521 группа дисц. Микробиология

Задание по лабораторной работе: сделать конспект по указанной теме

**Тема: Изучение возбудителей молочнокислого брожения и брожения целлюлозы и продуктов их жизнедеятельности**

**Цель занятия:** ознакомиться с химизмом молочнокислого брожения и брожения целлюлозы, с качественными реакциями на молочную кислоту, с морфологией молочнокислых бактерий.

**Материалы и оборудование:** 0,1 н р-р NаОН, 10%-ный р-р серной кислоты, насыщенный р-р СuSО4, 2%-ный спиртовой р-р тиофена, 2%-ный р-р КМnО4, 0,5%-ный аммиачный р-р АgNО3, спиртовой 5%-ный р-р фенола, концентрированная Н2SO4, 5%-ный р-р FeCl3, р-р фенолфталеина, водный р-р метиленового синего, жидкость Никифорова, р-р генцианвиолета, р-р Люголя, 96%-ный спирт, р-р карболового фуксина, дистиллированная вода, колбы на 50 мл, пипетки на 10 мл, фильтровальная бумага, вата, предметные стекла, спиртовки, микроскопы, настольные лампы, стеклянные штативы с кристаллизаторами, промывалки, свежее и кислое молоко, ряженка, простокваша, кислые сливки, сметана, кефир, сливочное масло, рассолы капусты, огурцов.

Химизм молочнокислого брожения. Молочнокислое брожение вызывается молочнокислыми бактериями, которые с помощью ферментов сбраживают молочный сахар (лактозу) и любой другой сахар (глюкозу) до молочной кислоты и других продуктов:

C6H12O6 = 2 СН3СНОНСООН + 100 кДж (24 ккал)

Процесс идет с накоплением энергии. По характеру брожения молочнокислые бактерии делятся на две группы: гомоферментативные, когда продукт разложения – молочная кислота, и гетероферментативные, вызывающие образование, кроме молочной кислоты, других продуктов брожения: спирта, уксусной кислоты, СО2 и др.

К первой группе относятся: молочнокислый и сливочный стрептококки, ацидофильная и болгарская палочки, огуречная палочка.

Представители гомоферментативного брожения:

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

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

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

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

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

Ко второй группе (гетероферментативные бактерии) относятся капустная палочка, ряд лактобацилл (Lactobacillus plantarum, L. Fermenti, L. brevis), а также кефирные дрожжи и молочная плесень. Микроорганизмы этой группы чаще встречаются в заквашенных овощах и силосе.

Представители гетероферментативного брожения:

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

Кефирные дрожжи (Saccharomyces kefiri) - переводящие молочный сахар (лактозу) в спирт, в небольшом количестве.

Молочная плесень (Oidium lactis) - можно обнаружить сверху на молочнокислых продуктах, имеет мицелий, распадающийся на четырехугольные или овальные клетки, отличающиеся сравнительно большими размерами. Окисляет молочную кислоту до СО2 и воды, ухудшая качество скисшего молока.

**Качественные реакции на молочную кислоту:**

1. ***Определение уксусного альдегида***. Кислое молоко фильтруют через складчатый фильтр, к 10 мл фильтрата добавляют 1 мл 10%-ного р-ра серной кислоты, нагревают в конической колбе до кипения, затем по каплям прибавляют 2%-ный р-р (2 мл) КMnO4. В этих условиях происходит окисление молочной кислоты с КМnО4 до СН3СОН (уксусный альдегид):

а) 2КМn04 + ЗН2S04 = К2S04+ 2МnSO4 + ЗН2О +3O2.

Затем покрывают горлышко колбы фильтровальной бумагой, смоченной аммиачным раствором оксида серебра (смачивают бумагу вначале 0,5%-ным р-ром АgNОз, затем раствором NH4OH. Бумага темнеет под влиянием паров уксусного альдегида:

СН3СНОНСООН + 5(0) = 5СН3СОН + 5С02 + 5Н2О;

б) СН3СОН + 2[Аg(NН3)2]ОН + ЗН2О = СН3СООН + 2Аg + + 4NH4OH

2. ***Реакция Уффельмана (проба с фенолом).*** В пробирку к 10 мл 5%-ного р-ра фенола добавить несколько капель 5%-ного р-ра хлорного железа (FeCl3). Наблюдаем образование интенсивно окрашенного синего раствора. Прибавление одной-двух капель сыворотки кислого молока, содержащей молочную кислоту, делает раствор желтоватым.

3. ***Реакция со спиртовым раствором тиофена.*** Кислое молоко фильтруют через складчатый фильтр. К 2 мл фильтрата добавляют 5 мл концентрированной серной кислоты и 10 капель насыщенного р-ра медного купороса. Нагревают при потряхивании на водяной бане при 100°С в течение 5 мин. При охлаждении добавляют 3-5 капель 0,2%-ного спиртового р-ра тиофена. В присутствии молочной кислоты возникает вишнево-красное окрашивание.

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

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

**Брожение целлюлозы**. Брожение целлюлозы заключается в разрушении клетчатки в анаэробных условиях под влиянием различных анаэробных спорообразующих бактерий с образованием масляной и уксусной кислот, углекислого газа, водорода или метана. Спорообразующие анаэробные палочки, имеют оптимальную температуру развития около 30°С, они широко распространены в природе. Брожение клетчатки вызывают также некоторые термофильные бактерии. Они образуют споры и являются факультативными анаэробами, хорошо развивающимися при температуре 60-65°С.

Упрощенная схема анаэробного разложения целлюлозы представлена следующими реакциями:

1. Гидролиз целлюлозы и образование дисахаридов (целлобиозы) и моносахаридов (глюкозы):

(С6Н10О5)n + ½nН2О→½nС12Н22О11

½n С12Н22О11 + ½nН2О→nС6Н12О6

1. Сбраживание моносахаридов (глюкозы):

С6Н12О6→СН3СН2СН2СООН + СН3СООН + СО2 + Н2

Аэробное разрушение клетчатки происходит под действием различных микроорганизмов - грибов и аэробных бактерий. К их числу относятся многие грибы из родов пенициллиум, аспергиллус, ботритис, кладоспориум и других, а также актиномицеты и миксобактерии. Аэробное разрушение клетчатки имеет огромное значение в процессах разложения различных растительных остатков и их минерализации в природе. В результате разложения клетчатки, а также других органических соединений, в почве под влиянием грибов и бактерий образуется гумус - темноокрашенное вещество, характеризующее черноземную почву.

Проведение опыта по маслянокислому брожению целлюлозы: в круглую плоскодонную колбу вносят около 1-2 г фильтровальной бумаги (или вату), нарезанной мелкими полосками, и заливают доверху средой следующего состава (в %): KNH4HPO4 – 0,2; KH2PO4 – 0,1; CaCl2 – 0,03; пептон – 0,1; MgSO4 – 0,05; CaCO3 – 0,5. Среду заражают небольшим количеством почвы и закрывают колбу корковой пробкой с отверстием для выхода газов. Через несколько дней при температуре 30-35ºС начинается брожение клетчатки, которое длится 2-3 недели. Фильтровальная бумага по мере сбраживания слегка ослизняется, желтеет и постепенно разрушается бактериями.

Для получения накопительной культуры термофильных целлюлозоразлагающих бактерий пользуются питательной средой следующего состава (в г на 1 л водопроводной воды): NaNH4HPO4 – 1,0; KH2PO4 – 0,5; K2HPO4  - 0,5; MgSO4 – 0,4; NaCl – 0,1; MnSO4 – следы; FeSO4 – следы; пептон – 0,5; CaCO3 – 0,5.

На дно длинных пробирок помещают полоски фильтровальной бумаги слоем 1,5-2 см, заливают средой на 2/3 и заражают небольшим количеством конского навоза. Пробирки инкубируют при температуре 60ºС. Через несколько дней начинают интенсивно выделяться газы. Бумага приобретает желтую окраску и постепенно превращаются в аморфную массу.

Микроскопирование целлюлозоразлагающих бактерий. Извлекают пинцетом со дна колбы кусочек разлагающейся бумаги и размазывают на предметном стекле (без добавления воды). Мазок сушат обычным способом, фиксируют на пламени горелки и окрашивают фуксином.

В колбах, инкубируемых при температуре 30ºС, развиваются длинные тонкие палочки с круглой спорой на конце – Bac. Omelianskii.

В накопительной культуре термофильных целлюлозоразлагающих бактерий выявляются длинные крупные палочки с грушевидной спорой на конце – Bac. cellulosae dissolvens.

**Задание 1:** законспектировать химизм молочнокислого брожения, характеристику основных представителей брожения.

**Задание 2:** законспектировать качественные реакции на молочную кислоту, записать уравнения реакций.

**Задание 3:** законспектировать химизм анаэробного брожения целлюлозы.

***Контрольные вопросы:***

1. Какие микроорганизмы вызывают молочнокислое брожение?
2. Чем отличается гомоферментативный процесс от гетероферментативного?
3. Каким способом можно обнаружить молочную кислоту?
4. Под влиянием каких микроорганизмов происходит анаэробное брожение целлюлозы? Их свойства.
5. Под влиянием каких микроорганизмов происходит аэробное брожение целлюлозы?