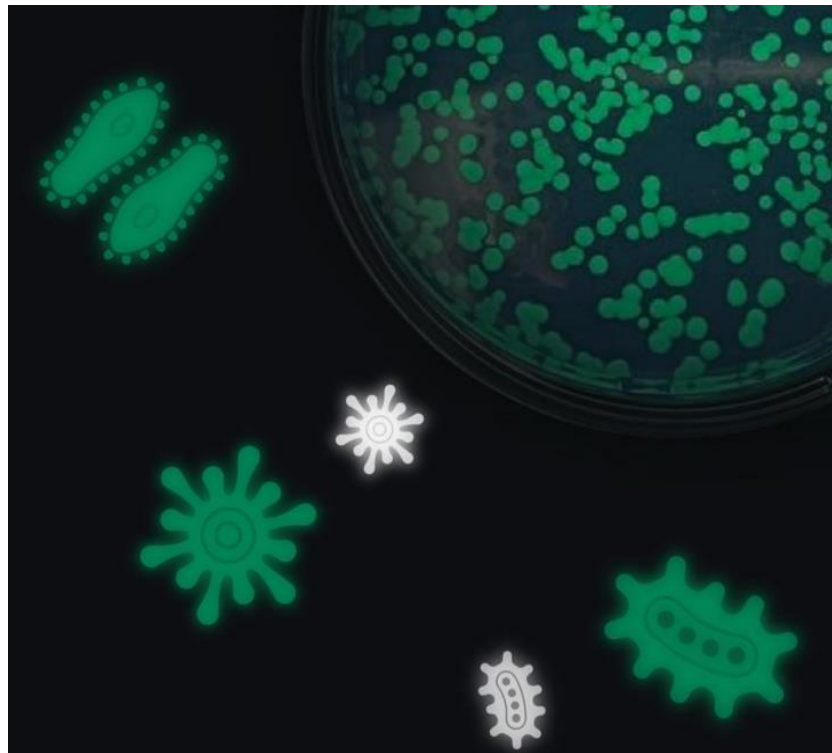


ІІТМО

**М.С. Ашихмина, М.О. Володарский,
О.О. Осьмак, В.С. Филозоф, М.В. Санников,
А.А. Старикова, С.А. Уласевич, Е.В. Скорб**

**МОБИЛЬНАЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ
ЛАБОРАТОРИЯ "КУБ"**



**Санкт-Петербург
2024**

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

УНИВЕРСИТЕТ ИТМО

**М.С. Ашихмина, М.О. Володарский,
О.О. Осьмак, В.С. Филозоф, М.В. Санников,
А.А. Старикова, С.А. Уласевич, Е.В. Скорб**
**МОБИЛЬНАЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ
ЛАБОРАТОРИЯ "КУБ"**

УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКОЕ ПОСОБИЕ

РЕКОМЕНДОВАНО К ИСПОЛЬЗОВАНИЮ В УНИВЕРСИТЕТЕ
ИТМО

по направлению подготовки 18.03.01, 19.03.01
в качестве Учебно-методического пособия для реализации основных
профессиональных образовательных программ высшего образования
бакалавриата

ИТМО

Санкт-Петербург
2024

М.С. Ашихмина, М.О. Володарский, О.О. Осьмак, В.С. Филозоф, М.В. Санников, А.А. Старикова, С.А. Уласевич, Е.В. Скорб, Мобильная микробиологическая лаборатория "КУБ"— СПб: Университет ИТМО, 2024. – 118 с.

Рецензент(ы):

Яковченко Наталья Владимировна, кандидат технических наук, доцент (квалификационная категория "ординарный доцент") факультета биотехнологий, Университета ИТМО.

Книга является подробным руководством по работе в микробиологической лаборатории, охватывающим теоретические основы и практические аспекты, включая инструкции по выполнению экспериментов. Особое внимание уделено обучению работе с оборудованием, реактивами и методикам проведения лабораторных процедур для преподавателей, школьников и студентов. Издание помогает углубить знания в микробиологии и развить навыки для научно-исследовательской деятельности.

Нарушение правил эксплуатации и техники безопасности является ответственностью организации-пользователя.

The logo for ITMO University, consisting of the letters 'ИТМО' in a bold, black, sans-serif font. The letter 'И' has a small dot above it.

ИТМО (Санкт-Петербург) — национальный исследовательский университет, научно-образовательная корпорация. Альма-матер победителей международных соревнований по программированию. Приоритетные направления: ИТ и искусственный интеллект, фотоника, робототехника, квантовые коммуникации, трансляционная медицина, Life Sciences, Art&Science, Science Communication.

Лидер федеральной программы «Приоритет-2030», в рамках которой реализуется программа «Университет открытого кода». С 2022 ИТМО работает в рамках новой модели развития — научно-образовательной корпорации. В ее основе академическая свобода, поддержка начинаний студентов и сотрудников, распределенная система управления, приверженность открытому коду, бизнес-подходы к организации работы. Образование в университете основано на выборе индивидуальной траектории для каждого студента.

ИТМО пять лет подряд — в сотне лучших в области Automation & Control (кибернетика) Шанхайского рейтинга. По версии SuperJob занимает первое место в Петербурге и второе в России по уровню зарплат выпускников в сфере ИТ. Университет в топе международных рейтингов среди российских вузов. Входит в топ-5 российских университетов по качеству приема на бюджетные места. Рекордсмен по поступлению олимпиадников в Петербурге. С 2019 года ИТМО самостоятельно присуждает ученые степени кандидата и доктора наук.

© Университет ИТМО, 2024

© М.С. Ашихмина, М.О. Володарский, О.О. Осьмак, В.С. Филозоф, М.В. Санников, А.А. Старикова, С.А. Уласевич, Е.В. Скорб, 2024

Содержание

1.1 Общие правила техники безопасности	6
1.2 Подготовка перед началом работы	7
1.3 Основные правила работы в ламинарном боксе.....	8
1.4 Утилизация и обработка отходов.....	9
1.5 Поведение в случае аварийных ситуаций	10
ПОСУДА И РЕАКТИВЫ	12
2.1 Стеклопосуда в микробиологической лаборатории	12
2.2 Пластиковая посуда в микробиологической лаборатории	13
2.3 Реактивы в микробиологической лаборатории	15
3.1 История развития микробиологии	17
3.2 Структура клетки	18
3.3 Основы систематики микроорганизмов	21
3.4 Морфология и физиология прокариот.....	24
3.5 Особенности систематики прокариот.....	28
3.6 Филогенетический обзор домена Bacteria	29
3.7 Молочнокислые бактерии	30
3.8 Биотехнологическая схема производства продуктов микробного синтеза	31
3.9 Основы квантово-химических расчетов.....	35
3.10 Температурные режимы при работе с бактериями	52
3.11 Оборудование мобильной микробиологической лаборатории «КУБ»	55
4.1 Обработка данных в OriginPro.....	72
4.2 Основные понятия научно-исследовательской работы	75
4.3 Оформление работы	77
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 1. Методы исследования микроорганизмов. Морфология микроорганизмов	79
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 2. Изучение морфологии бактерий. Дифференциальные методы окраски бактерий	82
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 3. Молочнокислородное брожение бактерий	85
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 4. Культивирование микроорганизмов на питательных средах	87
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 5. Взаимоотношения между микроорганизмами ...	89
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 6. Исследование ферментативной активности молочнокислых бактерий.....	91
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 7. Формирование периодических структур лизеганга гидроксиапатита и изучение синтеза молочной кислоты.....	99
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 8. Применение DFT расчетов для исследования и прогнозирования эффективности криопротекторов	106

Введение

На сегодняшний день микробиология и биотехнология находят широкое применение в различных областях науки и промышленности, включая медицину, сельское хозяйство, экологию и производство пищевых продуктов. Современные достижения в этих областях позволяют разрабатывать новые подходы к изучению микроорганизмов, созданию биопрепаратов, улучшению экологической ситуации и решению глобальных задач, таких как обеспечение продовольственной безопасности и снижение уровня загрязнения окружающей среды.

Обучение студентов в области химической технологии и биотехнологии основывается на сочетании теоретических знаний с практическими навыками, что включает изучение экспериментальных методов и применение расчетных технологий.

Данное методическое пособие предназначено для студентов бакалавриата, обучающихся по дисциплинам: "Биохимия", "Молекулярно-генетические подходы в биотехнологии" и "Биотехнология микроорганизмов и микробиологический синтез". Пособие направлено на приобретение знаний и практических навыков, необходимых для работы с микроорганизмами и их биотехнологическим применением. Студенты приобретут знания о физиологических и биохимических процессах, происходящих в клетках микроорганизмов, и о методах их изучения, освоят молекулярно-генетические подходы, включая технологию рекомбинантных ДНК, принципы биосинтеза микробных метаболитов и особенности ферментационных процессов. Также студенты научатся разрабатывать планы экспериментов, анализировать данные и интерпретировать результаты исследований. В процессе выполнения лабораторных работ студенты приобретут навыки работы с оборудованием, реактивами и программным обеспечением для обработки экспериментальных данных.

Работа с методическим пособием позволит развить такие компетенции, как способность проектировать и осуществлять биотехнологические процессы, выбирать оптимальные средства технологического оснащения и сырье, а также внедрять и модернизировать биотехнологические процессы. При выполнении лабораторных работ студенты научатся анализировать и объяснять биохимические и физиологические процессы, разрабатывать новые методы для их исследования и применять полученные знания для решения прикладных задач в биотехнологии.

Для успешного освоения материала пособия студенты должны обладать базовыми знаниями по биологии, химии и биохимии, понимать принципы работы с лабораторным оборудованием и реактивами. Эти входные знания являются основными для понимания методов и технологий, представленных в методическом пособии.

Методическое пособие рассчитано на использование в учебном процессе как в рамках контактных занятий, так и для самостоятельной работы. Студенты изучают теоретический материал, представленный в пособии, а затем применяют его на практике в ходе выполнения лабораторных работ. Практическая часть включает пошаговые инструкции для подготовки и проведения экспериментов, что позволяет сформировать навыки работы в микробиологической лаборатории и современными биотехнологическими инструментами. Такой подход обеспечивает развитие профессиональных компетенций и навыков самостоятельного анализа, необходимых для работы в сфере биотехнологии.

ОСНОВЫ ТЕХНИКИ БЕЗОПАСНОСТИ

Работа в мобильной микробиологической лаборатории (далее – ММЛ) «КУБ», особенно в стерильном боксе, требует строгого соблюдения правил техники безопасности для предотвращения загрязнения образцов, защиты персонала и окружающей среды. Важно не только предотвратить попадание посторонних микроорганизмов в рабочую среду, но и избежать заражения патогенными микроорганизмами. Рассмотрим основные требования и рекомендации.

Систематическое или серьезное нарушение протоколов безопасности представляет угрозу как для самого нарушителя, так и для окружающих. В таких случаях нарушитель должен быть отстранен от работы в лаборатории до завершения практикума, пройти повторную оценку знаний по технике безопасности.

1.1 Общие правила техники безопасности

Работа в ММЛ сопряжена с определенными рисками, связанными с химическими веществами, биологическими агентами, острыми предметами и электрическим оборудованием. Для защиты учащихся, персонала и предотвращения несчастных случаев необходимо строго соблюдать общие правила техники безопасности.

К выполнению лабораторных и научно-исследовательских работ допускаются учащиеся, которые заранее ознакомились с описанием предстоящих работ, освоили теоретический материал по изучаемой теме и оформили подробный план работ в лабораторном журнале.

Работа в ММЛ должна быть предварительно спланирована учащимся и одобрена преподавателем. Любое действие, выполняемое впервые, обязательно согласуется с преподавателем или лаборантом. К сложным операциям приступают только после одобрения преподавателем качества сборки и проверки правильности подготовки.

В ММЛ не разрешается входить без преподавателя или лаборанта. Вход в лабораторию строго без верхней одежды. При любой работе в лаборатории должны находиться не менее двух человек. Категорически запрещается работать учащимся в отсутствие преподавателя или лаборанта. Нельзя проводить в ММЛ какие-либо работы, не связанные непосредственно с выполнением учебных или научно-исследовательских заданий.

Безопасность при работе с оборудованием

Электрическое оборудование должно использоваться в соответствии с инструкциями. Все шнуры и приборы должны регулярно проверяться на наличие

повреждений. Важно избегать перегрузки розеток и всегда выключать оборудование после завершения работы.

Работа с острыми и колющими предметами

Все острые предметы (скальпели, ножи, иглы) должны использоваться с особой осторожностью. Отработанные иглы и острые инструменты следует утилизировать в специальные контейнеры для биологически опасных отходов, чтобы избежать случайных порезов и инфекций.

Личная защита и гигиена

Использование средств индивидуальной защиты (СИЗ):

Работающий в ММЛ должен всегда носить защитные средства индивидуальной защиты, включающие стерильные перчатки, халаты, маски и защитные очки. Если работа связана с потенциально опасными аэрозолями, следует использовать респираторы. Лабораторные халаты и другие СИЗ должны храниться отдельно от уличной одежды, а после работы — обязательно обрабатываться.

В некоторых случаях, при работе с особо опасными патогенами (например, вирусами высокой патогенности), рекомендуется использование герметичных комбинезонов и респираторов класса защиты FFP3.

При работе с химическими реактивами, биологическими материалами или горячим оборудованием следует всегда использовать соответствующие перчатки (химически стойкие, термостойкие и т. д.). После работы перчатки необходимо снимать по правилам, избегая контакта загрязненной внешней поверхности с кожей.

Перчатки должны быть заменены при обнаружении повреждений или при переходе к работе с другим биологическим материалом. Важно помнить, что загрязненные перчатки могут служить переносчиками сторонних агентов, поэтому их утилизация должна осуществляться в соответствии с установленными правилами.

Строго запрещено есть, пить или наносить косметику в лаборатории. Руки следует мыть до и после работы, а также после контакта с любыми потенциально опасными веществами.

1.2 Подготовка перед началом работы

Дезинфекция поверхностей и рук

Перед началом работы в стерильном боксе необходимо тщательно продезинфицировать рабочие поверхности и руки. Для этого используются дезинфицирующие растворы, например, 70%-ный этанол или специальные антисептики на основе хлоргексидина или спиртов. Согласно научным данным,

70%-ный спирт обладает оптимальным балансом проникающей способности и антимикробного действия, разрушая липидные мембраны микроорганизмов.

Дезинфекция рук проводится как с помощью антисептических растворов, так и при необходимости с использованием ультрафиолетовых ламп (особенно в случае работы с особо опасными микроорганизмами).

Стерилизация расходных материалов

Все инструменты и материалы, используемые в работе, должны быть стерильны. Это достигается автоклавированием (при температуре 121°C и давлении 1 атмосфера в течение 15–20 минут) или обработкой сухим жаром (180°C в течение 1,5–2 часов). Использование одноразовых стерильных перчаток и пипеток также является обязательным.

Биологическая безопасность

Работа с микроорганизмами требует соблюдения мер биологической безопасности. В зависимости от уровня риска (от 1 до 4) назначаются различные уровни защиты.

Например, микроорганизмы 1 группы уровня риска не представляют опасности для здоровых людей и животных, и риск их распространения в окружающую среду минимален. Эти микроорганизмы либо не способны вызывать заболевания у человека, либо вызывают крайне редко встречающиеся и неопасные для жизни инфекции. Микроорганизмы 2 группы уровня риска могут вызывать инфекции у человека, однако, эти инфекции обычно поддаются лечению, и риск тяжелого течения заболевания невысок. Заражение такими микроорганизмами может произойти при случайном контакте или через слизистые оболочки, раны и при вдыхании аэрозолей. Микроорганизмы 3 и 4 уровней имеют высокий риск заражения человека. Для работы с этими уровнями необходимы стерильные герметичные боксы с фильтрами HEPA, которые задерживают до 99,97% частиц размером до 0,3 мкм, что предотвращает утечку опасных микроорганизмов в окружающую среду.

1.3 Основные правила работы в ламинарном боксе

Поддержание стерильности

Во время работы в микробиологическом боксе создается ламинарный поток воздуха, который направляется сверху вниз и обеспечивает удаление возможных загрязнений из рабочей зоны. Ламинарные потоки воздуха под давлением создают стерильную рабочую среду, что позволяет работать с микроорганизмами без риска их загрязнения посторонними агентами. Для обеспечения максимальной эффективности потоков воздуха не следует загромождать внутреннее пространство бокса или ставить предметы на пути воздушного потока.

Правила перемещения рук и материалов

Руки должны перемещаться в боксе плавно, чтобы не нарушать ламинарные потоки. Все материалы и инструменты вводятся в бокс только после их обработки или стерилизации. При этом работа должна проходить в зоне максимальной стерильности, которая находится в центре бокса, вдали от стенок и краев.

1.4 Утилизация и обработка отходов

Все отходы, возникающие в процессе работы в боксе, включая использованные расходные материалы, биологические образцы и отходы с биологическими жидкостями, должны быть обеззаражены перед утилизацией. Обеззараживание обычно проводится с помощью автоклава или химических дезинфектантов, таких как хлорсодержащие соединения или растворы на основе активного кислорода.

После завершения работы боксы и поверхности снова дезинфицируются, а персонал проходит повторную обработку рук и снимает СИЗ по специальным правилам, чтобы избежать распространения микроорганизмов. Специальные правила включают:

- Убедитесь, что все работы завершены, и вы находитесь в безопасной зоне, где нет риска перекрестного загрязнения.
- Начните со снятия перчаток. Возьмите одну перчатку за запястье и аккуратно снимите её, выворачивая наизнанку, чтобы не касаться внешней поверхности.
- Держите снятую перчатку в другой руке. С помощью пальцев оставшейся перчатки захватите внутреннюю поверхность первой перчатки и снова выверните её наизнанку при снятии. Убедитесь, что обе перчатки помещены в специальный контейнер для биологических отходов.
- Поместите использованную одежду в специальный мешок для медицинских отходов.
- После снятия всех СИЗ тщательно вымойте руки с мылом и проточной водой в течение не менее 20 секунд.
- Используйте антисептическое средство на основе спирта для дополнительной дезинфекции.
- После снятия СИЗ и обработки рук обработайте рабочую поверхность дезинфицирующим средством, чтобы уничтожить возможные оставшиеся микроорганизмы.

1.5 Поведение в случае аварийных ситуаций

Разлив химических веществ

При разливе опасных химикатов необходимо немедленно прекратить работу, оценить характер утечки и использовать соответствующие меры: сорбенты для абсорбции, защитные перчатки и очки. В случае утечки токсичных газов необходимо эвакуировать помещение.

Ожоги и травмы

В случае получения химического ожога необходимо немедленно промыть пораженный участок кожи большим количеством воды в течение не менее 15 минут, а затем обратиться за медицинской помощью. При механических травмах – остановить кровотечение и немедленно обратиться к врачу.

Пожарная безопасность

В лаборатории должны быть установлены огнетушители, системы пожарной сигнализации и аварийные выходы. Персонал должен быть проинструктирован о действиях в случае пожара и уметь пользоваться огнетушителями.

Аварийные ситуации

Аварийные ситуации в микробиологических лабораториях могут включать разлив биологического материала, повреждение оборудования или утечку микроорганизмов. При возникновении таких ситуаций необходимо немедленно прекратить работу, заблокировать зону загрязнения и сообщить ответственным лицам.

Работа с разливами биологических жидкостей проводится с использованием дезинфицирующих растворов и средств индивидуальной защиты. Если разлив произошел внутри бокса, его внутренние поверхности обрабатываются дезинфицирующим раствором с экспозицией не менее 30 минут.

Работа в микробиологической лаборатории требует соблюдения строгих правил техники безопасности. Эти меры направлены на защиту как исследователей, так и образцов, с которыми они работают. Научные исследования подтверждают эффективность таких мер, как дезинфекция, использование стерильных материалов и контроль за воздушными потоками, что делает их обязательными при работе с биологическими объектами.

Контрольные вопросы

1. Какие основные цели соблюдения техники безопасности в микробиологической лаборатории?

2. Какие риски существуют при работе в микробиологической лаборатории?
3. Что необходимо сделать перед началом лабораторных работ в ММЛ «КУБ»?
4. Какие правила следует соблюдать при работе с острыми и колющими предметами?
5. Почему важно использовать средства индивидуальной защиты (СИЗ) и какие основные виды СИЗ применяются в ММЛ?
6. Как проводится дезинфекция рук и поверхностей перед началом работы?
7. В чем заключается стерилизация расходных материалов и оборудования?
8. Какие уровни биологической безопасности существуют и чем они отличаются?
9. Как поддерживается стерильность в ламинарном боксе?
10. Какие действия нужно предпринять при аварийных ситуациях, таких как разлив биологического материала или утечка микроорганизмов?

ПОСУДА И РЕАКТИВЫ

Работа в ММЛ требует использования специализированной посуды и реактивов, которые обеспечивают точность и безопасность исследований. Микробиология – это наука о микроорганизмах, и при работе с ними важны строгие меры стерильности, чтобы исключить контаминацию и достичь достоверных результатов. В лаборатории используются как стеклянная, так и пластиковая посуда, каждая из которых имеет свои особенности применения и стерилизации.

2.1 Стеклянная посуда в микробиологической лаборатории

Стеклянная лабораторная посуда традиционно широко применяется в микробиологии благодаря своей термостойкости и возможности многократного использования. Стекло не вступает в реакцию с большинством химических веществ и сохраняет свою форму и свойства после многократной стерилизации.

Основные виды стеклянной посуды

1. Стеклянные чашки Петри используются для культивирования микроорганизмов на твердых питательных средах. Перед использованием чашки стерилизуются, что исключает возможность контаминации.

2. Колбы Эрленмейера используются для приготовления питательных сред и роста культур микроорганизмов в жидкой среде. Благодаря своей конической форме они удобны для перемешивания и предотвращают разбрызгивание жидкости.

3. Стеклянные пробирки применяются для культивирования микроорганизмов в жидкой и твердой среде. Они могут закрываться ватными или резиновыми пробками, а также помещаться в автоклав для стерилизации.

4. Стеклянные пипетки используются для точного измерения и переноса жидкостей. Для предотвращения контаминации их также стерилизуют в автоклаве или с помощью сухого жара.



Рисунок 2.1 – Основные виды стеклянной посуды: 1 – чашки Петри; 2 – колба Эрленмейера; 3 – пробирки; 4 – пипетки

Стерилизация стеклянной посуды

Стеклянная посуда может быть стерилизована несколькими способами:

- Автоклавирование. Это самый распространенный метод стерилизации стеклянной посуды. Автоклав работает при температуре 121°C и давлении 1 атм в течение 15–20 минут. Этот метод позволяет эффективно уничтожить микроорганизмы, споры и другие формы жизни.
- Стерилизация сухим жаром. В печах для сухой стерилизации стеклянную посуду обрабатывают при температуре около 120–180°C в течение 1,5-2 ч. Этот метод предпочтителен, если посуду нельзя подвергать влажной стерилизации (например, при необходимости избегать контакта с водой).

2.2 Пластиковая посуда в микробиологической лаборатории

Пластиковая посуда всё чаще используется в микробиологических исследованиях благодаря своей одноразовости, что минимизирует риск перекрестной контаминации. Современные пластиковые материалы также обладают высокой прозрачностью и химической стойкостью.

Основные виды пластиковой посуды

1. Пластиковые чашки Петри широко применяются для выращивания культур микроорганизмов. Они обычно изготавливаются из полистирола и поставляются уже стерилизованными. Эти чашки не требуют дальнейшей обработки и после использования утилизируются. Чашки петри бывают одно-, 2-х-, 3-х- и 4-х-секционные, а также квадратные и прямоугольные.



Рисунок 2.2 – Основные виды пластиковой посуды, используемой в микробиологических исследованиях: 1 – чашки Петри; 2 – пробирки; 3 – пипетки; 4 – культуральные планшеты; 5 – фильтрующая система с фильтром 0,22 мкм

2. Одноразовые пробирки (часто из полипропилена или полиэтилена) применяются для выращивания микроорганизмов и хранения образцов. Они поставляются стерильными и обычно используются для одноразовых целей.

3. Пластиковые одноразовые пипетки (градуированные и пастеровские) применяются для точного дозирования жидкостей. Они стерильны и не требуют дополнительной обработки перед использованием.

4. Культуральные планшеты представляют собой многолуночные пластины, которые используются для культивирования клеток и микроорганизмов. Они бывают различных форматов (например, 6-, 12-, 24-, 96-луночные) и изготовлены из полистирола или других биосовместимых материалов.

5. Фильтрующая система 0,22 мкм представляют собой важный инструмент в лабораторной практике, особенно в микробиологии и клеточной культуре. Эти системы используются для стерилизации жидкостей, удаления микроорганизмов и частиц из растворов, что необходимо для обеспечения чистоты и безопасности в экспериментах.

Стерильность пластиковой посуды

Пластиковая посуда обычно не выдерживает автоклавирования или стерилизации сухим жаром, поэтому она выпускается уже стерилизованной и готовой к применению. Методы стерилизации пластиковой посуды перед упаковкой включают: гамма-облучение, этиленоксидную стерилизацию, УФ-облучение.

2.3 Реактивы в микробиологической лаборатории

В микробиологической лаборатории реактивы играют ключевую роль в проведении исследований и экспериментов. Они могут быть неорганическими, биологическими или органическими веществами, используемыми для создания питательных сред, окрашивания микроорганизмов и проведения различных тестов.

Все реактивы должны храниться в стеклянных или пластиковых банках с плотно закрытыми крышками. Каждая банка с реактивом должна иметь название вещества, информацию о дате выпуска и условиях хранения, а также класс чистоты вещества. По степени чистоты, то есть содержанию основного вещества и допустимых примесей, реактивы имеют следующую классификацию, показанную на рис. 2.3 (ГОСТ 13867).

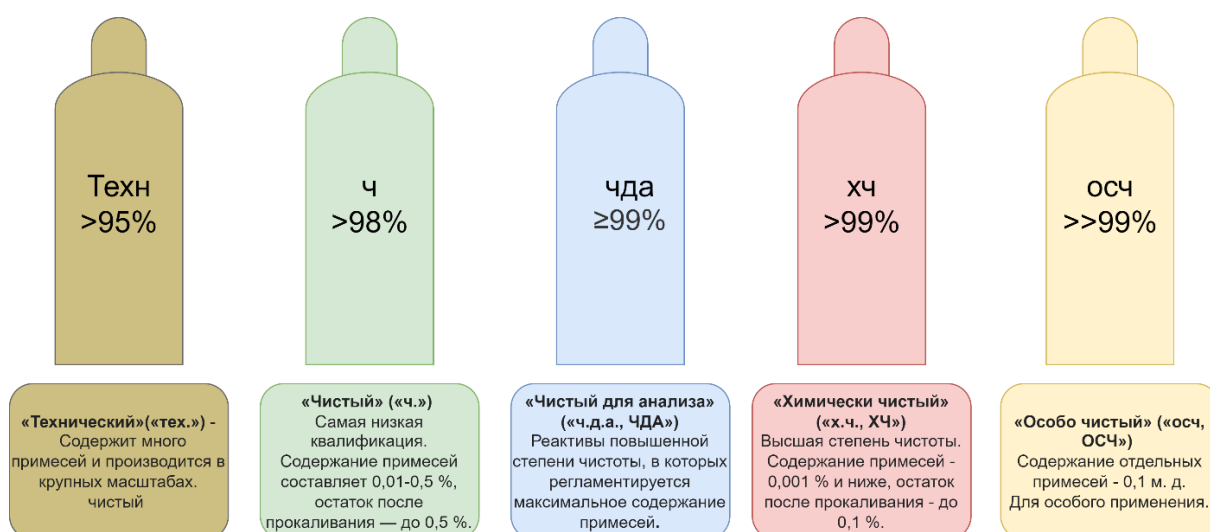


Рисунок 2.3 – Классификация веществ по степени чистоты

Также реактивы могут классифицировать по назначению – «Для микробиологии» и «Для Биохимических исследований». Реактивы для микробиологических и биохимических исследований часто проходят более строгий контроль качества, включая тестирование на отсутствие ингибирующих или токсичных эффектов на клетки или микроорганизмы.

Независимо от чистоты и назначения, твердые (сухие) реактивы следует отбирать из банок, пересыпая приблизительную навеску в чистую сухую пробирку, а затем при помощи шпателя или ложечки (фарфоровой, металлической, стеклянной или пластиковой) проводить взвешивание. Жидкие реактивы отбираются при помощи пипеток или других дозирующих устройств.

Неизрасходованные реактивы запрещено пересыпать (переливать) обратно в банку, их необходимо сдавать лаборанту. Запрещено оставлять реактивы на рабочих столах и в ламинарном шкафу на срок более одного рабочего дня. Не

разрешено совместное (в непосредственной близости) хранение реактивов, способных вступать в реакцию друг с другом. Запрещено совместное хранение веществ, которые в случае возникновения пожара необходимо тушить разными средствами пожаротушения.

Основные типы реактивов для микробиологических исследований

1. Питательные среды. Это растворы или твердые субстраты, содержащие необходимые для роста микроорганизмов питательные вещества. В лабораториях применяются среды общего назначения (например, агар) и селективные среды, которые поддерживают рост определённых видов микроорганизмов.

2. Красители и индикаторы. Красители, такие как метиленовый синий или сафранин, применяются для окрашивания клеток в микроскопических исследованиях, что помогает лучше визуализировать структуру микроорганизмов.

3. Антибиотики и антисептики. Используются для контроля роста микроорганизмов и предотвращения контаминации культур. Применение антибиотиков позволяет избирательно подавлять рост определённых штаммов микроорганизмов.

4. Буферные растворы. Они поддерживают постоянный pH в процессе роста микроорганизмов и необходимы для проведения различных микробиологических тестов.

Контрольные вопросы

1. Почему важно соблюдать стерильность при использовании посуды и реактивов в микробиологической лаборатории?

2. Какие виды стеклянной посуды чаще всего используются в микробиологии, и для чего они предназначены?

3. Как стерилизуются стеклянные чашки Петри перед использованием?

4. Чем пластиковая посуда отличается от стеклянной, и каковы её преимущества?

5. Какой метод стерилизации обычно используется для пластиковой посуды?

6. Какие типы пластиковых посуды подходят для культивирования микроорганизмов?

7. Как классифицируются реактивы в микробиологической лаборатории в зависимости от их чистоты?

8. Почему важно иметь отдельные контейнеры для биологических и химических отходов?

9. Какие реактивы используются для окрашивания микроорганизмов и зачем?

10. Какие питательные среды используются в микробиологии и в чем их различие?

3 ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ

3.1 История развития микробиологии

Первым шагом к открытию микробов стало изобретение микроскопа в конце XVI века. Хотя идеи увеличительных приборов существовали и ранее, первенство в создании микроскопа приписывается голландским мастерам. В 1590 году Захарий Янссен (около 1580–1638) вместе со своим отцом Гансом Янсеном, работая в Нидерландах, изготовил один из первых примитивных микроскопов, который позволял увеличить изображение объекта в 3–9 раз.

Однако настоящая революция произошла позже, благодаря трудам других учёных. В 1609 году Галилео Галилей (1564–1642), знаменитый итальянский астроном и физик, создал свою версию микроскопа, который он назвал «оккиолино». Этот прибор уже позволял достигать более существенных увеличений и стал важным этапом в развитии оптики.

Наибольшего прогресса в улучшении микроскопов достиг голландский натуралист и мастер по созданию линз Антони ван Левенгук (1632–1723). Он не имел специального научного образования, однако благодаря своим мастерским навыкам он смог изготовить линзы, которые давали невероятное по тем временам увеличение – до 300 раз. С помощью этих линз Левенгук смог впервые наблюдать микроорганизмы в капле воды и других образцах. В 1674 году он впервые описал «анималькули» (так он называл увиденные им микроорганизмы), которые в будущем были признаны бактериями и простейшими. Это событие стало отправной точкой для развития микробиологии как науки.

Хотя Левенгук впервые наблюдал микроорганизмы, научное сообщество не сразу признало их значимость. В течение следующих двух столетий учёные только начинали осознавать роль микробов в природе и жизни человека.

В XIX веке значительный вклад в развитие микробиологии внесли Луи Пастер (1822–1895) и Роберт Кох (1843–1910). Работы Пастера по изучению брожения, начиная с 1857 года, показали, что этот процесс происходит под воздействием микроорганизмов. Он также развенчал теорию самозарождения, доказав, что микроорганизмы не возникают самопроизвольно, а распространяются из окружающей среды. Открытие Пастера стало основой для создания процесса пастеризации – метода уничтожения вредных микроорганизмов в продуктах, таких как молоко и вино, путем кратковременного нагрева.

В конце XIX века немецкий врач Роберт Кох стал пионером в исследовании инфекционных заболеваний. В 1876 году он доказал, что сибирская язва вызывается бактерией *Bacillus anthracis*, став первым, кто связал конкретный микроорганизм с определённой болезнью. В дальнейшем Кох разработал свои знаменитые постулаты, которые описывают принципы, по которым можно установить причинно-следственную связь между микроорганизмом и болезнью.

Также свой вклад внес Дмитрий Иванович (1864–1920), который в 1892 году открыл вирусы, исследуя мозаичную болезнь табака. Это открытие стало первым шагом к изучению вирусов, которые отличаются от бактерий и других микроорганизмов своими размерами и структурой.

В XX веке микробиология продолжила развиваться. Одним из величайших достижений стало открытие пенициллина. В 1928 году Александр Флеминг случайно обнаружил, что плесневый гриб *Penicillium notatum* убивает бактерии. Лишь в 1940-х годах Ховард Флори и Эрнст Борис Чейн разработали методы массового производства пенициллина, что позволило эффективно лечить инфекционные заболевания. Вслед за этим были открыты другие антибиотики, что сделало возможным борьбу с ранее смертельными инфекциями. В середине XX века началось изучение вирусов, когда Уэнделл Стэнли кристаллизовал вирус табачной мозаики. Позднее были открыты структуры ДНК и РНК, что позволило глубже понять природу вирусов и заложило основы молекулярной биологии.

В XXI веке микробиология активно развивается благодаря технологиям секвенирования генома и изучению микробиома человека. Современные методы, такие как CRISPR-Cas9, позволили редактировать гены, открыв новые возможности в медицине. Однако широкое использование антибиотиков привело к появлению устойчивых к ним штаммов бактерий, что стало серьёзной угрозой для медицины. Сегодня учёные продолжают искать решения для борьбы с антимикробной резистентностью и изучают роль микробов в экосистемах и здоровье человека.

3.2 Структура клетки

Структура клетки – это основа жизни всех живых организмов, начиная от одноклеточных бактерий и заканчивая сложными многоклеточными организмами, такими как растения и животные. Все клетки можно разделить на две большие группы: прокариотические и эукариотические. Основные различия между этими клетками заключаются в их структуре и организации.

Прокариотические клетки – это простейшие клетки, не имеющие оформленного ядра и мембранных органоидов. Примером прокариотических организмов являются бактерии и археи. В таких клетках генетический материал представлен кольцевой молекулой ДНК, которая свободно плавает в цитоплазме и называется нуклеоидом. Прокариоты окружены плазматической мембраной, которая регулирует обмен веществ с окружающей средой, и часто имеют клеточную стенку, придающую клетке дополнительную защиту и форму. В отличие от эукариот, у прокариот отсутствуют митохондрии и хлоропласты, но есть специальные структуры — рибосомы, где происходит синтез белков. Некоторые бактерии также имеют жгутики или ворсинки, с помощью которых они могут передвигаться или прикрепляться к поверхностям.

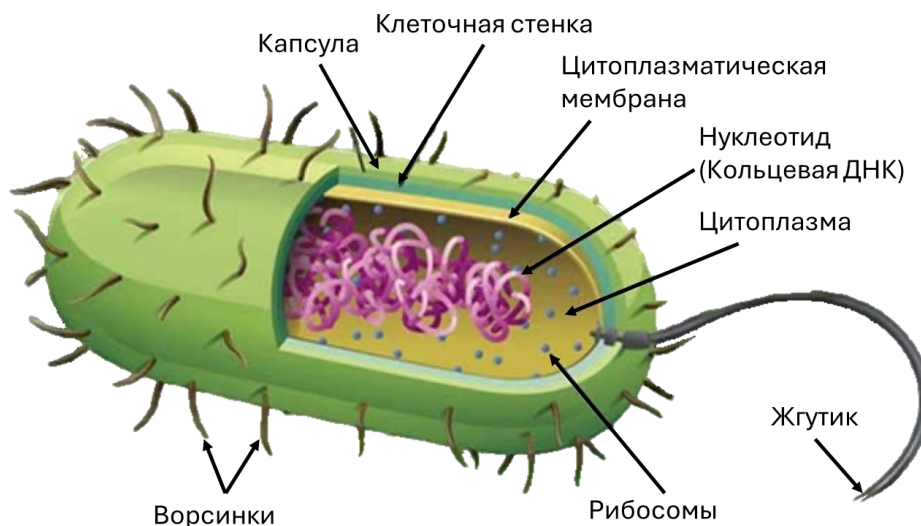


Рисунок 3.1 – Строение прокариотической клетки

Грамм-статус – это характеристика бактерий, которая определяется с помощью метода окрашивания по Граму, разработанного датским врачом Хансом Кристианом Грамом в 1884 году. Бактерии делятся на два типа в зависимости от реакции на окрашивание: грамположительные и грамотрицательные.

Грамположительные бактерии сохраняют фиолетовый цвет после окрашивания и промывания. Это связано с особенностями их клеточной стенки, которая состоит из толстого слоя пептидогликана, который составляет около 20-80 нанометров, что делает стенку толстой и прочной. В пептидогликане также содержатся тейхоевые кислоты, которые придают стенке дополнительную стабильность и могут играть роль в патогенезе. Этот слой удерживает краситель, что и придаёт им характерный цвет.

Грамотрицательные бактерии не удерживают фиолетовый краситель, и при дополнительной окраске они приобретают розовый или красный цвет. Их клеточная стенка гораздо тоньше (около 8–10 нанометров) и содержит значительно меньше пептидогликана, но дополнительно окружена внешней мембраной, которая препятствует проникновению некоторых антибиотиков и делает их более устойчивыми к агрессивным факторам.

Клеточная стенка бактерий состоит из двух ключевых компонентов:

Пептидогликан (муреин) – это основной структурный элемент клеточной стенки бактерий. Он состоит из длинных полисахаридных цепей, связанных короткими пептидными мостиками. Эти мостики обеспечивают жёсткость и защиту от осмотического давления.

Внешняя мембрана (характерна для грамотрицательных бактерий) состоит из двух слоёв: внутреннего слоя фосфолипидов и наружного слоя липополисахаридов (ЛПС). ЛПС может вызывать сильную иммунную реакцию у

человека и играет важную роль в защите бактерии от внешних угроз, таких как антибиотики и ферменты.

Эукариотические клетки более сложны по своей структуре и характерны для организмов, таких как животные, растения, грибы и простейшие. Главным отличием эукариот является наличие ядра, окружённого ядерной мембраной, где хранится генетический материал в виде линейных молекул ДНК, связанных с белками (хромосомами).



Рисунок 3.2 – Строение эукариотической клетки

Кроме ядра, в эукариотических клетках есть различные мембранные органоиды:

1. Митохондрии – «энергетические станции» клетки, где происходит синтез АТФ, основного источника энергии для всех процессов.

2. Эндоплазматическая сеть (ЭПС) – система мембран, которая участвует в синтезе и транспорте белков и липидов. ЭПС бывает двух типов: гранулярная (с рибосомами на поверхности, где синтезируются белки) и гладкая (без рибосом, где происходит синтез липидов).

3. Аппарат Гольджи – органоид, ответственный за сортировку, упаковку и модификацию белков и липидов.

4. Лизосомы – структуры, содержащие ферменты для расщепления крупных молекул и переработки клеточного «мусора».

5. Рибосомы – как и в прокариотах, здесь происходит синтез белков, но у эукариот они могут быть связаны с ЭПС или свободно плавать в цитоплазме.

У растений и некоторых простейших есть ещё два важных органоида:

- Хлоропласты, где происходит фотосинтез – процесс преобразования солнечной энергии в химическую, что позволяет растениям самостоятельно синтезировать органические вещества.

- Вакуоль – большая полость, заполненная клеточным соком, которая регулирует осмотическое давление, хранит питательные вещества и выводит продукты обмена.

Клеточная стенка присутствует у растений, грибов и некоторых простейших, придавая клетке жёсткость и защиту. У растений она состоит из целлюлозы, у грибов – из хитина.

Основное различие между растительными и животными клетками заключается в том, что растительные клетки имеют хлоропласты для фотосинтеза, крупную центральную вакуоль и клеточную стенку, тогда как у животных клеток этих структур нет, но у них лучше развиты структуры для движения и пищеварения (например, лизосомы).

Таким образом, клетки прокариот и эукариот различаются как по организации генетического материала, так и по наличию органоидов. Прокариоты проще устроены и не имеют ядра и мембранных органелл, тогда как эукариоты обладают более сложной внутренней структурой, с множеством органоидов, выполняющих специализированные функции.

3.3 Основы систематики микроорганизмов

Систематика микроорганизмов – это наука, которая занимается классификацией, описанием и номенклатурой различных микроорганизмов. В рамках систематики исследуются не только внешние признаки микробов, но и их генетические, физиологические и биохимические особенности. Цель систематики – создание упорядоченной системы, которая помогает учёным классифицировать и идентифицировать организмы, а также понимать их эволюционные связи.

Принципы систематики

Систематика основывается на разделении микроорганизмов на таксоны – группы, в которые организмы объединяются на основании сходства и различий. Таксоны располагаются иерархически: от наиболее общего к более частному. Основные таксономические уровни – это домен, царство, тип, класс, порядок, семейство, род и вид.

Примером может служить бактерия *Escherichia coli*. В её классификации:

- Домен: Бактерии (Bacteria)
- Царство: Прокариоты (Prokaryota)
- Тип: Протеобактерии (Proteobacteria)
- Класс: Гамма-протеобактерии (Gammaproteobacteria)
- Порядок: Enterobacteriales

- Семейство: Enterobacteriaceae
- Род: *Escherichia*
- Вид: *Escherichia coli*

Эта иерархическая система помогает учёным отслеживать эволюционные связи микроорганизмов и систематизировать их огромную разновидность.

Систематика микроорганизмов включает несколько основных разделов.

- Таксономия – разработка теоретических основ классификации, правил и методов.
- Классификация – распределение микроорганизмов по иерархическим группам.
- Номенклатура – система наименования микроорганизмов, которая помогает стандартизировать их имена.
- Филогения – исследование эволюционной истории микроорганизмов.

Генетические критерии

Генетические критерии играют центральную роль в современной систематике микроорганизмов. Эти методы позволяют наиболее точно определить родственные связи между разными видами и родами. Генетические методы базируются на анализе ДНК и РНК микроорганизмов и включают:

1. Гибридизация нуклеиновых кислот. Этот метод основан на комплементарности ДНК-цепей. Для изучения двух видов микроорганизмов их ДНК разделяют на одноцепочечные молекулы и смешивают. Чем больше сходных участков, тем больше комплементарных связей образуется между ДНК этих двух организмов. Если гибридизация достигает 70%, микроорганизмы относятся к одному виду. Этот метод часто используется для различения видов внутри рода.

2. Анализ содержания GC-пар в ДНК. Количество пар гуанина и цитозина в ДНК варьируется у разных микроорганизмов. Близкородственные виды имеют схожий процент GC-пар. Например, у бактерий рода *Pseudomonas* содержание GC-пар варьируется от 61,8% до 69,5%, что свидетельствует об их близком родстве.

3. Секвенирование ДНК. Секвенирование – это метод, который позволяет определить точную последовательность нуклеотидов в геноме. Наиболее часто изучаются гены рибосомальной РНК (16S рРНК для прокариот). Это один из самых надёжных способов определить филогенетические связи между микроорганизмами. Например, если различия в 16S рРНК превышают 5%, микроорганизмы относят к разным родам.

Пример: Секвенирование рибосомальной РНК позволило выделить археи как отдельную от бактерий группу, хотя внешне они очень схожи.

Фенотипические критерии

Фенотипические критерии систематики основаны на морфологических, культуральных и физиолого-биохимических особенностях микроорганизмов.

1. Морфологические признаки. К этим признакам относятся форма клеток (кокки, бациллы, спириллы), их размеры, наличие или отсутствие капсул и жгутиков. Например, бактерии рода *Staphylococcus* имеют форму кокков и располагаются в виде гроздьев. Жгутики помогают бактериям, таким как *Escherichia coli*, передвигаться в жидкой среде.

2. Культуральные признаки. Эти признаки характеризуют особенности роста микроорганизмов на питательных средах. Например, бактерии рода *Bacillus* образуют крупные, шероховатые колонии на плотной питательной среде. Цвет, форма и консистенция колоний – важные критерии для определения рода и вида микроорганизмов.

3. Физиолого-биохимические признаки. Это способность к ферментации, потребление кислорода, использование различных источников энергии. Например, *Lactobacillus* способен ферментировать молочную кислоту, а *Clostridium* — анаэроб, который растёт без кислорода.

Серологические критерии

Серологические критерии основаны на реакциях антиген-антитело. Эти методы позволяют идентифицировать микроорганизмы на основе их антигенных структур. Серологические тесты, такие как агглютинация и иммунофлуоресценция, применяются для диагностики и идентификации патогенных бактерий.

Пример: Серологические методы помогают различать штаммы бактерий, таких как *Escherichia coli* O157, который является патогенным и вызывает кишечные инфекции.

Иерархическая систематика

Систематика микроорганизмов построена по иерархической схеме, где каждый таксон подчиняется вышестоящему. На вершине этой иерархии находятся домены – крупнейшие таксономические единицы. Далее идут царства, типы, классы, порядки, семейства, роды и виды.

Для прокариотов (бактерий и архей) вид не всегда определяется так чётко, как у эукариотов, поскольку они не размножаются половым путём. Вместо этого вид определяется на основе генетического и фенотипического сходства штаммов. Виды могут дополнительно делиться на подвиды, штаммы, биовары и серовары.

Современная классификация

Современная классификация микроорганизмов основывается на молекулярных данных, особенно на анализе последовательностей ДНК и РНК.

Одним из важнейших шагов в современной систематике стало выделение трёх доменов жизни:

1. Бактерии (Bacteria) – прокариотические микроорганизмы, такие как *Escherichia coli* и *Streptococcus*.

2. Археи (Archaea) – прокариоты, отличающиеся от бактерий по структуре клеточной мембраны и генетическому аппарату. Пример: *Methanobacterium*, которое обитает в экстремальных условиях.

3. Эукариоты (Eukarya) – организмы с оформленным ядром, такие как грибы, простейшие и водоросли.

Эти три домена были выделены благодаря анализу генов рибосомальной РНК. Археи, например, раньше считались бактериями, но молекулярные данные показали их отдельное филогенетическое положение.

Контрольные вопросы

1. Кто первым разработал микроскоп, и каково его значение для микробиологии?
2. Какое открытие Антони ван Левенгук сделал с помощью микроскопа?
3. Какое значение имело доказательство Луи Пастера о роли микроорганизмов в брожении?
4. Какую теорию опроверг Луи Пастер, и в чем её суть?
5. Какую роль сыграл Роберт Кох в развитии микробиологии?
6. Какие постулаты разработал Роберт Кох, и в чём их значимость?
7. Что изучал Дмитрий Ивановский, и как это привело к открытию вирусов?
8. Каково значение открытия пенициллина в истории медицины?
9. Какие современные методы изучения микробиологии появились в XXI веке?
10. Почему антимикробная резистентность стала угрозой современной медицине?

3.4 Морфология и физиология прокариот

Морфология прокариот

Морфология клеток прокариот имеет важное значение в систематике и классификации этих микроорганизмов. Основные параметры, на которые обращают внимание при изучении морфологии, – это размер, форма клеток и тип скоплений.

Размер клеток прокариот варьируется от 0,2 мкм до 700 мкм. Средний размер большинства бактерий составляет 1–3 мкм. Например, диаметр клетки *Escherichia coli* составляет около 1 мкм, а её длина – 2 мкм. Однако существуют бактерии-гиганты, такие как *Epulopiscium fishelsoni*, достигающие 600 мкм в длину и 75 мкм в диаметре. В то же время есть микроскопические формы, например

нанобактерии размером менее 0,1 мкм, однако их существование является предметом дискуссий.

Форма клеток прокариот также является важным таксономическим признаком. Она определяется особыми белками цитоскелета, которые поддерживают форму клетки (рис. 3.3).

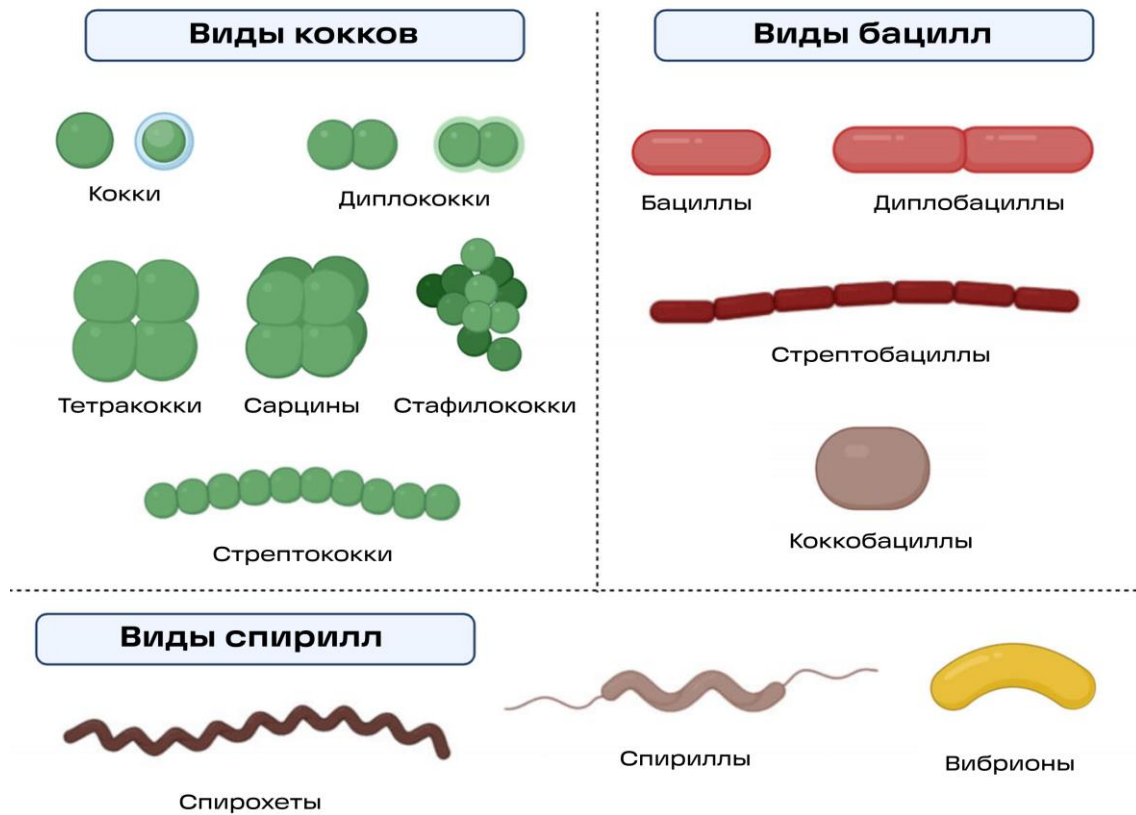


Рисунок 3.3 – Бактериальные формы и скопления

У прокариот выделяют три основные формы:

1. Сферическая форма (кокки). Сферические клетки могут располагаться поодиночке, в парах (диплококки), цепочках (стрептококки) или образовывать сложные скопления, такие как тетракокки (четыре клетки) или сарцины (восемь клеток).

2. Палочковидная форма. Клетки цилиндрической формы (бациллы) могут быть одиночными, располагаться в парах (диплобактерии) или образовывать цепочки (стрептобактерии). Концы палочковидных клеток могут быть закруглёнными, суженными или срезанными под углом.

3. Извитая форма. Клетки, имеющие один завиток, называются вибрионами, несколько завитков – спириллами, а множество завитков – спирохетами.

Кроме трёх основных форм встречаются и другие, более редкие: клетки с выростами, нитевидные формы, веретенообразные и коккобактерии. У

архебактерий встречаются такие экзотические формы, как ланцетовидные, спиралевидные и овальные клетки.

Типы клеточных скоплений – это ещё один морфологический признак. После деления клетки могут оставаться соединёнными между собой, образуя характерные скопления. Например, кокки могут формировать диплококки (две клетки), стрептококки (цепочки клеток) или стафилококки (неправильные скопления, напоминающие гроздь винограда).

Физиология прокариот

Физиология микроорганизмов – это важный раздел микробиологии, который изучает процессы жизнедеятельности микробных клеток, их питание, рост, обмен веществ и взаимодействие с окружающей средой.

Питание – это совокупность процессов, включающих поступление, переваривание и усвоение питательных веществ. Эти процессы важны для обмена веществ, благодаря которому микроорганизмы получают необходимые химические соединения, используемые для роста, жизнедеятельности и размножения. В природных условиях микроорганизмы развиваются лишь тогда, когда находят необходимые химические вещества для получения энергии и синтеза клеточных компонентов. Эти соединения называют питательными веществами.

В лабораторных условиях для выращивания микроорганизмов используют питательные среды, содержащие все необходимые элементы в растворённом виде. Для того чтобы выяснить, какие вещества необходимы микроорганизмам, важно учитывать их химический состав и способ питания.

Химический состав микробной клетки

Клетки микроорганизмов, как и любые другие живые клетки, более чем наполовину состоят из воды, которая составляет 70–85% от массы клетки. Оставшаяся часть – это так называемое сухое вещество, которое составляет 15–30% массы. Оно содержит множество химических элементов, из которых наиболее важными являются шесть биогенных элементов: углерод, кислород, азот, водород, сера и фосфор. Эти элементы составляют более 95% массы клетки и играют ключевую роль в её развитии. Например, углерод и водород входят в состав всех органических соединений, а кислород используется при аэробном дыхании. Азот является основным компонентом аминокислот, нуклеиновых кислот и многих ферментов, а фосфор необходим для создания ДНК и клеточных мембран.

Кроме биогенных элементов, клетки содержат макроэлементы, такие как калий, натрий, кальций, магний, хлор и железо, которые помогают в ферментативных процессах и поддержании осмотического давления. Также в клетке присутствуют микроэлементы, такие как марганец, кобальт, медь и цинк. Хотя их требуется совсем немного, они важны для ферментативной активности и других процессов.

Типы питания микроорганизмов

Микроорганизмы можно разделить на две основные группы в зависимости от источника углерода: автотрофы и гетеротрофы.

Автотрофы способны использовать неорганические вещества, такие как углекислый газ (CO_2), для синтеза всех необходимых для жизни соединений. Примером таких микроорганизмов являются фотосинтезирующие бактерии и водоросли, которые используют энергию света для создания органических веществ из неорганических соединений. Другие автотрофы, называемые хемосинтетиками, получают энергию за счёт окисления неорганических веществ, таких как аммиак или сероводород.

Гетеротрофы, напротив, получают углерод из органических соединений, таких как углеводы или белки. Большинство микроорганизмов являются гетеротрофами. Они могут питаться разными источниками углерода: от простых сахаров, таких как глюкоза, до более сложных соединений, таких как белки и жирные кислоты. Некоторые микроорганизмы могут даже разлагать трудноразрушаемые вещества, например, нефть, спирты или другие промышленные отходы, что делает их важными для биотехнологий и экологической очистки.

Источники энергии

Микроорганизмы также классифицируются по типам источников энергии. Фототрофы используют свет как источник энергии, тогда как хемотрофы извлекают энергию из химических соединений. Например, фотосинтезирующие бактерии преобразуют световую энергию в химическую с помощью процесса, называемого фотофосфорилированием, тогда как хемотрофы получают энергию путём окисления органических или неорганических веществ.

В зависимости от доноров электронов микроорганизмы могут быть литотрофами (используют неорганические вещества, например водород или серу) или органотрофами (используют органические соединения как доноры электронов). Эти различия определяют разнообразие типов питания, от фотосинтеза до брожения и дыхания.

Факторы роста. Многие микроорганизмы для роста и размножения нуждаются в особых факторах роста — веществах, которые они не могут синтезировать самостоятельно. К таким веществам относятся аминокислоты, витамины и азотистые основания. Например, бактерии рода *Leuconostoc* нуждаются в 17 аминокислотах, чтобы расти и развиваться. Если микроорганизм способен синтезировать все необходимые вещества самостоятельно, его называют прототрофом. Если же он нуждается в добавлении одного или нескольких факторов роста, то его называют ауксотрофом.

3.5 Особенности систематики прокариот

Систематика прокариот развивается с учётом генетических, физиологических и морфологических признаков. Одним из важнейших аспектов систематики является классификация микроорганизмов на основании данных о генах, таких как последовательности 16S рРНК. Эти генетические маркеры позволяют точно определять родственные связи между различными группами прокариот.

Основными принципами систематики являются:

- Генетическая классификация – строится на анализе геномов, рибосомальных РНК и других генетических элементов;
- Фенотипическая классификация – основывается на морфологических и физиологических признаках;
- Номенклатура – присвоение названий новым видам и родам по международным стандартам.

Каждый новый вид прокариот должен быть описан, его типовой штамм должен быть депонирован в международные коллекции микроорганизмов. Описание нового вида обязательно должно быть опубликовано в научном журнале, таком как *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*.

Современные классификационные руководства, такие как *Руководство Берджи по систематической бактериологии* и *Прокариоты*, служат основой для систематики и идентификации новых видов бактерий и архей. Эти руководства содержат информацию о структуре геномов, фенотипических признаках и филогенетических связях прокариот.

Контрольные вопросы

1. Что такое систематика микроорганизмов, и какие задачи она решает?
2. Какие основные таксономические уровни используются в систематике микроорганизмов?
3. Какие фенотипические признаки важны для классификации микроорганизмов?
4. В чём заключается метод гибридизации нуклеиновых кислот и для чего он используется?
5. Какое значение имеют серологические критерии для определения микроорганизмов?
6. Какой процент сходства в 16S рРНК позволяет определить родственные связи между микроорганизмами?
7. В чём особенности систематики прокариот по сравнению с эукариотами?
8. Какие различия имеются между таксономическими категориями «вид» и «штамм»?

9. Какие три домена жизни выделяются на основании молекулярной классификации?

10. Почему археи были выделены в отдельную группу от бактерий?

3.6 Филогенетический обзор домена Bacteria

Домен Bacteria включает огромную и разнообразную группу прокариот, отличающихся как по внешнему виду, так и по биохимическим и физиологическим особенностям. Систематизация бактерий основана на филогенетическом анализе, главным образом, на последовательностях генов 16S рРНК. На сегодняшний день известно более 80 филогенетических ветвей бактерий, некоторые из которых были обнаружены только на основе секвенирования ДНК из природных сообществ, и их фенотипические признаки до конца не изучены.

Основные филогенетические ветви бактерий

Наиболее значимые филогенетические группы бактерий, которые играют важную роль в биотехнологии, медицине, сельском хозяйстве и экологии.

1. Протеобактерии (*Proteobacteria*) – самая крупная и разнообразная группа бактерий, которая включает хемолитотрофов, фототрофов, аэробов и анаэробов. Протеобактерии подразделяются на пять классов: альфа, бета, гамма, дельта и эпсилон-протеобактерии. Эти бактерии могут быть как патогенными (например, *Escherichia coli*, *Salmonella*), так и полезными (симбиотические бактерии рода *Rhizobium*, которые фиксируют азот в клубеньках бобовых растений). Среди протеобактерий также встречаются бактерии, способные окислять железо и серу, что имеет значение для биогеохимических циклов.

2. Грамположительные бактерии включают виды, у которых клеточная стенка состоит из толстого слоя пептидогликана, что придаёт им положительную окраску по Граму. Эти бактерии подразделяются на два крупных подразделения: с низким и высоким содержанием гуанин-цитозиновых пар (GC) в ДНК. К ним относятся такие известные роды, как *Bacillus* и *Clostridium* (спорообразующие), а также *Streptococcus* и *Staphylococcus* (не образующие спор). Грамположительные бактерии могут быть как возбудителями болезней, так и производителями антибиотиков (например, род *Streptomyces*).

3. Цианобактерии (*Cyanobacteria*) – это фотосинтезирующие бактерии, которые могут фиксировать углекислый газ с помощью процесса фотосинтеза. Они играют важную роль в экосистемах, участвуя в круговороте азота и углерода. Цианобактерии встречаются в различных средах обитания, от пресной воды до океанов, а также в экстремальных условиях, таких как горячие источники. Они известны способностью вызывать «цветение» воды, что может быть опасным для экосистемы из-за выделения токсинов.

4. Актинобактерии (*Actinobacteria*) – это высокоорганизованные бактерии, многие из которых образуют мицелий, напоминающий грибной. Представители этой группы, такие как *Streptomyces*, являются одними из главных производителей антибиотиков. Актинобактерии также играют важную роль в разложении органических веществ в почве.

5. Зеленые серные бактерии (*Chlorobi*) и зеленые несерные бактерии – это группы фототрофных бактерий, которые осуществляют аноксигенный фотосинтез, используя серу и сероводород в качестве доноров электронов. Эти бактерии встречаются в бескислородных зонах водоёмов и могут участвовать в серном цикле.

6. Хламидии (*Chlamydiae*) – грамотрицательные бактерии, большинство из которых являются внутриклеточными паразитами. Они вызывают такие заболевания у человека, как хламидиоз и трахома.

7. Спирохеты (*Spirochaetes*) – это бактерии с характерной извитой формой. Некоторые из них являются патогенами, такими как *Treponema pallidum* (возбудитель сифилиса) и *Borrelia burgdorferi* (возбудитель болезни Лайма).

8. Бактерии рода *Aquifex* – считаются одними из самых древних филогенетических ветвей бактерий. Эти организмы – гипертермофилы, способные жить в экстремальных условиях, таких как горячие источники. Они используют водород и сульфиды в качестве источников энергии.

3.7 Молочнокислые бактерии

Молочнокислые бактерии (МКБ) представляют собой группу грамположительных микроорганизмов, которые играют ключевую роль в процессе ферментации углеводов с образованием молочной кислоты. Эти бактерии относятся к семейству *Lactobacillaceae* и включают такие роды, как *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* и другие. Основной особенностью МКБ является их способность разлагать сахара (глюкозу, лактозу и другие углеводы) с образованием молочной кислоты, что обуславливает их использование в производстве кисломолочных продуктов, квашения овощей и других ферментированных продуктов.

Рост и развитие молочнокислых бактерий

Рост молочнокислых бактерий зависит от ряда факторов, таких как температура, рН, доступность питательных веществ и условия культивирования. Для большинства МКБ оптимальная температура роста варьируется от 30 до 40 °С, а оптимальный рН находится в диапазоне 4,0–6,0, что связано с их адаптацией к кислым условиям. МКБ растут анаэробно или факультативно анаэробно, что означает, что они могут развиваться как в отсутствие кислорода, так и при его наличии. В процессе их жизнедеятельности молочная кислота накапливается в

среде, что снижает рН и ограничивает дальнейший рост патогенных микроорганизмов.

Особенности культивирования на различных средах

Молочнокислые бактерии требуют среды, богатой углеводами (особенно сахарами), поскольку они метаболизируют углеводы с образованием молочной кислоты. В зависимости от задачи МКБ могут культивироваться на различных средах: от синтетических, где можно изучить метаболические процессы, до селективных для изоляции конкретных штаммов. Выбор среды также зависит от условий, необходимых для их роста и производства ферментированных продуктов.

Таким образом, молочнокислые бактерии являются важными микроорганизмами как в естественных процессах ферментации, так и в пищевой промышленности. Их рост и развитие зависят от множества факторов, а правильный выбор питательной среды позволяет эффективно их культивировать для различных целей.

3.8 Биотехнологическая схема производства продуктов микробного синтеза

Процесс производства продуктов микробного синтеза основан на использовании микроорганизмов-продуцентов, которые, культивируясь в контролируемых условиях, синтезируют целевые продукты – метаболиты (например, антибиотики, витамины, ферменты) или биомассу (например, белок). Основные этапы производства включают: приготовление питательной среды, получение посевного материала, культивирование, выделение продукта и его очистку (рис. 3.4).

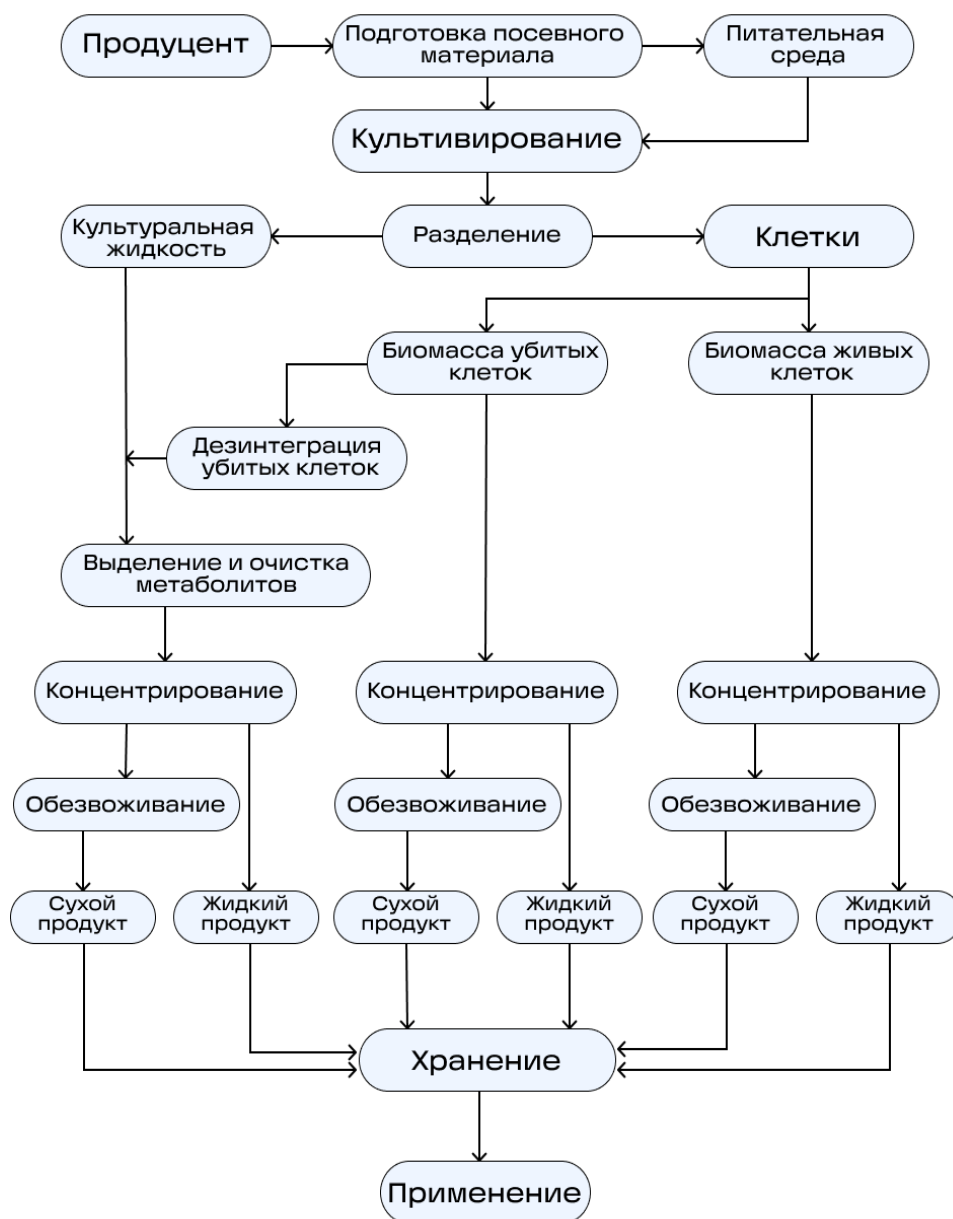


Рисунок 3.4 – Схема биотехнологического производства продуктов микробного синтеза

1. Приготовление питательной среды

Питательная среда – это смесь питательных веществ, необходимых для роста и размножения микроорганизмов. Ее состав зависит от специфики микробного продуцента и целевого продукта. Обычно питательная среда включает:

- Углеродный источник (глюкоза, крахмал, лактоза) для обеспечения энергетических потребностей;

- Азотный источник (аммонийные соли, аминокислоты, пептоны) для синтеза белков и нуклеиновых кислот;
- Минеральные соли (фосфаты, сульфаты, магний, калий) для обеспечения микроэлементами;
- Буферные системы для поддержания оптимального уровня pH;
- В некоторых случаях добавляются витамины и ростовые факторы, необходимые для конкретного типа микроорганизмов.

Правильный состав питательной среды является критически важным, так как он влияет на метаболическую активность продуцента и выход целевого продукта. Например, для промышленного производства пенициллина используют лактозу как углеродный источник, чтобы замедлить рост продуцента и стимулировать синтез антибиотика.

2. Получение посевного материала

Посевной материал – это высокоактивная культура микроорганизмов, специально подготовленная для масштабного культивирования. Подготовка посевного материала включает несколько этапов:

- Выбор штамма продуцента. Микроорганизмы отбираются на основе их способности производить целевой продукт в наибольших количествах. Важно также учитывать устойчивость штаммов к изменению условий окружающей среды (температура, pH, аэрация).

- Предварительное культивирование. Перед масштабным культивированием микроорганизмы сначала выращиваются в небольших объемах в лабораторных условиях для накопления достаточного количества клеточной массы. Это называется культивирование на наклонных средах или жидкостное культивирование.

Использование генетически модифицированных штаммов (ГМО) позволяет повысить эффективность синтеза целевого продукта. Например, штаммы *Escherichia coli* были генетически модифицированы для производства человеческого инсулина.

3. Культивирование

На этом этапе микроорганизмы выращиваются в больших объемах в биореакторах (ферментерах). Это основной этап, на котором происходит синтез целевого продукта. Культивирование может быть периодическим (batch), полупериодическим или непрерывным.

Основные параметры, которые контролируются в процессе культивирования:

- Температура: большинство промышленных микроорганизмов растут при температуре 25–37°C, но есть и экстремофильные штаммы (например, термофильные или психрофильные бактерии), требующие других температур.

- **pH среды:** контроль уровня pH важен для поддержания активности ферментов микроорганизмов. Например, *Lactobacillus* требует кислой среды для роста и производства молочной кислоты.

- **Аэрация и перемешивание:** важно обеспечивать достаточное количество кислорода для аэробных микроорганизмов. Используются специальные аэраторы и мешалки для равномерного распределения кислорода в среде.

- **Питание:** в процессе культивирования могут добавляться дополнительные порции питательных веществ для поддержания роста клеток (особенно в непрерывных системах).

Ферментация – это основной метод культивирования в промышленности. Например, в биотехнологии применяется глубокое аэробное культивирование микроорганизмов в жидких питательных средах для производства антибиотиков, ферментов и витаминов.

4. Выделение продукта (биомасса, метаболиты)

После завершения процесса культивирования начинается стадия разделения целевых продуктов от культурной жидкости. В зависимости от типа продукта разделение может включать:

- **Выделение биомассы:** если целевым продуктом является биомасса микроорганизмов (например, при производстве белка одноклеточных), клетки отделяются от культурной жидкости путем центрифугирования или фильтрации.

- **Выделение метаболитов:** если продуктом являются метаболиты (например, антибиотики, витамины), необходимо отделить их от клеточной массы. Это достигается через процессы экстракции, осаждения или адсорбции.

Для достижения максимальной эффективности выделения продукта также может использоваться дезинтеграция клеток, если продукт находится внутри клеток (например, при получении ферментов).

Для выделения продуктов используются различные методы, такие как ультрафильтрация, хроматография и экстракция. Например, для выделения пенициллина применяется кислотная экстракция с последующей кристаллизацией.

5. Очистка продукта

После выделения сырого продукта необходимо его очистить от примесей, включая клеточные фрагменты, остатки питательной среды и побочные продукты метаболизма. Основные методы очистки включают:

- **Фильтрация** — для удаления крупных примесей.

- **Хроматография** — для разделения компонентов на основе их химических свойств (например, ионообменная, адсорбционная, гелевая фильтрация).

- **Осаждение и экстракция** — для выделения конечного продукта из раствора. Это может включать органические растворители или другие реагенты.

После очистки продукт может подвергаться концентрированию (например, через сублимационную сушку) и сушке (лиофилизация или распылительная сушка) для получения готового препарата в виде порошка или жидкости.

Высокоэффективные методы очистки, такие как мембранные технологии и ионообменная хроматография, позволяют достичь чистоты продукта до 99%, что особенно важно в фармацевтической промышленности.

Биотехнологическая схема производства продуктов микробного синтеза включает несколько ключевых этапов, начиная с приготовления питательной среды и получения посевного материала до выделения и очистки конечного продукта. Каждый из этапов требует контроля множества параметров для обеспечения максимальной эффективности синтеза. Развитие биотехнологий позволяет улучшать процессы культивирования, выделения и очистки, делая производство более эффективным и безопасным.

Контрольные вопросы

1. Какие этапы включает биотехнологическая схема производства продуктов микробного синтеза?
2. Какова роль питательных сред в процессе культивирования микроорганизмов?
3. Какие компоненты обязательно включаются в питательную среду?
4. Что такое посевной материал и как он подготавливается?
5. Как регулируются условия культивирования, такие как температура и pH?
6. Чем отличается периодическое культивирование от непрерывного?
7. Какие методы используются для выделения целевых продуктов из культуры?
8. В чем заключается очистка продукта и какие методы для этого применяются?
9. Какую роль играют генетически модифицированные штаммы в биотехнологическом производстве?
10. Какие методы очистки необходимы для получения конечного продукта высокой чистоты?

3.9 Основы квантово-химических расчетов

Основы квантово-химических расчетов и теории функционала плотности (DFT) лежат в области применения квантовой механики для моделирования и предсказания свойств молекул и материалов. Это важнейшие инструменты современной химии и биотехнологии, которые позволяют исследовать молекулярные структуры, реакции и физико-химические свойства систем на атомарном уровне.

Квантовая химия и ее методы

Квантовая химия — это область, которая использует принципы квантовой механики для моделирования различных характеристик молекул и твердых тел. Основные подходы – метод молекулярных орбиталей (МО), метод Хартри-Фока (HF), а также пост-Хартри-Фок методы, такие как MP2 (второй порядок теории возмущений Мёллера-Плессе), метод конфигурационных взаимодействий (CI) и метод связанных кластеров (CC).

Основные задачи квантовой химии

1. **Определение энергетических состояний:** расчеты позволяют определить основные и возбужденные состояния молекулы.
2. **Расчёт структур и оптимизация геометрии:** квантово-химические методы позволяют найти оптимальную геометрию молекулы с наименьшей энергией.
3. **Исследование реакционных путей:** можно рассчитать барьеры активации и пути химических реакций.

Теория функционала плотности

DFT — это популярный и эффективный метод для расчетов в квантовой химии, который базируется на использовании плотности электронов, а не волновой функции, что упрощает расчеты сложных систем. Основное положение DFT — теорема Хоэнберга-Кона, которая утверждает, что все свойства системы можно выразить через плотность электронов. В рамках DFT рассчитываются не индивидуальные орбитали, а суммарная плотность, что снижает вычислительные затраты, позволяя моделировать большие молекулы и твердые тела.

Основные понятия DFT

1. **Функционал плотности:** функционал энергии выражает энергию системы как функцию электронной плотности. Основные используемые функционалы включают LDA (локальное приближение плотности) и GGA (градиентно-корректированные функционалы).
2. **Приближения и типы функционалов:** для учета обменных и корреляционных взаимодействий разрабатываются различные функционалы, такие как B3LYP, PBE и др. Эти функционалы позволяют достигать хорошего баланса между точностью и затратами времени на расчеты.
3. **Преимущества и ограничения DFT:** хотя DFT эффективен и удобен, он часто сталкивается с трудностями при моделировании систем в возбуждённых состояниях.

В DFT для получения точных результатов важно учитывать правильный выбор функционала, корректное описание взаимодействий и подходящий

базисный набор. Каждый из этих элементов влияет на точность, производительность и предсказательную силу расчетов.

Функционалы в DFT

Функционал в DFT описывает обменные и корреляционные взаимодействия в электронной системе. Существует множество функционалов, разработанных для разных задач. Основные классы функционалов:

1. **LDA (Local Density Approximation)** – локальное приближение плотности:

- Использует только плотность в конкретной точке и предполагает, что свойства системы зависят только от плотности в этой точке.
- Подходит для систем с примерно равномерной плотностью, таких как электронный газ и простые твердые тела, но часто менее точен для молекул.

2. **GGA (Generalized Gradient Approximation)** – обобщенное градиентное приближение:

- Учитывает градиент плотности, то есть изменение плотности вокруг точки, что дает более точные результаты для молекул и неоднородных систем.
- Примеры: функционалы PBE (Perdew-Burke-Ernzerhof), BLYP, которые часто используются для расчета молекул и органических соединений.

3. **Гибридные функционалы:**

- Включают в себя часть обменной энергии из метода Хартри-Фока, что повышает точность, особенно для систем с локализованными электронами.
- Примеры: B3LYP (включает 20% обмена Хартри-Фока), PBE0.

4. **Методы повышенной точности (meta-GGA):**

- Учитывают вторые производные плотности и часто более точны для сложных систем.
- Примеры: M06, TPSS.

Дисперсионные взаимодействия

В DFT стандартные функционалы плохо учитывают дисперсионные взаимодействия (слабые силы между неполярными молекулами или атомами), что особенно критично для молекулярных кристаллов, органических соединений и биологических молекул. Для учета этих взаимодействий были разработаны специальные методы:

1. **DFT-D (DFT with Dispersion correction):**

- Самый популярный подход, когда к энергии системы добавляется эмпирический член, зависящий от межатомных расстояний.
- Пример: DFT-D3 (третья версия дисперсионной поправки Гримме), которая включает затухающие функции и параметры, специфичные для различных атомов и типов функционалов.

2. **DFT-D4:**

- Усовершенствованная версия DFT-D3, которая учитывает атомные поляризуемости и включает более сложные затухающие функции для точного учета дисперсионных сил в многокомпонентных системах.

3. VV10 и подобные функционалы:

- Функционалы с встраиванием дисперсионных взаимодействий в сам функционал. Включают вклад дисперсионных взаимодействий в выражение для обменно-корреляционной энергии.

○ Пример: rVV10, который работает лучше для расчета межмолекулярных взаимодействий в больших системах.

4. Методы DFT+vdW(TS):

- Используют схему атомной поляризуемости, как в методе Tkatchenko-Scheffler (TS), для расчета дисперсионных взаимодействий. Этот метод оценивает силы между атомами на основе их объемов и электронных свойств, что позволяет более точно учитывать их поляризуемость.

В DFT и квантовой химии учитываются различные типы взаимодействий между атомами и молекулами, которые определяют физико-химические свойства системы. Ниже приведены основные типы взаимодействий, которые учитываются (или могут быть учтены) в расчетах DFT:

1. Ковалентные взаимодействия

Ковалентные связи возникают при совместном использовании электронной пары двумя атомами, формируя молекулярные орбитали. Эти взаимодействия описываются основными функциями в DFT, и для их расчета используются обменно-корреляционные функционалы. Ковалентные связи являются сильными взаимодействиями, и для их точного описания функционалы должны правильно учитывать обменные и корреляционные эффекты.

2. Ионные (электростатические) взаимодействия

Ионные взаимодействия возникают между противоположно заряженными ионами и обусловлены кулоновскими силами. Они также являются сильными взаимодействиями и часто встречаются в твердых телах (например, в кристаллических решетках). Стандартные DFT-функционалы обычно справляются с описанием ионных взаимодействий, но точность зависит от функционала и параметров расчета.

3. Ван-дер-ваальсовы (дисперсионные) взаимодействия

Ван-дер-ваальсовы взаимодействия — это слабые, нелокальные взаимодействия между нейтральными атомами и молекулами. Они включают три основных типа:

- **Диполь-дипольные взаимодействия (ориентационные):** между молекулами с постоянными дипольными моментами.
- **Диполь-индуцированные дипольные взаимодействия:** один из атомов или молекул поляризует другую.

- **Дисперсионные взаимодействия (индукционные):** возникают из-за корреляции мгновенных колебаний электронных облаков.

Стандартные функционалы, такие как LDA и GGA, плохо учитывают ван-дер-ваальсовы взаимодействия. Для их корректного описания используются дисперсионные поправки (например, DFT-D3, DFT-D4) или функционалы с встроенной дисперсионной коррекцией (например, rVV10, vdW-DF).

4. Водородные связи

Водородные связи представляют собой особый тип взаимодействий, при котором водородный атом, связанный с электроотрицательным атомом (например, кислородом или азотом), взаимодействует с другой электроотрицательной частицей. Водородные связи являются более слабыми, чем ковалентные, но сильнее, чем большинство ван-дер-ваальсовых взаимодействий.

GGA функционалы, такие как PBE, и гибридные функционалы, такие как B3LYP, хорошо справляются с описанием водородных связей, но точность может быть улучшена при добавлении дисперсионных поправок.

5. Металлические связи

Металлические связи представляют собой взаимодействия между атомами металлов, где электроны делокализованы по всей структуре. Они обуславливают электрическую проводимость и высокую теплопроводность металлов. Для описания металлических связей функционалы LDA и GGA могут давать адекватные результаты, но для высокой точности иногда используются специализированные функционалы, такие как функционалы в рамках GGA (например, PBE).

6. Пи-стэкинг взаимодействия

Пи-стэкинг (π -стэкинг) — это взаимодействие между ароматическими кольцами, где происходит наложение π -орбиталей. Пи-стэкинг характерен для биомолекул (например, ДНК, белков) и органических соединений. Эти взаимодействия слабы и относятся к типу ван-дер-ваальсовых взаимодействий, поэтому для их учета важно использовать функционалы с дисперсионными поправками или специальные методы, такие как vdW-DF.

7. Сильные корреляционные взаимодействия

Системы с сильной корреляцией (например, оксиды переходных металлов, тяжелые металлы) требуют учета сильной взаимозависимости движения электронов, что плохо описывается стандартными функционалами DFT. Для таких систем используются специальные подходы, например, DFT+U или методы, такие как динамическое среднее поле (DMFT), которые добавляют корреляционные поправки.

8. Магнитные взаимодействия

Магнитные взаимодействия возникают в системах, где есть несогласованные спины, такие как ферромагнитные или антиферромагнитные материалы. DFT позволяет учитывать магнитные свойства через

спин-поляризованные расчеты, где описываются взаимодействия между спинами электронов. Такие расчеты обычно выполняются с использованием функционалов, учитывающих спиновые плотности.

Базисные наборы в DFT расчетах

Базисный набор — это набор функций, которые описывают электронные орбитали атомов в системе. От выбора базисного набора зависит точность и скорость расчетов.

1. Минимальные базисные наборы (STO-3G):

- Используют минимально возможное число функций для описания каждого атома, что упрощает расчеты, но снижает точность.
- Подходят для грубых оценок и предварительных расчетов.

2. Валентно-расщеплённые базисные наборы (например, 6-31G, 6-311G):

- Базисный набор 6-31G включает дополнительные функции для более точного описания внешних электронов, что повышает точность молекулярных расчетов. Расширенные версии, такие как 6-311++G**, содержат поляризационные и диффузные функции. Эти дополнения позволяют более точно моделировать реакции, ионы и межмолекулярные взаимодействия.

3. Поляризационные функции (*):

- Включают дополнительные функции, такие как d- и f-орбитали, что позволяет лучше описывать распределение электронов и поляризацию.
- Полезны для систем, где атомы сильно отклоняются от сферической симметрии.

4. Диффузные функции (+):

- Добавляют функции для учета электронов, удаленных от ядер (например, для анионов и возбужденных состояний).

5. Псевдопотенциалы (ECP):

- Используются для замены ядра и внутренних электронов атома эффективным потенциалом, что уменьшает вычислительную нагрузку, особенно для тяжелых атомов, таких как переходные металлы.
- Например, базисы LANL2DZ или SDD включают такие псевдопотенциалы и применяются для расчетов тяжелых элементов.

Сравнение методов и подходов

• **Точность:** гибридные функционалы (B3LYP, PBE0) с дисперсионными поправками (например, DFT-D3) и расширенными базисами (6-311++G**) считаются стандартом для точных расчетов, однако их использование требует значительных ресурсов.

• **Производительность:** для больших систем или предварительных расчетов часто используются упрощенные функционалы (LDA, GGA) с минимальными

базисными наборами или псевдопотенциалами, чтобы снизить вычислительные затраты.

• **Баланс точности и эффективности:** поляризованные базисы с диффузными функциями и функционалы GGA, такие как PBE-D3, позволяют достичь хорошего баланса между производительностью и точностью для расчета свойств молекул и твердых тел.

3.9.1 Базовые операции для проведения расчетов

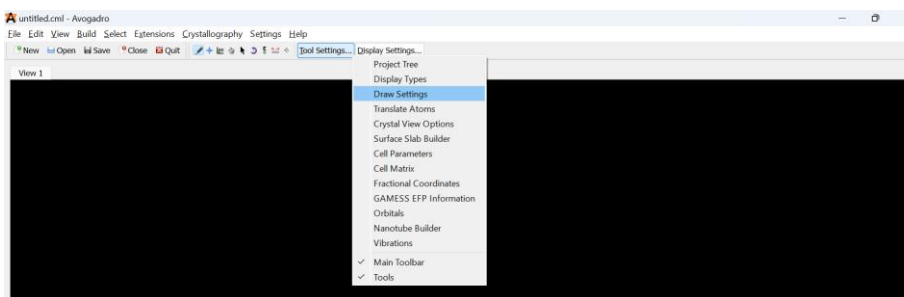
Построение молекул с помощью редактора Avogadro

Avogadro — это удобный инструмент для создания и редактирования молекулярных структур, который позволяет визуализировать молекулы и подготавливать их для дальнейших квантово-химических расчетов. В Avogadro вы можете настроить геометрию молекулы, оптимизировать ее структуру и экспортировать в формате, совместимом с ORCA. После этого подготовленный файл можно использовать для проведения расчетов в ORCA, что позволит получить важные данные о свойствах молекулы.

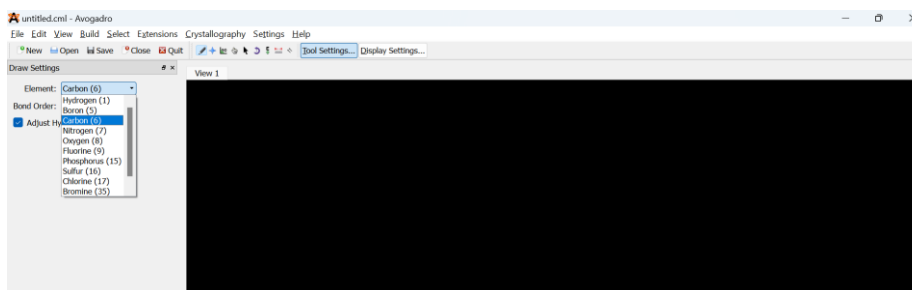
Скачать: <https://avogadro.cc/>

Построение молекул

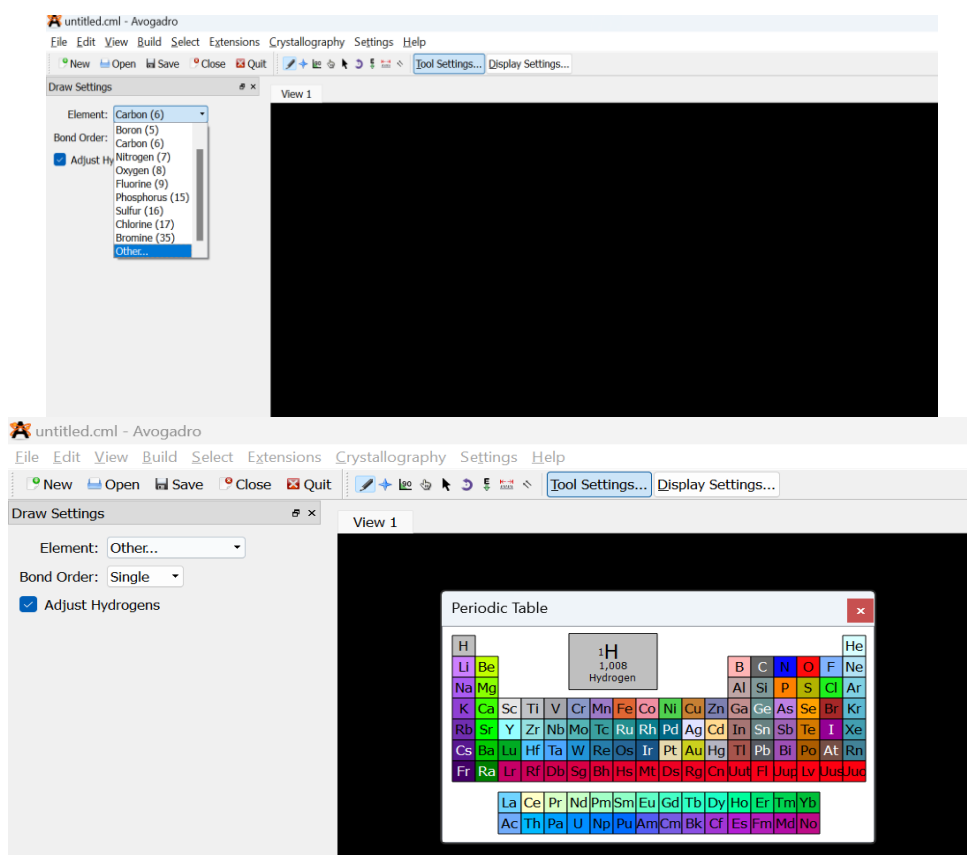
1. Открыть окно по редактированию молекул. Для этого надо навести курсор мыши на иконку с надписью: «Tool Settings» и щелкнуть правой кнопкой мыши по нему. Из выпадающего списка выбрать «Draw settings».



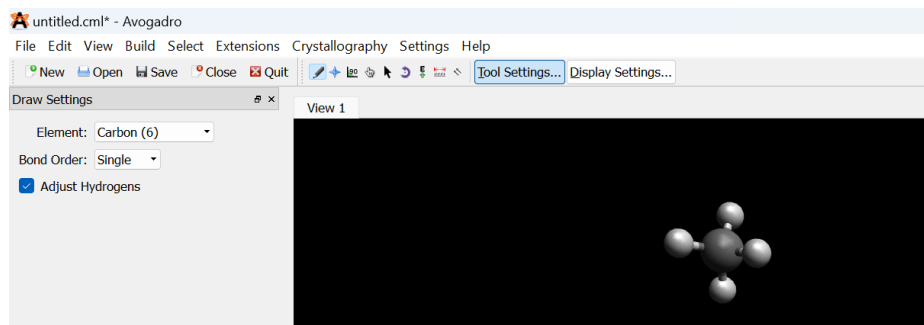
2. Выбрать элемент, входящий в состав криопротектора, необходимый для построения молекулы.



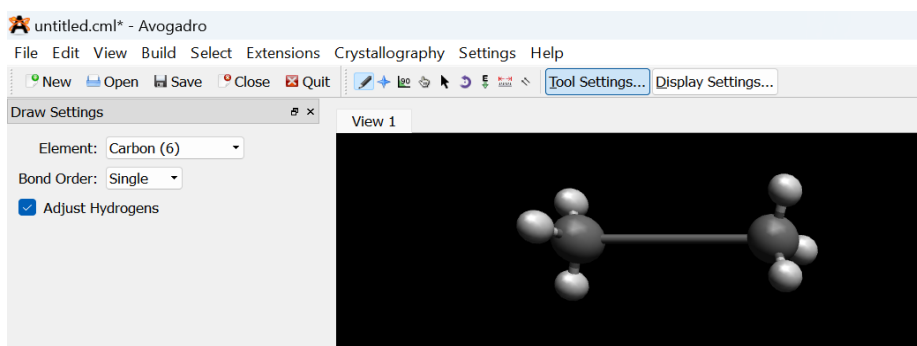
3. Если элемент, входящий в состав криопротектора, не представлен в выпадающем списке, его можно выбрать, используя периодическую таблицу, прокрутив колесико мыши и щелкнуть левой кнопкой мыши по иконке «Other».



4. Кликнуть левой кнопкой мыши в поле. Так, в нем появится выбранный атом (в данном случае – углерод). Наличие галочки «Adjust Hydrogens» позволяет автоматически добавлять атомы водорода согласно валентности атома. Нажатие правой кнопкой мыши по атому приводит к его удалению.

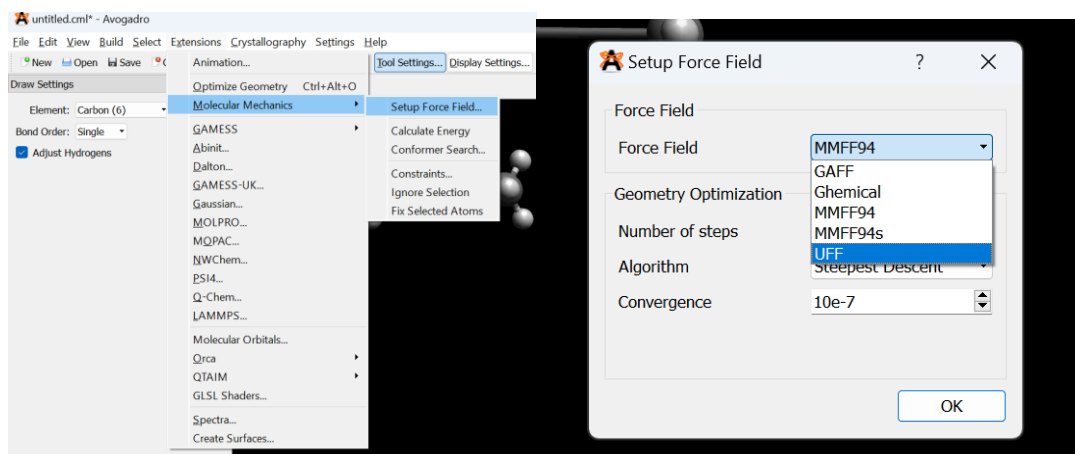


5. Щелчок левой кнопкой мыши по начальному атому и перемещение курсора мыши вправо приводит к образованию связи с другим атомом.

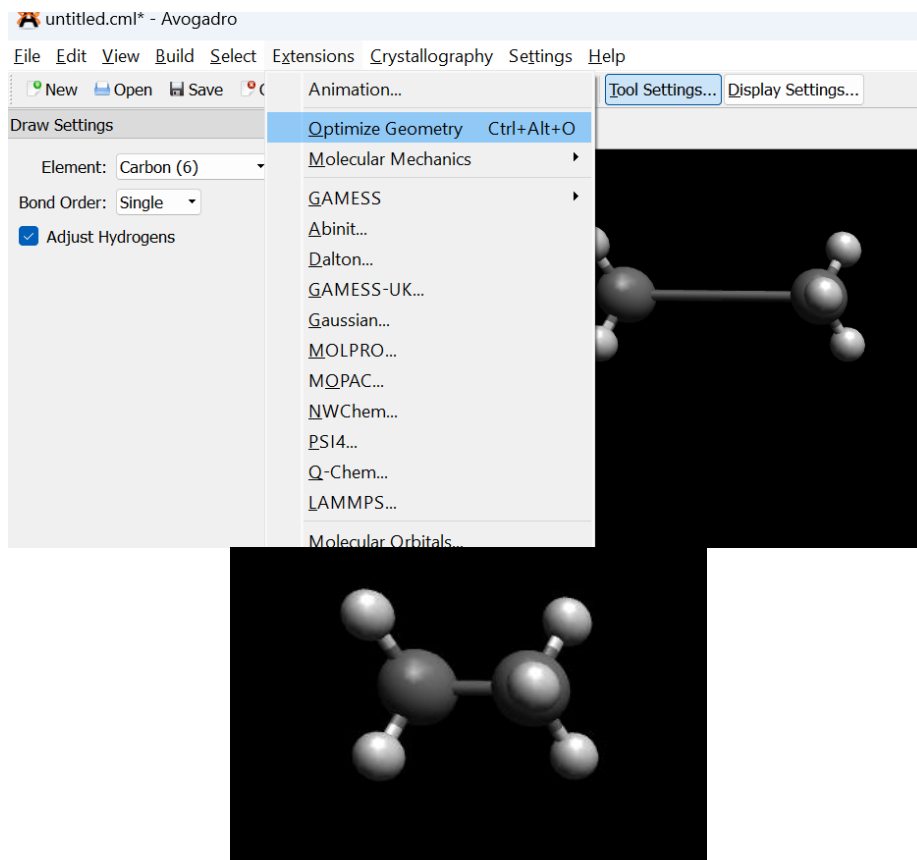


6. Для получения правильных длин связи и углов в молекуле возможна оптимизация геометрии модельной структуры путем выбора наиболее оптимального метода – UFF.

Для этого нужно навести курсор мыши на иконку «Extensions» и щёлкнуть по ней левой кнопкой мыши. В выпадающем меню выбрать «Molecular Mechanics», далее щелкнуть левой кнопкой мыши по «Setup Force Filed». В открывшемся меню напротив настройки «Force Filed» в выпадающем меню надо, прокрутив колесико мыши, щелкнуть по настройке «UFF».

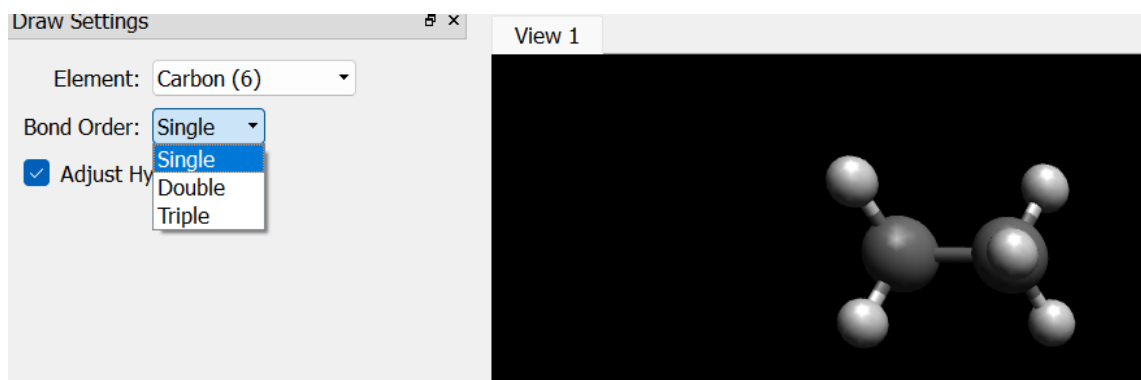


Далее с помощью вызова меню «Extensions», следует щелкнуть левой кнопкой мыши по иконке «Optimize Geometry».

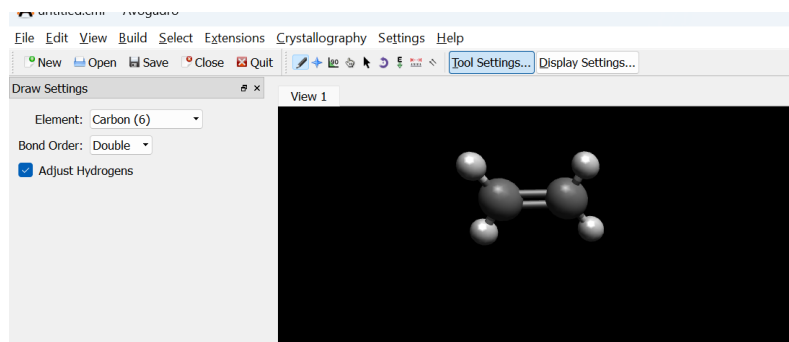


Таким образом, получили оптимизированную геометрию этана C_2H_6 .

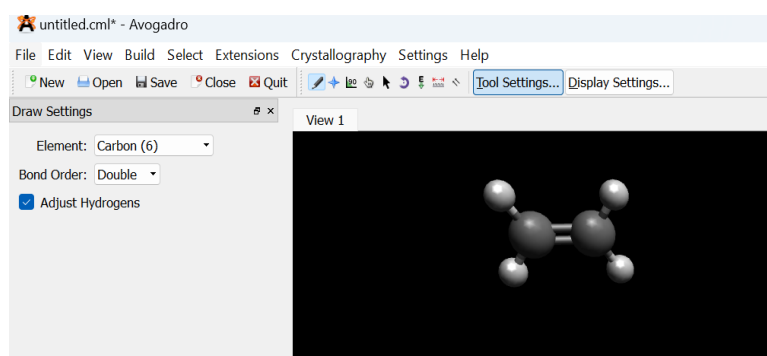
7. Для построения двойной или тройной связи нужно выбрать «Double» или «Triple» соответственно.




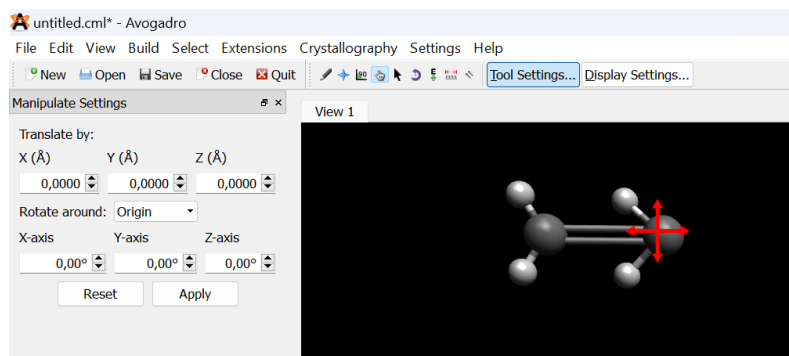
Далее щелкнуть левой кнопкой мыши по одинарной связи C-C. Образуется молекула этилена C_2H_4 .






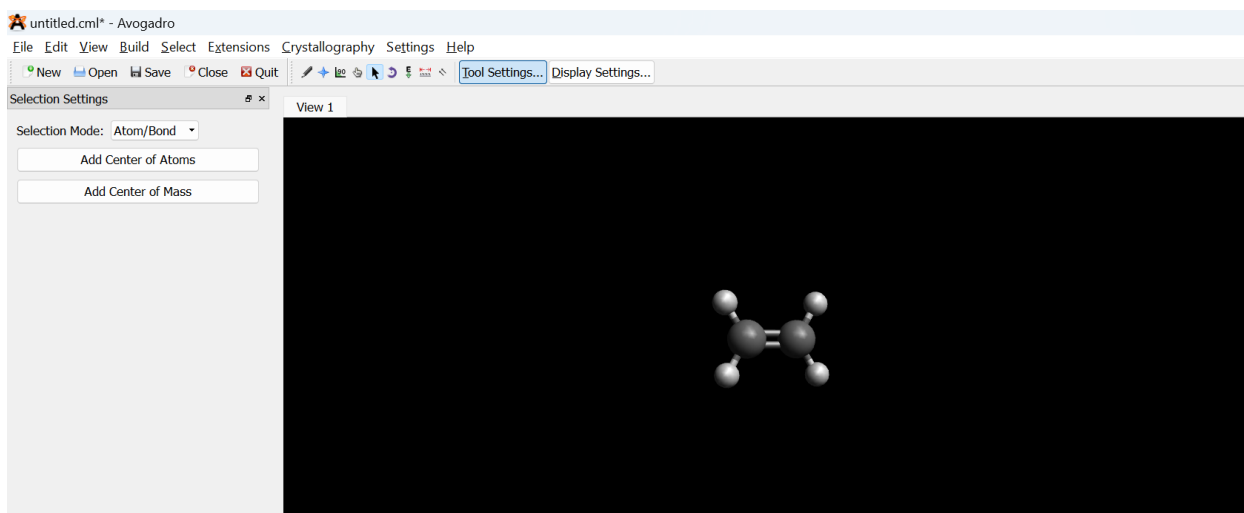
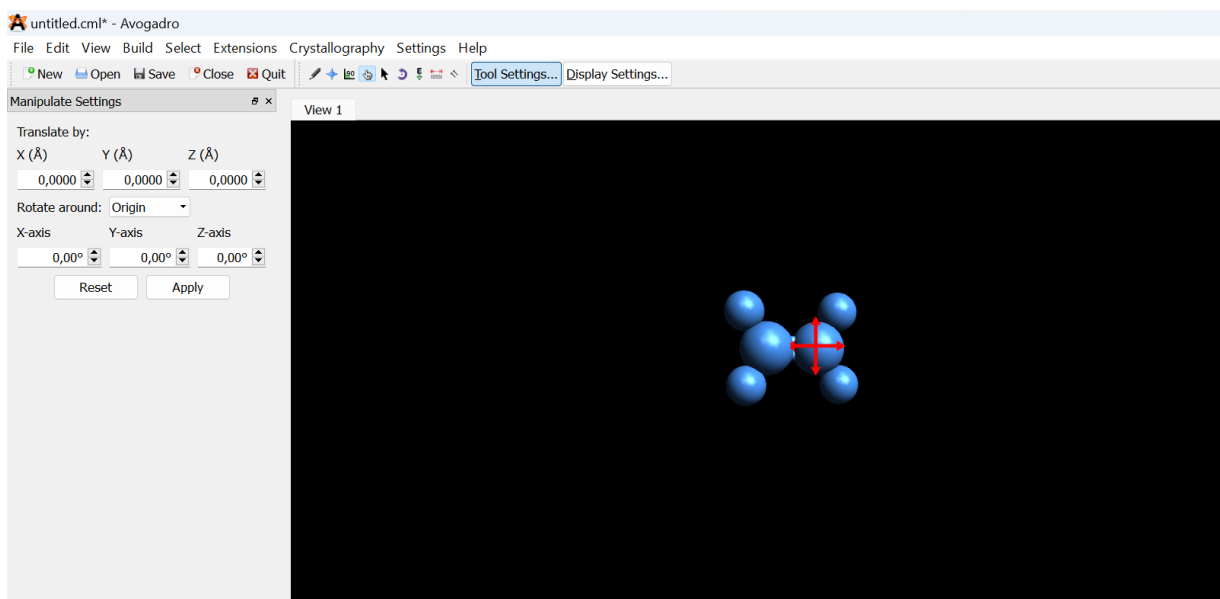
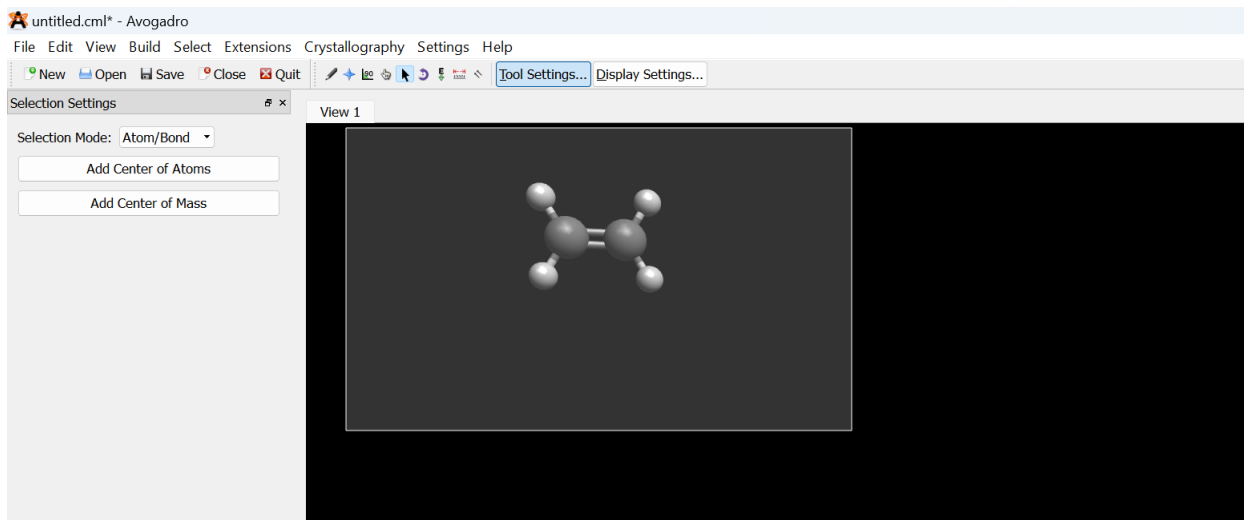
Для получения оптимизированной геометрии молекулы используем метод UFF.



8. С помощью инструмента  можно перемещать молекулу в плоскости, зажав левую кнопку мыши и перемещая курсор.



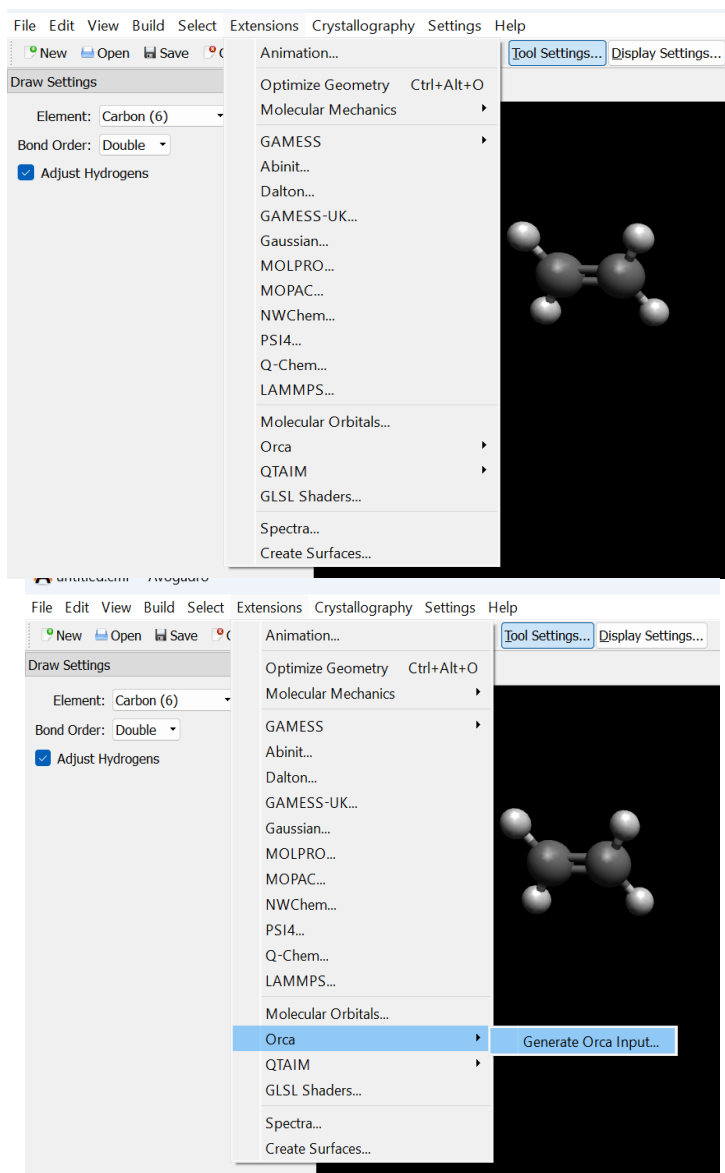
9. Молекулу или фрагмент молекулы можно выделить  и перемещать по полю с помощью . Убрать выделение атомов можно в режиме , нажав правой кнопкой в любой точке поля.

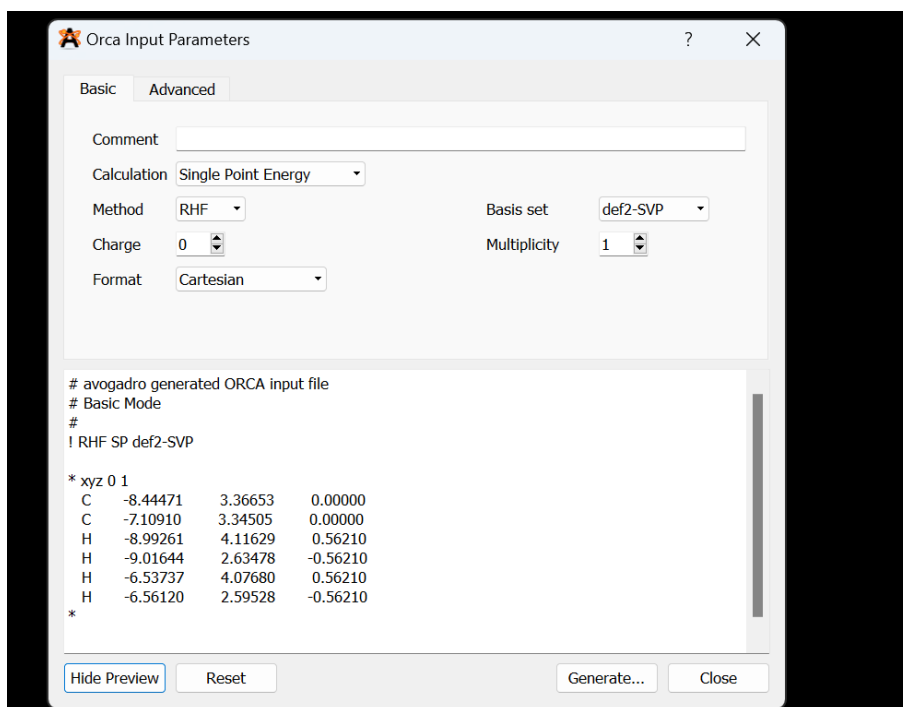


Генерация input-файла для расчетов в программе ORCA

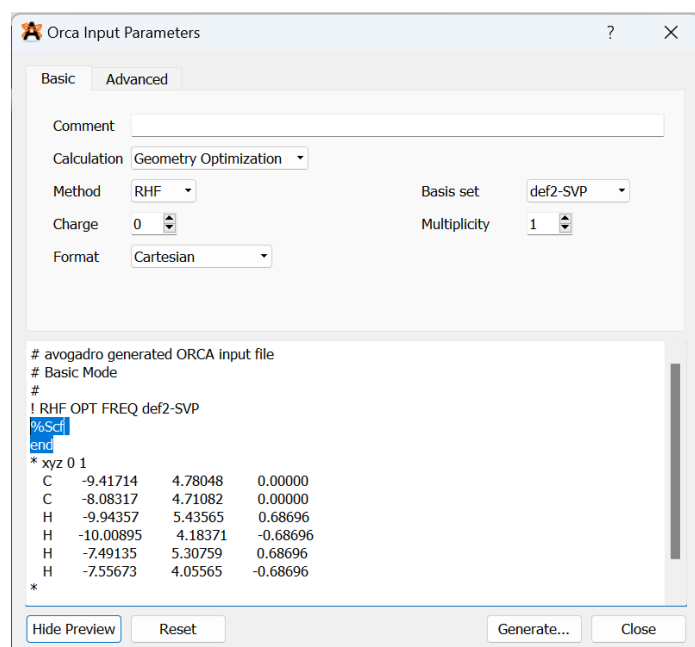
Графическая программа Avogadro позволяет генерировать input-файл для программы квантово-химических расчетов ORCA

Для генерирования input-файла необходимо построить молекулу, предварительно оптимизировав геометрию. Далее нажать «Extensions»-«Orca»-«Generate Orca Input»... В поле под # прописываются различные комментарии, которые не считываются программой ORCA. Ниже необходимо прописать метод, базисный набор и другие различные параметры, необходимые для расчета. Далее автоматически добавляются координаты молекулы. При необходимости можно изменить заряд и мультиплетность системы. Нажав кнопку «Generate», необходимо выбрать папку, в которую сохранится input-файл (по умолчанию – это обычный текстовый файл с расширением .inp).



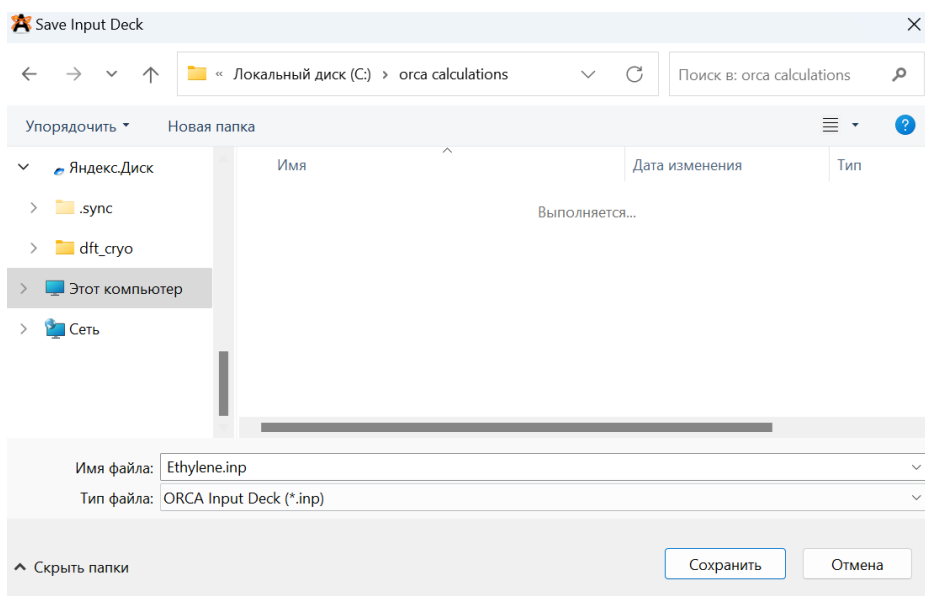


В открывшемся окне нужно выбрать «Geometry Optimizations». В окно ввода текста для необходимо ввести: %Scf end.



Для дальнейшего выполнения работы оптимальным базисным сетом (напротив иконки «Basis set») является def2-SVP, заряд («Charge») для наших систем будет постоянным – 0, мультиплетность («Multiplicity») – 1.

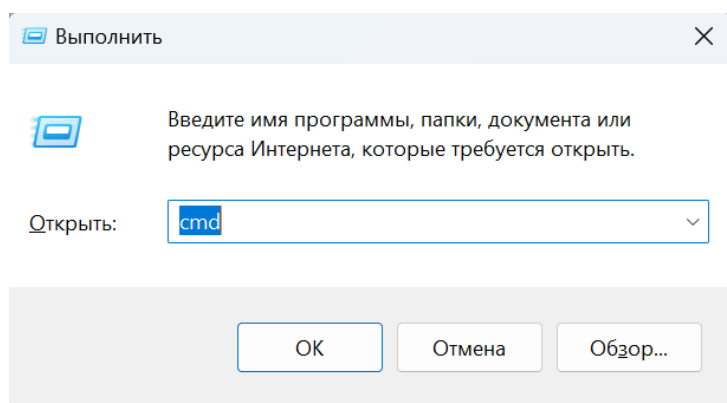
Далее нажимаем на иконку «Generate» и сохраняем файл в выбранной нами папке.



Запуск расчета в ORCA

В приведенном примере с помощью командной строки представлен запуск расчета inp-файла Ethylene.inp, который находится в папке C:\orca calculations. Сформированный out-файл после завершения расчета будет сохранен в этой же папке. После завершения расчета в командной строке появится строка C:\orca>, сигнализируя о том, что можно запустить следующий расчет.

Открываем командную строку комбинацией клавиш Win + R



Прописываем путь к папке, в которой находится наш файл.inp с помощью команды «cd».

```
C:\WINDOWS\system32\cmd.exe
Microsoft Windows [Version 10.0.22631.4317]
(c) Корпорация Майкрософт (Microsoft Corporation). Все права защищены.
C:\Users\VladFilozop>cd C:\orca calculations
C:\orca calculations>_
```

Командой «C:\orca\» запускаем квантово-химический расчет.

```
C:\WINDOWS\system32\cmd.exe
Microsoft Windows [Version 10.0.22631.4317]
(c) Корпорация Майкрософт (Microsoft Corporation). Все права защищены.
C:\Users\VladFilozop>cd C:\orca calculations
C:\orca calculations>C:\Orca\orca Ethylene.inp > Ethylene.out
```

После завершения расчета в командной строке появится строка C:\orca>

```
C:\WINDOWS\system32\cmd.exe
Microsoft Windows [Version 10.0.22631.4317]
(c) Корпорация Майкрософт (Microsoft Corporation). Все права защищены.
C:\Users\VladFilozop>cd C:\orca calculations
C:\orca calculations>C:\Orca\orca Ethylene.inp > Ethylene.out
C:\orca calculations>_
```

Сформированный out-файл находится в той же папке, в которую был сохранен inp-файл.

Этот компьютер > Локальный диск (C:) > orca calculations

Поиск в: orca calculations

Имя	Дата изменения	Тип	Размер
Ethylene.engrad	01.11.2024 0:04	Файл "ENGRAD"	1 КБ
Ethylene.gbvw	01.11.2024 0:04	Файл "GBW"	526 КБ
Ethylene.hess	01.11.2024 0:04	Файл "HESS"	18 КБ
Ethylene.inp	01.11.2024 0:04	Файл "INP"	1 КБ
Ethylene.opt	01.11.2024 0:04	Файл "OPT"	14 КБ
Ethylene.out	01.11.2024 0:04	Файл "OUT"	103 КБ
Ethylene.prop	01.11.2024 0:04	Файл "PROP"	1 КБ
Ethylene.xyz	01.11.2024 0:04	Файл "XYZ"	1 КБ
Ethylene_property.bt	01.11.2024 0:04	Текстовый документ	7 КБ
Ethylene_trj.xyz	01.11.2024 0:04	Файл "XYZ"	2 КБ

Визуализация расчетов

При открытии out -файла через программу Блокнот (или любом другом текстовом редакторе) можно получить некоторую полезную информацию, сгенерированную программой в результате расчета молекулы, используя поиск (ctrl + F), по ключевым словам:

1. VIBRATIONAL FREQUENCIES – колебательные частоты, теоретический ИК-спектр молекулы. Отсутствие мнимых частот (imaginary frequencies) говорит о нахождении молекулы в глобальном или локальном минимуме энергии.

```

-----
VIBRATIONAL FREQUENCIES
-----
Scaling factor for frequencies = 1.00000000 (already applied!)

0:      0.00 cm**-1
1:      0.00 cm**-1
2:      0.00 cm**-1
3:      0.00 cm**-1
4:      0.00 cm**-1
5:      0.00 cm**-1
6:      885.29 cm**-1
7:     1072.64 cm**-1
8:     1098.72 cm**-1
9:     1137.93 cm**-1
10:    1326.49 cm**-1
11:    1463.58 cm**-1
12:    1568.40 cm**-1
13:    1837.78 cm**-1
14:    3287.08 cm**-1
15:    3311.67 cm**-1
16:    3379.28 cm**-1
17:    3402.02 cm**-1

```

2. GIBBS FREE ENERGY – значения рассчитанных термодинамических характеристик: энтальпии, энтропии, энергии Гиббса. Энергия в файле выдается в Хартри. Перевод единиц: 1 Хартри = 27,2 эВ = 627,503 ккал/моль = 2625,5 кДж/моль

```

-----
GIBBS FREE ENERGY
-----

The Gibbs free energy is  $G = H - T \cdot S$ 

Total enthalpy          ...   -77.91990989 Eh
Total entropy correction ...   -0.02477534 Eh   -15.55 kcal/mol
-----
Final Gibbs free energy ...   -77.94468522 Eh

For completeness - the Gibbs free energy minus the electronic energy
G-E(e1)                ...    0.03330748 Eh    20.90 kcal/mol

```

Контрольные вопросы

1. Что изучает квантовая химия и для чего она используется в биотехнологии?
2. Какие основные методы квантовой химии используются для молекулярных расчётов?
3. Что такое метод Хартри-Фока, и в чём его значимость?
4. Какие основные задачи решаются с помощью квантово-химических расчетов?
5. В чём суть метода теории функционала плотности (DFT)?
6. Какой подход к расчёту плотности электронов используется в DFT?
7. Какие типы функционалов DFT применяются для расчётов молекул?
8. В чём преимущества и недостатки метода DFT?
9. Почему учёт дисперсионных взаимодействий важен для моделирования органических молекул?
10. Какую роль играют функционалы B3LYP и PBE в теории функционала плотности?

3.10 Температурные режимы при работе с бактериями

Температура является одним из ключевых факторов, влияющих на рост и развитие бактерий. Разные виды микроорганизмов имеют свои температурные оптимумы, в пределах которых они наиболее активно размножаются и проявляют метаболическую активность. Контроль температуры важен как при культивировании бактерий, так и при их хранении и транспортировке. Соблюдение температурных условий позволяет эффективно контролировать рост микроорганизмов и сохранять их жизнеспособность на длительный срок.

Культивирование микроорганизмов: температурный режим

Для культивирования большинства микроорганизмов в лабораторных условиях используются температуры в диапазоне 20–45°C. Этот диапазон считается оптимальным для роста многих бактерий, особенно тех, которые обитают в организме человека и животных.

Мезофильные виды растут при оптимальной температуре 25–32°C; как правило, минимальной температурой для них является 10°C. Для термофильных видов оптимальная температура роста колеблется в пределах 38–45°C, а минимальная – 20–22°C.

Для поддержания стабильных условий культивирования в лабораториях используются термостаты и инкубаторы — устройства, которые обеспечивают постоянную температуру на протяжении долгого времени. Точность температурного контроля в термостатах и инкубаторах обычно составляет $\pm 0,5^\circ\text{C}$, что позволяет создавать оптимальные условия для роста и развития бактерий.

Охлаждение и хранение биологических образцов

Охлаждение и правильное хранение микробиологических образцов важны для предотвращения их разложения или нежелательного роста микроорганизмов. Для кратковременного хранения или транспортировки используются различные системы охлаждения, в зависимости от требований к температуре.

Хранение при низких температурах

Для хранения бактериальных культур на срок от нескольких дней до нескольких недель обычно применяют холодильники с температурой от +4°C до -18°C. Это позволяет сохранить жизнеспособность бактерий и замедлить их рост.

Для длительного хранения бактериальных культур (от нескольких недель до нескольких месяцев) используются морозильные камеры с температурой от -20°C до -96°C. При таких низких температурах активность ферментов микроорганизмов останавливается, что сохраняет жизнеспособность клеток на длительное время.

Для длительного хранения особо ценных микробиологических образцов, таких как штаммы бактерий или клеточные линии, применяют жидкий азот с температурой -196°C. В таких условиях микроорганизмы и биоматериалы переходят в состояние анабиоза, что позволяет сохранять их годами без повреждений клеточных структур.

Жидкий азот используется не только для хранения, но и для транспортировки образцов, особенно на большие расстояния. Это особенно важно при перевозке чувствительных к температуре бактерий или вирусов, чтобы сохранить их жизнеспособность до момента использования.

Использование охлаждающих смесей и сухого льда

Для поддержания низких температур во время транспортировки могут использоваться специальные охлаждающие смеси и сухой лёд (твёрдая форма углекислого газа с температурой -78,5°C). Сухой лёд часто используется для кратковременной транспортировки образцов при низких температурах, так как он легко испаряется, обеспечивая стабильную среду с температурой значительно ниже 0°C.

Для быстрого охлаждения колбы с бактериальной культурой её можно погружать в баню или химический стакан с охлаждающей смесью. В качестве охлаждающих смесей используют охлажденную воду температурой +5 - +15°C, лед с водой (0°C) или воду со льдом и солью (<-2°C). Вода в охлаждающих смесях необходима для более эффективного охлаждения, так как воздух является плохим проводником тепла. Для эффективного охлаждения рекомендуется использовать колотый (измельченный) лёд.

Для приготовления охлаждающей смеси используют измельченный лёд, который смешивают с солью (например, NaCl) в фарфоровой ступке в соотношении 3:1. При этом воду не добавляют, она образуется в процессе таяния льда.

Составы охлаждающих смесей представлены ниже. Для лучшего сохранения холода рекомендуется размещать охлаждающую жидкость в пенопластовом кожухе. Для приготовления охлаждающих смесей не рекомендуется использовать снег.

Таблица 3.1 – Составы охлаждающих смесей

Вещества	Состав смеси: соль (г) на 100 г льда	Криогидратная точка, минус °C
CaCl ₂ × 6H ₂ O	123	40,3
	150	55,0
	164	39,0
	81	21,5
	41	9,0
NH ₄ NO ₃	45	16,7
NH ₄ Cl	25	15,4
NH ₄ Cl + NaCl	42 + 42	40,0
NH ₄ NO ₃ + NaNO ₃	25 + 55	25,8
(NH ₄) ₂ SO ₄	62	19,0
KCl	30	10,5
C ₂ H ₅ OH + лёд	77 + 73	30,0

Следует соблюдать особую осторожность с охлаждающими смесями, температура которых ниже -20°C. При попадании на кожу такие смеси способны вызывать криожоги. В случае необходимости проведения процессов при экстремально сильном охлаждении (температуры ниже -40°C) необходимо использовать пинцет или щипцы для размещения колбы в термосе. При этом необходимо использовать защитные очки, а для защиты рук необходимо использовать трикотажные перчатки внутри и резиновые сверху.

Контрольные вопросы

1. Почему температура считается ключевым фактором в росте и развитии бактерий?
2. Каковы оптимальные температурные диапазоны для мезофильных и термофильных бактерий?
3. Как поддержание правильной температуры влияет на культивирование и хранение бактерий?
4. Какие типы оборудования обычно используются для регулирования температуры во время культивирования бактерий?
5. Насколько важен контроль температуры для сохранения жизнеспособности бактериальных культур?
6. Опишите рекомендуемые температуры хранения бактериальных культур и обоснование их применения.
7. Какие методы охлаждения можно использовать для краткосрочного хранения или транспортировки образцов микроорганизмов?
8. Как жидкий азот сохраняет жизнеспособность особо ценных микробиологических образцов?
9. Какие меры предосторожности следует соблюдать при работе с охлаждающими смесями и сухим льдом в лаборатории?
10. Какое влияние оказывает температура на метаболическую активность молочнокислых бактерий в процессе ферментации?

3.11 Оборудование мобильной микробиологической лаборатории «КУБ»

Бокс микробиологической безопасности

Бокс микробиологической безопасности, также известный как ламинар, Neoteric предназначен для создания регулируемой и стерильной атмосферы для работы с чистыми культурами, уменьшения риска заражения оператора при работе с патогенными агентами и микроорганизмами, передающимися воздушно-капельным путем, защиты окружающей среды, а также защиты продукта от внешнего загрязнения или перекрёстной контаминации.

В ламинарных боксах обеспечивается стерильность на рабочем месте за счет фильтрации входящего воздуха ламинарными (без завихрений) потоками воздуха внутри рабочей зоны. Синими стрелками обозначены потоки стерильного воздуха, красными – загрязненного, зелеными – внешнего.



Рисунок 3.5 – Бокс микробиологической безопасности

Перед началом работы в ламинаре должна проводиться обработка бокса УФ-излучением в течение 15-30 мин, затем – обработка поверхностей 70 % этанолом.

Для очистки воздуха в ламинарах использует предварительный фильтр, фильтр HEPA (высокоэффективный фильтр для твердых частиц), а иногда и дополнительный фильтр ULPA (воздух со сверхнизкой проникающей способностью). Эти фильтры улавливают и удаляют переносимые по воздуху частицы, включая пыль, бактерии и другие загрязняющие вещества, гарантируя чистоту и контролируемую среду внутри шкафа.

Ход работы

1. Загружать в ламинар необходимо только те предметы, которые необходимы для текущей работы.
2. Располагать предметы необходимо так, чтобы рабочие операции с ними выполнялись в логической последовательности.
3. Заранее разместить в рабочей камере ламинара дезинфекционные средства и салфетки для обработки мест разлива и брызг.
4. Оборудование, при работе которого возможно образование аэрозоля (например, мешалки, настольные центрифуги и т.п.), а также источники дополнительных воздушных потоков следует размещать на максимальном удалении от рабочего проема.

Работа в ламинаре

1. Перед началом работы в ламинаре необходимо плотно закрыть окна и двери помещения и выключить оборудование, способное создать сильные потоки воздуха (кондиционер, вентилятор и т.д.).

2. При перемещении рук внутрь рабочей камеры бокса и из неё движения совершать плавно, перпендикулярно плоскости рабочего проёма.

3. Перед началом любых манипуляций внутри рабочей камеры бокса после внесения рук подождать некоторое время для стабилизации воздушных потоков и обдува рук чистым воздухом.

4. Перед внесением любых предметов в рабочую зону, в том числе рук, необходимо проводить обработку спиртовым или дезинфицирующим раствором.

5. Осуществлять постоянный контроль над тем, чтобы воздухозаборные отверстия в столешнице не были перекрыты рукавами халата, бумагой, снятой упаковкой и/или другими предметами.

Термостат электрический суховоздушный

Термостат электрический суховоздушный используется для бактериологических и серологических исследований. Термостат постепенно выходит на рабочую температуру и с высокой точностью поддерживает её внутри рабочей камеры на протяжении указанного времени. В лабораториях он используется для выращивания и поддержания микробиологических культур или клеточных культур.



Рисунок 3.6 – Термостат электрический суховоздушный

Ход работы

1. Разместить объекты термостатирования на полках камеры и закрыть дверь. Объекты термостатирования следует загружать в таком количестве и таким

образом, чтобы не препятствовать свободному прохождению воздуха к каждому объекту.

2. Включить переключатель «СЕТЬ», при этом на цифровом табло панели управления, находящейся на двери термостата, высвечивается текущая температура в камере термостата. Если заданная температура больше, чем температура в камере, включатся индикатор «НАГРЕВ», находящийся на панели под дверью термостата, и светодиодный индикатор на цифровом табло. Индикаторы сигнализируют о включении нагревателя.

3. При необходимости корректировки программы нажать клавишу «Р», при этом на цифровом табло высветится заданная ранее температура в мигающем режиме, а в крайнем правом разряде цифрового индикатора высветится точка. Установить клавишами «▲» «▼» на панели управления требуемую температуру в рабочей камере, контролируя её по показаниям цифрового табло.

4. Для включения термостата в работу и для записи в память введённой информации нажать клавишу «Р», при этом на цифровом табло высветится текущая температура в камере, а точка в правом разряде цифрового индикатора погаснет.

5. Введенная температура сохраняется в памяти термостата при выключении питания.

6. При включении индикатора «АВАРИЯ», сигнализирующем об аварийном превышении температуры, необходимо выключить термостат и принять меры к устранению неисправностей.

7. Внимание! До выхода на установившийся тепловой режим температура в рабочей камере на непродолжительное время может превышать заданную.

8. При необходимости можно включить освещение камеры (кнопка «СВЕТ» находится на лицевой панели под дверью термостата). Свет включается при принудительном удержании кнопки в нажатом положении.

9. При работе термостата переключатель «ВЕНТ», находящийся под дверью термостата, должен быть включён.

Считыватель микропланшетов MR-96A

Универсальный инструмент для проведения широкого спектра исследований, связанных с анализом биологических образцов, включая исследования бактерий. Данный прибор используется для измерения оптической плотности жидких образцов в лунках микропланшетов, что позволяет проводить количественные анализы бактериального роста, активности ферментов и других биохимических параметров.



Рисунок 3.7 – Считыватель микропланшетов

Работа спектрального оборудования основана на принципах анализа спектра излучения, отражения и пропускания. Зная параметры входного сигнала, излученного источником, и выходного, полученного фотоэлементом, можно провести анализ качественного и количественного состава пробы.

Основы спектрального анализа

Спектральный анализ – это метод изучения вещества на основе его взаимодействия с электромагнитным излучением. Он широко используется для определения состава веществ, изучения их физических и химических свойств. Для работы на спектральном оборудовании важно знать основные понятия, принципы взаимодействия света и материи, а также ключевые формулы, применяемые в этом методе. Электромагнитный спектр охватывает такие виды излучений, как гамма, ультрафиолетовое, видимое, микроволновое, рентгеновское излучение и радиоволны.

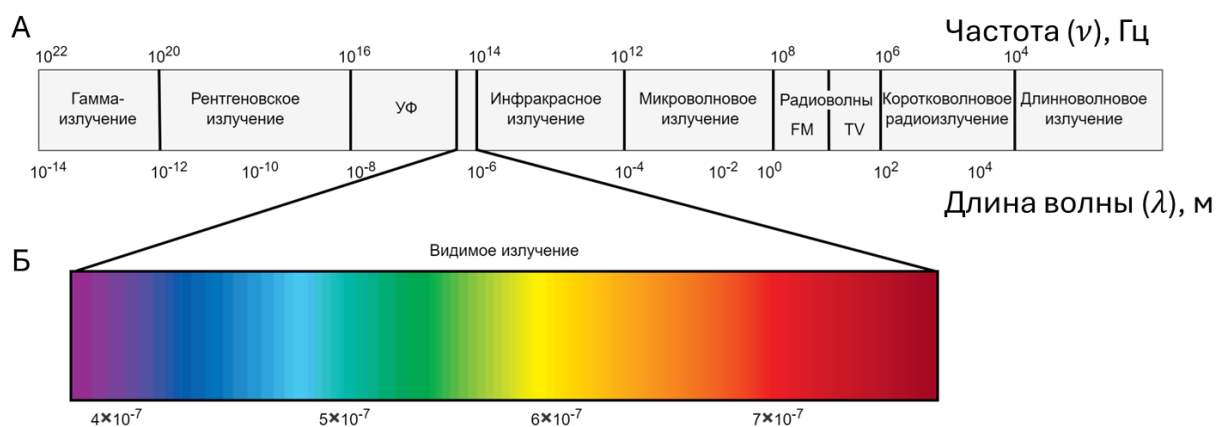


Рисунок 3.8 – А – спектр электромагнитного излучения; Б – спектр видимого света

Спектр – это распределение излучения по длинам волн или частотам. В зависимости от природы взаимодействия вещества со светом спектры делятся на:

- Эмиссионные спектры – спектры излучения вещества (например, при нагреве или возбуждении), образуются, когда атомы или молекулы вещества переходят из возбуждённого состояния в основное, излучая свет. В каждом веществе такой переход уникален, что позволяет определить его состав.
- Абсорбционные спектры – спектры поглощения света веществом. Возникает, когда вещество поглощает свет определённых длин волн, а остальной свет проходит через вещество. Исследуя, какие длины волн поглощаются, можно также определить состав вещества.

Спектральный анализ основывается на взаимодействии вещества с электромагнитным излучением, характеризуемым длиной волны (λ) и частотой (ν). Эти величины связаны через скорость света (c):

$$c = \lambda \nu \quad (1)$$

где $c = 3 \times 10^8$ м/с (скорость света в вакууме), λ – длина волны (в метрах), а ν – частота (в герцах).

Энергия фотона E , которая характеризует квант света, пропорциональна частоте излучения:

$$E = h\nu \quad (2)$$

где $h = 6,626 \times 10^{-34}$ Дж \times с – постоянная Планка, а ν – частота света.

Также, энергию можно выразить через длину волны:

$$E = \frac{hc}{\lambda} \quad (3)$$

Эта формула позволяет рассчитать энергию фотона по известной длине волны и используется для анализа спектров.

Цвет вещества зависит от длины волны поглощенной части спектра. Максимум поглощения характеризуют структуру вещества и могут быть использованы для идентификации.

Таблица 3.2 – Спектр видимого света по длине волны

λ погл. света, нм	Поглощенный свет	Видимый доп. свет
390-435	Фиолетовый	Желто-зеленый
435-480	Синий	Желтый
480-490	Сине-зеленый	Оранжевый
490-500	Зелено-синий	Красный
500-560	Зеленый	Пурпурный
560-580	Желто-зеленый	Фиолетовый
580-595	Желтый	Синий
595-605	Оранжевый	Сине-зеленый
605-730	Красный	Зелено-синий
730-770	Пурпурный	Зеленый

Виды спектрального анализа

1. Ультрафиолетово-видимая спектроскопия (УФ-вид)

Этот метод основан на поглощении или испускании света в диапазоне от ультрафиолетовых до видимых длин волн (от 200 до 800 нм). Это один из наиболее часто используемых методов для анализа органических соединений и концентрации веществ в растворах.

2. Инфракрасная спектроскопия (ИК-спектроскопия)

ИК-спектроскопия используется для изучения поглощения инфракрасного излучения ($\lambda = 2,5-25$ мкм). Она позволяет анализировать вибрационные и вращательные состояния молекул, что особенно полезно для идентификации функциональных групп в органических соединениях.

3. Рентгеновская спектроскопия

При рентгеновской спектроскопии используются высокоэнергетические фотоны (рентгеновское излучение), которые способны выбивать электроны из внутренних оболочек атомов. Этот метод применяется для изучения состава материалов и структурных характеристик кристаллов.

4. Флуоресцентная спектроскопия

Основана на измерении флуоресценции – явления, при котором вещество излучает свет после поглощения фотонов. Флуоресцентная спектроскопия чувствительна к очень малым концентрациям веществ и часто используется в биологии и химии для количественного анализа.

Основные формулы для работы на спектральном оборудовании

Закон Бугера-Ламберта-Бера описывает зависимость между интенсивностью света, проходящего через вещество, и его концентрацией. Он широко применяется

в спектроскопии для количественного анализа веществ, основываясь на их способности поглощать свет при определённой длине волны.

Закон утверждает, что количество света, поглощённого веществом, зависит от трёх факторов:

1. Концентрации вещества (c), через которое проходит свет.
2. Толщины слоя вещества (l), через которое проходит свет (так называемая длина оптического пути).
3. Молярного коэффициента поглощения (ε), который является характеристикой вещества и зависит от длины волны света.

Математическая формулировка закона:

$$A = \varepsilon lc \quad (4)$$

A – оптическая плотность (поглощение), безразмерная величина.

Оптическая плотность (A) — это мера того, сколько света поглощается раствором. Она связана с интенсивностью падающего света (I_0) и интенсивностью света после прохождения через раствор (I):

$$A = \log \frac{I_0}{I} \quad (5)$$

Чем выше оптическая плотность, тем больше света поглощается веществом.

Молярный коэффициент поглощения (ε) зависит от природы вещества и длины волны света. Для каждого вещества при каждой длине волны это значение уникально, что позволяет использовать спектроскопию для качественного и количественного анализа.

Закон Бугера-Ламберта-Бера применяется в УФ-видимой спектроскопии для анализа растворов. Он позволяет определить концентрацию вещества в растворе, измерив поглощение света на определённой длине волны.

Однако существует ограничение закона, которое заключается в следующем:

1. Закон справедлив только для монохроматического света, то есть для излучения одной длины волны. В случае использования полихроматического света (нескольких длин волн) результат может быть искажён.

2. Закон действует при низких концентрациях раствора, то есть при оптической плотности не выше 0,9, так как при высоких концентрациях возможны взаимодействия между молекулами, влияющие на поглощение света.

Микроскоп Микромед

Микроскоп предназначен для наблюдения и морфологических исследований препаратов в проходящем свете по методу светлого поля, а также по методу темного поля, фазового контраста и простой поляризации.



Рисунок 3.9 – Микроскоп Микромед

В проходящем свете исследования могут проводиться по методу светлого поля, фазового контраста и люминесценции. Толщина объекта исследования не играет роли, так как перевернутая конструкция микроскопа (освещение объекта сверху, наблюдение – снизу) позволяет исследовать габаритные объекты или объекты, расположенные в специальной посуде (чашках Петри, колбах и т.п.) Осветительная система микроскопа рассчитана для работы с лабораторной посудой высотой до 70 мм. Объективы микроскопа планахроматической коррекции имеют увеличенный рабочий отрезок, что позволяет просматривать объекты в лабораторной посуде с толщиной дна до 1,5 мм.

В исследованиях микроорганизмов, а также клеток животных, растений широко используются различные методы микроскопии. Основные из них – это метод светлого поля, метод темного поля и фазово-контрастная микроскопия. Каждый из этих методов имеет свои особенности и применяется для решения определённых научных задач.

- Метод светлого поля – это один из самых простых и распространённых методов микроскопии. Он основан на использовании света, проходящего через объект. Этот метод часто применяют для исследования окрашенных клеток и тканей, которые хорошо различимы на светлом фоне.

Принцип работы: свет проходит через образец, который находится на прозрачном предметном стекле. Если объект непрозрачен или окрашен, то он будет поглощать свет и создаст контрастное изображение на светлом фоне. Изображение получается путём регистрации неравномерного распределения света, прошедшего через разные участки объекта.

- Метод темного поля – это микроскопический метод, позволяющий наблюдать прозрачные и неокрашенные объекты на тёмном фоне. Этот метод

повышает контраст изображения и подходит для исследования мелких объектов, невидимых в обычном светлом поле. Метод используется для наблюдения неокрашенных и живых клеток животных и растений. Например, можно наблюдать подвижность и форму клеток в их естественном состоянии.

Принцип работы: свет направляется на образец под углом, и лишь свет, рассеянный или дифрагированный объектом, попадает в объектив микроскопа. В результате сам объект светится на чёрном или очень тёмном фоне.

- Фазово-контрастная микроскопия – это метод, который позволяет изучать неокрашенные и живые клетки без необходимости применения красителей. Он основан на преобразовании разностей в фазах света (которые возникают при прохождении через различные участки объекта) в различия в интенсивности света. В микробиологии этот метод активно используется для исследования живых бактерий, их формы, структуры, подвижности и взаимодействий. Он позволяет наблюдать процессы роста, деления и других важных клеточных изменений в реальном времени.

Принцип работы: при прохождении света через объект изменяется его фаза в зависимости от толщины и плотности участков объекта. Специальная система в микроскопе преобразует эти фазовые сдвиги в видимый контраст, что позволяет наблюдать тонкие прозрачные структуры, которые невидимы в обычном светлом поле.

Автоклав настольный

Автоклав – это устройство для стерилизации инструментов, посуды, питательных сред и других материалов с использованием насыщенного пара под давлением. В микробиологии автоклавирование — один из ключевых методов для уничтожения всех форм микроорганизмов, включая бактерии, вирусы, грибки и их споры.



Рисунок 3.10 – Автоклав настольный

Автоклав работает на основе комбинированного действия высокого давления и температуры. Основные этапы стерилизации в автоклаве:

1. Заполнение камеры паром: при запуске автоклава в его камеру подаётся насыщенный водяной пар под давлением. Пар проникает в каждую часть материалов, создавая необходимую температуру для уничтожения микроорганизмов.

2. Повышение давления и температуры: типично температура в автоклаве достигает 121°C при давлении 1,1-1,3 атм (15-18 psi). Это стандартные параметры для стерилизации. В таких условиях большинство патогенных микроорганизмов и спор уничтожаются за 15-20 минут.

3. Поддержание заданной температуры: в течение определённого времени (от 15 до 60 минут в зависимости от типа материала) автоклав поддерживает заданную температуру и давление для полного уничтожения всех микроорганизмов.

4. Медленное снижение давления и охлаждение: после завершения стерилизации автоклав медленно снижает давление, давая материалам остыть. Быстрое снижение давления может вызвать разрыв контейнеров или порчу материалов.

Применение автоклава в микробиологии

1. Стерилизация питательных сред: для культивирования микроорганизмов необходимы стерильные питательные среды, чтобы предотвратить заражение сторонними микробами. Автоклав используется для стерилизации жидких и твёрдых питательных сред перед их разливом в стерильные контейнеры.

2. Стерилизация лабораторного оборудования: лабораторная посуда, стеклянные пипетки, колбы, чашки Петри и другие материалы автоклавируются для предотвращения микробного загрязнения. В микробиологии используется как стеклянная, так и пластиковая посуда, совместимая с автоклавированием.

3. Утилизация биологических отходов: в лабораториях, работающих с микроорганизмами, автоклав используется для обеззараживания биологических отходов и загрязнённых материалов перед их утилизацией. Это предотвращает распространение патогенных микроорганизмов в окружающую среду.

4. Стерилизация жидкостей: автоклавирование часто применяется для стерилизации растворов, таких как буферы, водные растворы химических веществ и питательных сред, которые необходимы для микробиологических исследований.

Прецизионные весы

Лабораторные весы – это приборы, предназначенные для точного измерения массы различных материалов с минимальной погрешностью. Они широко применяются в научных, исследовательских и промышленно-лабораторных целях для работы с твёрдыми телами, сыпучими веществами и жидкостями. В

лабораториях используются только цифровые весы, так как с 2001 года использование механических моделей для лабораторных измерений запрещено.



Рисунок 3.11 – Весы лабораторные

Лабораторные весы различаются по типам и уровню точности. Основные виды весов:

- Аналитические весы – это наиболее точные весы, используемые для измерения массы с высокой точностью до тысячных долей грамма. Часто применяются в химии и биохимии для точного взвешивания малых количеств веществ.
- Лабораторные весы – широко применяются для общелабораторных задач с точностью измерений до сотых долей грамма. Подходят для повседневного использования в химических лабораториях.
- Технохимические весы – используются в промышленности и лабораториях, где необходима высокая точность, но не на уровне аналитических весов. Эти весы применяются для анализа химических веществ в большем масштабе, чем аналитические.
- Технические/бытовые весы – менее точные весы, которые могут использоваться для простых лабораторных или бытовых измерений. Точность таких весов значительно ниже по сравнению с аналитическими или лабораторными.

Точное взвешивание – ключевой аспект работы с химическими веществами в лаборатории. Для получения достоверных результатов необходимо соблюдать следующие правила:

1. Вещества необходимо взвешивать в специальной таре, которая должна быть чистой, сухой и легкой. Для уменьшения погрешности масса тары должна быть сопоставима или меньше массы взвешиваемого вещества. Сначала на весы

помещают тару, измеряют её массу, затем добавляют вещество и снова измеряют массу, вычитая массу тары для получения чистого веса вещества.

2. Запрещено взвешивать мокрые и горячие вещества, так как они могут исказить результаты взвешивания. Мокрые вещества могут вызвать конденсацию на весах, что повлияет на точность измерений, а горячие образцы могут создавать воздушные потоки, нарушая показания.

3. Важно проводить взвешивание в условиях стабильной температуры и отсутствия сквозняков, так как даже небольшие воздушные потоки могут повлиять на точность результатов. Лучше всего взвешивать вещества в закрытой кабине весов, которая минимизирует влияние внешних факторов.

4. Поверхность весов и тара должны быть сухими и чистыми. Загрязнение весов пылью или остатками других веществ может привести к неточным результатам.

5. Каждый тип весов имеет предельную допустимую массу для взвешивания. Превышение этой массы может повредить оборудование и привести к неправильным результатам.

6. Перед каждым измерением весы необходимо откалибровать и обнулить, чтобы учесть массу тары или другого контейнера, в котором будет взвешиваться вещество.

Дозатор

Дозатор – это устройство, используемое для точного дозирования жидкостей и суспензий клеток в лабораториях. Работа с дозатором осуществляется при использовании стерильных наконечников.



Рисунок 3.12 – Дозатор одноканальный

Принцип работы дозатора основан на создании в съёмном наконечнике вакуума и избыточного давления. При создании вакуума происходит втягивание жидкости в наконечник, а при избыточном давлении – её сброс.

Наконечники следует подбирать под размер посадочного места на дозаторе, контролируя герметичность. Наконечники изготовлены из полипропилена, который выдерживает автоклавирование при 121 °С.

Механические дозаторы могут иметь 1, 8, 12 или 16 каналов. В микробиологической лаборатории пипет-дозаторы должны быть частично или полностью автоклавируемы.

Порядок работы

1. Установить требуемый объем дозы вращением головки плунжера (Плунжер — это компонент устройства, который отвечает за точное измерение и передачу заданного объема жидкости или газа. Он представляет собой цилиндрическую деталь, которая перемещается внутри корпуса дозатора и позволяет контролировать объем отбираемой или выдаваемой жидкости). На цифровом индикаторе, расположенном на ручке дозатора, отображается выбранный объем. Для увеличения объёма повернуть головку плунжера по часовой стрелке, для уменьшения - против часовой стрелки.

Внимание: не допускается установка значений объёма дозы, выходящих за нормативный диапазон дозатора.

2. Для максимального удобства и эффективности в работе держать дозатор так, чтобы указательный палец опирался на упор дозатора. При всасывании жидкости в наконечник держать дозатор в вертикальном положении (максимальное допустимое отклонение от вертикали – 10°).

3. Отбор и дозировку осуществлять, непосредственно оперируя головкой плунжера.

Внимание: для точной и аккуратной работы с дозатором необходимо нажимать и отпускать головку медленно, особенно при работе с жидкостями с высокой вязкостью. До начала работы с новым наконечником смочить его той жидкостью, которая подлежит дозировке. Для этого набрать и выпустить жидкость несколько раз.

Два способа дозирования веществ

1. *Прямой способ дозирования.* Нажать на головку плунжера дозатора большим пальцем до первой остановки, затем осторожно погрузить наконечник дозатора в раствор на глубину 3-5 мм и медленно освободить плунжер. Нужный объем жидкости находится в наконечнике.

2. *Обратный способ дозирования.* Нажать на головку плунжера большим пальцем до упора, затем погрузить наконечник в раствор на 3-5 мм и медленно освободить плунжер. Наконечник заполнен. После этого медленно нажать на головку плунжера до первой остановки. Часть жидкости остаётся в наконечнике. Оставшаяся жидкость выливается в сосуд для реактива или в отходы путём нажатия головки плунжера до второй остановки, то есть до упора.

Обратный способ дозирования рекомендуется применять в следующих случаях:

- при работе с легковоспламеняющимися жидкостями;

- при работе с растворами большой вязкости;
- для дозирования маленьких объёмов (до 25 мкл).

Проверка и калибровка пипет-дозатора

Дозатор необходимо периодически очищать, заменять фильтр на входе, проверять и калибровать. Для проверки следует выставить максимальный допустимый объём, установить на весах стакан, оттарировать. Затем налить последовательно 10 проб дистиллированной воды комнатной температуры. Если любая из проб отличается по массе от предыдущей более, чем на 5%, измерения необходимо проводить заново.

Так как дозатор откалиброван при комнатной температуре, воду более низкой и более высокой температуры использовать нельзя, так как у них будет разная плотность.

Если суммарная масса 10 проб отличается от расчетной более, чем на 1%, измерения следует повторить. При повторении ошибки пометить дозатор как неточный и откалибровать.

Практика использования дозаторов

Практика использования дозаторов, особенно при работе с малыми объемами, является важным аспектом в различных лабораторных процессах. Одним из эффективных методов обучения работе с дозатором является выполнение упражнений по заполнению трафаретов необходимым объемом. Это позволяет пользователю ознакомиться с принципом работы дозатора, а также отработать навык точного дозирования. Такие упражнения помогают понять, как правильно набирать и выпускать жидкость, как учитывать вязкость вещества и как минимизировать потери при переносе.

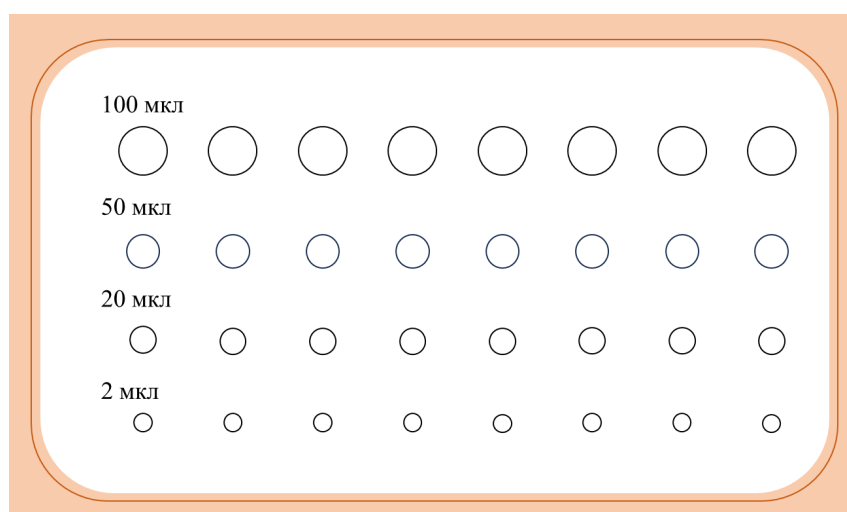


Рисунок 3.13 – Практическое упражнения по использованию дозатора в лаборатории

Практика с трафаретами способствует развитию моторики и координации, что особенно важно при работе с малыми объемами, где даже небольшая ошибка может привести к значительным отклонениям в результатах. Кроме того, регулярные упражнения помогают пользователю привыкнуть к особенностям конкретной модели дозатора

Запрещается переворачивать дозатор, когда отобранная жидкость находится в наконечнике. Нельзя допускать попадания растворов внутрь дозатора, это ведёт к его порче. Обязательно менять наконечник при переходе от одного раствора к другому. Не направлять конус кончика наконечника на себя или на других людей. Хранить дозатор следует в вертикальном положении.

Контрольные вопросы

1. Какова основная функция бокса микробиологической безопасности в мобильной микробиологической лаборатории?
2. Какие меры принимаются для обеспечения стерильности внутри ламинарного бокса?
3. Какова роль термостата электрического суховоздушного в лаборатории?
4. Почему важно использовать стерильные расходные материалы и реактивы в мобильной лаборатории?
5. Какие виды посуды применяются в мобильной микробиологической лаборатории и для чего они предназначены?
6. Какую опасность представляют охлаждающие смеси и сухой лед при работе в лаборатории?
7. Как организуется работа в ламинарном боксе для предотвращения перекрестной контаминации?
8. Почему важно соблюдать протоколы безопасности при работе с биологическими образцами?

4. ОБРАБОТКА И ПРЕДСТАВЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Обработка и представление результатов являются ключевыми этапами любого научного исследования, будь то в области химии, физики или социальных наук. Математическая обработка данных позволяет не только извлечь значимые выводы из экспериментов, но и подтвердить надежность и воспроизводимость полученных результатов. Статистическая проверка данных является неотъемлемой частью обработки результатов. Она включает в себя анализ разброса данных, проверку на наличие выбросов и оценку достоверности полученных результатов. При значительных различиях между экспериментальными данными возможно нарушение условий эксперимента или наличие ошибок в измерениях. В таких случаях необходимо провести дополнительный анализ или повторить эксперимент для подтверждения полученных данных.

Представление результатов также играет важную роль, так как от этого зависит, насколько ясно и убедительно будет донесена информация до научного сообщества. Графики, таблицы и диаграммы помогают визуализировать данные и делают их более доступными для интерпретации. Правильное оформление и структурирование представленных данных способствует лучшему пониманию и восприятию результатов исследования.

В химии, например, важным аспектом является расчет выхода реакции при заданных условиях. Это позволяет оценить эффективность процесса и оптимизировать условия для достижения максимального выхода продукта. Кроме того, обработка данных приборов, таких как спектры, хроматограммы или вольтамперные кривые, требует тщательного анализа для извлечения полезной информации о структуре вещества, его концентрации или кинетике реакции.

Обработка данных в микробиологии и биотехнологии играет важную роль в интерпретации результатов исследований и разработке новых технологий. Эти области науки часто работают с большими объемами данных, полученными из экспериментов.

Главным результатом измерений является аналитический сигнал – измеряемый отклик системы на внешний стимул или изменение условия.

Важная характеристика любых данных – погрешность. Различают абсолютную (выраженную в тех же единицах, что и искомая величина) и относительную (выраженную в процентах) погрешность.

По характеру появления погрешность:

- случайная (приборный «выброс»)
- систематическая.

Для минимизации ошибок проводят:

- параллельные опыты (один и тот же образец готовят для анализа и анализируют несколько раз)

- контрольные опыты (подготавливают заранее известный контрольный образец, который даст определенный аналитический сигнал) измерения.

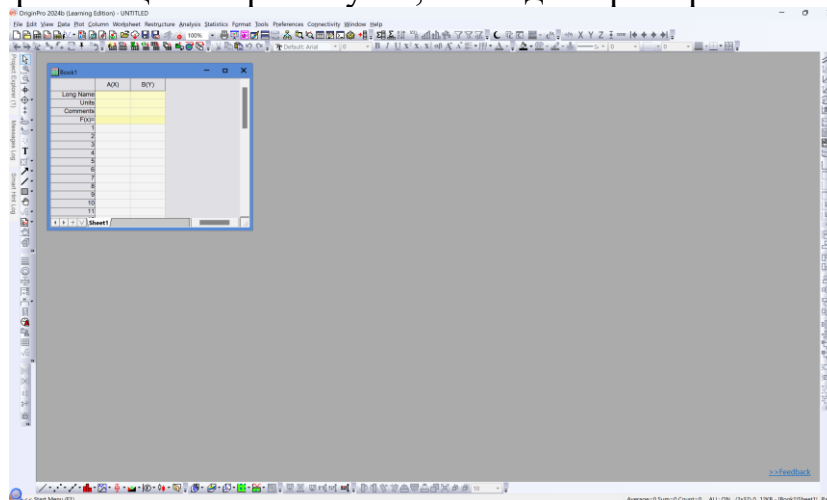
Обработка и интерпретация аналитических сигналов требуют использования статистических методов и программного обеспечения для анализа данных, чтобы обеспечить точность и надежность результатов. Эти данные помогают принимать обоснованные решения в исследованиях и промышленной практике.

Для проведения качественного анализа результатов в микробиологических и биотехнологических исследованиях крайне важно правильно фиксировать все данные. Когда осуществляется синтез или культивирование, необходимо тщательно записывать в лабораторном журнале все входные и выходные параметры эксперимента. Это включает в себя такие детали, как концентрации реагентов, условия инкубации, время проведения эксперимента и полученные результаты. Такая документация обеспечивает возможность воспроизведения эксперимента и анализа любых отклонений. Если исследование проводится с использованием приборов, часто существует возможность скачать выходные данные в цифровом формате. Однако важно следить за тем, как называются файлы и как идентифицируются эксперименты. Рекомендуется вести параллельную запись в лабораторном журнале, указывая номер и название каждого файла. Это позволяет избежать путаницы и облегчает последующий анализ данных.

После сбора данных часто требуется построение графиков и их обработка на компьютере. Для этого используются программы, такие как MS Excel, OriginPro, LibreOffice и другие. Эти инструменты позволяют визуализировать результаты, проводить статистический анализ и выявлять тенденции. Правильная организация данных и использование соответствующего программного обеспечения значительно упрощают интерпретацию результатов и принятие обоснованных научных решений.

4.1 Обработка данных в OriginPro

Окно, открывающееся при запуске, выглядит примерно так:



- Таблица необходима для построения графика по точкам.
- Столбцы A(X) и B(Y) – для координат точек по оси X и Y соответственно.

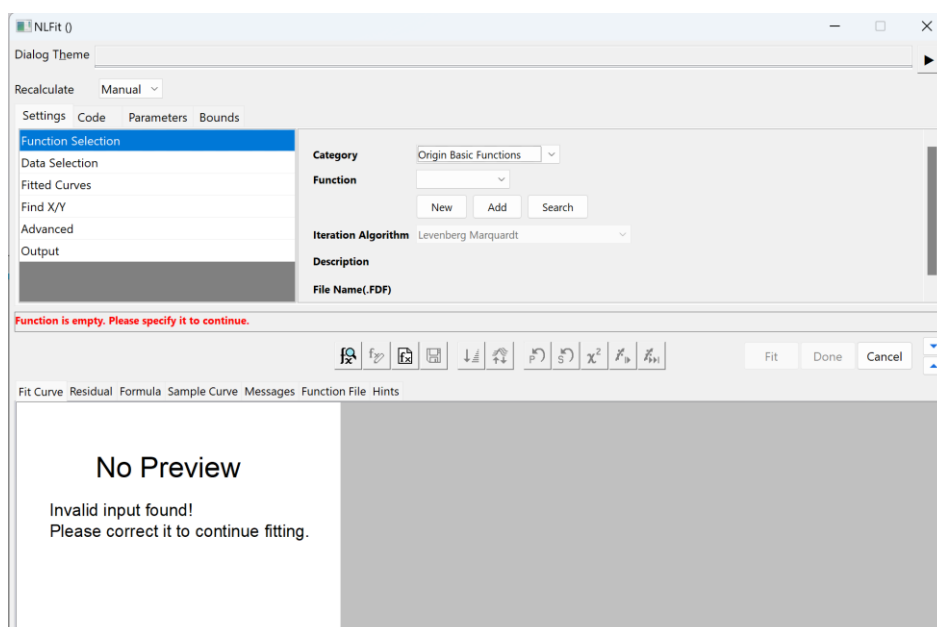
При этом непосредственно точки должны располагаться в пронумерованных строках. Строка “Long Name” содержит в себе названия осей (будут располагаться по центру осей с внешней от графика стороны). Информация из полей строки “Units” будет расположена в скобках сразу после названия осей. Данные из ячейки на пересечении строки Comments и столбца B(Y) появятся в небольшой рамочке над графиком. Стоит отметить, что если не ввести что-нибудь в поля “Long Name” и поле “Comments” в столбце B(Y), то они заполнятся автоматически. Заполнять названия стоит только на английском.

После введения данных их нужно нанести на график. Для этого проще всего выделить таблицу с нашими точками и нажать на одну из кнопок снизу: Line, Scatter, Line+Symbol.

- При выборе графиков «Только линия» и «Линия и точки» график будет представлять собой ломаную. Поэтому рекомендуется выбирать вариант «Только точки» и впоследствии добавлять аппроксимированную кривую. Исключением служат случаи, когда все добавленные точки лежат на одной прямой или очень близки к этому.

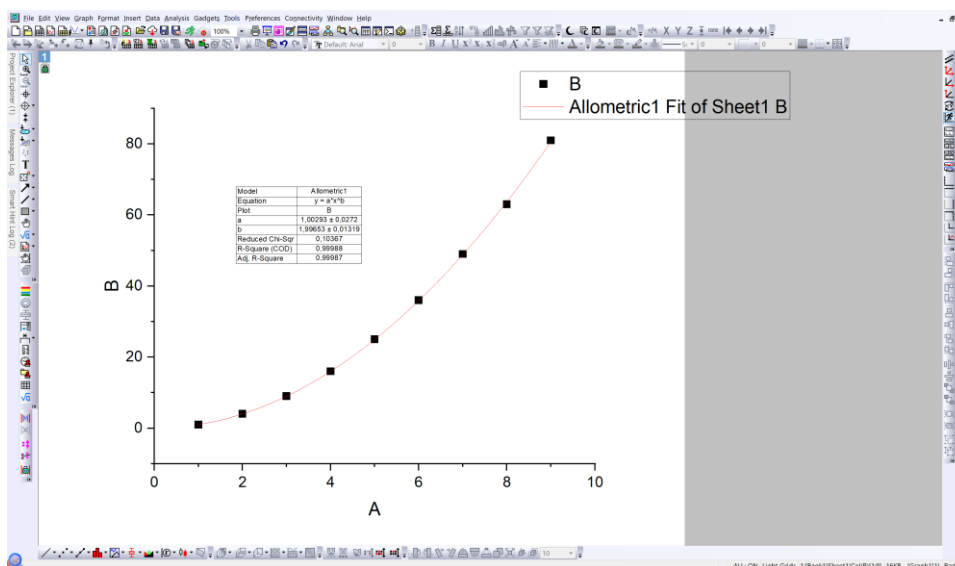
Теперь можно построить аппроксимированную кривую. В двух словах, это наиболее близкая к данным точкам кривая, описываемая функцией. Для этого необходимо сделать следующее:

- Зайти в Меню -> Analysis -> Fitting -> Nonlinear Curve Fit (Или нажать Ctrl + Y). Откроется такое окно:



- В Category выбираем «семейство» нужных функций, потом саму функцию. (следующий раскрывающийся список). После выбора функции можно открыть вкладку Formula, что позволит увидеть формулу для аппроксимации выбранной функции. Программа подбирает коэффициенты самостоятельно. После выбора подходящей функции нажимает кнопку Fit. Откроется окно с аппроксимированным графиком и таблицей. Она содержит цвет кривой аппроксимации и название выбранной формулы.

- В таблице строка Equation – формула выбранной функции.
- Adj. R-Square – коэффициент достоверности аппроксимации. Чем ближе коэффициент к единице – тем лучше.



- Чтобы отметить на графике погрешности, нужно создать еще 2 столбца для значений погрешностей. Для этого щелкнуть правой кнопкой мыши рядом со столбцами с координатами точек и выбрать пункт “Add new column”.

- Теперь нужно сообщить программе о том, что это именно погрешности, а не ещё одни координаты точек графика. Для этого выделяем столбец и нажимаем правая кнопка мыши -> Set As -> X Error (Или Y Error).

- Для настроек отображения графика нужно щелкнуть правой кнопкой мыши по пустому пространству внутри графика и выбрать пункт “Axis...”. Откроется новое окно.

- Подокно Scale отвечает за настройки масштаба. Поля “From” и “To” отвечают за то, с какого числа на оси начинается видимая часть графика.

- Поле “Type” задает тип шкалы на оси. По умолчанию это обычный, линейный тип. Однако бывают случаи, когда удобнее использовать логарифмический масштаб.

- Поле “Increment” определяет масштаб оси, задавая числовой промежуток между основными координатными отметками.

- Поле “# Minor Ticks” показывает, сколько маленьких штрихов будет между главными координатными штрихами. Поле “First Tick” показывает, с какой точки начинается ось. Причем, если эта точка попадает на маленький координатный штрих, то все маленькие координатные штрихи становятся большими и подписываются. Большие штрихи соответственно становятся маленькими.

- Подокно Title&Format:

В поле “Title” по умолчанию находится надпись вида %(?X) (или %(?Y), в зависимости от оси). Вместо этой строки над осью Origin выводится информация, которую система считает необходимой. Проще всего не искать что, как и откуда это получается, а просто вручную задать необходимую подпись. Поля “Major Ticks” и “Minor Ticks” задают ориентацию координатных штрихов. Аналогичные действия совершаем для второй оси.

- Подокно Grid lines:

Здесь задаем координатную сетку. Ставим галочки для отрисовки линий, соответствующие главным координатным штрихам (Major Grids) и маленьким координатным штрихам (Minor Grids). Ниже задаем цвет, форму и толщину линий.

- Подокно Custom Tick Labels:

Когда обе оси начинаются с какой-либо одной цифры (например – с нуля), необходимо убрать одно из таких чисел. Для этого нужно отметить пункт “Hide” в строчке “At Axis Begin”.

4.2 Основные понятия научно-исследовательской работы

Научно-исследовательские работы считаются завершенными или переходят на следующий этап, как правило, после публикации их результатов в научных журналах либо представления на конгрессах, конференциях и других научных мероприятиях. Публикация и презентация результатов являются важными этапами в научной деятельности.

Научно-исследовательские работы могут быть различного типа, в зависимости от целей, методов и контекста их выполнения. Основные типы научных работ:

- Теоретические исследования – основное внимание уделяется разработке новых теорий, моделей и концепций, включая анализ существующей литературы и создание новых гипотез. В таких исследованиях не предполагают проведения эмпирических экспериментов.
- Эмпирические исследования – основаны на сборе и анализе данных из реального мира, как правило, включают эксперименты, наблюдения, опросы и другие методы сбора данных. Цель – проверка гипотез и получение практических результатов.
- Прикладные исследования – направлены на решение конкретных практических задач. Результаты, полученные в ходе прикладных

исследований, применимы в промышленности, медицине, образовании и других сферах. Часто требуют тесного взаимодействия с практиками и специалистами в соответствующей области.

- Фундаментальные исследования – ориентированы на получение новых знаний без непосредственной привязки к практическому применению. Как правило, исследуют основные законы природы, общества и могут стать основой для будущих прикладных исследований.
- Обзорные работы – систематический анализ и обобщение существующих исследований по определенной теме. Такие работы помогают выявить тенденции, пробелы и перспективы в изучаемой области. Часто служат основой для дальнейших исследований.

Все виды исследования могут быть представлены в следующих материалах:

- Доклады и тезисы – краткие и полные формы представления результатов научных исследований на конференциях, симпозиумах, конгрессах и тд. Доклады содержат основные результаты и выводы исследования, в то время, как Тезисы — это краткие резюме докладов, которые публикуются в сборниках материалов конференций. Они дают общее представление о сути исследования и его основных выводах.
- Реферат – это краткий обзор научной работы или нескольких работ на заданную тему. Он включает в себя анализ и обобщение существующих исследований, что помогает понять текущее состояние изучаемого вопроса.
- Научная статья – это подробный отчет о проведенном исследовании, включающий постановку проблемы, методологию, результаты и их обсуждение. Публикация статьи в рецензируемом журнале является важным этапом в научной деятельности.
- Гранты – это финансовая поддержка, предоставляемая исследователям для проведения научных исследований. Получение гранта требует подготовки заявки, в которой описываются цели исследования, методология и ожидаемые результаты.
- Учебник – это систематизированные знания по определенной дисциплине. Он предназначен для использования в образовательных учреждениях и помогает школьникам и студентам освоить предмет.
- Монография – это научная книга, посвященная одной теме или проблеме. Она представляет собой углубленное исследование, часто включающее оригинальные результаты автора.
- Презентации – используются для визуального представления информации перед аудиторией. Они помогают структурировать материал и делают его более доступным для восприятия.
- Внедрение – это процесс применения результатов научных исследований на практике. Это может включать разработку новых технологий, методов или

продуктов, которые улучшают существующие процессы или решают конкретные проблемы.

- Патенты и свидетельства – это юридические документы, которые защищают изобретения и дают их владельцу исключительные права на использование и коммерциализацию. Свидетельства могут относиться к регистрации авторских прав или товарных знаков, защищая интеллектуальную собственность автора.

4.3 Оформление работы

Правильное оформление научной работы не только улучшает восприятие материала читателями, но и повышает шансы на успешную публикацию в научных журналах. К сожалению, не существует единых требований к оформлению. Каждое издательство может устанавливать свои правила оформления работ. Основные элементы оформления научной работы включают:

- Название. Должно быть кратким, информативным и отражать суть проведенного исследования. Хорошее название привлекает внимание и дает представление о содержании работы.
- Авторы. Перечисляются все авторы, участвовавшие в исследовании, включая руководителя. Обычно указывается их аффилиация (организация, в которой они работают или учатся). Также указывается контактное лицо, с которым можно связаться в случае необходимости.
- Аннотация. Краткое резюме работы, обычно объемом 150-250 слов. Аннотация должна содержать цель исследования, основные методы, ключевые результаты и заключение.
- Ключевые слова. Несколько слов или фраз (обычно 3-10), которые помогают индексировать работу для поисковых систем и облегчить ее нахождение потенциальными читателями.
- Введение. Описывает контекст и актуальность исследования, формулирует исследовательскую проблему и цели работы, отражает предыдущие результаты по теме исследования. Введение должно подвести читателя к основным вопросам, которые рассматриваются в исследовании.
- Материалы и методы. Подробное описание использованных материалов и методов проведения исследования. Этот раздел должен быть достаточно детализированным, чтобы другой исследователь мог воспроизвести эксперимент.
- Результаты и обсуждение. Представление полученных данных с их анализом. В этом разделе сравниваются результаты с предыдущими исследованиями, обсуждаются их значение и возможные объяснения.

- Выводы/Заключение. Краткое изложение основных выводов исследования. Может включать рекомендации для дальнейших исследований или практического применения результатов.
- Благодарности. Упоминание лиц и организаций, оказавших помощь в проведении исследования или подготовке работы.
- Список литературы. Перечень всех источников, на которые были сделаны ссылки в работе. Оформление списка литературы должно соответствовать требованиям конкретного издания или стандарта (например, APA, MLA, Chicago).
- Дополнительные материалы (если есть). Включают таблицы, графики, фотографии или другие данные, которые дополняют текст основной части работы. Часто размещаются в приложениях.

Контрольные вопросы

- 1 Почему обработка данных является ключевым этапом научного исследования?
- 2 Какие основные методы статистической проверки данных используются в обработке результатов?
- 3 Какова роль графиков и таблиц в представлении научных данных?
- 4 Какие ошибки могут возникнуть при анализе данных и как их можно минимизировать?
- 5 Почему важно фиксировать все параметры эксперимента в лабораторном журнале?
- 6 Какие программы могут быть использованы для обработки и визуализации данных?
- 7 Каковы основные типы научных работ, и чем они отличаются друг от друга?
- 8 Какие материалы представляют результаты научных исследований на конференциях?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 1

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ. МОРФОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Цель работы: изучить методы исследования микроорганизмов, исследовать морфологию молочнокислых бактерий, ознакомиться с техникой микроскопирования и методами их культивирования на различных питательных средах, таких как чашки Петри и скошенный агар.

Материалы и оборудование:

1. Культуры молочнокислых бактерий (*Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* и другие).
2. Питательные среды:
 - МРС-агар (для культивирования молочнокислых бактерий);
 - Скошенный агар;
 - Чашки Петри с агаром.
3. Микроскоп с иммерсионным объективом.
4. Предметные и покровные стекла.
5. Красители: метиленовый синий.
6. Лупа или стереомикроскоп (для осмотра колоний).
7. Инструменты: бактериологическая петля, шпатели, пинцеты.
8. Паяльная или спиртовая горелка (для стерилизации).
9. Препараты для фиксации и окрашивания бактерий (этанол 96%, водный раствор красителей).
10. Инкубатор с поддержанием температуры 30-37°C.

Теоретические основы:

Молочнокислые бактерии играют важную роль в производстве продуктов питания, таких как йогурты, сыры и квашеные продукты. Они производят молочную кислоту в процессе ферментации углеводов, что обуславливает снижение pH и подавление роста патогенной микрофлоры.

Морфология: Молочнокислые бактерии имеют разнообразную морфологию. Большинство из них представлены кокками или палочками [1,2].

- **Кокки** (круглые клетки) могут формировать цепочки или кластерные структуры. Пример – *Streptococcus lactis*.
- **Палочки** – продолговатые клетки, часто встречаются у рода *Lactobacillus*.

Ход работы:

1. *Подготовка к работе:*

- Провести дезинфекцию рабочего стола и инструментов. Подготовить бактериологические петли, обработав их пламенем горелки.
- Надеть лабораторный халат, перчатки, защитные очки.
- Стерилизовать предметные стекла и приготовить все необходимые материалы.

2. *Культивирование молочнокислых бактерий на различных средах:*

Культивирование на чашках Петри:

- Возьмите чашки Петри с питательным агаром и нанесите на поверхность бактериологической петлей пробу культуры молочнокислых бактерий. Распределите материал равномерно по поверхности (секторным методом).
- Поместите чашки Петри в инкубатор при температуре 30-37°C на 24-48 часов для культивирования.

Культивирование на скошенном агаре:

- Возьмите пробирки со скошенным агаром и внесите на поверхность агаровой среды небольшое количество бактериальной культуры с помощью бактериологической петли.
- Инкубируйте пробирки при аналогичной температуре (30-37°C).

Наблюдение за ростом колоний:

- После инкубации осмотрите чашки Петри и пробирки. Отметьте форму, размер, цвет и структуру колоний. Колонии молочнокислых бактерий обычно имеют гладкую поверхность и беловатый цвет.
- Используйте лупу или стереомикроскоп для более детального осмотра колоний.

3. *Микроскопирование бактерий:*

Приготовление микроскопического препарата:

- На чистое предметное стекло поместите каплю стерильной воды.
- Возьмите небольшую часть культуры молочнокислых бактерий из чашки Петри или скошенного агара бактериологической петлей и размешайте в капле воды на стекле.
- Высушите препарат на воздухе, затем зафиксируйте его, прокаливая предметное стекло над пламенем горелки.

Окрашивание бактерий:

- Препарат окрасьте метиленовым синим:
- Нанесите метиленовый краситель на препарат на 1-2 минуты.
- Аккуратно промойте препарат водой. Избегайте попадания струи воды на препарат
- Высушите препарат.

Микроскопирование:

- Исследуйте окрашенный препарат под микроскопом.
- Обратите внимание на морфологию бактерий: форму, размер, расположение клеток (цепочки, кластерные структуры).

4. Оценка результатов:

- Зарисуйте наблюдаемые микроскопические структуры.
- Укажите, какие морфологические формы преобладают у молочнокислых бактерий.
- Запишите особенности роста колоний на разных питательных средах.

Что должны получить

- На чашках Петри с агаром наблюдаются колонии молочнокислых бактерий округлой формы, с гладкими краями, диаметром от 1 до 5 мм.
- На скошенном агаре бактерии формируют гладкий налет, что характерно для культур *Lactobacillus*.
- При микроскопировании окрашенных препаратов можно наблюдать палочки (у *Lactobacillus*) или кокки (у *Streptococcus*), расположенные цепочками или парами.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 2

ИЗУЧЕНИЕ МОРФОЛОГИИ БАКТЕРИЙ. ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ ОКРАСКИ БАКТЕРИЙ

Цель работы: изучить морфологию бактерий при помощи микрокопирования. Освоить основные методики приготовления препаратов живых и фиксированных бактериальных клеток. Ознакомиться с методами простой и дифференциальной окраски бактерий [3].

Материалы и оборудование:

1. Микроскоп с объективами разного увеличения.
2. Стеклянные предметные и покровные стёкла.
3. Лабораторные пипетки.
4. Бактериальные культуры (*Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Escherichia coli*).
5. Фиксирующие растворы (метанол или этанол).
6. Простые красители (метиленовый синий, фуксин).
7. Растворы для дифференциальной окраски (реагенты для окраски по Граму).
8. Дистиллированная вода.
9. Спиртовая горелка.
10. Бумажные салфетки, фильтровальная бумага.

Теоретические основы:

1. Морфология бактерий:

Бактерии — это простейшие микроорганизмы, имеющие разнообразные формы и размеры. Основные формы бактерий:

- **Кокки** — шаровидные бактерии.
- **Бациллы** — палочковидные бактерии.
- **Спириллы** — спиралевидные бактерии.
- **Вибрионы** — изогнутые, в форме запятой.

Морфология бактерий важна для их классификации и идентификации, и она может быть изучена при помощи микроскопии и окраски.

2. Методы приготовления препаратов:

В микробиологии используются как препараты живых бактерий, так и фиксированные препараты, которые окрашиваются для лучшего изучения клеточной структуры.

3. Простейшие и дифференциальные методы окраски:

• Простые методы окраски используют один краситель для выявления морфологии бактерий. Они дают представление о форме и размере бактерий, но не различают разные типы клеточных стенок.

- Дифференциальные методы окраски позволяют различать бактерии по структуре их клеточных стенок. Примером является окраска по Граму, которая разделяет бактерии на грамположительные и грамотрицательные.

Практическая часть:

1. Приготовление препаратов живых бактериальных клеток

Цель: получить микроскопический препарат живых бактерий для наблюдения их подвижности и морфологии.

- На чистое предметное стекло капните каплю дистиллированной воды.
- Используя стерильную петлю или пипетку, перенесите небольшое количество бактериальной культуры в каплю воды.
- Покройте каплю покровным стеклом, избегая пузырьков воздуха.
- Рассмотрите препарат под микроскопом, начиная с малого увеличения, постепенно переходя на большее.

Примечание: при работе с живыми клетками нельзя использовать окрашивание, так как это может убить микроорганизмы.

2. Приготовление препаратов фиксированных клеток

Цель: зафиксировать клетки для последующего окрашивания.

- На чистое предметное стекло нанесите небольшую каплю воды.
- Стерильной петлей добавьте немного культуры бактерий в каплю воды и распределите по поверхности стекла, создавая тонкий мазок.
- Дайте мазку высохнуть на воздухе.
- После высыхания закрепите клетки на стекле, держа его над пламенем спиртовой горелки (несколько раз быстро пронесите стекло через пламя). Это убьет бактерии и зафиксирует их на стекле.

3. Окраска фиксированных препаратов микроорганизмов простыми методами

Простая окраска метиленовым синим:

- После фиксации нанесите на мазок несколько капель метиленового синего.
- Оставьте препарат на 1-2 минуты.
- Аккуратно смойте краситель дистиллированной водой, удерживая стекло под углом.
- Промокните стекло фильтровальной бумагой или дайте ему высохнуть на воздухе.
- Рассмотрите препарат под микроскопом.

Результаты: бактерии окрасятся в синий цвет, что позволит изучить их морфологию.

Дифференциальные методы окраски

Цель: разделить бактерии на грамположительные и грамотрицательные по строению клеточной стенки.

1. Приготовьте фиксированный мазок.
2. Нанесите на мазок кристаллический фиолетовый на 1 минуту.
3. Смойте краситель водой.
4. Добавьте раствор йодного раствора на 1 минуту (йод является фиксатором).
5. Смойте водой и обработайте мазок 95% этанолом в течение 10–20 секунд.
6. Сразу же промойте водой.
7. Нанесите на мазок фуксин или сафранин на 1 минуту.
8. Смойте водой и высушите стекло.

Результаты: грамположительные бактерии окрашиваются в фиолетовый цвет, так как их толстая клеточная стенка удерживает кристаллический фиолетовый. Грамотрицательные бактерии окрашиваются в красный или розовый, поскольку их тонкая стенка теряет первичный краситель и воспринимает второй.

Оценка результатов:

- Зарисуйте наблюдаемые микроскопические структуры.
- Укажите, какие морфологические формы преобладают у молочнокислых бактерий.
- Запишите особенности роста колоний на разных питательных средах.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 3 МОЛОЧНОКИСЛОЕ БРОЖЕНИЕ БАКТЕРИЙ

Цель работы: ознакомиться с процессом молочнокислого брожения и изучить физиологические особенности молочнокислых бактерий.

Материалы и оборудование:

1. Микробиологическая петля
2. Стеклянные предметные стёкла
3. Чашки Петри
4. Пробирки с питательной средой
5. Лабораторные пипетки
6. Лактоза или молоко
7. Индикаторы pH (лакмусовая бумага или pH-метр)
8. Культура молочнокислых бактерий (например, *Lactobacillus* spp.)
9. Стерильная вода
10. Термостат

Теоретические основы:

1. Молочнокислое брожение

Молочнокислое брожение — это тип анаэробного дыхания, при котором бактерии ферментируют углеводы, такие как лактоза, с образованием молочной кислоты и выделением небольшого количества энергии. Это один из важнейших биохимических процессов в природе, используемый в пищевой промышленности для производства [4]. Основные организмы, которые осуществляют молочнокислое брожение, — это молочнокислые бактерии, например, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* и *Leuconostoc*.

2. Виды молочнокислого брожения:

- Гомоферментативное брожение – продуктом является молочная кислота. Представители гомоферментативного брожения являются *Streptococcus lactis*, *Lactobacterium bulgaricum*, *Lactobacterium acidophilum* и др.
- Гетероферментативное брожение – помимо молочной кислоты образуются другие продукты, такие как спирты, уксусная кислота и углекислый газ и др. Представители *Lactobacillus brevis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Leuconostoc mesenteroides* и др.

3. Значение pH:

В процессе молочнокислого брожения молочная кислота накапливается в среде, понижая её pH, что ведет к закислению среды. Контроль pH является важным показателем активности молочнокислых бактерий.

Практическая часть:

1. Подготовка к работе:

- Подготовьте пробирки с питательной средой, содержащей лактозу или молоко.
- Стерилизуйте микробиологическую петлю в пламени горелки.

2. Посев бактерий:

- Используя стерильную петлю, перенесите культуру молочнокислых бактерий в пробирки с подготовленной средой.
- Закройте пробирки крышками, чтобы предотвратить доступ воздуха, и поместите их в термостат при температуре 37–42°C на 24–48 часов.

3. Приготовление микропрепарата:

- Нанесите стерильной микробиологической петлёй мазок из культуры молочнокислых бактерий на предметное стекло. Избегайте чрезмерно плотного мазка
- Зафиксируйте мазок нагреванием.
- Окрасьте препарат метиленовым синим для изучения морфологии бактерий.
- Рассмотрите препарат под микроскопом.

Важно: приготовление микропрепарата должно совершаться сразу после открытия образца, для предотвращения контаминации.

4. Наблюдение и измерение:

- Через 24–48 часов проверьте изменение рН среды с помощью лакмусовой бумаги или рН-метра. Снижение рН указывает на активность молочнокислых бактерий и накопление молочной кислоты.
- Отметьте изменения внешнего вида питательной среды (помутнение или осадок) — это свидетельство роста бактерий.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 4

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ НА ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ

Цель работы: изучить методы культивирования молочнокислых бактерий на различных питательных средах. Освоить методы посева микроорганизмов: на чашки Петри, скошенный агар, укол в агар [5].

Материалы и оборудование:

1. Микробиологические чашки Петри.
2. Пробирки со скошенным агаром.
3. Пробирки с плотной агаровой средой для укола.
4. Лабораторные пипетки.
5. Микробиологическая петля.
6. Питательная среда для молочнокислых бактерий.
7. Культуры молочнокислых бактерий.
8. Спиртовая горелка.
9. Термостат (37–42°C).

Теоретические основы

1. Питательные среды:

- Скошенный агар: плотная питательная среда, используемая для поддержания культур в активном состоянии и хранения.
- Плотный агар для укола: используется для изучения роста бактерий в глубине среды, что позволяет оценить их способность расти в анаэробных условиях.
- Чашки Петри с агаром: обеспечивают широкую поверхность для роста бактерий, что удобно для изучения колоний и выделения чистых культур.

Практическая часть:

1. Метод посева на чашки Петри

Цель: Посев молочнокислых бактерий для изучения колоний.

- Подготовьте чашки Петри с плотной питательной средой.
- Стерильной петлёй перенесите небольшое количество культуры молочнокислых бактерий.
- Проведите штриховой посев (зигзагообразными движениями) по поверхности агара, стараясь не повредить его.
- Закройте чашки крышками и поместите их в термостат крышкой вниз при 37–42°C на 24–48 часов.

- После инкубации изучите морфологию выросших колоний: их форму, размер, цвет.

2. Метод посева на скошенный агар

Цель: Поддержание культуры молочнокислых бактерий в активном состоянии.

- В пробирки со скошенным агаром введите стерильной петлёй культуру бактерий.

- Проведите штрих по поверхности скошенного агара, начиная с нижней части и поднимаясь вверх.

- Поместите пробирки в термостат при температуре 37–42°C на 24–48 часов.

- После инкубации наблюдайте за ростом бактерий по всей поверхности скошенного агара.

3. Метод укола в агар

Цель: оценить способность молочнокислых бактерий к росту в анаэробных условиях.

- В пробирки с плотной агаровой средой (не скошенной) при помощи стерильной петли сделайте прямой укол вдоль оси пробирки на глубину 2/3.

- Поместите пробирки в термостат при температуре 37–42°C на 24–48 часов.

- По результатам наблюдения отметьте наличие роста бактерий вдоль укола — если бактерии растут в глубине агара, это указывает на их способность к анаэробному росту.

Результаты:

- Рост на чашках Петри: сформировались отдельные колонии бактерий, которые можно охарактеризовать по их морфологии.

- Рост на скошенном агаре: бактерии равномерно распределены по поверхности агара, что говорит об их активном росте.

- Рост при уколе в агар: наблюдается рост в глубине среды, что свидетельствует о способности бактерий к анаэробному дыханию.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 5

ВЗАИМООТНОШЕНИЯ МЕЖДУ МИКРООРГАНИЗМАМИ

Цель работы: изучить взаимодействие между различными видами молочнокислых бактерий при их совместном культивировании.

Материалы и оборудование:

1. Микробиологические чашки Петри.
2. Пробирки с питательными средами.
3. Культуры молочнокислых бактерий разных.
4. Микробиологическая петля.
5. Спиртовая горелка.
6. Термостат (37–42°C).
7. рН-метр или лакмусовые бумажки.
8. Стерильная вода.

Теоретические основы:

1. Взаимоотношения между микроорганизмами:

В природе и лабораторных условиях микроорганизмы часто взаимодействуют друг с другом, и эти взаимодействия могут оказывать положительное, отрицательное или нейтральное влияние [6]. Основные типы взаимоотношений между микроорганизмами включают:

- Симбиоз — взаимовыгодное взаимодействие, при котором оба вида бактерий получают выгоду.
- Комменсализм — один организм получает выгоду, в то время как другой не испытывает заметного влияния.
- Антагонизм — один микроорганизм угнетает или тормозит рост другого (например, через выделение антибиотических веществ или конкуренцию за питательные вещества).

2. Совместное культивирование молочнокислых бактерий:

Молочнокислые бактерии часто используют совместное культивирование для усиления метаболической активности, более эффективного ферментирования лактозы и улучшения текстуры и вкуса конечных продуктов в пищевой промышленности (например, при производстве кефира, йогурта). Важно исследовать, как различные виды взаимодействуют между собой, особенно в условиях ограниченных питательных ресурсов.

Практическая часть:

1. Подготовка к работе:

- Подготовьте чашки Петри с питательной средой, содержащей лактозу или молоко.
- Используйте культуры молочнокислых бактерий разных видов, таких как *Lactobacillus*, *Lactococcus* и *Streptococcus*.

2. Посев культур бактерий:

- Проведите штриховой посев каждого вида бактерий по отдельности на чашки Петри с плотной питательной средой.
- На другую чашку Петри проведите штриховой посев сразу двух видов бактерий одновременно, используя одну половину чашки для одного вида, а другую для второго. Центральная область чашки станет зоной их взаимодействия.
- Поместите чашки Петри в термостат при температуре 37–42°C на 24–48 часов.

3. Наблюдение за ростом:

- По прошествии инкубационного периода проведите анализ выросших колоний. Обратите внимание на зону взаимодействия двух видов:
 - Есть ли торможение роста одного из видов?
 - Произошло ли разделение колоний или они слились?
 - Наблюдается ли изменение цвета среды, что может указывать на изменение метаболической активности?

4. Измерение кислотности среды:

- Используйте рН-метр или лакмусовую бумагу для измерения кислотности в разных областях чашек Петри.
- Сравните значения рН в отдельных культурах и в зоне совместного культивирования.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 6 ИССЛЕДОВАНИЕ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ

Цель работы: исследование ферментативной активности молочнокислых бактерий при воздействии различных углеводов

Теоретические основы:

Молочнокислые бактерии (МКБ) представляют собой группу грамположительных бактерий, которые способны ферментировать углеводы с образованием молочной кислоты. Эти бактерии играют ключевую роль в пищевой промышленности, особенно в производстве кисломолочных продуктов, таких как йогурт, кефир, сметана и сыры. Основные роды МКБ *включают Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc и Streptococcus.*

МКБ могут метаболизировать углеводы через два основных пути ферментации: гомоферментативное и гетероферментативное брожение. Эти два типа брожения различаются по продуктам, которые образуются в результате метаболизма сахаров [7].

Ферментация углеводов

Ферментация углеводов — это процесс метаболизма сахаров, при котором образуются органические кислоты, газы или спирты. В случае молочнокислых бактерий основным продуктом ферментации является молочная кислота.

Гомоферментативное брожение — это процесс, при котором основным продуктом метаболизма углеводов — молочная кислота. Этот тип брожения характерен для большинства видов рода *Lactobacillus*, а также для *Lactococcus lactis* и некоторых других молочнокислых бактерий. Общая схема гомоферментативного молочнокислого брожения представлена на рисунке Лб.1.

Основные этапы гомоферментативного брожения можно описать следующим образом:

- 1 Гликолиз (или путь Эмбден-Мейергоф-Парнасов). Основной этап гомоферментативного молочнокислого брожения.
- 2 Восстановление пирувата является ключевым этапом гомоферментативного молочнокислого брожения. Этот процесс происходит при участии фермента лактатдегидрогеназы (ЛДГ), который катализирует реакцию восстановления пирувата. ЛДГ способствует переносу двух электронов и одного протона от НАДН к пирувату, что приводит к образованию лактата и регенерации НАД⁺.

Анаэробный гликолиз состоит из 11 ферментативных реакций, представленных на рисунке Лб.2.

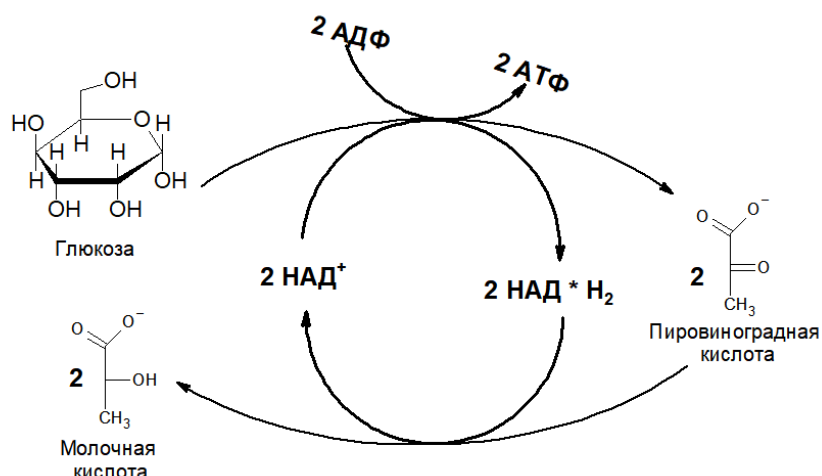


Рисунок Л6.1 – Схема гомоферментативного молочнокислого брожение

Первый этап гликолиза является подготовительным и требует затрат энергии аденозинтрифосфата (АТФ), активации глюкозы и образования триозофосфатов. Первая реакция гликолиза включает превращение глюкозы в реакционноспособное соединение путем фосфорилирования 6-го атома углерода, который не входит в кольцо. Эту реакцию катализирует фермент гексокиназа. Во второй реакции фермент глюкозофосфат-изомераза выводит еще один атом углерода из кольца для последующего фосфорилирования, образуя фруктозо-6-фосфат. Третья реакция включает фосфорилирование фруктозо-6-фосфата ферментом фосфофруктокиназой, что приводит к образованию фруктозо-1,6-дифосфата. Эта реакция играет ключевую роль в регулировании скорости гликолиза. Четвертая реакция заключается в расщеплении фруктозо-1,6-дифосфата на две фосфорилированные триозы — глицеральдегид и диоксиацетон. Пятая реакция подготовительного этапа включает переход между глицеральдегидфосфатом и диоксиацетонфосфатом под воздействием триозофосфатизомеразы.

Второй этап гликолиза включает в себя реакции, которые высвобождают энергию из глицеральдегид-3-фосфата и аккумулируют её в виде АТФ. Этот этап состоит из нескольких ключевых реакций.

Шестая реакция гликолиза, катализируемая ферментом глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназой, включает окисление глицеральдегид-3-фосфата до 1,3-бисфосфоглицерата с одновременным присоединением фосфорной кислоты. В процессе этой реакции также образуется НАДН. Седьмая реакция, катализируемая ферментом фосфоглицераткиназой, использует энергию макроэргической связи 1,3-бисфосфоглицерата для синтеза АТФ из АДФ. Восьмая реакция включает изомеризацию 3-фосфоглицерата в 2-фосфоглицерат под воздействием фермента фосфоглицератмутазы. Девятая реакция, катализируемая ферментом энолазой, приводит к образованию фосфоенолпирувата, содержащего макроэргическую фосфоэфирную связь.

Десятая реакция представляет собой ещё одну реакцию субстратного фосфорилирования: фермент пируваткиназа переносит макроэргический фосфат с фосфоенолпирувата на АДФ, образуя пируват и АТФ. Одиннадцатая реакция происходит только в анаэробных условиях и заключается в преобразовании пирувата в молочную кислоту под действием фермента лактатдегидрогеназы. Эта реакция важна для клеток, так как позволяет окислять НАДН, образующийся в шестой реакции, в условиях отсутствия кислорода, поддерживая тем самым непрерывность гликолиза.

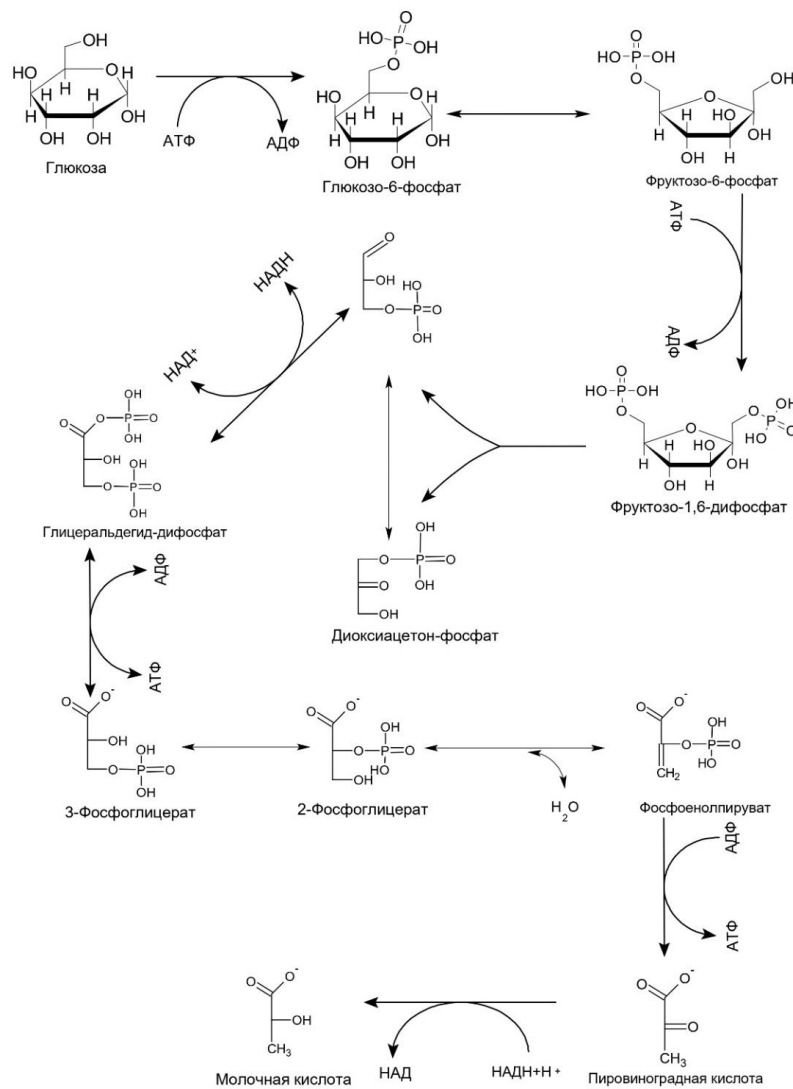


Рисунок Л6.2 – Схема анаэробного гликолиза глюкозы

Таким образом, гомоферментативное молочнокислое брожение представляет собой метаболический процесс, в котором глюкоза превращается в молочную

кислоту (лактат) с образованием энергии в виде АТФ. Этот процесс включает два основных этапа: гликолиз и восстановление пирувата до лактата. Гомоферментативное молочнокислое брожение обеспечивает клетку энергией и поддерживает баланс окислительно-восстановительных эквивалентов, что является критически важным для выживания в анаэробных условиях.

Химические свойства и изменение цвета

Бромкрезоловый пурпурный (ВСП) – это органический краситель, используемый в качестве кислотно-основного индикатора. Он изменяет цвет в зависимости от рН среды, что позволяет визуально оценивать кислотность или щелочность раствора. В лабораторных исследованиях ВСП часто используется для мониторинга ферментативной активности микроорганизмов, которые могут изменять рН среды в результате метаболических процессов.

Бромкрезоловый пурпурный имеет следующие цветовые изменения в зависимости от рН:

- Кислая среда (рН <5,2): Желтый цвет
- Нейтральная среда (рН 5,2–6,8): Переходные цвета от желтого к фиолетовому
- Щелочная среда (рН >6,8): Фиолетовый цвет

Эти изменения обусловлены структурными изменениями молекулы ВСП в зависимости от концентрации ионов водорода (H^+) в растворе.

Механизм изменения цвета

1. Кислая среда (рН <5,2):
 - В кислой среде концентрация ионов водорода высока.
 - ВСП принимает протон (H^+), что приводит к его переходу в форму, которая поглощает свет с длиной волны, соответствующей желтому цвету.
2. Нейтральная среда (рН 5,2–6,8):
 - В нейтральной среде концентрация ионов водорода умеренная.
 - ВСП находится в переходном состоянии между протонированной и депротонированной формами, что приводит к смешанным цветам, от желтого до фиолетового.
3. Щелочная среда (рН > 6,8):
 - В щелочной среде концентрация ионов водорода низка.
 - ВСП теряет протон, переходя в форму, которая поглощает свет с длиной волны, соответствующей фиолетовому цвету.

При использовании ВСП для исследования ферментативной активности молочнокислых бактерий мы можем наблюдать следующие изменения:

Начальный цвет среды:

- При подготовке питательной среды с ВСП и пептоном начальный рН обычно слегка щелочной, что придаёт среде фиолетовый цвет.

Изменение цвета в процессе инкубации:

- Если молочнокислые бактерии активно ферментируют добавленный сахар (глюкозу, лактозу или сахарозу), они производят органические кислоты (например, молочную кислоту).
- Образование кислот снижает рН среды, приводя к изменению цвета ВСР с фиолетового на желтый.

Питательная среда

Питательная среда для культивирования молочнокислых бактерий должна содержать источники углерода (углеводы), азота (пептоны) и другие необходимые микроэлементы.

Одна из таких минимальных питательных сред включает следующие компоненты:

- Пептон: источник азота и аминокислот, необходимых для роста и размножения бактерий.
- Сахара (глюкоза, лактоза или сахароза): Основные источники углерода и энергии.
- Натрий хлор (NaCl): регулирует осмотическое давление и поддерживает ионный баланс.
- Бромкрезоловый пурпурный: Индикатор рН для визуального мониторинга ферментативной активности.

Эта минимальная питательная среда позволяет оценить вклад углеводного компонента в рост и метаболизм молочнокислых бактерий.

В данной лабораторной работе используются три различных углевода: глюкоза, лактоза и сахароза. Эти сахара служат субстратами для ферментации и позволяют оценить предпочтения бактерий к тому или иному углеводу.

Материалы и оборудование:

1. Чистые культуры молочнокислых бактерий (например, *Lactobacillus* spp.)
2. Питательная среда с бромкрезоловым пурпурным
3. Пептон
4. Сахара: глюкоза, лактоза, сахароза
5. Хлорид натрия
6. Стерильные пробирки или колбы
7. Инкубатор (37°C)
8. Спиртовая горелка или лампа Бунзена
9. Дозатор 100-1000 мкл
10. Стерильный физиологический раствор
11. Стерильные наконечники 100-1000 мкл
12. Петли для посева или стерильные пипетки
13. Стерильные крышки или пробки для пробирок

14. Лабораторные перчатки и защитные очки
15. Дистиллированная вода
16. Автоклав
17. рН-метр (опционально)

Подготовка питательной среды

1. Приготовление основного раствора:

- Растворите 4 г пептона в 800 мл дистиллированной воды.
- Добавьте 0,016 г бромкрезолового пурпурного.
- Разделите раствор на четыре банки по 200 мл.

2. Добавление сахаров:

- В первую банку добавьте 2 г глюкозы.
- Во вторую – добавьте 2 г лактозы.
- В третью – добавьте 2 г сахарозы.
- Четвертая выступает контролем.
- Хорошо перемешайте каждую часть до полного растворения сахара.

3. Стерилизация:

- Стерилизуйте банки с питательной средой в автоклаве при 121°C в течение 15 минут.
- По окончании автоклавирования откройте автоклав и дождитесь до остывания, до температуры 50°C.

4. Засев бактерий и инкубация

Подготовка рабочего места

- Убедитесь, что ламинарный бокс был предварительно подготовлен и дезинфицирован.
- Наденьте стерильные перчатки и халат. Руки обработайте дезинфицирующим раствором.
- Расположите все необходимые материалы и инструменты внутри ламинарного бокса, избегая загромождения рабочей зоны.

Подготовка культуры

- Возьмите фалькон (пенициллинку) с бактериями.
- Добавьте 400 мкл стерильного физиологического раствора во фалькон с бактериями.
- Просуспензируйте содержимое фалькона, чтобы бактерии распределились равномерно.

5 Проведение засева

- Аккуратно откройте первую банку с питательной средой.
- Используя дозатор со стерильным наконечником, наберите 100 мкл приготовленной суспензии бактерий.

- Внесите 100 мкл культуры молочнокислых бактерий в банку, стараясь не касаться внутренней поверхности банки пипеткой.
- Обработайте крышку над пламенем горелки.
- Закройте банку крышкой, избегая касания внутренней поверхности крышки и горлышка банки.
- Круговыми движениями перемешайте содержимое банки, избегая попадания среды на крышку.

6 Повторение процесса

- Повторите процесс для каждой банки с различными сахарами и контрольной средой, используя новый стерильный наконечник для каждого засева, чтобы избежать перекрестной контаминации.

7 Инкубация

- После засева всех банок переместите их в инкубатор (термостат), предварительно нагретый до 37°C.
- Расположите банки таким образом, чтобы обеспечить равномерный доступ тепла ко всем образцам.

8 Регулярное наблюдение

- Начните регулярное наблюдение за банками через каждые несколько часов после начала инкубации. Это можно делать, например, каждые 3-4 часа в первые 15 часов, а затем каждые 1-2 часа по мере приближения к ожидаемому времени изменения цвета.
- Для наблюдения не обязательно открывать инкубатор, если он оснащен прозрачной дверцей или окошком.

9 Фиксация времени изменения цвета

- Зафиксируйте время начала изменения цвета питательной среды (переход от фиолетового к желтому). Это время указывает на начало активного роста и метаболической активности молочнокислых бактерий.
- Продолжайте наблюдение до полного перехода цвета среды в желтый. Зафиксируйте время окончания изменения цвета для каждой из банок.
- Записывайте данные для каждой банки отдельно, отмечая время начала и окончания изменения цвета, а также любые другие наблюдения (интенсивность цвета, наличие биомассы и т.д.).

10 Интерпретация результатов

- Время изменения цвета питательной среды с бромкрезоловым пурпурным может служить показателем скорости ферментации и активности молочнокислых бактерий в различных сахарных растворах.
- Сравните полученные данные для разных сахаров, чтобы оценить эффективность ферментации и метаболическую активность бактерий в каждой из сред

Таблица наблюдений

Время инкубации (часы)	Глюкоза	Лактоза	Сахароза
0			
4			
8			
12			
16			
17			
...			
...			
...			
48			

Обсуждение результатов

Необходимо провести обсуждение полученных результатов, уделив особое внимание следующим аспектам:

1. Ферментационная активность молочнокислых бактерий на основе изменений цвета питательной среды;
2. Различия в скорости изменения цвета между пробами с разными сахарами.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 7

ФОРМИРОВАНИЕ ПЕРИОДИЧЕСКИХ СТРУКТУР ЛИЗЕГАНГА ГИДРОКСИАПАТИТА И ИЗУЧЕНИЕ СИНТЕЗА МОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ

Цель работы: получение периодических структур Лизеганга гидроксиапатита и изучение синтеза молочной кислоты молочнокислыми бактериями в условиях формирования структур [8].

Теоретические основы:

Кольца Лизеганга, также известные как структуры Лизеганга, представляют собой концентрические кольца или ритмически чередующиеся полосы, которые образуются в результате периодического осаждения различных соединений при их диффузии в плотных средах. Этот феномен был впервые обнаружен немецким химиком и предпринимателем Рафаэлем Эдуардом Лизегангом. В 1896 году, работая в фотолаборатории своего отца, Лизеганг сделал интересное открытие. Он заметил, что если капнуть раствором нитрата серебра на фотопластинку, покрытую слоем желатина с содержанием сильного окислителя хромпика, то в результате химической реакции выпадет осадок. Этот осадок образует концентрические полосы, напоминающие годовые кольца на спиле дерева. Это явление настолько заинтриговало Лизеганга, что он посвятил почти полвека его изучению. Позднее, известный химик Вильгельм Оствальд дал этому явлению название «кольца Лизеганга».

Кольца Лизеганга представляют собой интересное и важное явление не только в лабораторных условиях, но и в природе. Эти структуры образуются в результате периодического осаждения веществ при их диффузии через пористые среды, такие как глинистые минералы, осадочные породы, гели и даже биологические ткани. В природе кольца Лизеганга могут быть найдены в различных геологических и биологических объектах.

Геологические примеры:

Осадочные породы

Кольца Лизеганга часто встречаются в осадочных породах, таких как песчаники, известняки и сланцы. Эти структуры образуются в результате сложных геохимических процессов, включающих диффузию металлов, таких как железо и марганец, через пористую матрицу породы. Когда растворенные металлы перемещаются через пористую среду, они могут достигать областей, где условия способствуют перенасыщению раствора. В этих зонах металлы осаждаются в виде оксидов или гидроксидов, формируя характерные концентрические полосы или кольца. Эти кольца могут варьироваться по размеру и интенсивности в зависимости от концентрации металлов и условий окружающей среды. Наблюдение и анализ колец Лизеганга в осадочных породах предоставляет важные

данные о древних гидрогеологических условиях и процессах, происходивших в земной коре.

Почвы и грунты

В почвах и грунтах кольца Лизеганга могут возникать при взаимодействии растворенных веществ с минералами почвы. Этот процесс часто начинается с диффузии железа или других металлов из подземных вод или атмосферных осадков в почву. По мере того, как железо диффундирует через почвенную матрицу, оно может достигать областей с подходящими химическими условиями для осаждения, например зон с изменяющимся рН или окислительно-восстановительным потенциалом. В этих условиях железо осаждается в виде гидроксида железа, создавая видимые кольцевые структуры. Такие образования могут служить индикаторами исторических изменений в химическом составе почвы и гидрологических режимах, а также помогают в изучении процессов почвообразования и миграции элементов в экосистемах.

Гидротермальные системы

В гидротермальных системах кольца Лизеганга могут образовываться при взаимодействии горячих растворов с окружающими породами. Эти системы часто связаны с вулканической активностью, где циркулирующие горячие растворы взаимодействуют с минералами в трещинах и пустотах пород. По мере охлаждения растворов и изменения их химического состава происходит осаждение минералов в виде концентрических структур. Например, железо, медь или другие металлы могут осаждаться в виде оксидов или сульфидов, формируя кольца вокруг источников гидротермальных растворов. Эти структуры не только украшают геологические разрезы, но и служат важными индикаторами для геологов при поиске рудных месторождений и изучении процессов формирования минералов.



Рисунок Л7.1 - Примеры колец Лизеганга в природе

Лабораторное изучение структур Лизеганга предоставляет ценные данные о процессах в химии и физике, а также открывает новые возможности для применения этих знаний в различных научных и технологических областях.

Материалы и реактивы:

1. Пептон
2. Глюкоза
3. Агар
4. Хлорид натрия (NaCl)
5. Двухзамещенный фосфат натрия (Na_2HPO_4)
6. Хлорид кальция (CaCl_2)
7. Бромкрезоловый пурпурный
8. Дистиллированная вода
9. Молочнокислые бактерии (например, *Lactobacillus* spp.)
10. Автоклав
11. Стеклянные или пластиковые чашки Петри
12. Дозатор
13. Мерный цилиндр
14. Магнитная мешалка с нагревом
15. Водяная баня
16. Инкубатор (37°C)
17. Весы
18. Стерильные наконечники 100–1000 мкл
19. Стерильные наконечники 10–200 мкл
20. Петли для посева или стерильные пипетки

Подготовка питательной среды

Для проведения исследований необходимо подготовить два вида питательной среды объемом 200 мл каждый. В одну из них будет добавлен индикатор бромкрезоловый пурпурный, а в другую — нет. Следуйте приведенной ниже методике.

Общие компоненты для обеих сред:

- Пептон: 1 г
- Агар: 2 г
- Хлорид натрия (NaCl): 0,6 г
- Глюкоза: 1 г
- Гидрофосфат натрия (Na_2HPO_4): 0,564 г

Дополнительный компонент для одной из сред: бромкрезоловый пурпурный: 0,004 г (4 мг)

Методика работы

- Возьмите чистые стеклянные термостойкие емкости (колбу или стакан) объемом не менее 250 мл.
- Налейте в емкости примерно 150 мл дистиллированной воды. Это позволит избежать перелива при добавлении сухих компонентов и облегчит процесс растворения.
- Тщательно взвесьте необходимые количества каждого компонента. Постепенно добавляйте взвешенные компоненты в емкость с водой. Постоянно помешивайте раствор стеклянной палочкой или магнитной мешалкой до полного растворения всех веществ. Это поможет избежать образования комков и обеспечит равномерное распределение компонентов.
- После добавления всех компонентов долейте дистиллированную воду до общего объема 200 мл.
- Нагрейте раствор до температуры 80-90°C. Постоянно помешивайте раствор, чтобы агар полностью растворился и не образовывались комки. Убедитесь, что весь агар полностью растворился и раствор стал однородным.
- Осторожно перелейте горячий раствор в автоклавируемую емкость (например, стеклянную бутылку или автоклавируемую колбу). Закройте емкость крышкой, но не слишком плотно, чтобы предотвратить избыточное давление внутри емкости.
- Поместите емкость с раствором в автоклав. Установите стандартные условия стерилизации и проведите стерилизацию.
- По окончании автоклавирования откройте автоклав, при помощи защитных перчаток осторожно возьмите банки, обработайте их дезинфицирующим раствором и переставьте в подготовленный к работе ламинарный бокс.

Работа в ламинарном боксе

- Соблюдая все правила стерильности разлейте по 15–20 мл полученной среды в стерильные чашки Петри диаметром 90 мм. Работайте оперативно, чтобы предотвратить застывание агара в наконечнике или банке. Убедитесь, что слой среды в каждой чашке равномерный и ровный. Оставьте чашки до полного застывания агара.
- Используя противоположную сторону стерильного наконечника, сделайте отверстие в центре застывшего агара в каждой чашке Петри. Удалите внутреннюю часть. Стерильным наконечником объемом 10–200 мкл введите стерильный раствор хлорида кальция (CaCl_2) в отверстие. Закройте крышку чашки Петри. Повторите действия со всеми чашками Петри. Оставьте чашки Петри в ламинарном боксе для формирования периодических структур Лизеганга¹.

¹ Первые кольца начнут формироваться через 2-3 часа. Однако для большего формирования колец потребуется 5-7 дней. При этом каждые 24 часа необходимо добавлять хлорид кальция в имеющееся отверстие. При этом важно соблюдать стерильность и использовать только стерильные материалы

- Уберите все использованные расходные материалы, протрите все поверхности ламинара дезинфицирующим раствором и проведите обработку УФ-лампой в течение 15–30 минут.



Рисунок Л7.2 - Примеры колец Лизеганга на питательной среде

Проведение посевов бактерий на подготовленные чашки Петри с питательной средой и кольцами Лизеганга

- Работайте в стерильной зоне – ламинарном боксе. Наденьте стерильные перчатки и используйте маску и лабораторный халат для минимизации риска контаминации.

1. Подготовка суспензии бактерий:

- Возьмите подготовленную пенициллинку с молочнокислыми бактериями. Добавьте 2 мл стерильного физиологического раствора и просуспензируйте содержимое пенициллинки, чтобы равномерно распределить бактерии. Для этого можно аккуратно встряхнуть пенициллинку или использовать вихревой миксер (вортекс).

2. Посев бактерий на чашки Петри:

- Возьмите стерильный наконечник с дозатором или пипетку. Наберите 100 мкл подготовленной бактериальной суспензии. Нанесите 100 мкл суспензии на поверхность одной из подготовленных чашек Петри с питательной средой и кольцами Лизеганга.

3. Распределение суспензии:

- Используя стерильный шпатель Дригальского, аккуратно распределите суспензию по поверхности агара. Избегайте надавливания и повреждения агара при распределении суспензии.

4. Повторение процедуры:

- Повторите шаги 2 и 3 для всех подготовленных чашек Петри.

5. Инкубация:

- После завершения посева, поместите чашки Петри в инкубатор при оптимальной температуре для роста молочнокислых бактерий (обычно 30-37°C). Инкубируйте чашки в течение необходимого времени (18-48 часов), наблюдая за ростом бактерий и формированием колоний.

Заключение по лабораторной работе

1. Рассчитайте р-фактор при формировании периодических структур.

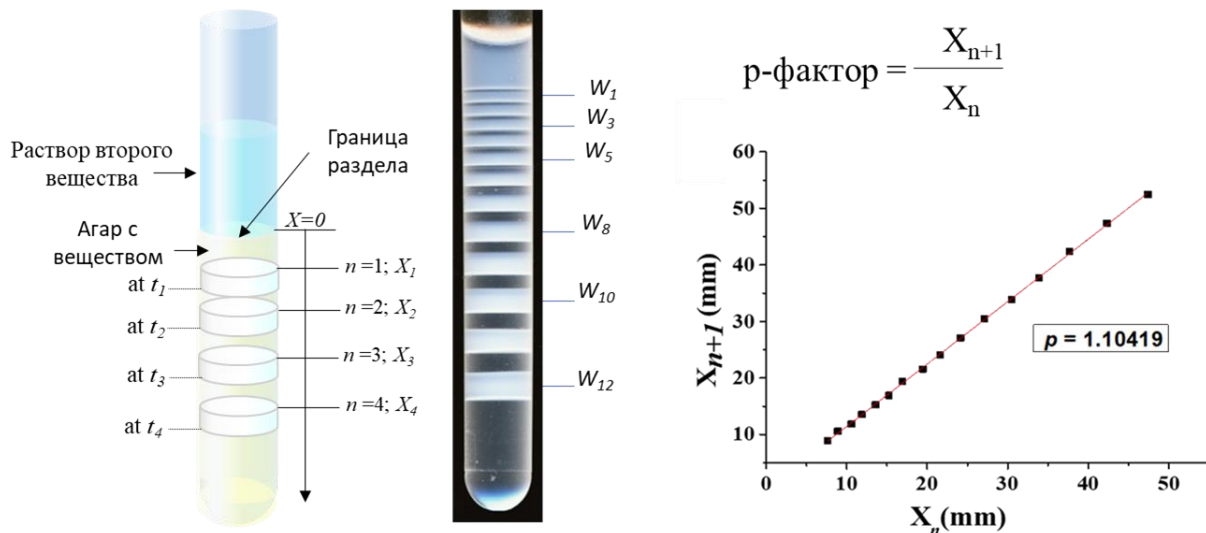


Рисунок Л7.3 - Пример расчета величины р-фактора

2. С учётом того, что осаждение фосфатов кальция протекает в условиях ограниченной диффузии, то в геле возникают участки, в которых соотношения между реагентами становятся стехиометрическими. Данные реакции представляют собой интерес в качестве модельных систем по изучению костной ткани, основным неорганическим компонентом которой является гидроксиапатит ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). Кроме того, в состав фосфатов кальция могут также входить трикальцийфосфат, брушит и октокальцийфосфат ($\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$).

Примечание

Соблюдение этих правил поможет обеспечить безопасность и эффективность работы в микробиологической лаборатории. Всегда следуйте установленным протоколам и инструкциям, чтобы минимизировать риск заражения и обеспечить точность результатов исследований.

Общие правила

- Носите лабораторный халат, перчатки и защитные очки.
- Волосы должны быть убраны под шапочку или завязаны, чтобы избежать их попадания в образцы.

- Все работы должны проводиться в стерильных условиях. Используйте автоклав для стерилизации инструментов и питательных сред.
- Рабочее место должно быть чистым и дезинфицированным перед началом и после завершения работы.
- Всегда читайте этикетки и инструкции перед использованием химических веществ.
- Храните химические вещества в надлежащих условиях и контейнерах.

Использование автоклава:

- Банки и контейнеры должны стоять вертикально. Допускается небольшой наклон, главное, чтобы жидкость не доставала до крышки.
- Будьте осторожны при открытии автоклава. Температура внутренних поверхностей автоклава около 100°C, банки горячие.
- Избегайте резких перепадов температуры. Запрещено сразу после автоклава помещать банки под холодную воду.

Специфические правила для микробиологической работы:

- Все биологические отходы должны утилизироваться в соответствии с установленными правилами.
- Используйте дезинфицирующие растворы для обработки рабочих поверхностей и инструментов.
- Работайте аккуратно, чтобы избежать контаминации культур.
- При пересеве культур используйте ламинарные боксы или спиртовые горелки для создания стерильного поля.
- Стерилизуйте инструменты перед и после использования. Это можно делать с помощью автоклава или спиртовой горелки.
- Используйте только стерильные пипетки, пробирки и другие расходные материалы.
- После завершения работы все поверхности должны быть тщательно дезинфицированы.
- Использованные инструменты и материалы должны быть обработаны дезинфицирующими растворами или помещены в автоклав для стерилизации.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 8

ПРИМЕНЕНИЕ DFT РАСЧЕТОВ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ И ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ КРИОПРОТЕКТОРОВ

Цель работы: изучение возможностей метода теории функционала плотности (Density Functional Theory, DFT) для анализа и прогнозирования свойств молекул криопротекторов. Оценка эффективности потенциальных криопротекторов на основе квантово-химических расчетов, включая определение их стабильности, взаимодействий с водными молекулами и других характеристик, важных для криоконсервации [9,10].

Теоретические основы:

1. Основы DFT:

Метод теории функционала плотности (DFT) является одним из наиболее популярных методов квантовой химии. Он позволяет рассчитывать электронную структуру молекул, определять энергетические параметры, дипольные моменты и другие свойства, используя приближения для корреляционной и обменной энергии.

2. Криопротекторы и их значение:

Криопротекторы – это вещества, способные предотвращать повреждение клеток при замораживании и оттаивании. Они предотвращают образование кристаллов льда, который может разрушить клеточные структуры. Наиболее известные криопротекторы – диметилсульфоксид (ДМСО), глицерин, этиленгликоль и пропиленгликоль.

3. Применение DFT для анализа криопротекторов:

Метод DFT может использоваться для расчета стабильности криопротекторов, их способности взаимодействовать с молекулами воды и прогнозирования их биосовместимости. Основные параметры, которые можно определить с помощью DFT: энергия взаимодействия молекул, распределение электронной плотности, поляризуемость и энергию водородных связей.

Оборудование и программное обеспечение

- Компьютер с установленным программным обеспечением для квантово-химических расчетов (ORCA).
- Средства визуализации (Avogadro).

Описание работы

1. Подготовка молекул криопротекторов для анализа. С использованием программного обеспечения, например, Gaussian или ORCA, создайте геометрии молекул криопротекторов (ДМСО, глицерин и др.) и оптимизируйте их структуру.

2. **Расчет энергетических характеристик.** Выполните расчеты энергии связи, электронной плотности и поляризуемости. Сравните полученные значения для различных криопротекторов.

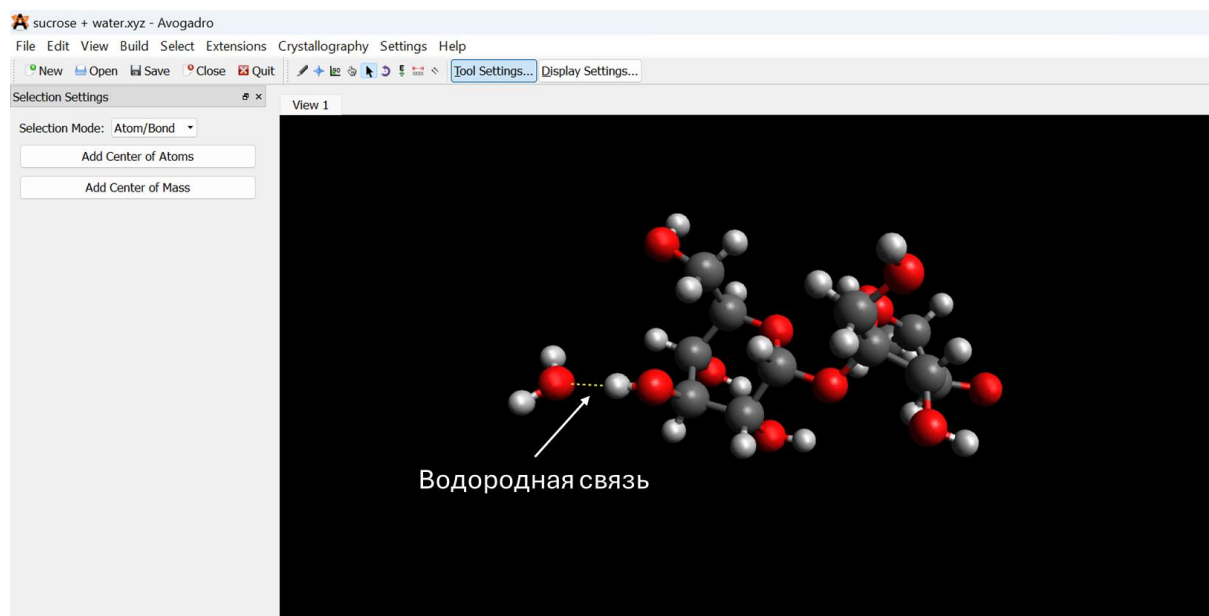
3. **Моделирование взаимодействия с водой.** Сформируйте модельную систему «криопротектор + молекула воды» и рассчитайте энергию взаимодействия. Определите наиболее вероятные точки образования водородных связей, используя изоповерхности электронной плотности.

4. **Анализ результатов и выводы.** Сравните эффективность различных криопротекторов на основе полученных данных: стабильность молекулы, способность к образованию водородных связей с водой, энергия взаимодействия с водными молекулами.

Ход работы

- Криопротекторы характеризуются своей способностью связываться с водой. Примером криопротектора является сахароза. Сахароза является эффективным криопротектором, поскольку она уменьшает образование кристаллов льда внутри клеток и тем самым снижает риск их повреждения. Благодаря своей способности связываться с водой, сахароза помогает поддерживать осмотическое равновесие, предотвращая разрушение клеточных структур в условиях низких температур.

- Предполагаем, что сахароза ($C_{12}H_{22}O_{11}$) будет связывать воду за счет водородных связей

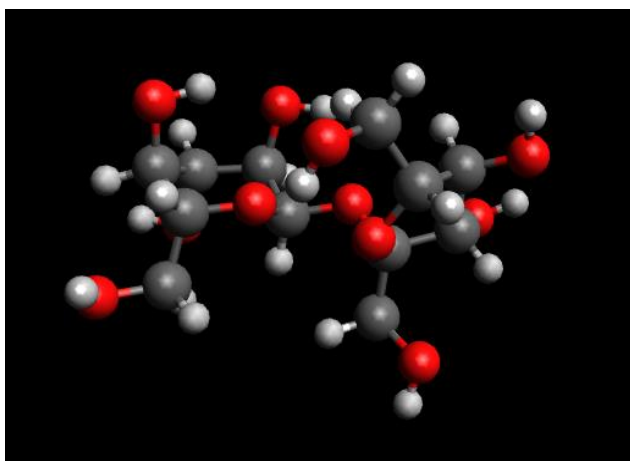


На рисунке изображена молекула сахарозы ($C_{12}H_{22}O_{11}$) с присоединенной через водородную связь (отмечена пунктирной линией) к ней водой H_2O .

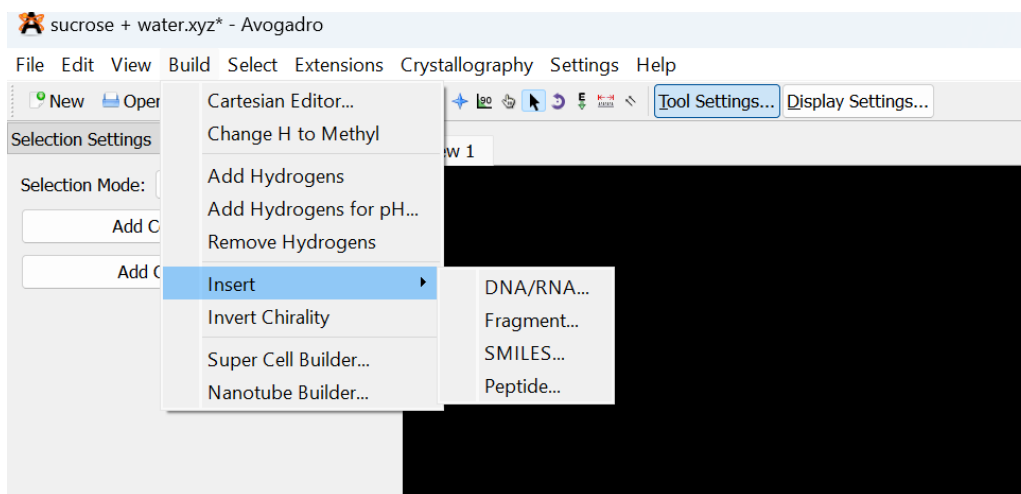
Исходя из вышеописанного, промоделируем связь молекулы сахарозы с молекулами воды. И с помощью квантово-химического расчета установим эффективность сахарозы как криопротектора.

1. Постройте молекулу сахарозы в графическом редакторе Avogadro и оптимизируем ее геометрию с помощью встроенного функционала UFF:

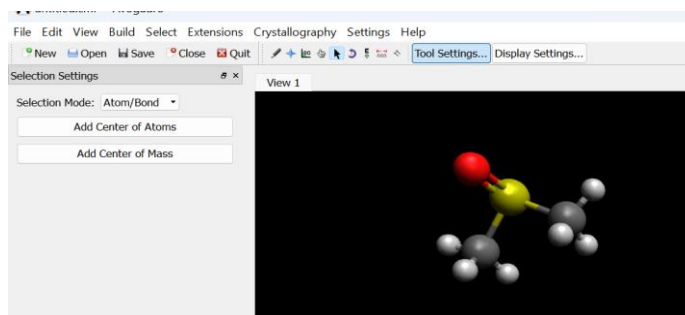
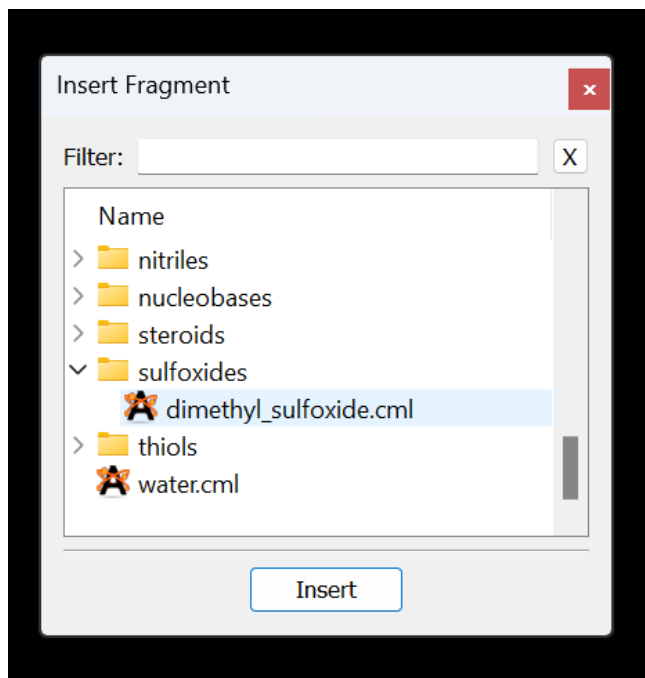
2.



Отметим, что в программе Avogadro можно добавлять молекулы (ДНК, РНК, пептиды, различные органические молекулы) из собственной библиотеки плагина «Build-Insert».



Так, например, в данной библиотеке есть молекула другого популярного криопротектора – ДМСО (диметилсульфоксида) C_2H_6OS .



В библиотеке содержатся циклические формы моносахаридов (включая глюкозу и фруктозу), которые являются субъединицами сахарозы. Соединив, которые с помощью гликозидной связи можно получить нужный дисахарид.

Однако, наиболее простым подходом построение молекул, является использование открытых баз данных и 3D-структур из них.

- Скачаем молекулу сахарозы с сайта PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>).

SEARCH FOR

SUCROSE

Treating this as a text search.

BEST MATCH



[sucrose; 57-50-1; saccharose; sugar; Table sugar; Cane sugar; White sugar; D-Sucrose; ...](#)

Compound CID: 5988

MF: C₁₂H₂₂O₁₁ MW: 342.3g/mol

IUPAC Name: (2R,3R,4S,5S,6R)-2-[(2S,3S,4S,5R)-3,4-dihydroxy-2,5-bis(hydroxymethyl)oxolan-2-yl]oxy-6-(hydroxymethyl)oxane-3,4,5-triol

Isomeric SMILES: C([C@@H]1[C@H]([C@@H]([C@H]([C@H](O1)O)C2[C@H]([C@@H]([C@H]([C@H](O2)CO)O)CO)O)O)O

InChIKey: CZMRCDWAGMRECN-UGDNZRGBSA-N

InChI: InChI=1S/C12H22O11/c13-1-4-6(16)8(18)9(19)11(21-4)23-12(3-15)10(20)7(17)5(2-14)22-12/H4-11,13-20H,1-3H2/4-5-6-7-8+9-,10+,11-,12+/m1/s1

- Кликнув левой кнопкой мыши по гиперссылке, перейдем на страницу сахарозы и кликнем по иконке «Download».

PubChem Sucrose (Compound)

Sucrose

PubChem CID: 5988

Structure: 2D, 3D, Crystal

Chemical Safety: [Laboratory Chemical Safety Summary \(LCSS\) Datasheet](#)

Molecular Formula: C₁₂H₂₂O₁₁

Synonyms: sucrose, 57-50-1, saccharose, sugar, Table sugar

Cite Download

CONTENTS

- Title and Summary
- Structures
- Biologic Description
- Names and Identifiers
- Chemical and Physical Properties
- Spectral Information
- Related Records
- Chemical Vendors
- Drug and Medication Information
- Food Additives and Ingredients
- Agrochemical Information
- Pharmacology and Biochemistry
- Use and Manufacturing

Скачаем 3D структуру сахарозы, выбирая как расширение SDF формат файла.

DOWNLOAD

SDF Save Display

ASNT Save Display

3D Conformer

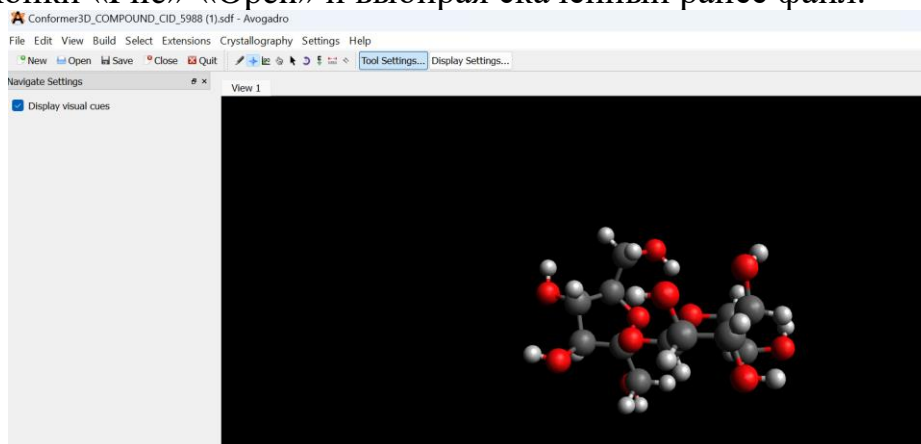
SDF Save Display JSON Save Display XML Save Display ASNT Save Display

Looking to Download a PDF of This Page?

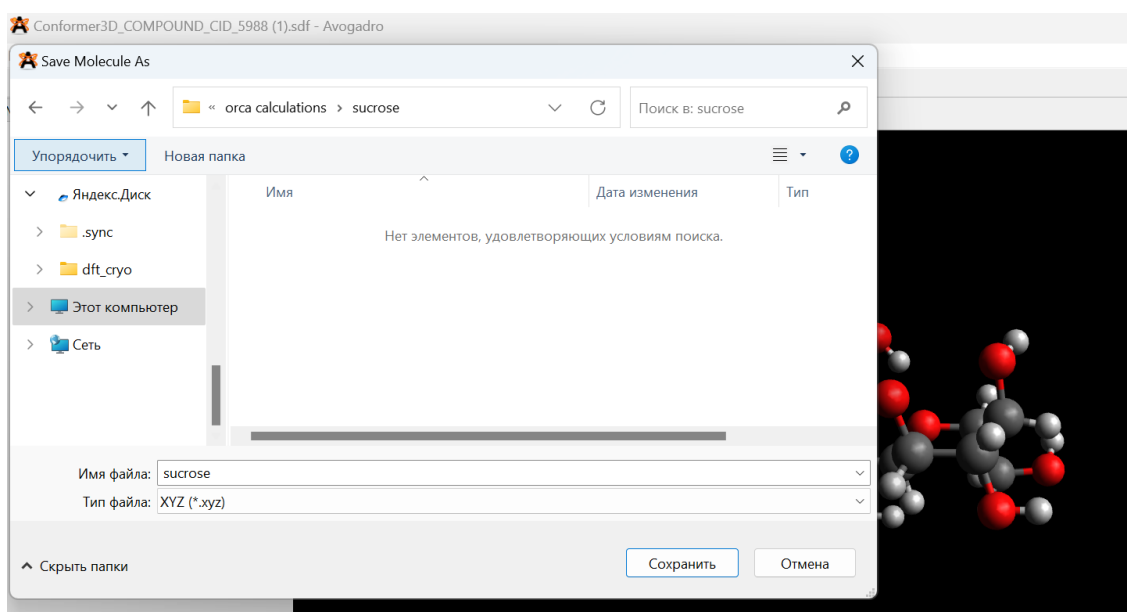
Please use **print** functionality available in your browser and look for a **save as PDF** option.

Note that some sections on this page might be loaded on demand (when you scroll to them), and thus, before saving the page to PDF, you would first want to scroll to the bottom of the page to make sure that everything is loaded. Alternatively, you may open a section of interest in a new window (using the new window icon available on the right side of the title of each section), and then save it to PDF.

- Откройте скаченный файл с помощью Avogadro, кликая левой кнопкой мыши на иконки «File»-«Open» и выбирая скаченный ранее файл.



- Сохраните файл в папке для расчета с помощью комбинации «File»-«Save as», так файл будет называться «sucrose», в качестве расширения выберите «xyz».




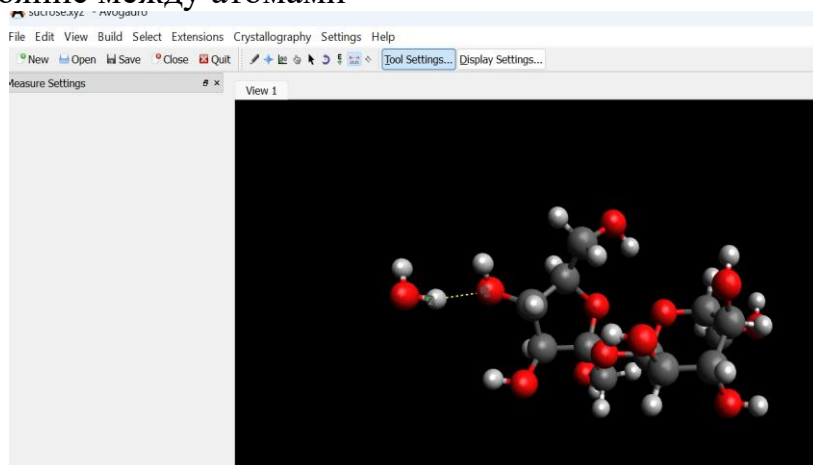
3. Присоедините молекулы воды к реакционным центрам сахарозы

После того, как вы сохранили файл, присоедините к гидроксильным (-ОН) группам сахарозы (всего их 8) молекулы воды, моделируя тем самым сольватную оболочку криопротектора.

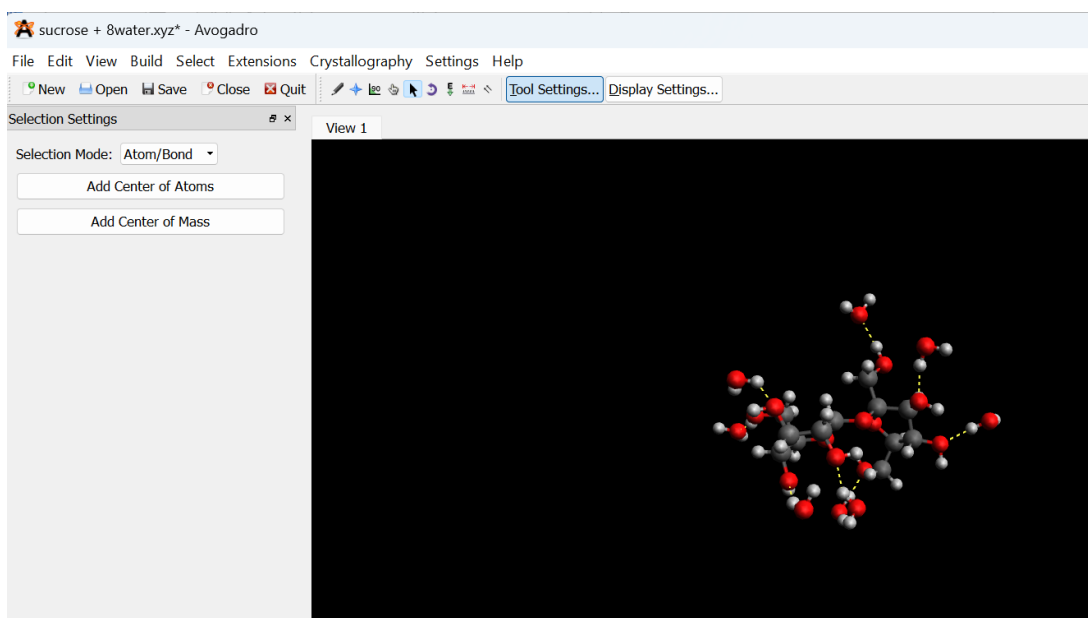
Помните, что водородные связи должны образовываться за счет неподелённой электронной пары (НЭП). В органических молекулах НЭП содержат следующие атомы: кислород O, сера S, азот N. Например, к молекуле ДМСО будет присоединяться лишь одна вода за счет НЭП кислорода.

Важным аспектом является так же то, что длина водородной связи обычно составляет от 1,5 до 2,5 ангстрем (Å). Этот параметр нужно учитывать при присоединении воды к функциональным группам.

- Присоедините молекулу воды к гидроксильной группе сахарозы, учитывая расстояние водородной связи. Используйте инструмент  для того, чтобы измерять расстояние между атомами



- Сохраните полученный файл в отдельную папку, с отличным от прошлого, названием, например «sucrose+_1water.xyz»
- Повторяйте последовательно добавлять молекулы воды и сохранять файлы в новые папки. Так, у следующего файла с названием «sucrose+_2water.xyz» и т.д. вплоть до «sucrose+_8water.xyz».

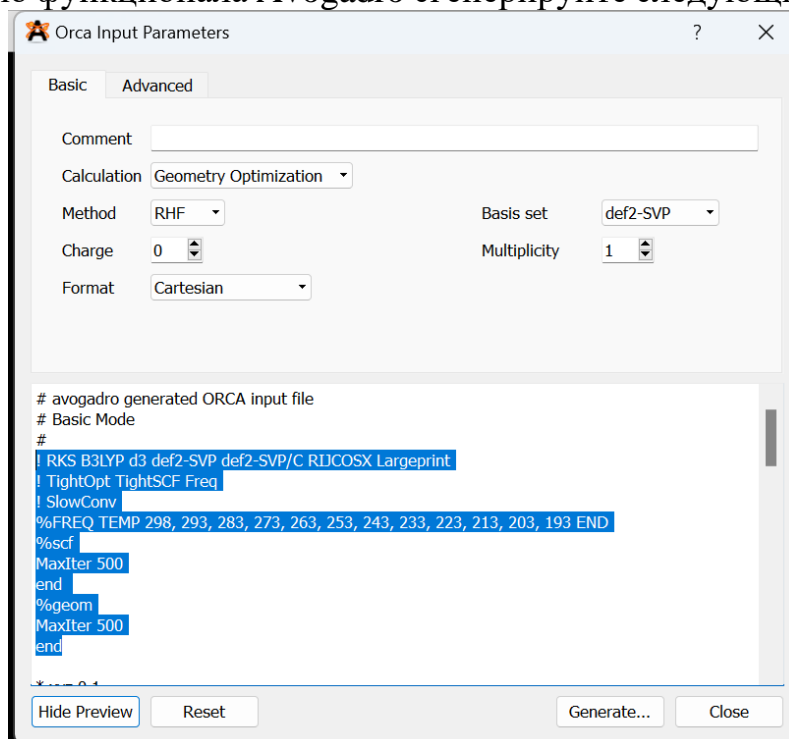


- Заполненная сольватная оболочка молекулы сахарозы. У 8 гидроксильных групп 8 молекул воды.

- Постройте молекулу воды в новом окне графического редактора. Сохраните в файле с расширением «xyz» в отдельную папку.

4. Сгенерируйте 3 inp-файла. Молекулу воды. Молекулу сахарозы. Молекулу сахарозы с 8 молекулами воды.

- С помощью функционала Avogadro сгенерируйте следующий метод расчета:



```
! RKS B3LYP d3 def2-SVP def2-SVP/C RIJCOSX Largeprint
! TightOpt TightSCF Freq
! SlowConv
%FREQ TEMP 298, 293, 283, 273, 263, 253, 243, 233, 223, 213, 203, 193 END
%scf
MaxIter 500
end
%geom
MaxIter 500
end
```

Данный расчет позволяет определять термодинамические характеристики системы при заданной вами температуре.

```
! r2SCAN-3c printbasis largeprint Opt Freq
%FREQ TEMP 298, 293, 283, 273, 263, 253, 243, 233, 223, 213, 203, 193 END
%Scf
MaxIter 500
```

End

Для слабых вычислительных мощностей подойдет вышеописанный метод расчета.

5. Рассчитайте сгенерированные inp-файлы с помощью программного пакета ORCA.

6. Визуализируйте полученные расчетные величины. Рассчитайте энергию Гиббса реакции.

Формула расчета энергии Гиббса реакции:

$$\Delta G_T^\circ = G_{prod.} - G_{reag.} \quad (6)$$

где, $G_{prod.}$ – это свободная энергия Гиббса из файла «sucrose+_8water.out». Т.е.

$$G_{prod.} = GIBBS\ FREE\ ENERGY_{sucrose+_8water.out} \quad (7)$$

$G_{reag.}$ - это сумма свободной энергии Гиббса из файла «sucrose.out» и «water.out» · 8, при этом свободная энергия Гиббса файла «water» умножается на 8, так как в системе 8 молекул воды.

$$G_{reag.} = GIBBS\ FREE\ ENERGY_{sucrose.out} + 8 \cdot GIBBS\ FREE\ ENERGY_{water.out} \quad (8)$$

• Проведите перевод энергии Гиббса из единиц Хартри в ккал/моль или кДж/моль.

7. Аналогично постройте молекулу глюкозы ($C_6H_{12}O_6$) с заполненной сольватной оболочкой (5 молекул воды), молекулу глюкозы и молекулу воды. Рассчитайте энергию Гиббса реакции используя программный пакет ORCA. По полученным термодинамическим характеристикам (энергиям Гиббса реакций) сделайте вывод о том, какое вещество обладает большими криопротекторными свойствами.

Рекомендуемая литература и полезные ссылки

1. Klainer A. S., Perkins R. L. Normal and abnormal morphology of microorganisms: A scanning-beam electron microscope study //JAMA. – 1971. – Т. 215. – №. 10. – P. 1655-1657.
DOI: 10.1001/jama.1971.03180230065013
2. Elzeini H. M. et al. Morphological and rheological identification of cocci lactic acid bacteria //J Microb Biochem Technol. – 2017. – Т. 9. – №. 01. – P. 519-26.
DOI: 10.4172/1948-5948.1000337
3. Moyes, Rita B., Jackie Reynolds, and Donald P. Breakwell. Differential staining of bacteria: gram stain // Current Protocols in Microbiology – 2009. –15.1. –: A-3C.
DOI: 10.1002/9780471729259.mca03cs15
4. Othman, Majdiah, et al. Extractive fermentation of lactic acid in lactic acid bacteria cultivation: A review. // Frontiers in Microbiology – 2017 – 8. – P. 2285.
DOI: 10.3389/fmicb.2017.02285
5. Lavrentev, Filipp V., et al. Perspectives of Bacillus coagulans MTCC 5856 in the production of fermented dairy products //LWT – 2021. – 148. – P. 111623.
DOI: 10.1016/j.lwt.2021.111623
6. Аcai, Pavel, et al. "Growth prediction of two bacterial populations in co-culture with lactic acid bacteria. Food Science and Technology International – 2019 – 25.8: – P. 692-700.
DOI: 10.1177/1082013219860360
7. Wang Y. et al. Metabolism characteristics of lactic acid bacteria and the expanding applications in food industry //Frontiers in bioengineering and biotechnology. – 2021. – Т. 9. – P. 612285.
DOI: 10.3389/fbioe.2021.612285
8. Eltantawy M. M. et al. Self-Assembled Liesegang Rings of Hydroxyapatite for Cell Culturing //Advanced NanoBiomed Research. – 2021. – Т. 1. – №. 5. – P. 2000048.
DOI: 10.1002/anbr.202000048
9. Степанов Н. Ф. Квантовая механика и квантовая химия. — М.: Мир, 2001. — С. 519. — ISBN 5-03-003414-5.
10. Ашихмина Мария Сергеевна, Краснова Василиса Федоровна, Орлова Ольга Юрьевна, Уласевич Светлана Александровна, Скорб Екатерина Владимировна РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ЛИОФИЛИЗАЦИИ И ОПТИМИЗАЦИЯ КРИОПРОТЕКТОРОВ ДЛЯ УЛУЧШЕНИЯ СОВМЕСТНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ БАКТЕРИЙ BACILLUS COAGULANS И STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS // Ползуновский вестник. 2024. №2. URL:

<https://cyberleninka.ru/article/n/razrabotka-tehnologii-liofilizatsii-i-optimiza-tsiya-krioprotektorov-dlya-uluchsheniya-sovmestnogo-kultivirovaniya-bakteriy>



Сайт Научно-образовательного центра инфохимии
Университета ИТМО
<https://infochemistry.ru/>



Группа Научно-образовательного центра инфохимии
Университета ИТМО
<https://vk.com/infochemistry>

Ашихмина Мария Сергеевна
Володарский Михаил Олегович
Осьмак Ольга Олеговна
Филозоп Владислав Сергеевич
Санников Максим Витальевич
Старикова Анна Александровна
Уласевич Светлана Александровна
Скорб Екатерина Владимировна

Мобильная микробиологическая лаборатория "КУБ"

Учебно-методическое пособие

В авторской редакции

Редакционно-издательский отдел Университета ИТМО

Зав. РИО

Н.Ф. Гусарова

Подписано к печати

Заказ №

Тираж

Отпечатано на ризографе

Редакционно-издательский отдел
Университета ИТМО
197101, Санкт-Петербург, Кронверкский пр., 49, литер А