

Государственное Образовательное Автономное Учреждение
«Новгородский Кванториум»

«Сравнение штаммов диких МКБ с культурными по скорости выработки
молочной кислоты»

Работу выполнили: Крайнева Анастасия 11 класс;

Мазур Анна 10 класс;

Макаревич Арина 8 класс

Руководитель проекта: Федоров Дмитрий Владимирович-
педагог доп. образования

Великий Новгород

2021

Содержание

I. Введение	2
1. Актуальность.....	
2. Проблема.....	
3. Гипотеза.....	
4. Цель.....	
5. Задачи.....	
II. Теоретическая часть	4
III. Практическая часть	6
IV. Заключение	14
1. Выводы.....	
2. Перспективы дальнейшего исследования.....	
V. Литература	15
VI. Приложение	15

Введение

Молочнокислые бактерии (МКБ) являются естественными обитателями желудочно-кишечного тракта и слизистых оболочек человека и животных. Также эти бактерии встречаются на поверхностях растений и в молочных продуктах. Как правило, среда обитания этих бактерий характеризуется избытком углеводов. Примером таких сред могут служить молочные продукты, ферментированное мясо, хлебобулочные изделия и субстраты растительного происхождения.

Лактобактерии играют важную роль в жизнедеятельности человека и животных: они создают кислую среду, которая подавляет патогенную микрофлору, поддерживают и оказывают стимулирующее действие на иммунную систему, помогают усвоению витаминов. Стоит отметить, что даже среди рассматриваемой группы бактерий встречаются патогенные формы.

В промышленности лактобактерии используют для создания многочисленных ферментированных продуктов питания. Также данные бактерии используются для производства молочной кислоты, экзополисахаридов и бактериоцинов, оказывающих угнетающее действие на другие виды бактерий. Лактобактерии широко применяются в качестве пробиотиков.

Актуальность:

Молочная кислота является востребованным продуктом как в пищевой промышленности (используется в качестве консерванта и подкислителя) так и при производстве биоразлагаемых полимеров. Молочную кислоту получают как химическим методом так и ферментативным, и актуальность последнего метода не снижается.

Проблема:

Любое производство интересуют те штаммы бактерий, которые производят молочную кислоту с наибольшей скоростью. Проанализировав обстановку на данный момент выяснили, что используют не большое разнообразие видов бактерий. Например, для сквашивания йогуртов используют сухие закваски, включающие в себя (в большинстве случаев) бактерии *Lactobacillus bulgaricus* и *Streptococcus thermophilus*.

Гипотеза:

Можно предположить, что молочнокислые бактерии, обнаруженные на растениях семейства Крестоцветные Бобовые, Злаковые и Гречишные могут отличаться скоростью выработки молочной кислоты.

Цель:

Выделить с поверхности растительного сырья Штаммы молочнокислых бактерий. Определить МКБ, которые наиболее активно вырабатывают молочную кислоту; проверить резистентность к антибиотикам.

Задачи:

1. Проанализировать литературу по данной теме;
2. Выделить культуры молочнокислых бактерий;
3. Пересеять колонии бактерий;
4. Произвести тест на наличие каталазы;
5. Произвести окраску по методу Грама;
6. Исследовать подвижность колоний;
7. Измерить скорость выработки молочной кислоты и сравнить результаты с культурными штаммами;
8. Провести исследование антибиотикоустойчивости бактерий (тест на резистентность к антибиотикам);
9. Подвести итоги проделанного исследования, сделать выводы.

Теоретическая часть

Характеристика молочнокислых бактерий

Общие сведения

Молочнокислые бактерии представляют собой группу грамположительных бактерий, включающую роды *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus* и *Bifidobacterium*, которые обладают способностью к ферментации сахаров с образованием молочной кислоты.

Органические кислоты и метаболиты, продуцируемые лактобактериями играют важную роль в сохранении пищевых продуктов, а также в поддержании кислотного рН. Выделяемые бактериями бактериоцины подавляют рост болезнетворных организмов и продлевают срок хранения продуктов. Молочнокислые бактерии, а именно бактерии родов *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, играют ключевую роль в получении силоса, причем на последних стадиях созревания (после снижения рН ниже 5.5).

Молочнокислые бактерии характеризуются палочковидные или сферической формы. Как правило, лактобактерии являются неспорообразующими, исключение составляют *Sporolactobacillus inulinus*. Представители данной группы неподвижны, их организмы не содержат каталазы и нитраты. Лактобактерии являются факультативными анаэробами.

Молочнокислые бактерии ферментируют углеводы с образованием молочной кислоты в качестве конечного продукта. Лактобактерии не способны синтезировать АТФ за счет дыхания, поскольку не содержат цитохромы. Представители данной группы способны только к брожению.

Молочнокислые бактерии можно разделить на две физиолого-биохимические подгруппы:

- 1) Гомоферментативные МКБ;

Представители данной подгруппы образуют практически одну молочную кислоту. К ним относятся бактерии видов *Streptococcus lactis*, *Streptococcus cremoris*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus lactis* и др.

2) Гетероферментативные МКБ;

Такие бактерии образуют смесь молочной кислоты, этанола, CO₂, и уксусной кислоты. К ним относятся *Leuconostos mesenteroides*, *Lactobacillus brevis*, *Bifidobacterium bifidum* и др.

На основе вышеперечисленной информации можно составить полный перечень признаков, определяющих лактобактерий:

- грамположительные;
- не образуют спор;
- не содержат каталазу;
- не содержат цитохромов;
- аэро- и кислототолерантные;
- требовательны к источникам питания;
- образуют молочную кислоту в качестве основного конечного продукта углеводного метаболизма.

Среда обитания

- 1) Молочнокислые бактерии **не обнаруживаются** в почве и в водоёмах.
- 2) Лактобактерии **обнаруживаются** в растениях и разлагающихся растительных остатках;

Лактобациллы обнаруживаются на всей поверхности растений, в ризосфере и в прикорневой зоне. В больших количествах они присутствуют в разлагающихся растительных остатках особенно на гниющих фруктах.

- 3) Лактобациллы **присутствует** в ферментированных пищевых продуктах растительного происхождения: квашеной капусте, солёных огурцах и другое) и напитках (пиве, вине, соках);
- 4) Молоко **не содержит** лактобацилл, когда покидают вымя, но они быстро попадают в него из воздуха, с инструмента и др.;

Стрептококки опережают лактобациллы по скорости роста, поэтому титр лактобациллы низкий даже в скисший молоке. Со временем лактобациллы начинают преобладать из-за большей устойчивости к кислой среде. Лактобациллы содержится в различных кисломолочных продуктах (йогурте, сыре, кефире и др.), куда их обычно доставляют специально при изготовлении пищевого продукта.

- 5) Молочнокислые бактерии **являются частью** нормальной микрофлоры человека и животных и присутствует в кишечнике и на слизистых оболочках.

Практическая часть

Ход работы

Выделение культур лактобактерий:

Исследуемый объект исследования- семейство Крестоцветные-капуста (зашифрованный образец №1); семейство Злаковые-ежа сборная (образец №2); семейство Бобовые-клевер (образец №3); семейство Гречишные-щавель (образец №4). Культурные штаммы: покупная кисломолочная продукция местного производства.

Для выделения культур понадобились:

- Питательная среда MRS- 13,4 г.
- Чашки Петри;
- NaCl;
- Ватные палочки;
- Дистиллированная вода для приготовления растворов;
- Термостойкий стакан для приготовления раствора среды;
- Микроволновая печь или водяная баня для приготовления среды;
- Ступка и пестик для измельчения образцов.

Приготовление среды для выделения бактерий:

- 1) Высыпали в термостойкий стакан 13,4 г. питательной среды MRS;
- 2) Добавили в стакан 200 мл дистиллированной воды;
- 3) Перемешали содержимое стакана с помощью шпателя или ложки;
- 4) Подогрели стакан в водяной бани до полного растворения компонентов;
- 5) Охладили полученный раствор до 45-50°С
- 6) На дно чашек Петри налейте тонкий слой (3-5 мм) полученного раствора среды.
(см. приложение фотографию 1)

Приготовление физиологического раствора:

- 1) Скрутили крышку и извлечем носик-дозатор из капельницы с навеской NaCl;
- 2) Добавили в капельницу 15 мл дистиллированной воды;
- 3) Вставили носик-дозатор в горлышко капельницы;

- 4) Плотно закрутили винтовую крышку и встряхивающими движениями руки перемешаем раствор до полного растворения соли.
(см. приложение фотографию 2)

Подготовка образцов растений:

- 1) Измельчили 1 г. исследуемого образца с помощью ножа или ножниц;
- 2) Поместили измельченную траву в ступку и добавьте 5 мл физиологического раствора (1/3 капельницы);
- 3) Растерли смесь в ступке с помощью пестика;
(см. приложение фотографию 3, 4, 5)

Нанесение образцов растений:

- 1) Обмакнули ватную палочку в раствор, образовавшийся при измельчении образца;
- 2) Аккуратно, стараясь не повредить поверхность среды, нанесли образец на поверхность одной секции чашки Петри. При нанесении образца следует водить ватной палочкой по среде, стараясь повторить узор, показанный на рисунке 1.
(см. приложение фотографию 6)
- 3) Поместили чашки Петри с нанесенными образцами в темное место на 3-7 дней (см. приложение фотографию 7,8). *Спустя 4 дня в чашке Петри выросли различные виды бактерий и плесень.*

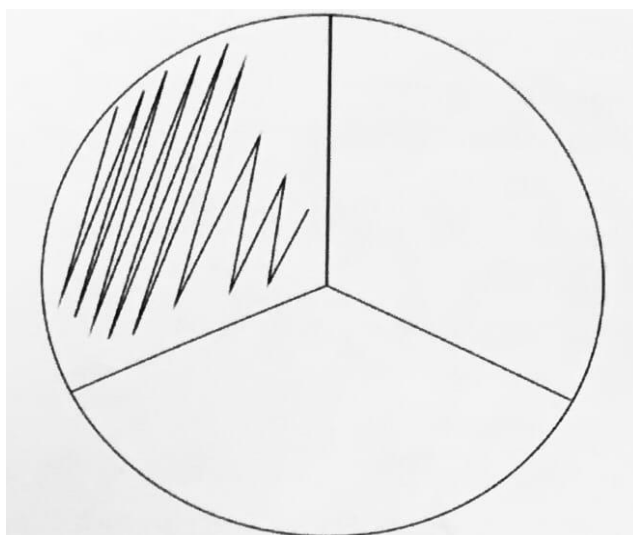


Рисунок 1

Пересев колоний бактерий:

- Зубочистки;
- Предметные стекла;
- NaCl-одна капельница (0,135 г);
- Ватные палочки;

- Питательная среда MRS- 13,4 г.
- CaCO₃- 4 г.
- Чашки Петри.

Приготовление среды:

- 1) Высыпали в термостойкий стакан 13,4 г. питательной среды MRS;
- 2) Добавили в стакан 200 мл дистиллированной воды;
- 3) Перемешали содержимое стакана с помощью шпателя и ложки;
- 4) Подогрели стакан в микроволновой печи до полного растворения компонентов;
- 5) Высыпали в раствор 4 г. CaCO₃ и перемешайте содержимое стакана до однородного состояния;
- 6) Охладили полученный раствор до 45-50°C;
- 7) На дно чашек Петри наливаем тонкий слой (3-5 мм) полученного раствора среды.

Отбор колоний для пересева:

- 1) Проанализировали колонии, выросшие в чашках Петри. Лактобактерии характеризуются следующими признаками:
 - Растут медленно и не образуют крупных колоний;
 - Колонии гладкие с ровными краями;
 - Колонии не имеют яркой окраски. Обычно, лактобактерии образуют колонии белого или молочного цвета и точно не бывают жёлтыми или оранжевыми.
(см. приложение фотографию 9)
- 2) Выбрали в чашках Петри колонии, наиболее подходящие под характеристики, перечисленные в п.1; *Смотря в бинокулярный микроскоп, обнаружили предположительные колонии молочнокислых бактерий. Колонии имели кремово-бежевую окраску и круглую форму с гладкими краями.*

Пересев выбранных колоний:

- 1) Нанесли на предметное стекло каплю физиологического раствора;
- 2) С помощью зубочистки подцепили выбранную колонию бактерий и перенесли в каплю физиологического раствора на предметном стекле;
(см. приложение фотографию 10)
- 3) Разболтали колонию в растворе (до получения однородной суспензии);
- 4) Обмакнули ватную палочку в полученную суспензию;
- 5) Нанесли образец на поверхность одной секции чашки Петри. Пример приведен на рисунке 2.

- б) Поместили чашки Петри с нанесенными колониями в темное место на 3-7 дней.

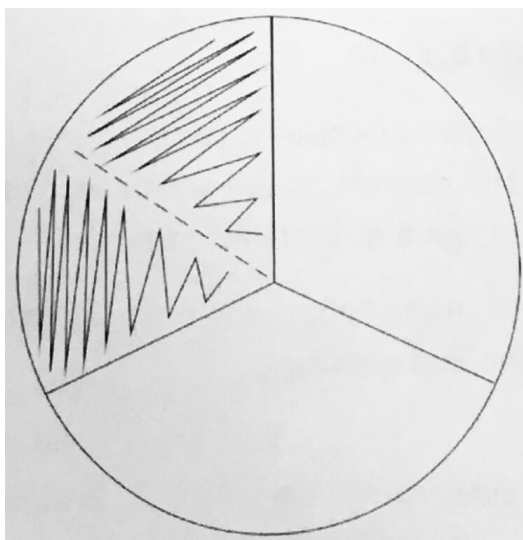


Рисунок 2.

Анализ полученных колоний:

Молочнокислые бактерии при росте в среде с добавлением CaCO_3 должны образовывать вокруг колоний зоны просветления, обусловленные превращением нерастворимого карбоната кальция в растворимый лактат кальция.

Бактерии имели запах, характерный молочнокислым продуктам. Цвет-кремово-бежевый.

(см. приложение фотографии 11,12)

Определили, являются ли выращенные культуры лактобактериями можно по совокупности признаков:

- Лактобактерии характеризуются отсутствием фермента, определяющего способность культуры разлагать пероксид водорода, -каталазы;
- Лактобактерии, как правило, неподвижны;
- Форма лактобактерий- палочки;
- Лактобактерии являются грамположительными.

Тест на наличие каталазы:

- 1) С помощью зубочистки подцепили колонию бактерий и перенесли её на предметное стекло;
- 2) Нанесли на колонию каплю пероксида водорода;
- 3) Выбрали бактерии с отрицательными результатами теста (пузырьки кислорода не образовывались).

В ходе эксперимента выделить чистую культуру не удалось, так как при проведении теста на каталазу, все образцы выделяли кислород.

Окраска по методу Грама

Окрашивание позволяет определить форму, а также толщину стенки бактерий.

Для выполнения потребовались:

- Зубочистки;
- Предметные стекла;
- Физиологический раствор;
- Фильтровальная бумага;
- Пинцет;
- Раствор генцианвиолета;
- Раствор Люголя;
- Изопропиловый спирт;
- Раствор фуксина.
- (см. приложение фотографию 13)

Процедура окрашивания:

- 1) Нанесли на предметное стекло каплю физиологического раствора;
- 2) С помощью зубочистки подцепили колонию бактерий и перенесли её в каплю физиологического раствора на предметном стекле;
- 3) Суспендировали колонию в растворе;
- 4) Высушили суспензию на воздухе;
- 5) Зафиксировали препарат с помощью пламени;
- 6) Отрезали от фильтровальной бумаги квадратный фрагмент;
- 7) Накрыли квадратным фрагментом фильтровальной бумаги зафиксированный препарат;
- 8) Нанесли на фрагмент фильтровальной бумаги каплю генцианвиолета и оставили на 2 минуты, для того чтобы препарат пропитался красителем;
- 9) Убрали фрагмент фильтровальной бумаги с препарата;
- 10) Нанесли на препарат каплю раствора Люголя и оставили на 1 минуту;
- 11) Смыли краситель с препарата с помощью изопропилового спирта;
- 12) Отрезали от фильтровальной бумаги ещё один квадратный фрагмент;
- 13) Промыли препарат под струей проточной воды;
- 14) Накрыли квадратным фрагментом фильтровальной бумаги зафиксированный препарат;
- 15) Нанесли на фрагмент фильтровальной бумаги каплю фуксина и оставили на 1 минуту, для того чтобы препарат пропитался красителем;
- 16) Промыли препарат под струей проточной воды;
- 17) Высушили полученный препарат.

Лактобактерии оказались грамположительными (окрашенными в фиолетовый цвет).

(см. приложение фотографии 14-17)

Исследование подвижности колоний

- Пробирки;
- Штатив для пробирок;
- Петли микробиологические;
- Питательная среда MRS;

Приготовление среды для выделения бактерий:

- 1) Высыпали в термостойкий стакан 3,35 г. питательной среды MRS;
 - 2) Добавили в стакан 100 мл дистиллированной воды;
 - 3) Перемешали содержимое стакана с помощью шпателя или ложки;
 - 4) Подогрели стакан в водяной бани до полного растворения компонентов;
 - 5) Охладили полученный раствор до 45-50°С
 - 6) Разлили полученный раствор среды по пробиркам. Объем раствора должен занимать $\frac{1}{2}$ от объема пробирки;
- Дожидались застывания среды.

Внесение колоний в среду:

- 7) С помощью микробиологической петли подцепили исследуемую колонию бактерий;
- 8) Петлей с колонией бактерий проткнули среду в пробирке, не доставая до дна 1 см;
- 9) Оставили пробирки на 4 дня в темном месте;

Проанализировали контуры роста колоний. Колонии лактобактерий, как правило, неподвижны и растут только на месте

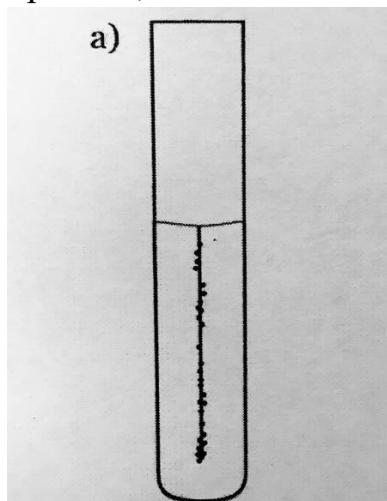


Рисунок 3.

(см. приложение фотографии 18-21)

Колонии неподвижны.

Исследование антибиотикоустойчивости бактерий

Для выполнения исследования понадобились:

- Питательная среда MRS- 13.4 г.;
- Предметные стекла;
- Зубочистки;
- Чаши Петри
- Физиологический раствор;
- Диски для определения устойчивости к антибиотикам.
(Антибиотики- цефтазидим, гентамицин, ципрофлоксацин, канамицин, ампициллин).

Приготовление среды:

- 1) Высыпали в термостойкий стакан 13,4 г. питательной среды MRS;
- 2) Добавили в стакан 200 мл дистиллированной водой;
- 3) Перемешали содержимое стакана с помощью шпателя;
- 4) Подогрели стакан в водяной бане до полного растворения компонентов;
- 5) Охладили полученный раствор 45-50°C;
- 6) На дно чашек Петри налили тонкий слой (3-5 мм) полученной раствора среды.
- 7) Дождались застывания среды.

Проведение исследования:

- 1) Нанесли на предметное стекло каплю физиологического раствора;
- 2) С помощью зубочистки подцепили выбранную колонию бактерий и перенесли в физиологическом растворе на предметном стекле;
- 3) Суспендировали колонию в растворе;
- 4) Обмакнули ватную палочку в полученную суспензию;
- 5) Аккуратно, стараясь не повредить поверхность среды, нанесли образец на поверхность одной чашки Петри. «Проштриховали» среду суспензией колоний (Рисунок 4).
- 6) Разместили 5 разных дисков для определения антибиотикоустойчивости в одной секции на равном расстоянии друг от друга (Рисунок 5).
- 7) Поместили чашки Петри на 3-7 дней в темное место.
(см. приложение фотографии 22-25)

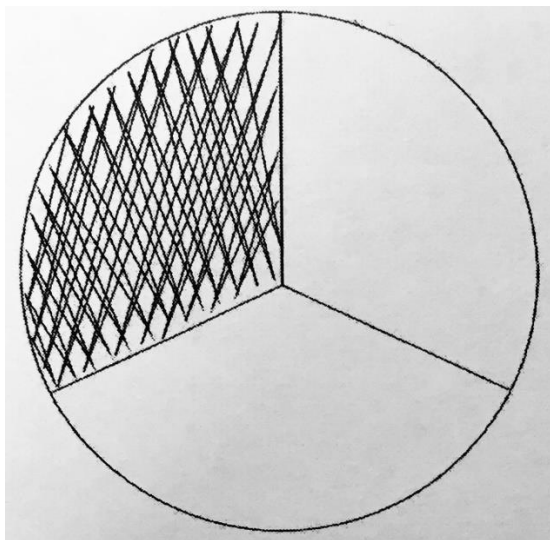


Рисунок 4

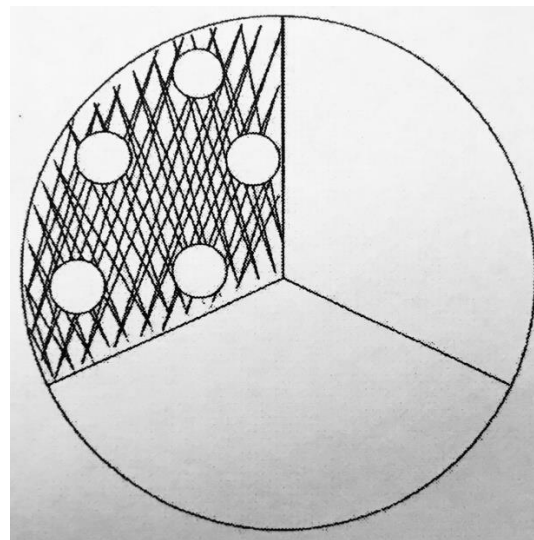


Рисунок 5

Проанализировали содержимое чашек Петри. (Если бактерии устойчивы к антибиотикам, то колонии будут расти равномерно по всей поверхности среды. Если бактерии неустойчивы к какому-то из антибиотиков, то вокруг диска с ним будут образовываться «пустоты»- колонии не будут расти возле диска.

- Бактерии, обнаруженные в растении семейства Крестоцветные оказались неустойчивыми ни к одному из видов проверяемых антибиотиков.
- Бактерии, обнаруженные в растении семейства Злаковые оказались не устойчивы к ампициллину.
- Бактерии, обнаруженные в растении семейства Бобовые оказались неустойчивыми к ампициллину, цефтазидиму и гентамицину.
- Бактерии, обнаруженные в растении семейства Гречишные оказались устойчивы ко всем антибиотикам.

Определение скорости выработки молочной кислоты:

Взяли 6 пробирок. Во все пробирки налили по 10 мл ультрапастеризованного молока «Лактис» АК. Нагрели пробирки с молоком на водяной бане приблизительно до 40°C. В пробирки №1-№4 посеяли колонии предположительных молочнокислых бактерий. В пробирку №5 внесли небольшую порцию (10мкг) йогурта АО «Лактис». Пробирку №6 оставили с чистым молоком. (см. приложение фотографию 26)

Затем поставили штатив с пробирками в термостат при температуре 40°C. (см. приложение фотографию 27). Проверяли скисло ли молоко каждый 20 минут. Данный опыт наглядно отражает процесс створаживания молока и

достаточно прост в выполнении. В связи с ограниченными сроками, реактивами и оборудованием, мы не успели провести более точные измерения, но в перспективе планируется провести опять по определению скорости выработки молочной кислоты методом кислотно-основного титрования.

В результате, первым (спустя 40 минут) скисло молоко пробирке №1, в которую пересели бактерии, обнаруженные в растениях семейства Крестоцветные (см. фотографию 28). Затем (спустя 60 минут) в пробирке №5 с культурными штаммами (см. фотографию 29). Через 1 час 40 минут в пробирках №2 и №4 молоко створожилось, «расслоилось» и также стало иметь характерный запах (см. фотографию 30-31). В пробирке №3 изменений не наблюдалось.

Заключение

Выводы

В результате проведённого исследования подтвердили гипотезу о том, что молочнокислые бактерии с растений, представителей разных семейств обладают разной степенью выработки молочной кислоты, а обнаруженные на растении семейства Крестоцветные обладают наибольшей скоростью выработки молочной кислоты, по сравнению с вышеперечисленными. На основании опыта по определению скорости выработки молочной кислоты пришли к выводу, что культурные штаммы МКБ, находящиеся в покупной кисломолочной продукции вырабатывают её медленнее, чем штаммы выделенные с поверхности Крестоцветных, но быстрее, чем бактерии, выделенные с поверхности других, исследуемых нами растений. Также провели тест на резистентность к антибиотикам и установили, что различные МКБ могут быть полирезистентны, т.е. устойчивы к двум и более антибактериальным препаратам, или не устойчивы к антибиотикам.

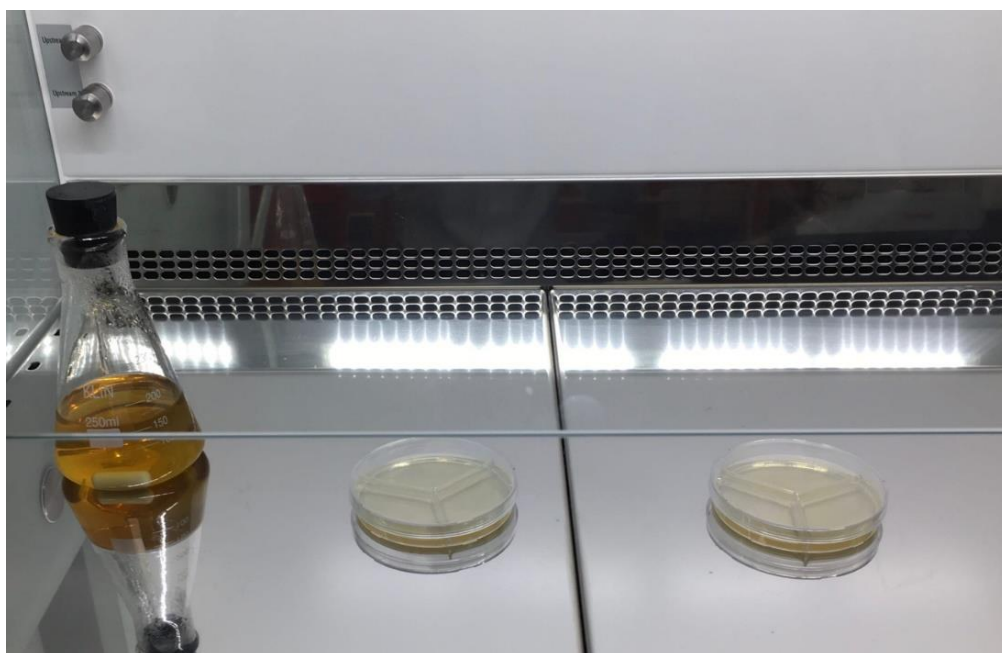
Перспективы дальнейшего исследования:

Поскольку проведенный опыт по скорости выработки молочной кислоты дает лишь косвенный результат. В перспективе будет воспроизведено количественное определение скорости выработки молочной кислоты методом титрования гидроксидом натрия в присутствии фенолфталеина согласно ГОСТу 490-79.

Литература

- Методические рекомендации и инструкции по применению набора «Охотник за лактобактериями»;
- Н.Грин, У.Стаут, Д.Тейлор «Биология. I том» 1996г. (стр.37-41);
- Т.Л.Богданова, Е.А.Солодова «Биология:справочник для поступающих в вузы» 2017г. (стр. 310)
- ГОСТ 490-79. Кислота молочная пищевая. Технические условия (с Изменениями N 1, 2, 3). – Взамен ГОСТ 490-41 – Москва: Изд-во стандартов, 1979. – 14 с.

Приложение



Фотография 1. Приготовление среды для выделения культуры бактерий.



Фотография 2. Приготовление физиологического раствора.

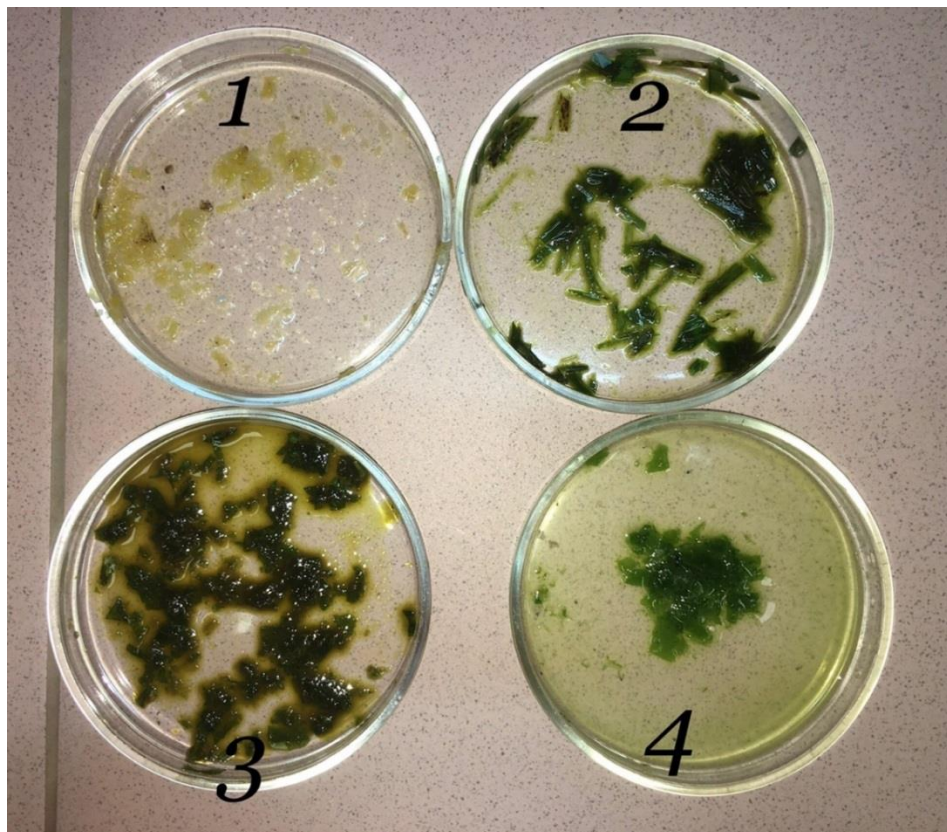


Фотография 3. Образцы бактерий.

1-капуста (Крестоцветные), 2-ежа сборная (Злаковые), 3-клевер (Бобовые), 4-щавель (Гречишные).

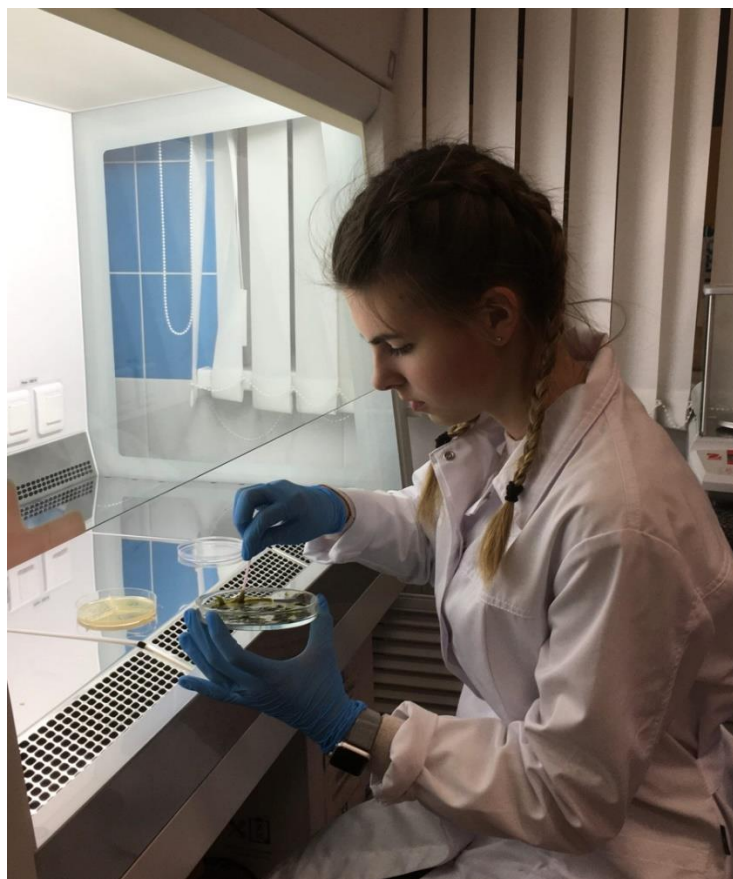


Фотография 4. Измельчение образцов растений.

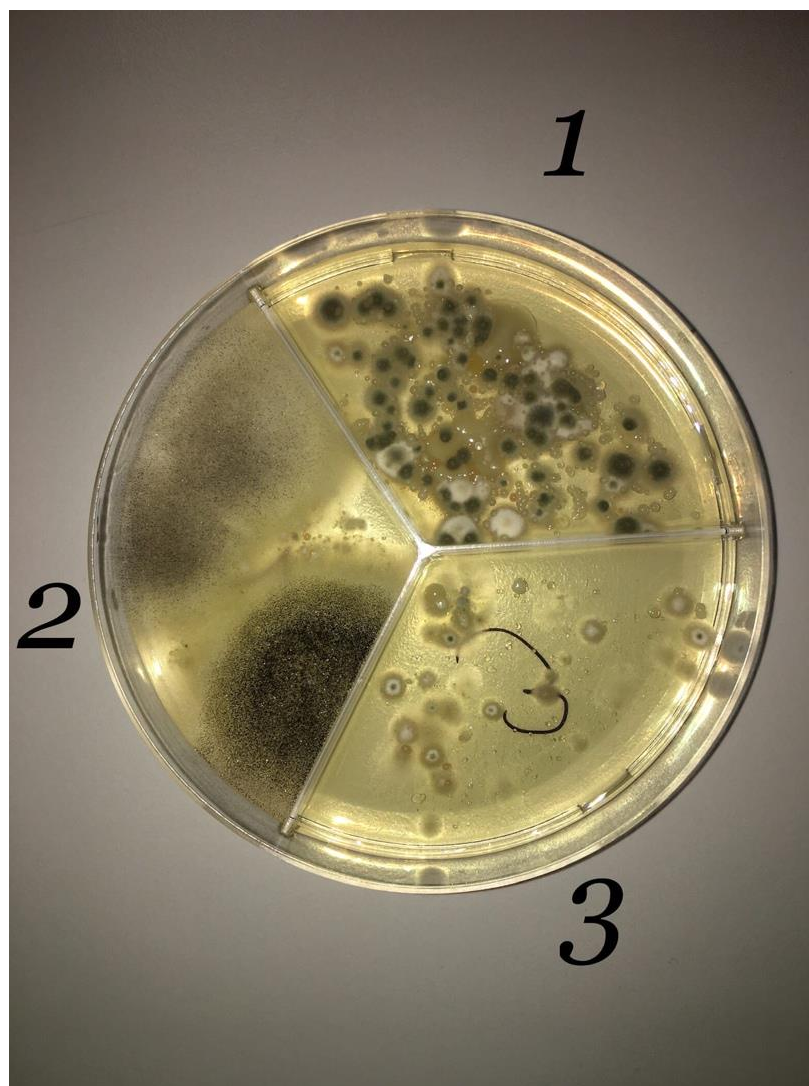


Фотография 5. Подготовка образцов растений.

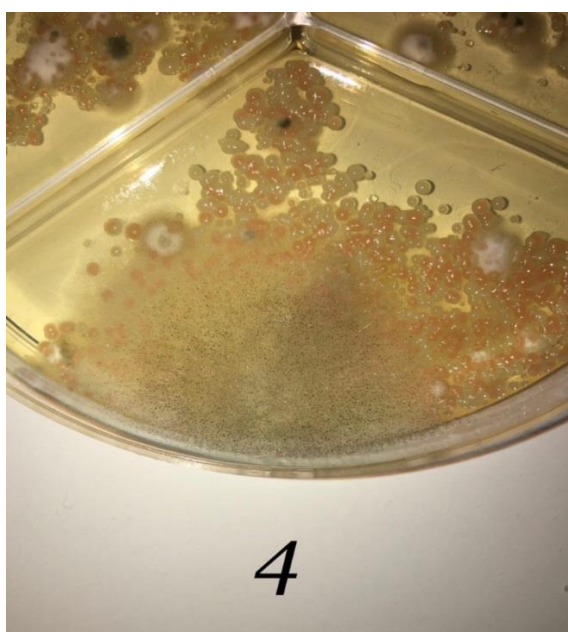
1-капуста (Крестоцветные), 2-ежа сборная (Злаковые), 3-клевер (Бобовые), 4-щавель (Гречишные).



Фотография 6. Нанесение образцов растений.

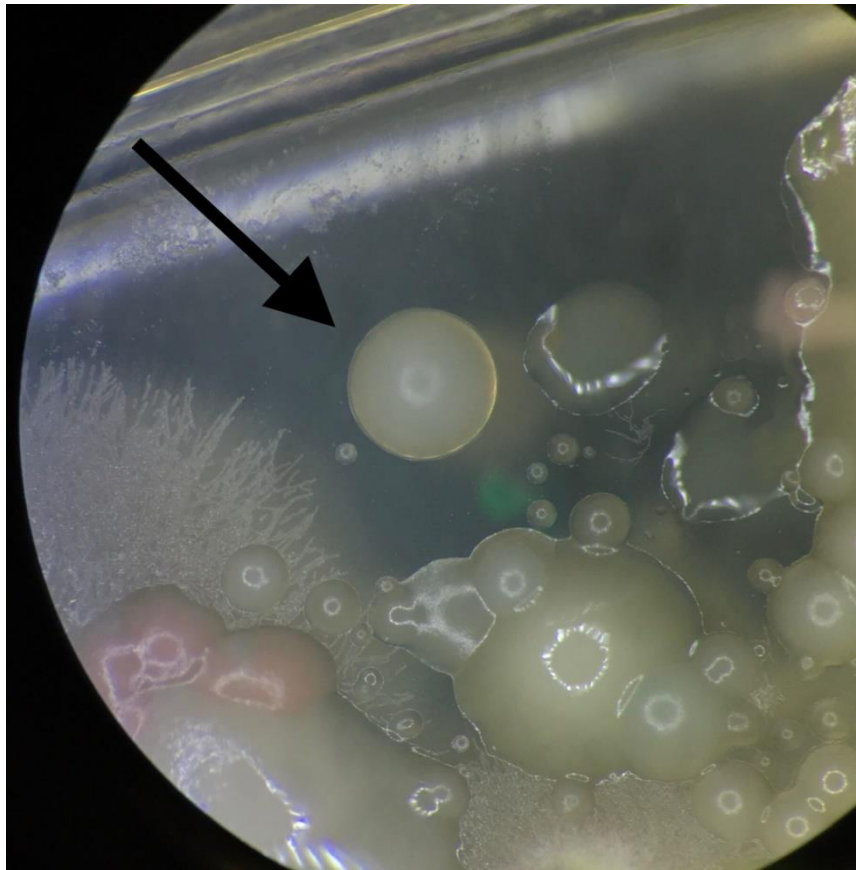


Фотография 7. Результаты спустя 4 дня после нанесения образцов растений.

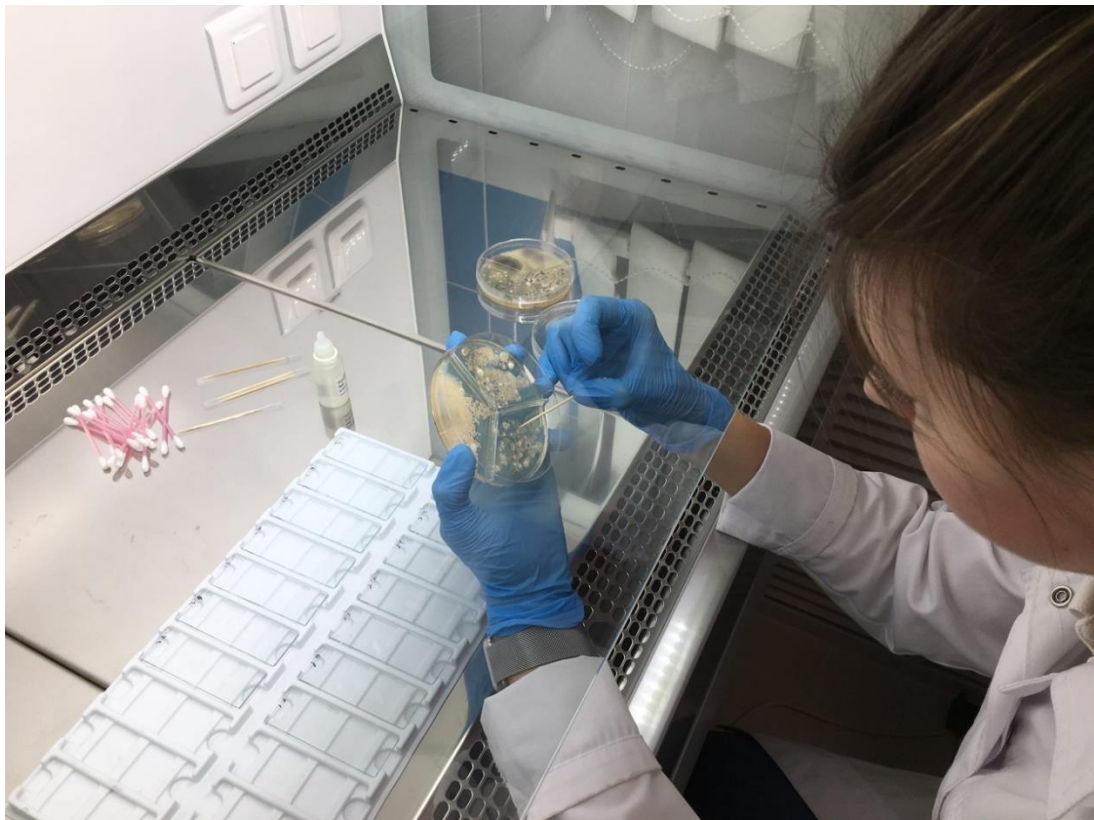


Фотография 8. Результаты спустя 4 дня после нанесения образцов растений.

1-капуста (Крестоцветные), 2-ежа сборная (Злаковые), 3-клевер (Бобовые), 4-щавель (Гречишные).



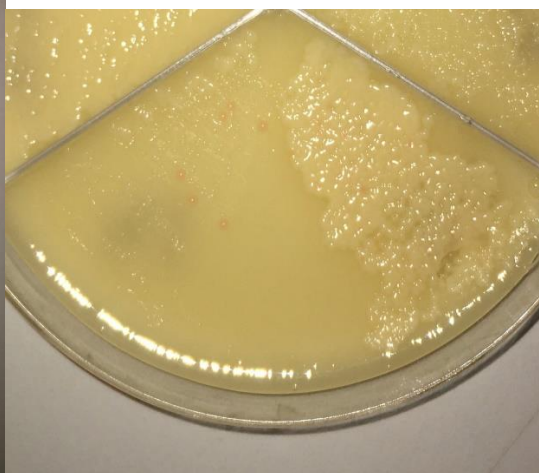
Фотография 9. Колония молочнокислых бактерий под микроскопом.



Фотография 10. Пересев колоний.



Фотография 11.

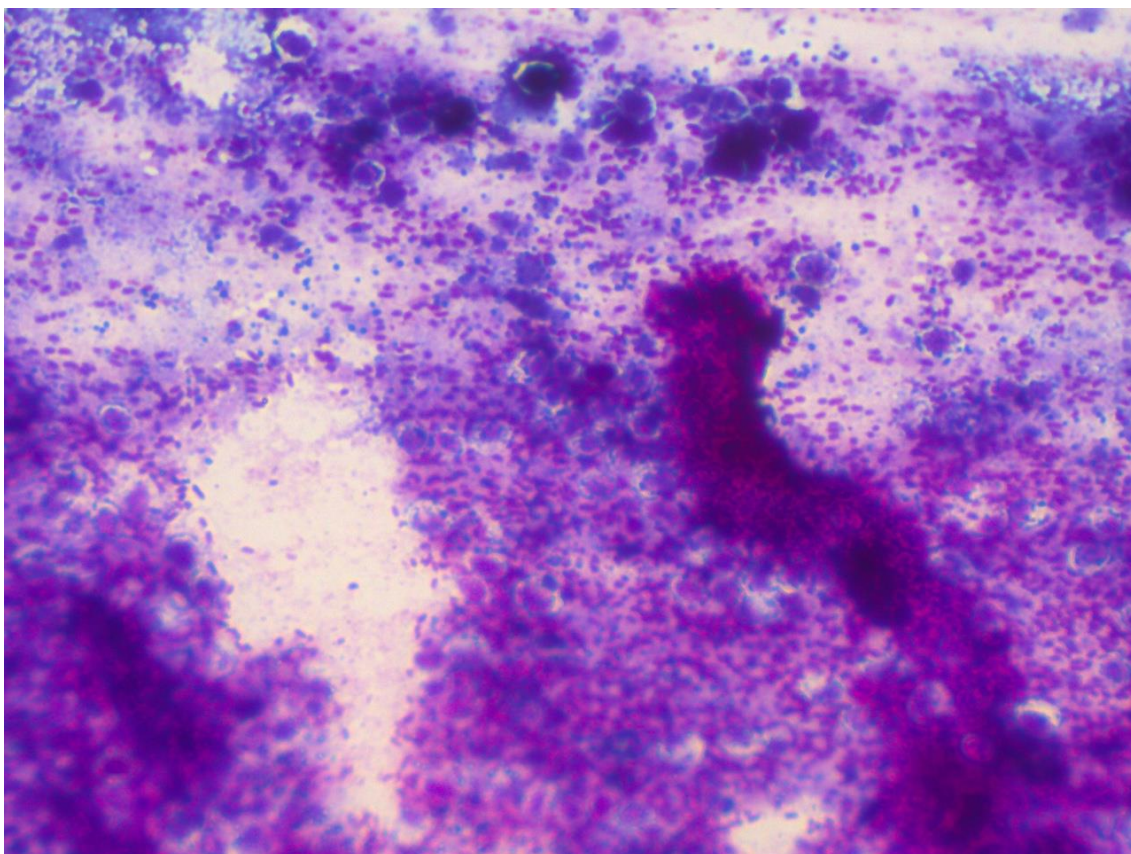


Фотография 12.

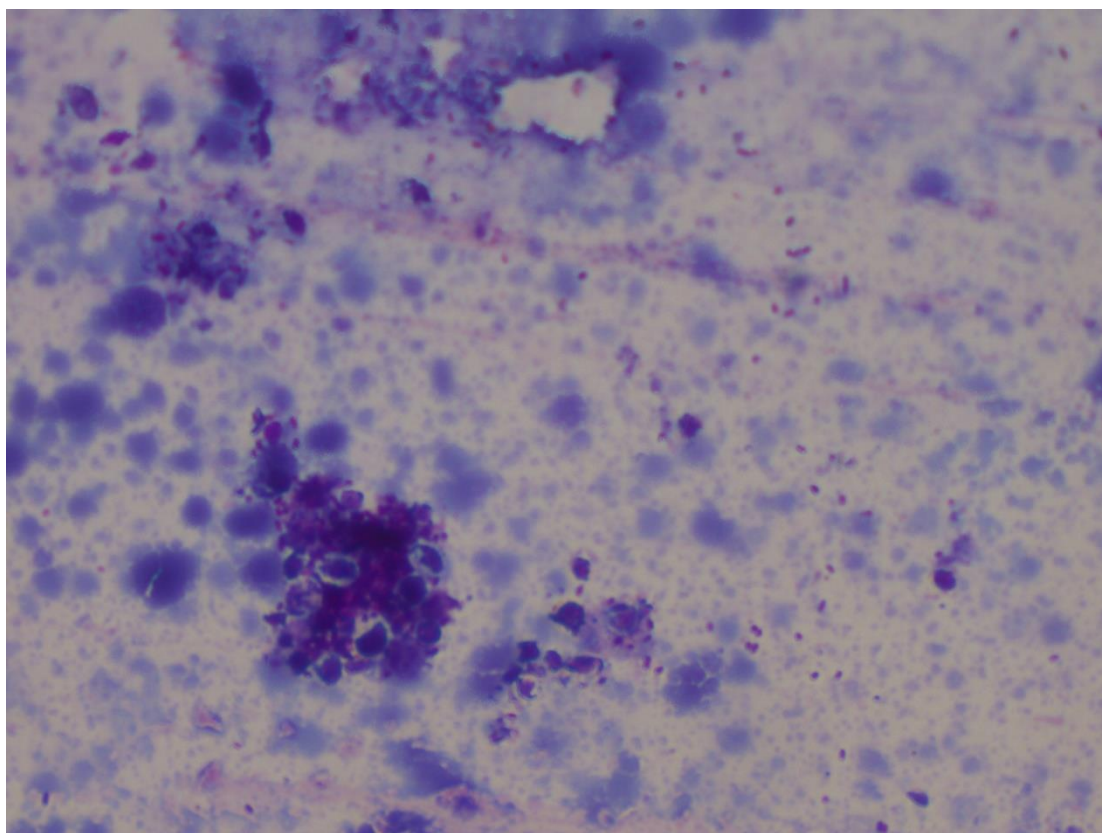
Результаты спустя 4 дня после пересева колоний.



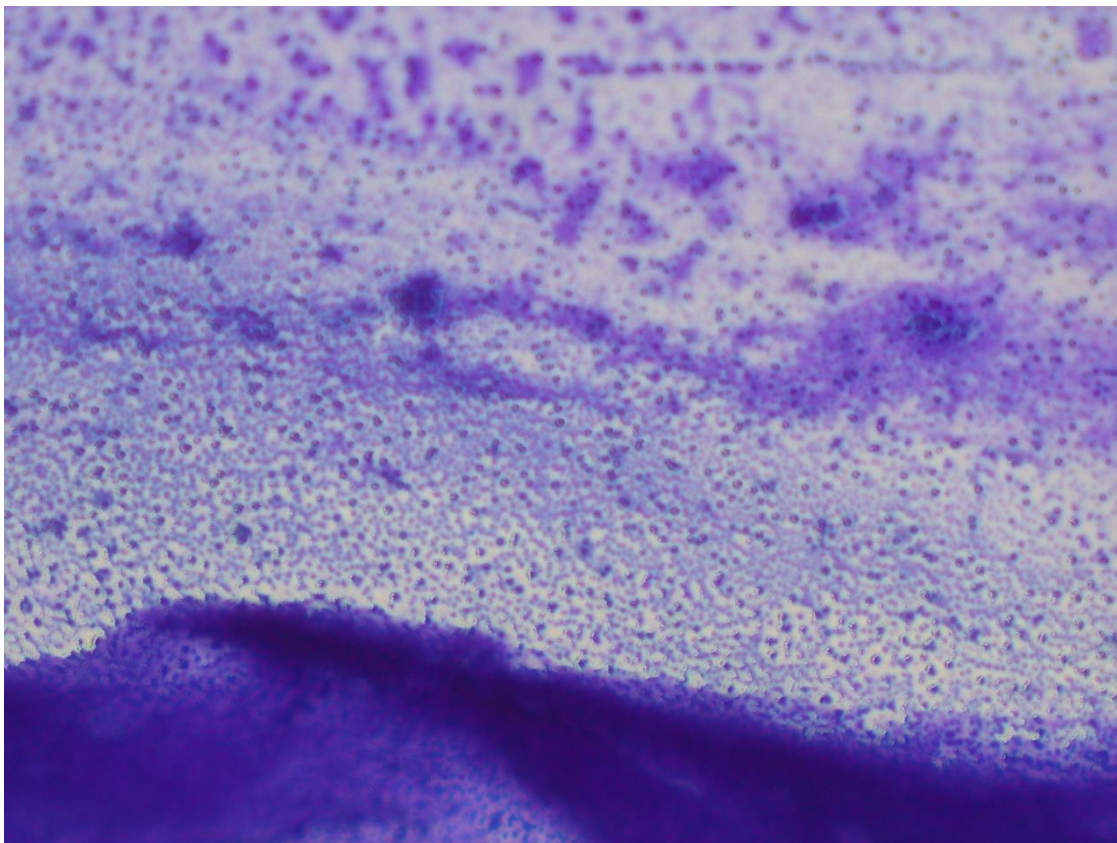
Фотография 13. Компоненты для окраски по методу Грама.



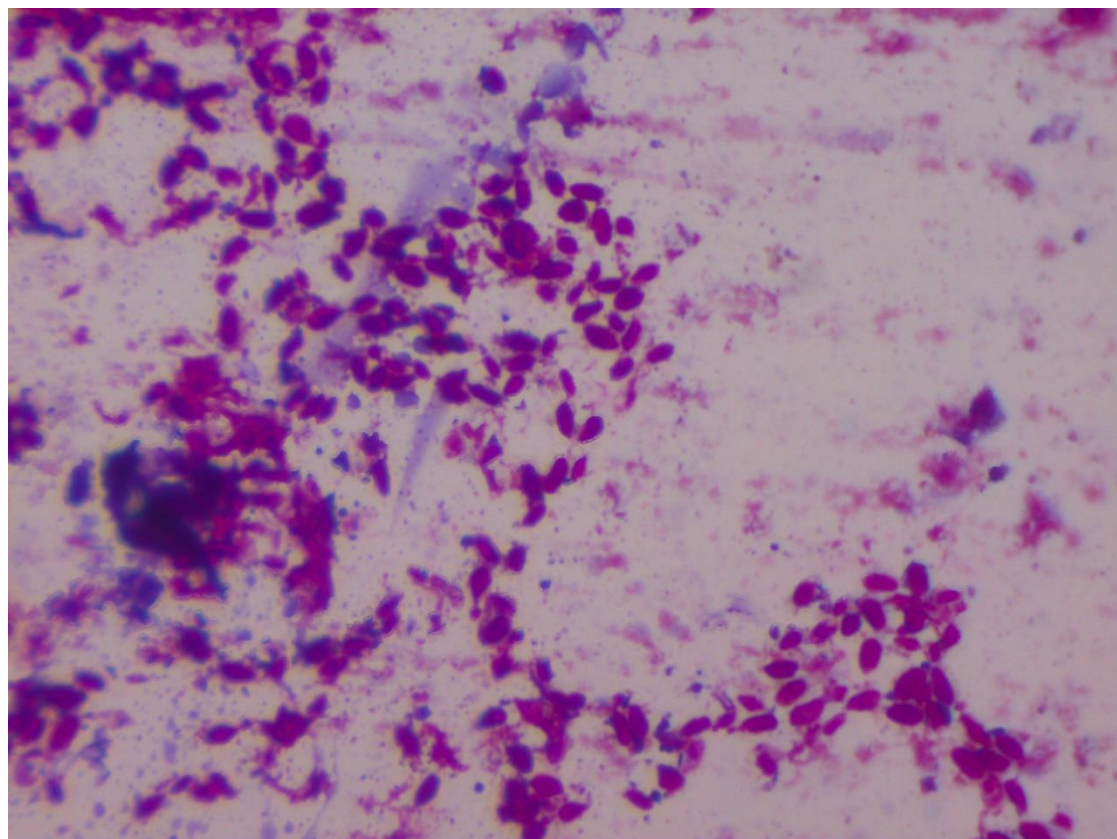
Фотография 14. Проба 1 (МКБ, выделенные из капусты).



Фотография 15. Проба 2 (МКБ, выделенные из ежи сборной).



Фотография 16. Проба 3 (МКБ, выделенные из клевера).



Фотография 17. Проба 4 (МКБ, выделенные из щавеля).



Фотография 18.

Проба 1 (МКБ, выделенные из капусты).



Фотография 19.

Проба 2 (МКБ, выделенные из ежи сборной).



Фотография 20.

Проба 3 (МКБ, выделенные из клевера).



Фотография 21.

Проба 4 (МКБ, выделенные из щавеля).

Колонии неподвижны.



Фотография 22.

Проба 1 (МКБ, выделенные из капусты).



Фотография 23.

Проба 2 (МКБ, выделенные из ежи сборной).



Фотография 24.

Проба 3 (МКБ, выделенные из клевера).



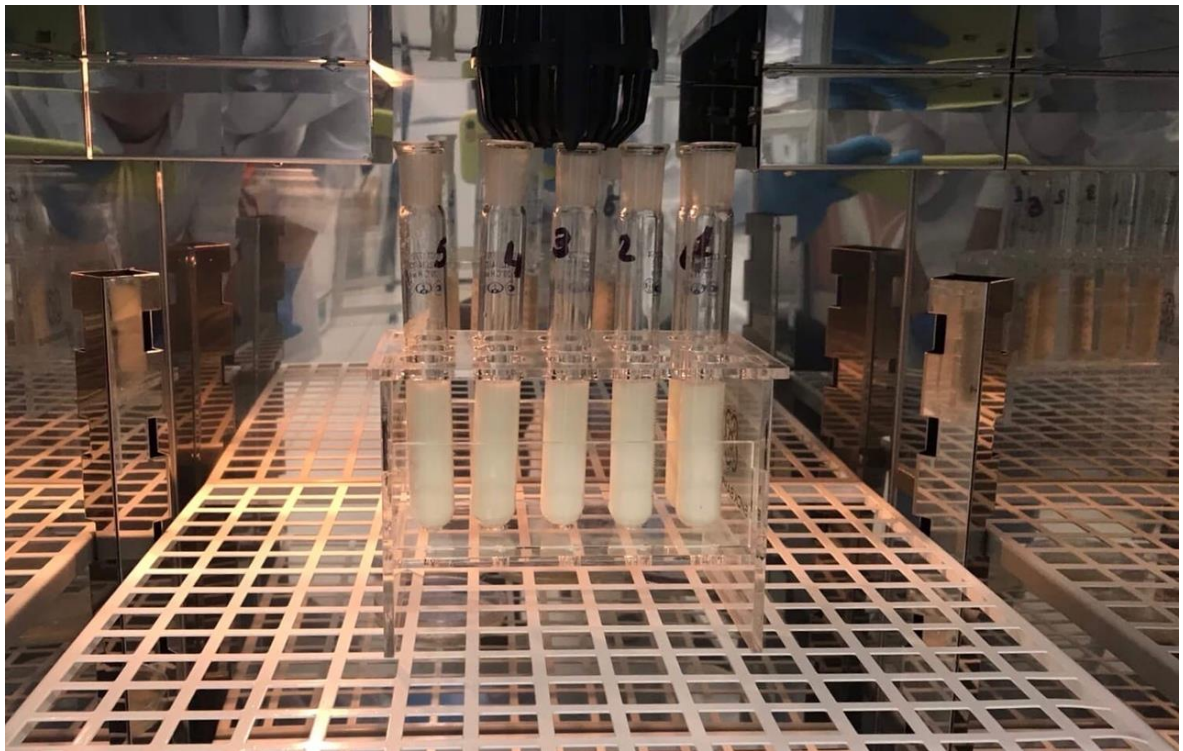
Фотография 25.

Проба 4 (МКБ, выделенные из щавеля).

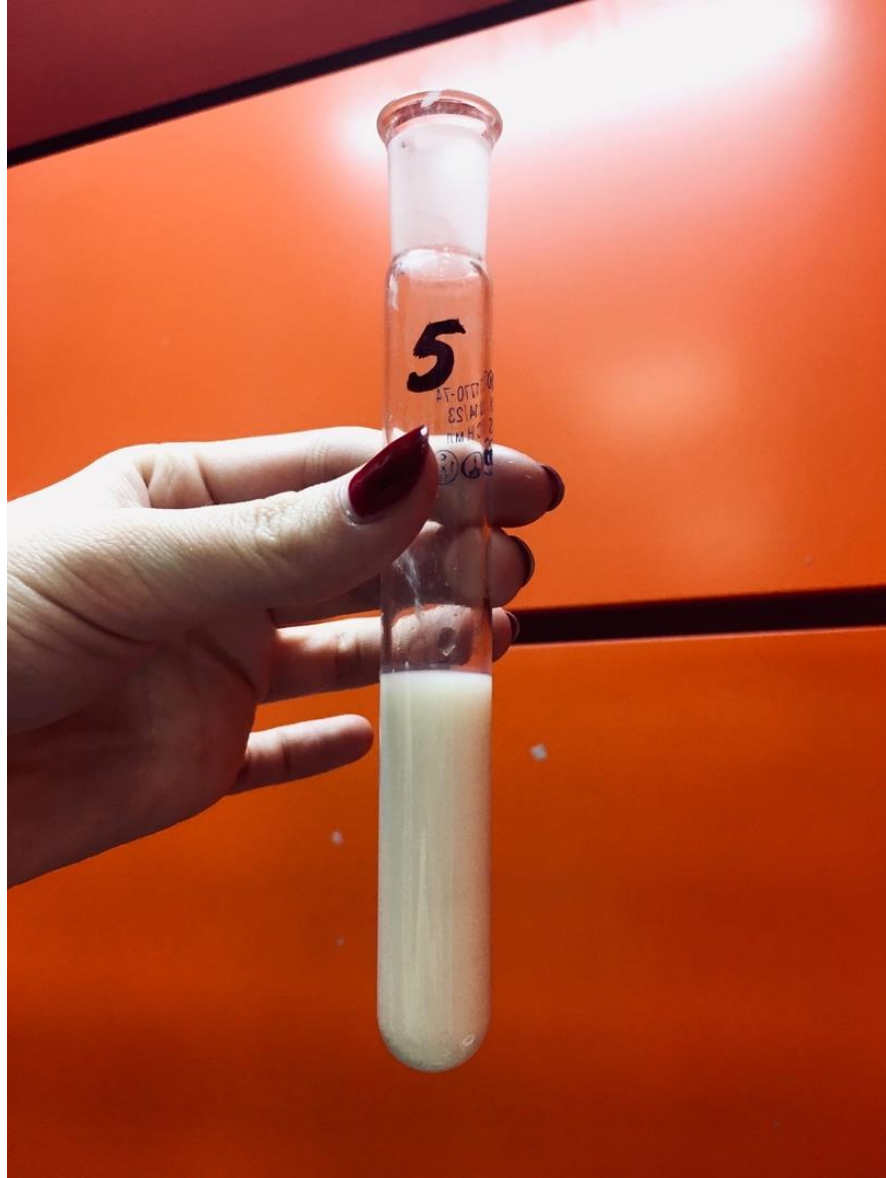
Результаты проведения теста на резистентность к антибиотикам.



Фотография 26. Проведение опыта по определению скорости выработки молочной кислоты.



Фотография 27. Пробирки в термостате.



Фотография 28. Пробирка №1 со скисшим, створоженным молоком.



Фотография 29. Пробирка №5 со скисшим, створоженным молоком.



Фотография 30. Пробирка №2 со скисшим, створоженным молоком.



Фотография 31. Пробирка №4 со скисшим, створоженным молоком.