521 группа дисц. Микробиология

Задание для лекции: найти материал по теме, законспектировать

Тема лекции: Трансформация микроорганизмами различных соединений

Вопросы:

1. Круговорот веществ в природе и участие в нем микроорганизмов;
2. Трансформация микроорганизмами соединений углерода;
3. Трансформация микроорганизмами соединений азота.

Задание по лабораторной работе: сделать конспект по указанной теме

**Тема: Изучение возбудителей спиртового брожения. Определение интенсивности спиртового брожения. Знакомство с возбудителями маслянокислого брожения и продуктами их жизнедеятельности**

**Цель занятия:** познакомиться с химизмом и качественными реакциями спиртового и маслянокислого брожения, с морфологией возбудителей этих видов брожения. Формируемые компетенции – знать микробиологические процессы трансформации различных соединений микроорганизмами, влияние продуктов метаболизма на качество и безопасность сырья, и продукты переработки (ПК-5, ПК-12).

**Материалы и оборудование**: дрожжи пекарские, 10%-ный р-р сахарозы, 10%-ный р-р едкого натра, йод кристаллический, Ва(ОН)2 или Са(ОН)2, спиртовки, колбы на 200–250 мл, пробки с газоотводной трубкой, штативы, концентрированная серная кислота, K2Cr2O7 кристаллический; 5%-ный р-р FeCl3, 95%-ный этиловый спирт, фуксин, р-р Люголя, предметные стекла, культура картофельной палочки.

**Предварительно**:

1. За час до занятия настоять в колбе дрожжи, 50 мл 10%-ного р-ра сахарозы и около 1 г дрожжей.
2. За неделю-полторы до занятия закладывают опыт. Для этого неочищенный промытый картофель нарезают ломтиками, которыми заполняют пробирку на 1/3 объема, добавляют щепотку мела и заполняют водой почти доверху. Пробирки помещают в водяную баню при температуре 80 °C на 10–15 мин., затем закрывают пробками и ставят в термостат с температурой 35°C. В этих условиях уже через 2-3 дня в жидкости обнаруживают бактерии маслянокислого брожения. Культура маслянокислых бактерий является при этом элективной. Для их преимущественного развития созданы анаэробные условия, бесспоровые формы других видов убиты предварительным нагреванием, добавка мела нейтрализует образующиеся кислоты и способствует развитию бактерий.

Другой способ получения культуры маслянокислых бактерий: 5 г ячменя (солода), 2 г мела, 5 г сахара – все заливают водой (100 мл) и кипятят в течение 5 мин. Горячую жидкость переливают в высокую пробирку, на дно которой бросают кусочек почвы или семени гороха. Пробирку держат в термостате при 30–35°C семь дней. На следующем занятии производят микроскопирование жидкости, в которой обнаруживают главным образом Clostridium pasteurianum, подвижные палочки с закругленными концами, одиночные и парные. В старых культурах у одного из концов клетки обнаруживают спору.

Химизм и представители спиртового брожения. Возбудители спиртового брожения широко распространены в природе – дикие дрожжи. К ним относятся дрожжевые грибы рода Мусoderma и Torula, плесневые грибы рода Мucor и некоторые бактерии. Культурные дрожжи выведены путем длительной селекции из диких дрожжей. К ним относятся: Saccharomyсеs cerevisiae и S. vini, S. ellipsoides. Эти дрожжи отличаются от диких тем, что способны выдерживать большие концентрации спирта в среде, образуют меньше побочных продуктов брожения, вследствие чего интенсивнее идут процессы брожения. Спиртовое брожение идет в анаэробных условиях, тогда как размножение дрожжей происходит при широком доступе кислорода при оптимальных температурах 30–35°С. Образующийся спирт вреден для дрожжей, и при накоплении его брожение прекращается. Однако при высокой концентрации сахара в растворе дрожжи могут оставаться живыми в среде, содержащей до 15% спирта. Суммарно процесс брожения выражается следующим уравнением: С6Н12О6 = 2С2Н5ОН +2CO2 + 130 кДж (31 ккал)

**Качественные реакции на брожение:**

1. Реакция с кристаллическим йодом. К 10 мл бродящей жидкости в пробирку добавить 1–2 мл концентрированного раствора 10%-ной щелочи и подогреть на спиртовке, не доводя до кипения (60 °С). Затем добавляют несколько кристалликов йода и снова нагревают. В присутствии спирта выпадает желтый осадок йодоформа, имеющий характерный запах:

С2Н5ОН+4J2+6NaOH = CHJ3+HCOONa + 5NaJ + 5H2O;

С2Н5ОН+4J2 = CJ3CHOHJ + 4HJ;

CJ3CHOHJ = CJ3COH + HJ;

CJ3COH + NaOH = HCOONa + CHJ3.

2. Реакция с двухромовокислым калием. В пробирку с 2–3 мл исследуемой жидкости добавляем кристаллик двухромовокислого калия и несколько капель концентрированной серной кислоты, смесь нагреваем на спиртовке. Цвет меняется до зеленого вследствие восстановления хрома:

K2Cr2O7 + 4H2SO4 + 3C2H5OH = K2Cr2(SO4)4 + 3CH3COH + 7H2O.

Выделяющийся уксусный альдегид ощутим по запаху.

3. Обнаружение углекислого газа. В колбу емкостью 250 мл наливают 50 мл 10%-ного р-ра сахарозы и около 1 г пекарских дрожжей, предварительно

разведенных в 10 мл 10 % сахарозы. Колбу закрывают пробкой с изогнутой трубкой, нижний конец которой погружают в пробирку с баритом или с известковой водой. Колбу с бродящей жидкостью помещают в водяную баню на плитке, где поддерживается температура 35–40°С с периодическим подогреванием. Через несколько минут после установки в пробирку с баритом начинают поступать пузырьки газа, со временем ток их становится равномерным. Баритовая вода начинает интенсивно мутнеть. Следят за выделением пузырьков и помутнением жидкости.

Маслянокислое брожение – сложный процесс превращения углеводов в масляную кислоту и другие продукты, совершаемый группой анаэробных спороносных бактерий. Химизм этого процесса сложен и до настоящего времени недостаточно выяснен. Схематично процесс можно выразить следующим образом:

С6Н12О6 → СН3СН2СН2СООН + 2СО2 + 2Н2 + 495 кДж (118 ккал)

Распаду подвергаются не только сахара, но и более сложные углеводы под действием сложных различных активных ферментов маслянокислых бактерий. Образующаяся масляная кислота в невысоких концентрациях является стимулятором роста растений. Маслянокислое брожение вызывается облигатными анаэробными бактериями из рода Clostridium.

Clostridium pasteurianum – свободноживущий анаэробный азотфиксатор, обитающий в почве. В клетках этих бактерий содержится гранулеза, которая окрашивается р-ром Люголя в синий цвет. Ее можно видеть при микроскопировании живых бактерий в капле суспензии культуральной жидкости с добавкой реактива методом раздавленной капли с масляной иммерсией. Каплю суспензии берут со дна пробирки трубочкой. С культуральной жидкостью проводят качественные реакции на масляную кислоту.

**Качественные реакции:**

1. К 3–4 мл жидкости в пробирку добавляют 0,5 мл 95%-ного спирта и одну-две капли концентрированной серной кислоты. Содержимое пробирки хорошо взбалтывают и нагревают. В присутствии масляной кислоты появляется запах масляно-этилового эфира, напоминающий запах ананаса:

СН3СН2СН2СООН + СН3СН2ОН = СН3СН2CH2СООСH2СН3 + Н2О.

2. К 5 мл исследуемой жидкости добавить 2 мл 5%-ного FeCl3. При нагревании образуется маслянокислое железо коричневого цвета:

2СН3(СН2)2СООН +FeCl3= [CH3(CH2)2COO]3Fe+3HCl.

**Задание 1:** законспектировать основные положения по теоретическому материалу по видам брожения;

**Задание 2:** провести качественные реакции по определению продуктов брожения с предварительно приготовленными культурами спиртового и маслянокислого брожения.

***Контрольные вопросы:***

1. Какие условия необходимы для протекания каждого из видов брожения: спиртового, маслянокислого? Назовите ферменты процессов брожения.

2. Назовите культурные расы дрожжей, вызывающих спиртовое брожение.

3. Как можно получить культуру маслянокислых бактерий?

4. Каковы особенности бактерий рода Clostridium?

5. Какие качественные реакции проводятся для обнаружения масляной кислоты в культуральной среде?