трехдневных культурах.

Ход работы. Техника окраски бактерий по Граму.

1. Приготовить фиксированный мазок исследуемой культуры микроорганизмов.
2. Мазок окрасить генцианвиолетом на 1–2 минуты на штативе.
3. Не смывая краситель, вытесняем его раствором Люголя, также оставляем на 1–2 мин.
4. Промыть препарат водой.

5. Обработать препарат 95 % спиртом или ацетоном: одну-две капли реактива наносят на поле мазка на 1–2 мин.
6. Смыть реактив водой.
7. Провести докрасивание препарата фуксином на 1–2 мин., промыть водой, подсушить, рассмотреть с иммерсией. Грам(+) микроорганизмы при этом окрашиваются в сиренево-фиолетовый цвет, грам(-) – в розово-малиновый.

Выводы:

Контрольные вопросы:

1. Техника приготовления живых препаратов микроорганизмов.
2. Техника приготовления фиксированных препаратов микроорганизмов.
3. Какие методы микроскопического исследования вы знаете?
4. Перечислите способы приготовления микропрепаратов.
5. Какие различия в строении клеточных стенок у грам(+) и грам(-) бактерий?
6. Техника окраски бактерий по Граму.

Лабораторная работа № 5. Описание морфологических свойств выделенных микроорганизмов

Цель работы: освоить и описать морфологические свойства выделенных микроорганизмов.

Задачи изучить:

- виды бактерий;
- размер бактерий;
- форму колонии;
- поверхность колонии.

Материалы и оборудование: дрожжи, чашки Петри с культурой, петля бактериологическая, H₂O дистиллированная, бромтимоловый синий, раствор Люголя, спирт ректификат, микроскопы, лупы, пинцеты, стекла предметные, микроскопы.

Ход работы. При описании роста культуры на поверхности агаризованной питательной среды учитывают:

- *размер* (диаметр) колоний в мм (если размеры колонии не превышают 1 мм, то их называют точечными);
- *форму колонии* – круглая, амебовидная, неправильная, ризоидная, сложная;
- *поверхность колонии* – гладкая, шероховатая, складчатая, морщинистая, с концентрическими кругами, радиально исчерченная.

Виды колоний представлены на рисунках 2, 3, 4.

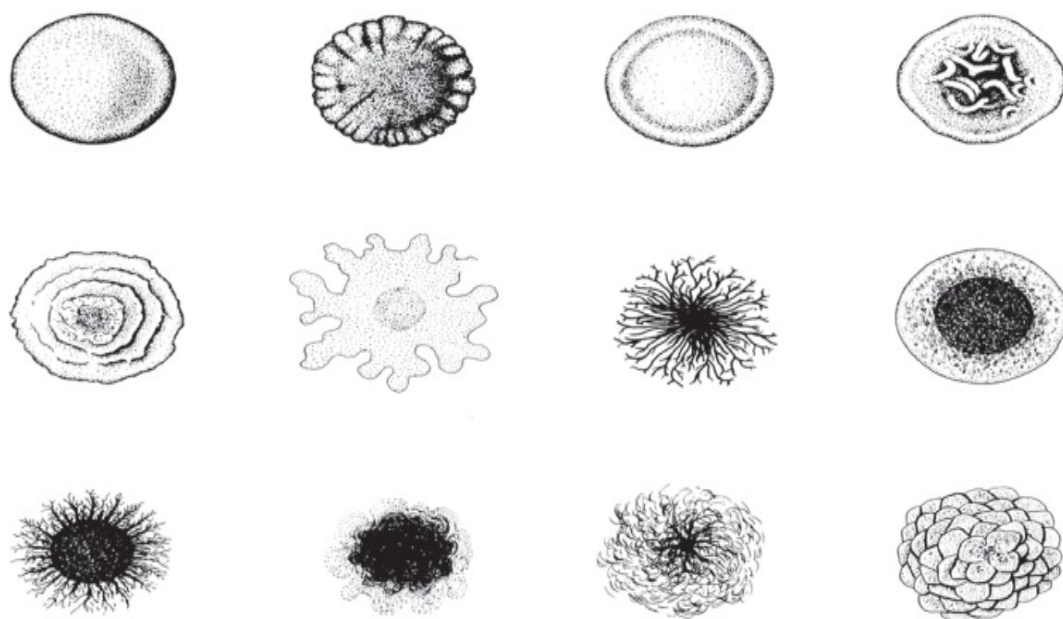


Рисунок 2. Формы колоний



Рисунок 3. Край колонии



Рисунок 4. Профиль колонии

Выводы.

Контрольные вопросы:

1. Какие бывают морфологические виды бактерий?
2. Описать поверхность и формы колоний.
3. Описать и зарисовать все виды микроорганизмов.

Лабораторная работа № 6. Составление питательных сред для выращивания дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*

Цель работы: сформировать навык составления питательных сред для выращивания биообъекта (на примере хлебопекарных дрожжей).

Задачи: изучить состав питательной среды для выращивания дрожжей

Теоретическое обоснование. При выращивании *Saccharomyces cerevisiae* готовят питательную среду, обеспечивающую растущие дрожжи как компонентами, входящими в состав дрожжевых клеток, так и веществами, которые способствуют их быстрому росту и размножению. Основным сырьем при производстве дрожжей служит меласса. Состав мелассы непостоянен. Оптимальным является содержание в мелассе сухих веществ – 77 %, золы – 7 %, суммы сбраживаемых сахаров – не более 50 %. pH – не ниже 7,0. Для эффективной переработки мелассу необходимо тщательно перемешивать до получения гомогенной массы с последующим обязательным осветлением. В зависимости от состава мелассы возникает необходимость в добавлении в питательную среду соответствующего количества минеральных солей, содержащих фосфор, азот, калий и др.

Материалы и оборудование: агар-агар, H₂O дистиллированная, соли, меласса (сахароза), весы, цилиндр, чашки Петри, водяная баня, колба термоустойчивая, стеклянные палочки.

Состав питательной среды для выращивания дрожжей представлен в таблице 1.

Таблица 1

Состав питательной среды для дрожжей

Компоненты питательной среды, кг	Объем питательной среды, кг	
Меласса	70,0	0,42
KCl, 20 %	0,2	0,0012
(NH ₄) ₂ SO ₄ , 20 %	1,4	0,0084
(NH ₄) ₂ HPO ₄ , 20 %	0,9	0,0054
вода	427,5	2,565

Выводы:

Контрольные вопросы

1. Виды питательных сред в зависимости от состава.
2. Источники углерода и азота в питательной среде
3. Какие компоненты питательной среды способствуют быстрому росту и размножению *Saccharomyces cerevisiae*?

Лабораторная работа № 7. Оценка состояния культуры дрожжей

Цель работы: освоить методы оценки состояния культуры дрожжей.

Задачи изучить:

- микроскопию препаратов дрожжей;
- динамику накопления биомассы дрожжей;
- определение прироста биомассы;
- определение усвояемого азота в среде;
- определение содержания сахарозы.

Опыт 1. Приготовление препарата дрожжей

Теоретическое обоснование. Микроскопия препаратов дрожжей позволяет следить за их состоянием и размножением. Молодые и зрелые дрожжи крупнее состарившихся. Оболочка у них едва заметна, вакуоли отсутствуют или очень малы. Они имеют большое количество почкующихся клеток. О старении культуры дрожжей можно судить по следующим признакам: их оболочка имеет вид утолщенного ободка, имеются большие вакуоли, присутствуют капельки жира. Бактерии Дельбрюка представляют собой расположенные попарно палочки длиной 3-7 мкм и более. Колонии округлой формы, беловатого цвета, мелкие, выпуклые. При нарушении нормальных условий культивирования бактерии образуют длинные, местами утолщенные нити.

Материалы и оборудование: раствор Люголя, йодид калия, H₂O дистиллированная, дрожжи, HCl концентрированная, микроскопы, предметные стекла, покровные стекла, фильтры бумажные, мерные цилиндры, пипетки, стаканчики химические, колбы плоскодонные, пипетки, стеклянные палочки, воронка Бюхнера, центрифуга, фотоэлектрориметр.

Ход работы. Препараты готовят неокрашенными и окрашивают раствором Люголя. Для этого взять навески 1 г йода и 2 г йодида калия, растворить в 300 мл воды. Далее приготовить препарат дрожжей. Для этого на один объем жидких дрожжей взять 3-5 объемов воды. Смесь энергично взболтать и оставить на 1 мин. Из верхнего слоя дрожжевой жидкости стеклянной палочкой перенести небольшую каплю на предметное стекло. Накрыть покровным стеклом и слегка прижать его сухим концом стеклянной палочки для удаления пузырьков воздуха. Препараты рассмотреть под микроскопом при увеличении в 500-1000 раз (объективы ×40 и ×90).

Опыт 2. Динамика накопления биомассы дрожжей

Теоретическое обоснование. Определение накопления биомассы дрожжей основана на фильтрации ее через бумажный фильтр с последующим взвешиванием фильтра. Для повышения точности определения концентрации исследуемые пробы отбирают исходя из предполагаемой концентрации дрожжевых клеток в суспензии: при концентрации до 50 г/л отбирают пробу объемом 1000 мл; от 50 до 150 г/л – 500 мл; от 150 до 300 г/л – 100 мл; более 300 г/л – 50 мл.

Ход работы. Через резиновую пробку герметично установить воронку Бюхнера на верхний тубус колбы. В воронку Бюхнера помещают два фильтра предварительно смоченных водой таким образом, чтобы фильтр на 3-5 мм возвышался над дном. Далее в мерный цилиндр отбирают количество исследуемой суспензии в зависимости от предполагаемой концентрации клеток. Перемешивают содержимое стеклянной палочкой и медленно переливают в подготовленную воронку Бюхнера. Включают вакуумный насос на 1 атм. Отфильтровав, разъединяют фильтры и взвешивают, определяя разницу между ними.

Концентрацию дрожжей в суспензии определяют по формуле:

$$X = M * 1000 / V,$$

где X – концентрация дрожжей в исследуемой суспензии, г/л;

M – масса отфильтрованных дрожжей;

V – объем исследуемой пробы, взятой на анализ, мл.

Опыт 3. Определение прироста биомассы.

Рост культуры можно оценить, используя фотоэлектроколориметр (длина волны 440 нм).

Ход работы. Мерной пипеткой отбирают 5 мл культуры дрожжей. Для растворения осадка солей (при необходимости) добавляют по каплям концентрированную соляную кислоту. Если плотность суспензии велика, то ее разводят подкисленной водопроводной водой. Отбор проб проводят трижды с интервалом в час. Измерения проводят с помощью фотоэлектроколориметра против соответствующей стерильной среды. Результаты исследований оформляют в виде таблицы.

Опыт 4. Определение усвояемого азота в среде

Материалы и оборудование: дрожжи, H₂O дистиллированная, 0,1 н раствор NaOH, фенолфталеин, 40 % формалин, 10 % NaOH, колбы плоскодонные, пипетки, мерные цилиндры, центрифуга, стаканчики химические, ареометр (сахарометр).

Ход работы. 10 мл фильтрата, отфильтрованного от дрожжей, разбавляют 90 мл дистиллированной воды и титруют сначала 0,1 н раствором гидроксида натрия с фенолфталеином до слабо-розового окрашивания. Затем туда же наливают 5 мл нейтрального 40 % формалина и титруют вторично 10 % раствором гидроксида

натрия до слабо-розового окрашивания. Количество мл 0,1 н раствора гидроксида натрия, пошедшего на второе титрование, называется формольным числом.

Опыт 5. Определение содержания сахарозы

Метод основан на измерении плотности жидких сред специальным ареометром (сахарометром) при температуре 20 °С. Результат измерения показывает содержание сахарозы в % по отношению к объему. Для проведения измерения в цилиндр, установленный строго вертикально, диаметром превышающий диаметр ареометра примерно на 2-2,5 см медленно наливают исследуемую жидкость. Особое внимание следует обратить на то, чтобы в ней не было посторонних включений, пузырьков воздуха и пены. При образовании пены цилиндр заполняют вровень с верхним слоем, пену снимают шпателем, а излишки жидкости удаляют пипеткой. Сухой и чистый сахарометр опускают в исследуемую жидкость, не касаясь стенок цилиндра. По истечении 3-5 мин. проводят отсчет по шкале сахарометра по нижнему краю мениска.

Выводы:

Контрольные вопросы:

1. Устройство микроскопа.
2. Что происходит с бактериями при нарушении нормальных условий культивирования?
3. Какие факторы влияют на динамику накопления биомассы дрожжей?
4. Какую роль для бактерий играет добавление азота и источников углерода в питательную среду?
5. Что такое целевой продукт?

Лабораторная работа № 8. Выделение из почвы микроорганизмов, продуцирующих гидролитические ферменты

Цель работы: освоить метод выделения из почвы микроорганизмов, продуцирующих гидролитические ферменты

Задачи изучить:

- способы взятия образцов;
- методы получения накопительных культур почвенных микроорганизмов.

Теоретическое обоснование. Промышленное производство ферментных препаратов впервые началось в США в 1894 г. с получения грибной амилазы. Тогда этот фермент использовали в качестве лекарственного препарата при нарушениях пищеварения. В настоящее время по объему производства ферменты занимают третье место после аминокислот и антибиотиков, при чем основная их часть приходится на долю *гидролитических ферментов*. Среди гидролаз наибольшее

применение получили пептидогидролазы (протеазы) и ферменты, расщепляющие гликозидные связи (амилазы, целлюлазы). Ферментные препараты находят широкое применение в различных областях промышленности (текстильной, целлюлозно-бумажной, химической – при производстве моющих средств, пищевой, фармацевтической) и в сельском хозяйстве (как кормовые добавки, ветеринарные препараты). Для промышленного получения ферментов используются штаммы бактерий *Bacillus*, грибов *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium* и др. Их клетки способны выделять ферменты в культуральную жидкость, что значительно облегчает процедуру очистки ферментных препаратов. Продуктивность этих организмов увеличена путем мутагенеза и селекции, а также путем оптимизации процессов культивирования.

Среди протеолитических ферментов, образуемых микроорганизмами, встречаются как эндопептидазы, так и экзопептидазы. Продуцентами протеаз, получаемых при промышленном производстве, являются преимущественно бактерии рода *Bacillus* и реже – стрептомицеты. Кислые протеазы на основе высокоактивного продуцента *Aspergillus oryzae* применяют в производстве спирта и для получения белковых гидролизатов высокого качества в пищевой промышленности. В сочетании с амилазой эти ферменты также используют в хлебопекарной промышленности. Они улучшают качество и аромат хлеба, ускоряют созревание теста, увеличивают пористость и объем хлеба.

В молочной промышленности использование протеаз ускоряет созревание сыров вдвое и снижает их себестоимость на 10 %. В кулинарии обработка мяса пептидгидролазами *Streptomyces griseus* (протелином и проназой) перед его приготовлением значительно улучшает качество мясных блюд.

В текстильной промышленности процесс расшлихтовки (выравнивания поверхности) тканей ферментными препаратами класса протеаз грибного происхождения ускоряется в 7–10 раз; эти же препараты служат для удаления белка серицина при размотке коконов тутового шелкопряда при производстве натурального шелка. В кожевенном и меховом производстве применяют препараты протеиназ (протелин и протофрадин), являющихся внеклеточными ферментами стрептомицетов. При этом время, требуемое для осуществления необходимых процессов, сокращается в несколько раз, сортность и качество шерсти и кож повышается. Щелочные протеазы на основе высокоактивного продуцента *Bacillus licheniformis* вместе с целлюлазами являются компонентами стиральных порошков и моющих средств. Кроме того, протеолитические ферменты применяют при извлечении серебра из фотографических пленок и бумаги. Важнейшей областью применения протеолитических ферментов является медицина. Нейтральные протеазы широко используются в лечении болезней желудочно-кишечного тракта, сердечно-сосудистой системы, в хирургии для обработки гнойных ран, ожоговых и обмороженных поверхностей. Протеазы способствуют размягчению омертвевшей ткани, облегчая тем самым дренаж ран и ускоряя их заживление. На втором месте по объему промышленного использования, после протеаз, находятся амилолитические

ферменты, которые катализируют гидролиз различных типов гликозидных связей в крахмале, декстрани, гликогене и родственных полисахаридах. К ферментам, расщепляющим гликозидную связь внутри полисахарида (эндоамилазам), относятся α -амилаза, пуллуланаза и циклодекстрин-глюкозилтрансфераза. Среди экзоамилаз выделяют β -амилазу, глюкоамилазу и амилоглюкозидазу. Из амилолитических ферментов чаще используют α -амилазу (из *Bacillus subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*) и глюкоамилазу (продуцируется представителями рода *Aspergillus*). α -Амилаза – фермент, осуществляющий эндогидролиз α -1,4- гликозидных связей крахмала, гликогена и родственных им полисахаридов до мальтозы, декстринов и глюкозы. α -Амилазы используются в процессе промышленного получения этанола как частичная замена дорогого солода в пивоварении, для улучшения качества муки в хлебопечении, а также в целлюлозно-бумажной промышленности. Кроме того, эти ферменты применяются в текстильной промышленности при изготовлении тканей и добавки к моющим средствам. Глюкоамилаза – экзофермент, атакующий крахмал с нередуцирующего конца полисахаридной цепочки, последовательно отщепляя глюкозные остатки с образованием преимущественно глюкозы. Препараты глюкоамилазы применяются для ферментативной обработки крахмалсодержащего сырья в спиртовой, крахмалопаточной, хлебопекарной и пивоваренной промышленности.

Целлюлолитические ферменты – ферменты класса гидролаз, катализирующие гидролиз 1,4-гликозидных связей в молекуле целлюлозы с образованием набора олигосахаридов различной степени полимеризации вплоть до мономера - глюкозы. Среди целлюлолитических ферментов микроорганизмов выделяют экзоглюканазы (целлобиогидролазы, отщепляющие от нередуцирующего конца целлюлозной цепи как остатки целлобиозы, целлотриозы, глюкозы, так и более крупные фрагменты), эндоглюканазы (гидролизующие β -1,4-гликозидные связи между остатками глюкозы в середине цепи), β -глюкозидазы (катализирующие превращение целлобиозы и целлотриозы в глюкозу). Среди промышленных продуцентов микробных целлюлаз ведущую роль играют различные виды грибов рода *Trichoderma* (*T. reesei*, *T. viride*, *T. longibrachiatum*). Это обусловлено высокой секреторной способностью их клеток, а также разнообразием продуцируемых ферментов с различной субстратной специфичностью, что делает эти продуценты универсальным объектом для получения различного рода биотехнологических продуктов. Препараты целлюлаз на основе грибов *Trichoderma* выпускаются во многих странах ведущими компаниями – производителями промышленных ферментов, в частности Novozymes (Дания), Genencor International (США), Iogen (Канада), PrimAlko (Финляндия), Meiji Seika Kaisha Ltd. и Shin Nihon Chemical Co. (Япония) и др. В пищевой промышленности целлюлазы используют для осветления соков, в пивоварении. Кроме того, целлюлолитические ферменты активно используются в целлюлозно-бумажной промышленности, в сельском хозяйстве (в процессе приготовления силоса). После полного гидролиза

целлюлозу можно использовать как дешевый источник глюкозы. С конца 1980-х гг. целлюлазы стали активно применяться для обработки текстильных изделий и материалов. Первым таким процессом стала ферментативная обработка джинсовых изделий, приводящая к частичному удалению красителя с поверхности ткани, в результате которой изделия приобретают внешний вид «вареных джинсов». В течение нескольких лет ферменты практически заменили пемзу и химические агенты, применявшиеся для этой цели ранее. Позднее целлюлазы стали широко использоваться для биополировки трикотажа и изделий на основе хлопчатобумажных и смесовых тканей. В результате такой обработки с поверхности материала удаляются ворсинки и неровности, материал становится более гладким, приятным на ощупь, и после серии стирок ткань не скатывается, что повышает потребительские свойства изделий. В последнее десятилетие целлюлазы также стали активно использоваться в качестве добавок к детергентам и моющим средствам, чтобы, воздействуя при стирке на текстильные материалы, содержащие в своем составе целлюлозные волокна, облегчить удаление грязей за счет гидролиза части поверхностных волокон. Процедура выделения потенциальных штаммов – продуцентов ферментов состоит из пяти основных этапов: взятия образцов, получения накопительных культур, получения чистых культур, проверки способности выделенных микроорганизмов продуцировать требуемые ферменты, описания свойств выделенных микроорганизмов.

Для получения накопительной культуры используются *селективные (элективные) среды*, в которых путем варьирования различных факторов создаются избирательные условия для преимущественного развития продуцента определенных веществ. Это позволяет проводить процедуру обогащения. *Обогащение* – процесс, обеспечивающий подходящие условия для выращивания и воспроизводства определенных микроорганизмов. Для других же микроорганизмов эти условия будут летальны или значительно замедлят их рост. Селективная питательная среда должна содержать в качестве источников углерода определенные соединения, предназначенные для отбора микроорганизмов, способных их утилизировать, либо ингибиторы, блокирующие специфические биохимические пути. Среда должна характеризоваться оптимальными для выделяемых микроорганизмов значениями pH, температуры и осмотического давления. Полученные в таких условиях культуры называют *накопительными*. При первичном скрининге производят отбор из крупной популяции организмов, имеющих специфическую активность. Это преимущественно качественный отбор. Большинство методов скрининга можно разделить на: прямые (которые предполагают специфическую идентификацию требуемого продукта, например, при использовании хроматографических методов); непрямые, такие как детекция фермента с помощью колориметрических или флуориметрических реакций, проходящих при наличии ферментативной активности. Для роста выделяемых микроорганизмов используют агаризованные среды, содержащие субстрат для определенного фермента. Наличие у бактерий ферментативной активности можно

определить при появлении вокруг колоний продуцента зон просветления, которые являются результатом гидролиза субстрата (например, гидролиза белков молока), либо зон, выявляемых после постановки колориметрической реакции (например, реакции на крахмал с реактивом Люголя). Такой скрининг проводится быстро, является недорогим и при этом сразу можно исследовать большое количество колоний.

Опыт 1. Взятие образцов

Материалы и оборудование: подгнившие овощи и фрукты, почва с растительными остатками, стерильный физраствор, спирт ректификат, H₂O дистиллированная, вата, весы, колбы плоскодонные с пробками, пинцеты, скальпели, керамические доски, часовые стекла, стеклянные палочки.

Ход работы. Из подгнивших овощей и фруктов, почвы с растительными остатками. Берут образец весом 30–40 г вносят в стерильную колбу на 250 мл, куда добавляют 40–50 мл стерильного физиологического раствора. Колбу 10 сек. интенсивно встряхивают, дают отстояться суспензии 30 мин.

Опыт 2. Получение накопительных культур

Материалы и оборудование: агар-агар; обезжиренное молоко, 0,5 % I₂; 5 % KI; 1 % водный раствор красителя Конго красного, 8 % водный раствор NaCl; 100 мл солевого концентрата: (K₂HPO₄ - 52,5 г, KH₂PO₄ - 22,5 г, (NH₄)₂SO₄ - 5,0 г; цитрат натрия 2H₂O - 2,5 г; H₂O дистиллированная до 1000 мл); 1М раствор MgSO₄ • 7 H₂O; крахмал 0,05 %; карбоксиметилцеллюлоза (КМЦ) 0,05 %; 2 % водный раствор агар-агара – 300 мл; чашки Петри; бактериологическая петля; шпатель Дригальского; колбы плоскодонные с пробками, пипетки, весы, шпатели, пинцеты, термостат 28 °С.

Ход работы. Для выделения бактерий, способных к образованию *амилаз*, высевают производят на минимальную агаризованную среду, содержащую солевой концентрат 5А как источник макро- и микроэлементов; в качестве единственного источника углерода добавлен крахмал в конечной концентрации 0,05 %. Чашки Петри инкубируют в течение 1-3х суток при 28 °С. При исследовании амилалитической активности чашку с выросшими колониями заливают раствором, содержащим 0,5 % I₂ и 5 % KI, и о наличии активности судят по образованию зон просветления вокруг колоний.

Чтобы выделить бактерии, способные образовывать *протеолитические ферменты*, высевают производят на минимальную среду, в которой в качестве единственного источника углерода добавлено обезжиренное молоко в конечной концентрации 0,7 %. Чашки инкубируют в течение 1-3-х суток при 28 °С. О наличии протеолитической активности судят по появлению прозрачных зон гидролиза белков молока вокруг колоний.

Для выделения бактерий, способных к образованию *целлюлаз*, высевают производят на минимальную среду, в которой в качестве единственного источника углерода

добавлена карбоксиметилцеллюлоза (КМЦ) в конечной концентрации 0,05 %. Чашки инкубируют в течение 1-3-х суток при 28 °С.

При проверке на целлюлолитическую активность чашку с выросшими клонами заливают 1 % водным раствором красителя Конго красного на 20 мин (происходит связывание красителя с целлюлозой), затем краситель сливают, чашки промывают 8 % водным раствором NaCl (для вымывания красителя из агар-агара). О наличии целлюлолитической активности судят по образованию зон просветления вокруг колоний.

Для приготовления 400 мл *минимальной среды* используют солевой концентрат – 80 мл, расплавленный 2 % водный агар-агар – 300 мл. Добавляют стерильную дистиллированную воду до 400 мл. После стерилизации добавляют 5 мл стерильного 1 М раствора $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ на 1 литр концентрата. Далее добавляют необходимые компоненты, в зависимости от способности образовывать разные виды ферментов.

Высев бактерий из образцов производят с помощью шпателя по методу Коха, последовательно используя три чашки Петри. На поверхность среды в первой чашке стерильной пипеткой наносят 0,1 мл образца, распределяют суспензию с помощью шпателя Дригальского. Далее, не стерилизуя шпатель, продолжают распределять образец сначала по поверхности среды во второй, а затем в третьей чашке. После соответствующего времени инкубирования (1–3 дня) при 28 °С чашки просматривают и отбирают для дальнейшей работы. Обычно на первой чашке наблюдается сплошной рост микроорганизмов, а на второй и третьей – рост изолированных колоний.

Выводы:

Контрольные вопросы:

1. Как определить активность ферментов?
2. Селективная питательная среда.
3. Как высевают бактерии из образцов?
4. Что такое накопительная культура и как ее получают?
5. Какие используются штаммы бактерий для промышленного получения ферментов?
6. Классификация ферментов.
7. Роль ферментов, используемых в различных областях промышленности.
8. Характеристика промышленных продуцентов микробных целлюлаз.
9. Область применения протеолитических ферментов.
10. Область применения амилалитических и целлюлолитических ферментов.

Лабораторная работа № 9. Выделение актиномицетов, продуцирующих антибиотики

Цель работы: освоить методы выделения актиномицетов, продуцирующих антибиотики

Задачи: изучить плесневые грибы, продуцирующие антибиотики.

Теоретическое обоснование. К антибиотикам относят вещества природного или синтетического происхождения, способные избирательно подавлять рост или уничтожать другие микроорганизмы. Первым из антибиотиков был открыт пенициллин, в 1929 г. Александр Флеминг наблюдал подавление роста стафилококка плесневым грибом *Penicillium notatum* (по современной таксономии *P. chrysogenum*). В настоящее время антибиотики нашли применение не только для лечения инфекционных болезней человека, но и как противоопухолевые препараты. Их используют в пищевой промышленности при консервировании продуктов, а также в животноводстве. Сегодня более 70 % всех антибиотических веществ, выпускаемых промышленностью и нашедших широкое применение, синтезируются актиномицетами. Эритромицин, стрептомицин, рифамицин, канамицин, тетрациклин – продукты жизнедеятельности актиномицетов. На их основе получен ряд полусинтетических форм антибиотиков. Источником для выделения актиномицетов могут служить нейтральные, слабощелочные почвы, торф. Актиномицеты на питательных средах растут медленно, поэтому в среде для их выделения концентрация сахаров должна быть максимальной либо должен использоваться трудно утилизируемый источник углерода, чтобы предотвратить быстрый рост псевдомонад и бацилл.

Материалы и оборудование: агар-агар, соли, физиологический раствор, крахмал, вода водопроводная, чашки Петри с питательной средой, образцы почвы, скальпели, шпатели, петля бактериологическая, термостат 28 °С, стаканчики химические колбы плоскодонные, мерный цилиндр, пипетки, весы, стеклянные палочки.

Ход работы. 50 г почвы помещают в стерильную колбу объемом 250 мл и добавляют 50–60 мл физиологического раствора (0,85 % раствор хлорида натрия в дистиллированной воде). Содержимое колбы хорошо перемешивают и 0,1 мл образца засевают шпателем на предварительно подготовленную чашку Петри со средой для выделения актиномицетов. Инкубируют при 28 °С в течение трех суток.

Среда для выделения актиномицетов:

(NH₄)₂ SO₄ - 1 г

K₂HPO₄ - 1 г

MgSO₄ - 1 г

NaCl - 1 г

Крахмал - 10 г

Агар-агар - 15 г

Вода водопроводная до 1 л.

Для исследования антибиотической активности выделенных бактерий используют метод агарового блока, находящегося в центре чашки Петри. Для проведения эксперимента готовят чашку Петри с агаризованной питательной средой. В центре чашки с помощью стерильной стеклянной пробирки вырезают лунку (рис. 5), в которую переносят вырезанный аналогичным образом агаровый блок из чашки с выросшими актиномицетами.

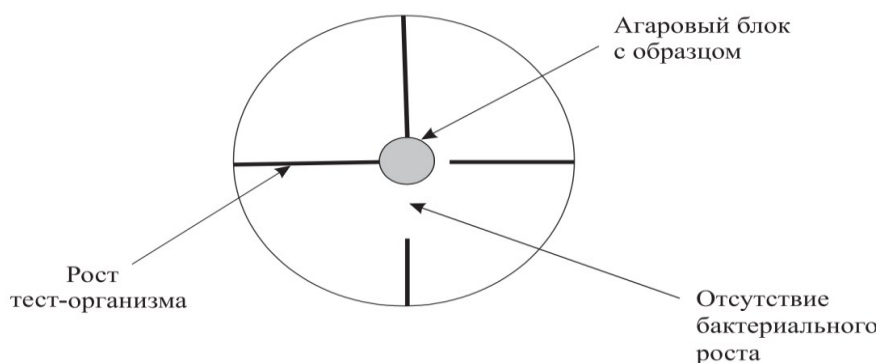


Рисунок 5. Определение антибиотических свойств микроорганизмов

Чашку помещают в термостат (28 °C) на 18–20 ч с тем, чтобы накопившийся в агаровом блоке антибиотик лучше продиффундировал в окружающий агар-агар. Затем по радиусам агаровой пластинки высевая штрихами тест-организмы, например, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Serratia marcescens*, *Streptomyces griseus*, и чашку вновь на 24 ч помещают в термостат (28 °C). Отсутствие роста тест-организма на том или ином расстоянии от блока будет указывать на продукцию антибиотических веществ организмами, находящимися в центре чашки. Если же наблюдается рост тест-организма в непосредственной близости от агарового блока, следовательно, выделенные ранее актиномицеты не продуцируют веществ, ингибирующих рост использованных в эксперименте тест-организмов.

Выводы:

Контрольные вопросы:

1. Плесневые грибы, продуцирующие антибиотики.
2. Классификация антибиотиков.
3. Какие вещества относятся к антибиотикам?
4. Использование антибиотиков.
5. Исследования антибиотической активности выделенных бактерий.

Лабораторная работа № 10. Исследование метода накопительных культур для выделения микроорганизмов разных физиологических групп

Цель работы: освоить методы исследования накопительных культур для выделения микроорганизмов разных физиологических групп.

Задачи изучить:

- получение накопительной культуры маслянокислых бактерий;
- получение накопительной культуры *Bacillus subtilis* var. *mesentericus* (картофельной палочки);
- получение накопительной культуры молочнокислых бактерий.

Теоретическое обоснование. Основой современного биотехнологического производства является микробиологический синтез, т. е. синтез различных веществ с помощью микроорганизмов. Бейеринком, Виноградским создана техника (методика) так называемых «накопительных культур» для выделения микроорганизмов определенных физиологических групп. Эта методика накопительных культур базируется на использовании селективных методов культивирования, т.е. создания определенных условий при культивировании, таких, как наличие pH, азота, освещенности, определенного источника углерода и энергии, концентрации элементов питания и др., которые наиболее благоприятны для развития микроорганизмов определенной физиологической группы. В таких условиях другие организмы не могут размножаться или их рост незначителен. Выбирая установленный состав питательной среды, параметры культивирования и инокулируя среду природными субстратами (ил, вода, почва) или техногенными (сточные воды и т.п.), содержащими разнообразные микроорганизмы, можно получить накопительную культуру микроорганизмов, которые характеризуются конкретными физиолого-биохимическими свойствами, т.е., могут развиваться при определенном значении pH и температуре, способных окислять определенные органические субстраты, фиксировать азот атмосферы, окислять неорганические соединения и др., в результате существенного развития микроорганизмов, приспособленных к конкретным условиям. Предотвращают рост сопровождающих микроорганизмов последовательные частые пересевы на такую же селективную жидкую среду, которые могли бы использовать продукты метаболизма или даже автолиза первичной культуры и, таким образом, позволяют получить обогащенную накопительную культуру. Оптимальным материалом для инокуляции при получении накопительных культур являются субстраты, в которых происходит естественное «обогащение». Для выделения микроорганизмов, способных использовать органические соединения, загрязняющие сточные воды химических производств - это пробы сточных вод этих же производств или почвы, загрязненные этими стоками, а для выделения микроорганизмов, окисляющих нефтепродукты - это почвы, загрязненные нефтью и т. д. Получение накопительной культуры определяют визуально, по проявлению признаков роста микроорганизма: появлению пленки, пигментов, осадка, помутнению

среды, выделению газообразных веществ и т. д. Из накопительных культур выделяют чистую культуру микроорганизмов.

Опыт 1. Получение накопительной культуры маслянокислых бактерий

Цель работы: освоить методы получения накопительной культуры маслянокислых бактерий.

Задачи изучить:

- сбраживание маслянокислыми бактериями углеводов;
- способность накопления маслянокислых бактерий на картофельном субстрате.

Теоретическое обоснование. Маслянокислые бактерии сбраживают углеводы, такие, как сахароза, крахмал, глюкоза с образованием масляной кислоты. Кроме масляной кислоты образуется некоторое количество углекислоты, водорода, уксусной кислоты. Маслянокислые бактерии - строгие анаэробы, поэтому при их культивировании нужно организовывать такие условия, которые обеспечивают отсутствие кислорода.

Материалы и оборудование: картофель, мел, стерильное молоко, кефир, концентрированная H_2SO_4 ; 96 % этиловый спирт, 5 % раствор хлорного железа, синька Лефлера, H_2O дистиллированная, пробирки, вата, термостат 37 °С, термометр, микроскопы, предметные стекла, чашки Петри с питательной средой, ватные пробки, шпатели, колбы плоскодонные, палочки стеклянные, водяная баня, пипетки, спиртовка, спички.

Ход работы. Для получения накопительной культуры маслянокислых бактерий необходимо в стерильную пробирку вместимостью 50 см³ поместить несколько кусочков неочищенного картофеля, четверть чайной ложки мела, залить водопроводной водой, при этом расстояние до пробки должно быть 2-3 см. Закрывать ватной пробкой и нагревать при температуре 80 °С в течение 10 мин в водяной бане, а затем поместить в термостат при температуре 37 °С. При микроскопировании на дне пробирки через несколько суток в жидкости обнаруживается большое количество подвижных палочек. Отличительной особенностью маслянокислых бактерий является их способность накапливать в клетках запасное вещество – гранулезу, а также образовывать споры.

Существуют два типа спорообразования: 1) клостридиальный; 2) плектридиальный.

Клостридиальный тип заключается в том, что при спорообразовании клетки утолщаются в середине. При плектридиальном типе наблюдается утолщение на конце клетки. После созревания спор гранулеза в клетках исчезает. Накопительную культуру анализируют после 6-7 дней культивирования. Для приготовления микроскопического препарата культуральную жидкость с микроорганизмами берут пипеткой со дна пробирки, вблизи ломтиков картофеля. Для выявления в культуральной жидкости масляной кислоты проводят две качественные реакции:

1) в сухую чистую пробирку вносят 3-5 см³ культуральной жидкости, взятой из середины пробирки с накопительной культурой. Добавляют 1-2 см³ 5 % раствора хлорного железа. Затем слегка подогревают. Из-за образования маслянокислого железа наблюдают появление кирпично-бурого окрашивания;

2) в сухую чистую пробирку вносят 3-5 см³ культуральной жидкости, взятой из середины пробирки с накопительной культурой. Добавляют 1-2 см³ 96 % этилового спирта, 1 см³ концентрированной серной кислоты. После прибавления концентрированной серной кислоты отмечается то, что дно пробирки нагревается. После охлаждения пробирки обнаруживают ананасный запах образовавшегося масляно-этилового эфира.

Опыт 2. Получение накопительной культуры *Bacillus subtilis var. mesentericus* (картофельной палочки)

Теоретическое обоснование. Широко распространена в природе картофельная палочка, особенно на картофеле, которая попадает из почвы. Главной характеристикой картофельной палочки является то, что она образует очень стойкие центральные споры, которые выдерживают нагревание при температуре 100 °С в течение 6 ч.

Материалы и оборудование: Н₂О дистиллированная, клубни картофеля, молоко, кефир, дрожжи, синька Лефлера, фуксин, люголь, спирт ректификат, спиртовка, пипетки, пробирки со штативом, стаканчики, микроскоп, предметные стекла, водяная баня, термостат 30 °С, чашки Петри, скальпели, керамические доски, стеклянные палочки.

Ход работы. Для получения накопительной культуры картофельной палочки нужно очищенный картофель нарезать ломтиками, поместить их в чашки Петри и провести прогревание в течение 10 мин при температуре 100 °С в стерилизаторе (все вегетативные клетки микроорганизмов инактивируются). При температуре 25-30 °С помещают в термостат на 3-4 дня. На картофеле прорастают споры и образуется крепкая морщинистая пленка, при микроскопировании которой видны подвижные палочки длиной до 4-5 мкм, часто соединенные в цепочки.

Опыт 3. Получение накопительной культуры молочнокислых бактерий

Теоретическое обоснование. Существенным признаком молочнокислых бактерий является способность осуществлять сбраживание углеводов (моно- и дисахаридов) с образованием молочной кислоты (молочнокислое брожение). Для получения накопительных культур молочнокислых бактерий инокулянтom могут быть кисломолочные продукты.

Ход работы. Для получения накопительной культуры молочнокислых бактерий необходимо стерильное молоко, которое используют в качестве питательной среды. В пробирку со стерильным молоком вносят 1 см³ кислого молока или любого кисломолочного продукта (кефир, ряженка, варенец, и т.д.). Пробирку с полученным

посевом и контрольную пробирку со стерильным молоком ставят в термостат при температуре 30-32 °С. Проводят микроскопирование препарата фиксированных клеток через 24 ч, приготовленного из культуральной жидкости. Учитывая особенность субстрата (молока), препарат фиксированных клеток готовят следующим образом: из пробирки на предметное стекло наносят каплю культуральной жидкости, которую равномерно размазывают покровным стеклом. Мазок высушивают на воздухе, фиксируют и одновременно обезжиривают смесью спирта и эфира (1:1) в течение 10 мин, а затем наносят непосредственно на мазок. После испарения смесь наливают повторно. Высушенный мазок окрашивают синькой Лефлера.

Задание

1. Изучить и получить накопительную культуру маслянокислых бактерий. Описать характер роста.
2. Приготовить и промикроскопировать препарат фиксированных клеток. Зарисовать.
3. Получить накопительную культуру картофельной палочки. Описать характер роста.
4. Приготовить препарат фиксированных клеток и промикроскопировать. Зарисовать.
5. Получить накопительную культуру молочнокислых бактерий из кислого молока или кефира. Описать характер роста.
6. Приготовить препарат фиксированных клеток. Микроскопировать и зарисовать.
7. Сделать выводы о получении накопительных культур микроорганизмов.

Выводы:

Контрольные вопросы:

1. Что является основой метода «накопительных культур»?
2. Характеристика маслянокислых бактерий.
3. Получение накопительной культуры маслянокислых бактерий.
4. С какой целью проводятся две качественные реакции при получении накопительной культуры маслянокислых бактерий?
5. Характеристика молочнокислых бактерий.
6. Получение накопительной культуры молочнокислых бактерий.
7. Характеристика картофельной палочки.
8. Получение накопительной культуры картофельной палочки.

Раздел 2. Комплексная переработка биологического сырья

Лабораторная работа № 11. Глубинное культивирование бактерий *Escherichia coli* в лабораторном ферментере

Цель работы: освоить глубинное культивирование бактерий *Escherichia coli* в лабораторном ферментере

Задачи: изучить методы культивирования микроорганизмов в ферментере.

Теоретическое обоснование. Изучение процесса микробного биосинтеза обычно начинается с исследования динамики роста периодической культуры. На начальном этапе разработки промышленного биотехнологического процесса культивируют микроорганизмы в лабораторном ферментере в периодическом режиме и прослеживают ход накопления биомассы и интересующего продукта, потребление исходного сырья, скорость поступления O_2 , коэффициенты массопередачи и др. Для этого регулярно отбирают пробы развивающейся культуры микроорганизмов и строят график зависимости клеточной биомассы (числа клеток) от времени – кривую роста бактериальной культуры, что позволяет выявить фазы роста клеточной популяции. Сравнение характера роста культуры микроорганизмов с динамикой накопления целевого продукта дает необходимую информацию для дальнейшей разработки биотехнологического процесса. Определение количества биомассы можно проводить, измеряя оптическую плотность в диапазоне длин волн 550–600 нм. Количество жизнеспособных клеток определяют, высевая определенный объем разведенной бактериальной культуры на чашки Петри с питательным агар-агаром и подсчитывая число образовавшихся на них колоний после инкубирования. Сравнение характера кривых роста, полученных двумя указанными способами, дает возможность в последующем определять переход бактериальной культуры в ту или иную фазу роста в процессе культивирования этих бактерий в аналогичных условиях, используя только нефелометрический метод.

Материалы и оборудование: культура бактерий, ферментер.

Ход работы. Для получения посевного материала накануне занятия (за 16–20 ч) готовят бульонную культуру бактерий *E. coli* В. Для этого в колбу с 200 мл питательного бульона петлей засевают бактерии и инкубируют при 37 °С в течении 12–16 ч. Подготавливают к работе предварительно стерилизованный автоклавированием ферментер, подключая к нему датчик измерения температуры, устройства для перемешивания и аэрирования. В ферментер объемом 5 л добавляют 1,8 л ПБ и вносят посевной материал в количестве 0,2 л. Аэрирование культуры осуществляется путем продувания через толщу среды стерильного воздуха, количество которого поддерживается на постоянном уровне автоматически. Перед попаданием в ферментер воздух стерилизуется, проходя через специальный мелкопористый фильтр.

После добавления в ферментер посевного материала отбирают 3 мл культуры, 0,5 мл из которых используют для приготовления требуемого разведения культуры, а оставшуюся часть – для определения плотности клеточных суспензий с помощью спектрофотометра при длине волны 600 нм (A600) относительно среды культивирования (в кювете сравнения).

Бактерии культивируют 5 ч, через каждые 30 мин производя отбор проб аналогичным способом. Для определения количества жизнеспособных клеток (N) высевает по 0,1 мл разведенной культуры на ранее подготовленные чашки с питательной средой. Бактерии инкубируют при 37 °С в течение 24 ч, после чего производят подсчет выросших бактериальных колоний.

На рисунке 6 представлено устройство ферментера с механическим перемешиванием для культивирования бактериальных клеток.

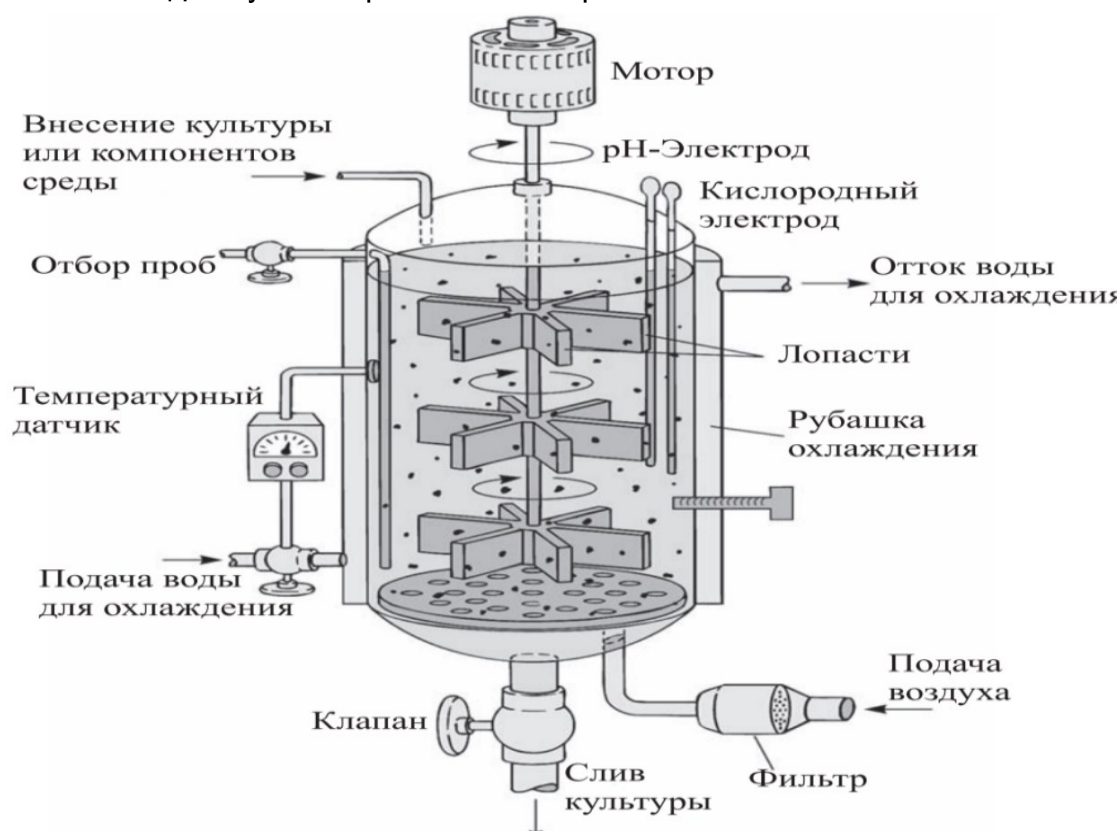


Рисунок 6. Устройство ферментера с механическим перемешиванием для культивирования бактериальных клеток

Учитывая, что колония - потомство одной клетки, рассчитывают количество жизнеспособных бактериальных клеток (N) в 1 мл культуры по формуле:

$$N = n D / V$$

где,

n – количество образовавшихся на чашке колоний;

D – степень разведения;

V – объем наносимой на чашку культуры, мл.

Лабораторная работа № 12. Комплексная переработка микробного сырья с получением продуктов белковой и нуклеотидной природы

Цель работы: овладеть комплексной переработкой микробного сырья с получением продуктов белковой и нуклеотидной природы.

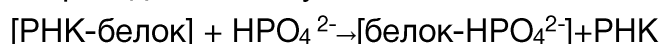
Задачи:

- изучить методы выделения дрожжевой РНК;
- ознакомиться навыками выполнения технологических операций по экстракции, центрифугированию в лабораторных условиях при выделении дрожжевой РНК;
- освоить определение концентрации нуклеиновых кислот по А.С. Спирину;
- ознакомиться с методами контроля промежуточных и конечных продуктов.

Теоретическое обоснование. Дрожжевая рибонуклеиновая кислота (РНК) представляет собой смесь полинуклеотидов разных молекулярных масс. Натриевая соль РНК – нуклеинат натрия находит применение в медицине при лечении широкого круга заболеваний, а технический продукт (РНК-концентрат) – в производстве мононуклеотидов. При этом основные субъединицы в виде нуклеотидов и 5'-мононуклеотидов, определяющие структуру РНК и содержащие основания (аденин, гуанин, цитозин и урацил) имеют самостоятельное значение и могут использоваться для производства лекарственных препаратов. Помимо вышеуказанных соединений представляют интерес некоторые основания нуклеиновых кислот, применяемые в современной биотехнологии в виде ростовых факторов (аденин и его производное кинетин) или в технологиях тонкого органического синтеза при получении фармакопейных препаратов (например, ацикловира на основе гуанина).

Источником сырья для получения дрожжевой РНК служат дрожжи рода *Candida*, выращенные на различных субстратах и содержащие не менее 7 % компонентов нуклеотидной природы.

Основу технологического процесса переработки дрожжей составляет экстракция полинуклеотидов из биомассы горячими водно-солевыми или водно-щелочными растворами. В первом случае получают полинуклеотиды, во втором – полинуклеопротеины. В качестве солевого экстрагента используют растворы фосфата калия или аммония. Известно, что нуклеиновые компоненты в клетке существуют в виде белково-нуклеинового комплекса (БНК). При обработке клеток солевым экстрагентом происходит связывание белков в комплекс с фосфатионом, в результате чего в раствор выделяются нуклеиновые кислоты в свободном виде:



При использовании щелочных экстрагентов в раствор выделяется белково-нуклеиновый комплекс, для разрушения которого в последующих стадиях технологического процесса используют соли ортофосфорной кислоты.

Из полученного экстракта компоненты нуклеиновых кислот выделяют путем осаждения последних в изоэлектрической точке (ИЭТ) с последующей очисткой от сопутствующих примесей белковой, липидной и углеводной природы.

Основным отходом, получаемым при выделении РНК из микробной биомассы, является денуклеинизированная биомасса (ДНБМ), содержащая до 42 % белковых веществ. Поэтому представляется целесообразным осуществить комплексную переработку сырья с одновременным получением продуктов полинуклеотидной (РНК) и белковой природы (белковых гидролизатов).

Белковые гидролизаты нашли широкое применение в микробиологии, медицине и других отраслях промышленности. В микробиологии они применяются в качестве азотсодержащей основы питательных сред для культивирования различных микроорганизмов. В медицине они используются для парентерального лечебного питания. Кроме того, белковые гидролизаты широко применяются в технических целях. В частности, в последние годы наметился интерес к использованию белковых гидролизатов в качестве комплексообразователей при электрохимическом извлечении редких и драгоценных металлов из низкосортного сырья.

Для получения продуктов белковой природы используют экстракцию белковых веществ под действием минеральных реагентов (кислот, щелочей) либо ферментных препаратов. В целях упрощения технологической схемы, а именно сокращения стадий очистки белковых гидролизатов от примесей углеводной и липидной природы, целесообразно выделять из экстракта белковых веществ полупродукт – изолированную белковую фракцию.

В дальнейшем такой полупродукт можно подвергнуть глубокому химическому или ферментативному гидролизу с получением смеси аминокислот и низших пептидов, которая способна найти широкое применение.

Опыт 1. Выделение дрожжевой РНК

Материалы и оборудование: сухие дрожжи, 1,5 моль/л диаммонийфосфат, раствор аммиака, 96 % спирт ректификат, концентрированная соляная кислота, колбы плоскодонные с пробками, вата, мешалка, стеклянные палочки, плитка, центрифуга, центрифужные пробирки, весы, вода дистиллированная, термометр для горячей воды, водяная баня, фильтры бумажные, пипетки, воронки, мерные цилиндры, рН-метр.

Ход работы. Взвесить 37 г сухих дрожжей. Приготовить 170 мл экстрагента (1,5 моль/л диаммонийфосфата), для этого рассчитать требуемое количество концентрированного раствора соли и воды.

Прогреть экстрагент до температуры экстракции (80 °С) внести 37 г сухих дрожжей на 170 мл приготовленного экстрагента. Затем включить мешалку. Когда суспензия прогреется до требуемой температуры (80 °С), добавить 5 мл концентрированного раствора аммиака и начать отсчет времени экстракции (15 мин), затем раствор охладить.

Охлажденную суспензию по 25 мл разлить в центрифужные пробирки и отцентрифугировать при 6000 об/мин в течение 15 мин. Денуклеинизированную биомассу собрать в отдельный стакан и оставить для выполнения опыта 2. Полученный бесклеточный экстракт при необходимости отфильтровать через бумажный фильтр и поставить на 30 мин в холодильник, измерив его объем.

Измерить концентрацию нуклеиновых кислот в экстракте *методом А.С. Спирина*. Пробу экстракта необходимо для анализа развести в 200 раз.

Опыт 2. Определение концентрации нуклеиновых кислот по А.С. Спирину

Теоретическое обоснование. Метод основан на гидролитическом отщеплении азотистых оснований от молекулы нуклеиновой кислоты при высокой температуре в присутствии хлорной кислоты и последующей спектрофотометрической регистрации отщепленных оснований.

Материалы и оборудование: 1 н раствор хлорной кислоты (HClO_4), H_2O дистиллированная, экстракт дрожжевой, спектрометр, пробирки в штативе, водяная баня, стаканчики химические, мерный цилиндр, пипетки.

Ход работы. 2 мл разведенного дистиллированной водой анализируемого раствора помещают в пробирку, в другую пробирку помещают 2 мл дистиллированной воды, затем приливают по 2 мл 1 н HClO_4 и выдерживают в течение 30 мин на водяной бане. Охладив содержимое пробирок, измеряют поглощение против контроля в кварцевых кюветах с толщиной поглощенного слоя 10 мм при 270 и 290 нм на спектрометре.

Расчет концентрации нуклеиновых кислот (мг/мл) проводят по формуле:

$$C_{\text{нк}} = (D_{270} - D_{290}) \cdot a \cdot 2 \cdot 54,21,$$

где D_{270} и D_{290} – поглощение при 270 и 290 нм;

2 – разведение анализируемого раствора при добавлении хлорной кислоты;

a – разведение без учета добавления хлорной кислоты;

54,21 – эмпирический коэффициент;

За окончательный результат принимают среднее арифметическое 3-х параллельных анализов.

Выводы.

Контрольные вопросы:

1. Роль нуклеиновых кислот в микробной клетке.
2. Практическое значение препаратов нуклеиновых кислот и продуктов их гидролиза.
3. Способы извлечения нуклеиновых кислот из микробной клетки.
4. Роль аммиака и диаммонийфосфата в экстракции РНК из клеток дрожжей.

5. Известно, что степень осаждения РНК в изоэлектрической точке растет с увеличением концентрации РНК в растворе. Какие способы Вы можете предложить для концентрирования, полученного в данной работе экстракта?
6. Какой растворитель (спирт или ацетон) целесообразнее использовать для сушки РНК и почему?
7. Известен способ извлечения РНК из клеток дрожжей в виде белково-нуклеинового комплекса. Предложите состав экстрагента для этого случая.
8. Способы гидролиза белка. Их достоинства и недостатки.
9. Пути использования продуктов гидролиза белка в пищевой, микробиологической, медицинской и других отраслях промышленности.

Лабораторная работа № 13. Образование лимонной кислоты грибом *Aspergillus niger*

Цель работы: освоить особенности образования лимонной кислоты грибом *Aspergillus niger* в различных условиях выращивания

Задачи: изучить способы выращивания гриба *Aspergillus niger*.

Теоретическое обоснование. В биотехнологии широко используется получение лимонной кислоты с помощью микроорганизмов. Этим важным свойством обладает и гриб *Aspergillus niger*.

Материалы и оборудование: 20 % раствор сахарозы; 10 % растворы NH_4NO_3 , KNO_3 , KH_2PO_4 , MgSO_4 , FeSO_4 , колбы плоскодонные емкостью 100 мл, цилиндры емкостью 100 мл, пипетки на 10 и 1 мл, препаровальные иглы, вата, культура гриба *Aspergillus niger*.

Ход работы. Готовят 200 мл полной питательной среды без микроэлементов, сахароза - 10,0 г; NH_4NO_3 - 0,3 г, KH_2PO_4 - 0,2 г, MgSO_4 - 0,05 г, FeSO_4 - 0,01 г.

Определяют исходную кислотность раствора с помощью pH-метра.

Питательную среду тщательно перемешивают и разливают по 50 мл в четыре конические колбочки, каждая емкостью 150 мл. Закрывают ватными пробками.

Во все колбочки вносят равное количество спор гриба. Колбы подписывают и ставят в термостат при 28-30 °С. На шестой день, когда пленка гриба достигнет большой мощности, проводят следующий опыт. Из колбы № 1 вынимают мицелий гриба, тщательно промывают с нижней стороны водой. Пленку гриба высушивают при 105 °С в сушильном шкафу до постоянного веса. С помощью pH-метра определяют кислотность фильтрата. Из колбы № 4 аккуратно сливают фильтрат и под мицелий подводят 50 мл свежей среды, после чего колбу помещают в термостат.

На седьмой день определяют кислотность фильтрата и сухой вес мицелия из колбы № 2 описанным выше способом.

На восьмой день определяют кислотность фильтрата и сухой вес мицелия из колб № 3 и 4 описанным выше способом.

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

Выводы: об образовании лимонной кислоты грибом *Aspergillus niger* в различных условиях.

Контрольные вопросы:

1. Сущность технологии получения лимонной кислоты.
2. Состав питательной среды для культивирования гриба *Aspergillus niger*.
3. Условия культивирования гриба *Aspergillus niger*.

Лабораторная работа № 14. Экстракционное извлечение липидов из биомассы

Цель работы: ознакомление с технологией экстракционного извлечения липидов из кормовой биомассы селективными растворителями,

Задачи: изучить методы проведения экстракции для определения содержания липидов в кормовых дрожжах.

Теоретическое обоснование. Липиды в клетках микроорганизмов выполняют многие чрезвычайно важные функции, и обычно содержание липидов и их состав является специфичным для разных групп микроорганизмов. Триглицериды, присутствующие в микроорганизмах, являются тем субстратом, на котором проявляется активность микробных триглицеридгидролаз – липаз. Накопление нейтральных липидов некоторыми микроорганизмами в неблагоприятных условиях существования или под воздействием повреждающих агентов указывает на их возможную защитную функцию. Фосфолипиды являются компонентами мембранных структур микробных клеток и в связи с этим участвуют во многих метаболических процессах.

Общее количество микробных липидов колеблется от 0,2 до 40 мас.% сухого вещества клетки, достигая более высоких значений при культивировании на средах, бедных азотом, но богатых углеводами или на средах с углеводородами. К числу микроорганизмов, богатых липидами, т.е. содержащих более 10 % липидов от сухой биомассы клетки, принадлежат дрожжи, микобактерии и коринебактерии, содержание липидов в клетках последних может достигать 64 %. Кроме того, условия культивирования в значительной степени влияют и на состав синтезируемых липидов.

В процессе культивирования микроорганизмов на различных субстратах можно получить все классы липидов:

- простые липиды (нейтральные жиры, воски);
- сложные липиды (фосфолипиды, гликолипиды);
- производные липидов (жирные кислоты, спирты, углеводороды, витамины К, Е).

Липиды микроорганизмов после выделения и соответствующей обработки могут с успехом быть использованы в шинной, лакокрасочной (как компоненты крема для обуви, сырье для синтеза смол, лаков и красок), химико-фармацевтической, медицинской (как сырье для получения эргостерина, убихинона и стероидных гормонов), металлургической (как компоненты составов для охлаждения режущего инструмента, а также защитных и консервационных масел), горнорудной (в качестве флотирующих агентов), строительной (как добавка к раствору бетона, улучшающая его физико-механические свойства) и др. Это позволит высвободить значительное количество жиров растительного и животного происхождения, используемых в настоящее время в этих отраслях промышленности, для пищевых целей. В промышленности микробные липиды выделяют из клеточной стенки дрожжей, полученных при их культивировании на гидролизатах растительного сырья или углеводородах нефти, методом экстракции.

Экстракционное отделение включает оборудование, как для проведения самого процесса экстракции, так и для стадии регенерации растворителя. В процессе экстракции параллельно получают два ценных продукта – обезжиренную микробную биомассу (биошрот) и липиды (био жир).

В экстракторах различных конструкций при повышенной температуре происходит выделение липидов из клеток дрожжей с помощью селективных растворителей. Биошрот из экстрактора поступает в десольвентор, где под действием острого пара и высокой температуры – до 90 °С – происходит удаление остатков растворителя из обезжиренной биомассы. Биошрот, выходящий из десольвентора, является готовым продуктом и направляется на стадии фасовки и упаковки. Концентрированный раствор биожира в растворителе (мисцелла) подается на дистилляцию для отделения биожира от растворителя. После дистилляции, включающей 2 - 3 колонны, готовый био жир поступает на склад или на дальнейшую переработку с целью разделения на составные компоненты. Отделенный в десольвенторе и дистилляторах растворитель после регенерации возвращается в экстрактор.

Опыт 1. Определение содержания липидов в кормовых дрожжах

Материалы и оборудование: сухие дрожжи, весы, 96 % спирт ректификат, колбы плоскодонные с пробками, весы, фильтры, водяная баня, холодильник для перегонки, HCl концентрированная, вата, цилиндры, качалка, стеклянные палочки, сушильный шкаф 105 °С, эксикатор.

Ход работы. В сухую коническую (качалочную) колбу помещают около 2 г дрожжей, предварительно взвешенных с точностью до 0,01 г. Затем добавляют 100 мл спирта для экстракции. Колбу закрывают ватным тампоном или пробкой, подписывают, ставят на качалку и проводят экстракцию липидов в течение 1,5 - 2 ч при 35 – 40 °С.

По окончании процесса экстракции колбу снимают с качалки, содержимое колбы фильтруют через складчатый фильтр, в предварительно взвешенную чистую круглодонную колбу вместимостью 250 мл. Остатки биомассы из качалочной колбы смывают на фильтр 30 мл экстракционной смеси (спирт).

Выделение липидов из раствора (мисцеллы) проводят с помощью отгонки растворителя на роторно-пленочном испарителе под вакуумом, создаваемым водоструйным насосом.

После отгонки растворителей круглодонную колбу с биожиром отсоединяют от прибора и помещают в сушильный шкаф, предварительно нагретый до 105 °С, выдерживают при этой температуре 30-40 мин для полного удаления растворителей. Затем колбу охлаждают в эксикаторе, взвешивают на аналитических весах с точностью до 0,002 г и определяют количество проэкстрагированных липидов.

Оставшийся после экстракции и фильтрования биошрот вместе с фильтром помещают в чашку Петри, сушат в сушильном шкафу при 105 °С в течение 1,5-2 ч, затем охлаждают в эксикаторе, взвешивают биошрот с точностью до 0,01 г и составляют материальный баланс процесса экстракции.

Параллельно проводят определение содержания липидов в биомассе с применением кислотного гидролиза. Для этого в круглодонную колбу вместимостью 100 мл помещают около 2 г дрожжей, предварительно взвешенных с точностью до 0,001 г, из той же партии, которая использовалась для экстракции. В колбу добавляют 2-3 мл пропанола, 10 мл разбавленной (2:1) соляной кислоты, а затем содержимое колбы тщательно перемешивают. Колбу соединяют с обратным холодильником, нагревают реакционную смесь на водяной бане при 75 °С в течение 1 ч. Затем в колбу через обратный холодильник добавляют 10 мл пропанола, колбу снимают с бани и оставляют для охлаждения. После охлаждения содержимое колбы переливают в делительную воронку, смывая остатки гидролизата со стенок колбы 20 мл диэтилового эфира. Смесь в воронке энергично встряхивают в течение 1 мин, добавляют 20 мл петролейного эфира и снова встряхивают в течение 1 мин.

После расслаивания отделяют кислотный слой, сливая его обратно в круглодонную колбу, а эфирный слой переливают в чистую делительную воронку. Экстракцию кислотного слоя проводят еще дважды, используя каждый раз 15 мл диэтилового и 15 мл петролейного эфира.

По окончании экстракции реакционную смесь сливают в канализацию, а объединенный эфирный экстракт дважды промывают в делительной воронке дистиллированной водой порциями по 20 мл, каждый раз встряхивая смесь 1 мин.

Эфирный экстракт фильтруют через складчатый фильтр, в предварительно взвешенную круглодонную колбу вместимостью 100 мл. Фильтр промывают, начиная с верхних краев, 10 мл смеси диэтилового и петролейного эфиров в соотношении 1:1.

Количество проэкстрагированных липидов (W_1 , мас.%) от массы кормовых дрожжей (m) определяется по формуле:

$$W_1 = (m_1 - m_0) \cdot 100 / m(1 - W/100),$$

где, m_1 – масса колбы с липидами, г;

m_0 – масса пустой колбы, г;

W – содержание влаги в исследуемом образце дрожжей, мас.%.

Выводы:

Контрольные вопросы:

1. Классификация микробных липидов и области их применения.
2. Влияние условий культивирования микроорганизмов на состав и количество синтезируемых липидов.
3. Влияние вида микроорганизма на количество и состав образующихся липидов.
4. Какими растворителями может проводиться процесс экстракции микробного жира из биомассы?
5. Как осуществляется процесс получения биожира в промышленности? Необходимость вспомогательных стадий при экстракции.
6. Влияние состава экстракционной смеси на технологичность процесса и количество извлекаемых липидов.
7. Что дает предварительная кислотная обработка (кислотный гидролиз) биомассы?
8. Какова ценность получаемого биошрота в зависимости от метода и степени извлечения?

Список литературы

Основная литература

1. Антипова Л.В. Основы биотехнологии переработки сельскохозяйственной продукции. - М.: Юрайт, 2020. - 204 с.
2. Беккер М.Е. Введение в биотехнологию /М.Е. Беккер. - М.: Книга по Требованию, 2012. - 115 с.
3. Блинов В.А., Буршина С.Н. Общая биотехнология: методические указания к лабораторным работам. - Саратов: РИК Полиграфия Поволжья, 2004. - 27 с.
4. Дебабов В.Г. Биотехнология. В 8 книгах. Книга 2. Современные методы создания промышленных штаммов микроорганизмов. Учебное пособие / В.Г. Дебабов, В.А. Лившиц. – М.: Высшая школа, 2013. - 208 с.
5. Егорова Н.С. Биотехнология: учеб. пособие для вузов: в 8 кн. - М.: Высшая школа, 2019. - 150 с.
6. Егорова Т.А. Основы биотехнологии. - М.: Высшая школа, 2003. – 250 с.
7. Загоскина Н.В. Биотехнология: теория и практика. - М.: Оникс, 2009. - 496 с.
8. Загоскина Н.В., Назаренко Л.В. Биотехнология. В 2 ч. Часть 1: учебник и практикум для вузов / под общей редакцией Н.В. Загоскиной, Л.В. Назаренко, 2-е изд., испр. и доп. – М.: Юрайт, 2020. 170 с.
9. Загоскина Н.В., Назаренко Л.В. Биотехнология. В 2 ч. Часть 2: учебник и практикум для вузов/ под общей редакцией Н.В. Загоскиной, Л.В. Назаренко, 2-е изд., испр. и доп.– М.:Юрайт, 2020. 219 с.
10. Зудин Д.В. Автоматизация биотехнологических исследований/ Д.В. Зудин, В.М. Кантере, В.А. Угодчиков. - М.: Высшая школа, 2017. - 112 с.
11. Иммуобилизованные клетки микроорганизмов: учеб. пособие / А.П. Сеницын [и др.]. - М.: Изд-во Моск. гос. ун-та, 1994. 288 с.
12. Клунова С. М. Биотехнология: учеб. для вузов / С.М. Клунова, Т.А. Егорова, Е.А. Живухина. - М.: Академия, 2010. - 255 с.
13. Лысак В.В. Микробиология: учеб. Пособие. - Минск, 2008. - 350 с.

Дополнительная литература

1. Неверова О.А. Пищевая биотехнология продуктов из сырья растительного происхождения/ О.А. Неверова, Г.А. Гореликова, В.М. Позняковский. - Новосибирск: Сиб. университет. изд-во, 2007. - 416 с.
2. Нетрусов А.И. Микробиология: учеб. для вузов / А.И. Нетрусов, И.Б. Котова. - М.: Академия, 2012. - 379 с.
3. Сазыкин Ю.О. Биотехнология: учеб. пособие для вузов/ Ю.О. Сазыкин. - М.: Академия, 2008. - 256 с.

4. Рубан Е.Л. Микробные липиды и липазы/ Е.Л. Рубан. - М.: Наука, 2021. - 218 с.
5. Русь О.Б., Ходосовская А.М. Введение в биотехнологию: Практикум. - Минск: БГУ, 2011. - 350 с.
6. Федорова О.С. Основы биотехнологии. - Красноярск, СибГУ им. М. Ф. Решетнева, 2022. - 100 с.
7. Чечина О.Н. Общая биотехнология: учебное пособие для вузов/ О.Н. Чечина, 2-е изд., перераб. и доп. - М.: Юрайт, 2020. - 231 с.
8. Шевелуха В.С. Сельскохозяйственная биотехнология/ В.С. Шевелуха, Е.А. Калашникова, С.В. Дегтярев и др. - М.: Высшая школа, 2019. - 416 с.
9. Шугалей В.С. Биотехнология: учеб. пособие для студентов / В.С. Шугалей. - Ростов-н/Д.: РИНЯЗ, 2001. - 84 с.

Электронный ресурс

1. Алешина Е.С. Культивирование микроорганизмов как основа биотехнологического процесса. - Оренбург: Университет, 2017. - 192 с. Режим доступа: <https://rucont.ru/efd/634971>.
2. Рябцева С.А. Общая биология и микробиология. Часть 1. Общая биология: учебное пособие. – Ставрополь: изд-во СКФУ, 2016. - 150 с. Режим доступа: <https://rucont.ru/efd/603356>.

Приложение

Оформление отчета

Отчет должен содержать:

1. Цель работы.
2. Краткое описание выполнения работы.
3. Результаты исследования образцов, необходимые расчеты, отчетные таблицы, фото.
4. Анализ полученных результатов и выводы.

ОТЧЕТ

проведения лабораторной работы по дисциплине

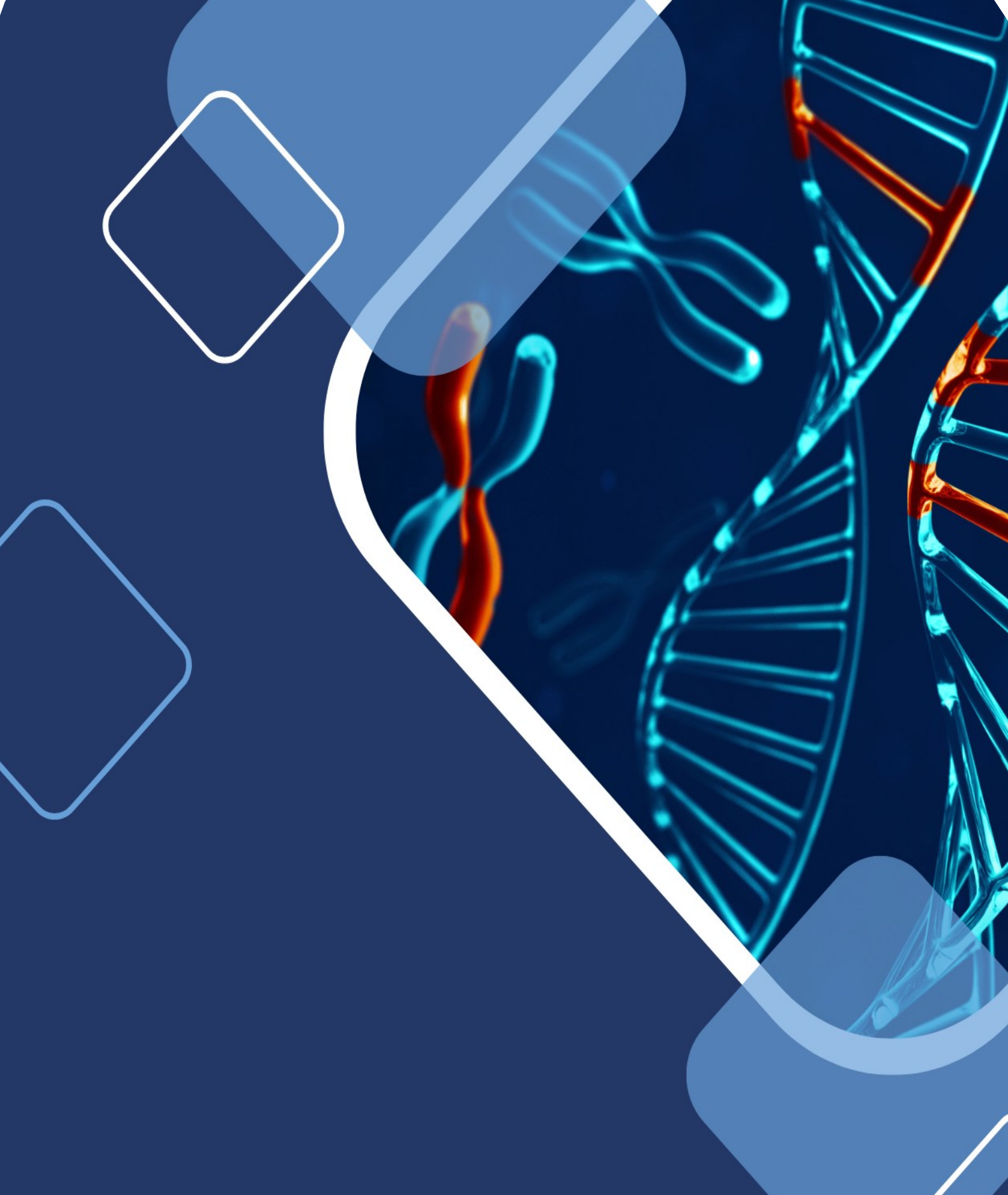
«Прикладная биотехнология»

Дата заполнения	Фамилии исполнителей:	
группа		
1. Название работы:		
2. Цель и задачи работы:	Цель работы:	
	Задачи работы:	
3. Принцип метода (теоретические основы)		
4. Последовательность проводимых операций		
Название этапа	Ход работы	Сырье и материалы
5. Результаты экспериментальных наблюдений и измерений		
6. Выводы		

Работу выполнил:

«___» _____ 20 ____ г.

Работу принял:



ISBN 978-5-908003-17-9



9 785908 003179 >

Усл. печ. л 2,8
Объем издания 6,9 МВ
Оформление электронного издания:
НОО Профессиональная наука, mail@scipro.ru
Дата размещения: 25.11.2025 г.
URL: http://scipro.ru/conf/biotechnology11_25.pdf