

Министерство образования и науки Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
Оренбургский государственный университет

Е. С. Алешина, Е. А. Дроздова, Н. А. Романенко

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ КАК ОСНОВА БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА

Рекомендовано ученым советом федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Оренбургский государственный университет» в качестве учебного пособия для студентов, обучающихся по программам высшего образования по направлениям подготовки 06.03.01 Биология

Оренбург
2017

УДК 579.22(075.8)

ББК 28.4я73

А49

Рецензент – доктор биологических наук, доцент Г.В. Карпова

Алешина, Е. С.

А49

Культивирование микроорганизмов как основа биотехнологического процесса : учебное пособие / Е. С. Алешина, Е. А. Дроздова, Н. А. Романенко, Оренбургский гос. ун-т. – Оренбург : ООО ИПК «Университет», 2017. – 191 с.

ISBN 978-5-7410-1658-9

Учебное пособие рекомендовано для студентов медицинских и биологических специальностей при изучении дисциплин «Промышленная микробиология с основами физиологии микроорганизмов», «Введение в биотехнологию», «Биохимия биотехнологических процессов», «Микробиология, вирусология и иммунология», также может быть использовано в качестве основной литературы при написании курсовой работы и в качестве справочного материала при выполнении экспериментальной части дипломного проекта.

В учебном пособии представлены сведения о культивировании микроорганизмов, устойчивости микроорганизмов во внешней среде, влиянии различных факторов среды на рост и развитие микроорганизмов.

Учебное пособие соответствует требованиям ФГОС ВПО по направлению подготовки 06.03.01 Биология, обеспечивая освоение следующих общепрофессиональных компетенций: способность понимать базовые представления о разнообразии биологических объектов, значение биоразнообразия для устойчивости биосферы, способность использовать методы наблюдения, описания, идентификации, классификации, культивирования биологических объектов (ОПК-3); способность применять базовые представления об основах общей, системной и прикладной экологии, принципы оптимального природопользования и охраны природы, мониторинга, оценки состояния природной среды и охраны живой природы (ОПК-10); способность применять современные представления об основах биотехнологических и биомедицинских производств, генной инженерии, нанобиотехнологии, молекулярного моделирования (ОПК-11); способность использовать знание основ и принципов биоэтики в профессиональной и социальной деятельности (ОПК-12).

УДК 579.22(075.8)

ББК 28.4я73

ISBN 978-5-7410-1658-9

© Алешина Е.С.,
Дроздова Е.А.,
Романенко Н.А., 2017
© ОГУ, 2017

Содержание

Введение	6
1 Культивирование клеток микроорганизмов	7
1.1 Классификация процессов культивирования	9
1.2 Получение накопительных и чистых культур	10
1.3 Методы культивирования на твердых средах. Массовая культура на твердой поверхности	13
1.4 Периодическое культивирование	15
1.4.1 Глубинное периодическое культивирование	25
1.4.2 Продленное периодическое культивирование	26
1.5 Многоциклическое культивирование	28
1.6 Полунепрерывное культивирование	29
1.7 Непрерывное культивирование	29
1.7.1 Гомогенные системы идеального смешения	30
1.7.2 Системы культивирования полного вытеснения	34
1.7.3 Системы твердожидкостного типа	35
1.8 Синхронно делящиеся культуры микроорганизмов	36
1.8.1 Периодическое синхронное культивирование	38
1.8.2 Непрерывно-синхронное культивирование	40
1.9 Тестовые задания к разделу «Культивирование клеток микроорганизмов»	41
2 Методы получения протопластов микроорганизмов	49
2.1 Получение протопластов у бактерий	49
2.2 Получение протопластов у грибов	52
2.3 Регенерация клеточной стенки и реверсия к клеточным формам	54
2.3.1 Реверсия бактериальных протопластов	55
2.3.2 Реверсия протопластов мицелиальных грибов	55
2.4 Тестовые задания по разделу «Методы получения протопластов микроорганизмов»	56
3 Параметры роста	59
3.1 Скорость роста	59

3.1.1	Удельная скорость роста	59
3.1.2	Время удвоения биомассы.....	61
3.1.3	Степень размножения	61
3.1.4	Обратное время удвоения.....	61
3.2	Справедливость закона экспоненциального роста.....	62
3.3	Экономический коэффициент	63
3.4	Метаболический коэффициент.....	64
3.5	Влияние концентрации субстрата на скорость роста.....	64
3.6	Значения константы насыщения K_s	66
3.7	Определение длительности лаг-периода	69
3.8	Предельные границы максимальной концентрации биомассы	69
3.9	Определение биомассы	71
3.9.1	Измерение массы и объема.....	72
3.9.2	Экономические эффекты	75
3.9.3	Скорость метаболических процессов.....	75
3.9.4	Метод светорассеяния.....	75
3.9.5	Подсчет клеток и органелл.....	78
3.9.6	Методы окрашивания.....	79
3.10	Тестовые задания по разделу «Параметры роста»	79
4	Субстраты для культивирования биообъектов	85
4.1	Принципы составления питательных сред.....	85
4.2	Типы питания микроорганизмов.....	96
4.3	Потребность микроорганизмов в химических элементах	102
4.4	Питательные среды.....	113
4.4.1	История открытия питательных сред.....	113
4.4.2	Требования, предъявляемые к средам.....	114
4.4.3	Этапы приготовления сред.....	116
4.4.4	Классификация питательных сред.....	122
4.5	Культивирование грибов.....	140

4.6 Тестовые задания к разделу «Субстраты для культивирования биообъектов»	141
5 Факторы, влияющие на рост и размножение микроорганизмов	157
5.1 Физические факторы, оказывающие влияние на рост и размножение микроорганизмов	158
5.2 Химические факторы, оказывающие влияние на рост и размножение микроорганизмов	169
5.3 Биологические факторы, оказывающие влияние на рост и размножение микроорганизмов	175
5.4 Антибиотики.....	178
5.5 Пробиотики.....	180
5.6 Бактериофаги.....	180
5.7 Тестовые задания к разделу «Факторы, влияющие на рост и размножение микроорганизмов»	182
Список использованных источников	189

Введение

Клеточные культуры с каждым годом находят все большее применение в самых разнообразных областях биологии, медицины, сельского хозяйства и особенно биотехнологии. Их используют при решении таких общебиологических проблем, как выяснение механизмов дифференцировки и пролиферации, взаимодействия клеток со средой, адаптации, старения, биологической подвижности, злокачественной трансформации и многих других.

Важная роль отводится клеточным культурам в биотехнологии при производстве вакцин и биологически активных веществ. Они являются исходным материалом для создания клеток-продуцентов, используются в целях повышения продуктивности сельскохозяйственных животных и для выведения новых сортов растений. Культуры клеток применяются для диагностики и лечения наследственных заболеваний, в качестве тест-объектов при испытании новых фармакологических веществ, а также для сохранения генофонда исчезающих видов животных и растений.

После изучения данного пособия у студентов должно произойти формирование понятия культивирования клеток как сложного и многопланового биотехнологического процесса, состоящего из ряда последовательных этапов. Это особенно важно, поскольку в основе любого биотехнологического производства лежит та или иная клеточная культура. В биотехнологии важно представлять весь процесс выращивания клеток – с момента инокуляции ими среды культивирования до отбора клеток по достижении ими заданной стадии роста или для отделения целевого продукта. Помимо этого неотъемлемой частью биотехнологического процесса является правильная организация работы в культуральной лаборатории, знание существующего оборудования для достижения этих целей, владение выбором при отборе клеточных линий и питательных сред, методами борьбы с клеточными контаминациями. Только в этом случае студент будет успешно решать поставленные перед ним биотехнологические задачи.

1 Культивирование клеток микроорганизмов

Исследование культивирования микроорганизмов начинается с 1830 г., когда Ш. Каньяр де Латур, К. Кютцинг и Т. Шванн открыли причину брожения вина (наличие клеток дрожжей).

В дальнейшем в области культивирования клеток не было никакого прогресса вплоть до 1850-х гг., когда Л. Пастер начал свои фундаментальные исследования: изучение физиологии дрожжей и бактерий, введение асептических методов, минимальных сред и исследование пищевых потребностей микроорганизмов и роли кислорода в процессах их жизнедеятельности. Работами Л. Пастера и его ученика М. Ролэна была установлена потребность в главных и второстепенных компонентах среды и в источниках энергии. Первая полная среда определенного состава была получена М. Ролэном в 1869 г. для культивирования грибов рода *Aspergillus*. Работа вызывает интерес еще и тем, что М. Ролэн определил пищевые потребности грибов не только качественно, но и количественно.

Говоря о замечательных работах Л. Пастера и М. Ролэна, необходимо отметить, что в их распоряжении не было метода чистых культур, предложенного Р. Кохом несколько позже (в 1870-е гг.) и дающего значительные преимущества выращивания микроорганизмов. Начиная с изящных работ Р. Коха, методы культивирования стали основной заботой микробиологов.

Потребность микроорганизмов в сложных органических веществах – факторах роста – впервые была обнаружена Вильдье в 1901 г., когда он открыл витамин В, или «факторы биос», необходимые для роста дрожжей.

В 1930-е гг. с введением метода колб на качалках началось развитие аппаратуры культивирования. Это дало возможность применять лабораторный метод для аэрации глубинных культур, особенно глубинных культур аэробных грибов, которые раньше выращивались только на поверхности твердых или жидких сред. В поверхностных культурах окружение организма гетерогенно, а в глубинных – гомогенно, что проще для изучения и контроля. Впоследствии глубинные культуры аэробных грибов сыграли значительную роль в развитии промышленного

производства антибиотиков. Возрастающее технологическое значение культуры микроорганизмов значительно стимулировало интерес к этой области и привело в 40-50-е гг. к созданию ферментеров с автоматической регуляцией условий среды. С этого времени благодаря активному развитию теории непрерывного культивирования хемостатного типа открылись широкие горизонты не только теоретического развития, но и практического применения культур клеток.

Процессы роста, развития, размножения, морфогенеза и дифференцировки микроорганизмов взаимосвязаны. Например, трудно уловить какие-либо качественные изменения в клетках бактерий после размножения, так как их переход в зрелое состояние осуществляется в пределах минут. У грибов (микро- и макромицетов) такие изменения проследить легче, поскольку жизненные циклы их сложнее, чем у бактерий, и разграничены во времени. Тем не менее, в каждое из этих понятий вкладывается четко определенный смысл.

Культивирование (от лат. *cultus* – выращивание) – выращивание микроорганизмов на питательных средах.

Рост – координированное увеличение размеров и веса клетки.

Развитие – совершенствование во времени структур и функций клетки, унаследованных потомками от родительских форм.

При увеличении во времени числа клеток популяции определенного вида или штамма в питательной среде говорят о размножении микроорганизма.

Под морфогенезом понимают процесс образования соответствующих форм микроорганизмов в конкретных условиях их существования.

Дифференцировка – это дифференциальное выражение генов, содержащихся в геноме клетки.

Культура – развивающиеся в процессе культивирования микроорганизмы. При развитии в жидкой среде культуры образуют суспензию, осадок, пленку, на плотной – колонии.

Чистая культура – культура, содержащая потомство клетки только одного вида.

Накопительная культура – культура, состоящая преимущественно из клеток одного вида.

Посев – внесение клеток микроорганизмов или какого-либо исследуемого материала (воды, почвы) в стерильную питательную среду.

Пересев, пассирование – перенесение уже выращенных клеток из одной среды в другую.

Инкубация (инкубирование) (от лат. *incubatio* – выращивание, высиживание птенцов) – культивирование при определенной температуре.

1.1 Классификация процессов культивирования

Выбор процесса культивирования зависит не только от потребностей организма, но и от того, для чего будет использована культура, т. е. от конечной цели эксперимента. Все известные процессы культивирования микроорганизмов, а их достаточно много, различаются по таким параметрам как состояние питательной среды (в этом случае культивирование носит поверхностный или глубинный характер), наличие или отсутствие перемешивания (динамические или статические культуры), содержание кислорода (аэробное или анаэробное культивирование), способ действия (закрытые системы, включающие в основном периодические, и открытые, включающие непрерывные культуры), количество ферментеров (в этом случае процессы могут быть одно-, дву- и многостадийные) и способ управления (культивирование хемостатное, турбидостатное, оксигеностатное, рН-статное и другие).

Культуры микроорганизмов можно подразделять на открытые (непрерывные) и закрытые (периодические) системы. Открытая система – это система, в которую все компоненты могут поступать или покидать ее. Закрытой называют такую систему, в которой хотя бы один из существующих компонентов не может ни поступать в систему, ни покидать ее. В результате чего, все непрерывные культуры, в которых происходит постоянный, с одной стороны, приток питательной среды, с другой – отток биомассы и других продуктов, являются открытыми системами. Простая периодическая культура, содержащая ограниченное первоначальное

количество питательного субстрата, служит примером закрытой системы. В закрытой системе скорость роста биомассы должна стремиться к нулю либо из-за недостатка субстрата, либо из-за непереносимости токсичного продукта при его дальнейшем накоплении. Следовательно, такие системы находятся в неустойчивом состоянии. Т. е. периодическая культура – популяция клеток в ограниченном жизненном пространстве. Рост в такой закрытой системе подчиняется закономерностям, действительным не только для одноклеточных, но и для многоклеточных микроорганизмов. В отличие от этого в открытых системах всегда есть возможность установления стабильного состояния и культура всегда находится в фазе экспоненциального роста.

1.2 Получение накопительных и чистых культур

В условиях естественного обитания чистые культуры микроорганизмов встречаются довольно редко. Тем не менее, основная часть современных представлений о свойствах микроорганизмов, а также их взаимоотношениях получена при изучении чистых культур. Поэтому часто возникает необходимость выделить в виде чистых культур различные виды микроорганизмов, которые сосуществуют в естественных условиях. Получение накопительных культур представляет собой не только основной этап процесса, который позволяет получить чистые культуры, но и дает возможность оценить различные воздействия факторов окружающей среды на смешанную микробную популяцию, благодаря которым может происходить отбор микроорганизмов, способных взаимодействовать со специфическими субстратами или хорошо расти в необычных условиях.

Выделение чистой культуры данного микроорганизма будет успешным, если он присутствует в смешанной популяции в достаточно высокой концентрации, т. е. количественно преобладает. Имеющиеся и разработанные на данном этапе методы накопления позволяют добиться увеличения относительного количества данного организма благодаря

1) созданию лучших условий для его роста и выживания по сравнению с другими;

2) путем пространственного отделения его от других членов популяции.

К физическим методам накопления следует относить регуляцию роста температурой, тепловую и ультразвуковую обработку, ультрафиолетовое облучение, приводящие к гибели или подавлению роста других организмов, присутствующих в популяции, но существенно не затрагивающих выделяемые клетки. Можно также использовать преимущества в некоторых физических свойствах изучаемого микроорганизма, таких как его размеры и подвижность; это позволяет в значительной мере отделить данный организм от других в популяции.

В основе действия химических методов лежит использование токсичных веществ, которые подавляют рост оставшейся части популяции, не оказывая влияния на выделяемый микроорганизм. Кроме того, это могут быть вещества, служащие источниками питания, используемыми преимущественно отдельными микроорганизмами в смешанной популяции.

Биологические методы включают использование специфических хозяев для выделяемого организма, а также преимуществ некоторых патогенных свойств микроорганизма (например, его инвазивность), которыми не обладают другие представители популяции. Во многих случаях для получения максимального эффекта накопления сочетают физические, химические и биологические методы.

Как правило, накопительные культуры получают

1) в закрытых (периодических) системах, т. е. микроорганизмы выращивают в обычных периодических (стационарных) условиях на чашках Петри, в колбах или пробирках, где в среде культивирования концентрация питательных веществ и продуктов метаболизма постоянно изменяется в процессе роста клеток;

2) в открытых хемостатных (непрерывных, проточных) системах, позволяющих контролировать концентрацию питательных веществ, лимитирующих рост клеток, что, в свою очередь, может избирательно влиять на скорость роста различных организмов в смешанной культуре, в результате чего какой-то микроорганизм начинает количественно преобладать.

Из накопительных культур бактерии обычно выделяют путем их пространственного отделения от других форм на твердой среде, где они растут в виде колоний. Для микроорганизмов, не растущих на твердых средах, можно использовать метод предельного разведения, последовательно перенося клетки в отдельные пробирки с жидкой средой. Поскольку обычные методы выделения не дают абсолютной гарантии чистоты получаемых культур, некоторые исследователи применяют более сложные приемы, с помощью которых отдельную бактериальную клетку выделяют из смешанной популяции, используя для получения клона микроскопический контроль.

Для выделения микроорганизмов в виде чистых культур известно сравнительно мало методов. Чаще всего используют способ изолирования отдельных клеток на твердой питательной среде, применяя при этом метод посева штрихом или разлива по чашкам небольшого количества жидкой культуры (метод предельных разведений). Препятствиями для получения отдельной колонии является то, что

- 1) не всегда существует гарантия чистоты культуры, поскольку колонии могут вырасти не только из отдельных клеток, но и из их скоплений;

- 2) если микроорганизмы образуют слизь, то к ней часто прикрепляются посторонние формы. Например, в случае выделения видов *Bacillus* или актиномицетов контаминирующие микроорганизмы могут быть опутаны соответственно цепочками клеток или гифами этих бактерий;

- 3) для очистки предпочтительнее использовать неселективную среду, поскольку на ней лучше растут контаминирующие микроорганизмы и их легче обнаружить. Но даже на неселективной среде не следует очень быстро отбирать колонии, поскольку за данный отрезок времени могут не вырасти медленно растущие контаминирующие организмы;

- 4) из чистой культуры обычно вырастают одинаковые колонии, и при микроскопировании выявляются схожие клетки, в частности по морфологии и результатам окраски по методу К. Грама. Однако возможны исключения, например, колонии, вырастающие из чистой культуры, могут быть гладкие (S) и шероховатые

(Р). Кроме того, в чистых культурах различных микроорганизмов могут появиться морфологически различные клетки, цисты и споры. Наконец, некоторые микроорганизмы проявляют грамвариабельность. Тем не менее, указанные критерии широко используются при определении чистоты культур.

1.3 Методы культивирования на твердых средах. Массовая культура на твердой поверхности

Выращиванием колоний на твердой поверхности получают максимальную плотность клеток, поскольку в данном случае жидкость находится только в промежуточном (межклеточном) пространстве и составляет от 20 % до 30 % общего объема (27 % от плотно упакованных тел независимо от их размера). Если инокулят сильно разбавлен, каждая клетка в результате деления дает начало отдельной колонии. Это может быть полезным для массовой культуры, если отбор колонии ведут по какому-то одному признаку (например, если необходимо вырастить вариант, который образует только «гладкие» колонии). Чаше инокулят бывает не разбавлен, и его равномерно распределяют по всей поверхности среды. В этом случае микроорганизмы растут в виде сплошного газона. Твердую поверхность обычно получают после добавления в среду агара или другого отвердителя. Известен также ряд методов, при которых колонии растут на мембране, помещенной на поверхности жидкой среды в сосуде.

Массовая культура бактерий на твердой среде имеет ряд преимуществ по сравнению с культурой, выращиваемой в жидкой среде.

Во-первых, в случае культур, выращенных на твердой среде, нет необходимости использовать центрифугу или другие средства для сбора клеток, поскольку в этих культурах клетки находятся уже в сконцентрированном состоянии. Особенно следует избегать центрифугирования при получении большого количества патогенных или других вредных микроорганизмов, поскольку при этом образуются аэрозоли. Для сгущения клеток и сбора биомассы на поверхность агаризованной среды пипеткой наносят небольшое количество стерильного солевого раствора или

буфера и суспендируют в нем выросшие колонии с помощью стерильного стеклянного шпателя. Таким способом можно получить большое количество клеток с поверхности агаровых сред в чашках Петри, в больших плоских культуральных матрасах и в больших плоских чашках, покрытых крышками из пирекса.

Во-вторых, твердые культуры относительно свободны от макромолекулярных компонентов и полностью свободны от частиц питательной среды, так как последние обычно находятся внутри агарового геля. Более того, твердые культуры относительно свободны от низкомолекулярных питательных веществ и продуктов метаболизма микроорганизмов, поскольку для их растворения необходимы значительно большие объемы среды. Следовательно, культуры, выращенные на твердой среде, особенно полезны для экспериментов (приготовления антигенов или для других целей), когда важна чистота клеточной суспензии.

В-третьих, на твердых средах можно получать результаты, которые невозможно достичь другим путем. Например, плодовые тела миксобактерий и эндоспоры определенных видов *Bacillus* образуются только при росте культур на твердой среде. Это объясняется тем, что лишь в данных условиях бактерии сохраняют между собой физические связи, а также тем, что в данном случае обеспечивается максимальное снабжение клеток кислородом атмосферы и вымывание продуктов метаболизма (например, кислот) из клеточного окружения. Если этого не происходит, рост культуры может подавляться.

Вместе с тем выращивание микроорганизмов на твердых средах по сравнению с культивированием в жидкой среде имеет определенные недостатки:

1) твердая культура имеет ограничения при выращивании больших количеств биомассы. Она дает возможность легко получать граммы клеток, десятки граммов выращивать уже затруднительно, а сотни граммов или килограммы клеток на твердой среде в лаборатории вырастить невозможно;

2) твердые культуры не обеспечивают однородность популяции клеток, т. е. культура гетерогенна в физиологическом отношении. Например, клетки в верхней части твердой аэробной среды (слой глубиной до 1000 клеток) могут находиться в условиях низкого содержания питательных веществ, но высокого содержания

кислорода, в то время как в нижних слоях среды условия могут быть противоположными. Гетерогенна культура и в техническом смысле, так как клетки микроорганизмов и питательная среда распределены неравномерно;

3) твердые культуры характеризуются небольшим числом клеток в пересчете на данное количество среды, что является экономически невыгодным.

Все процессы суспензионного или глубинного культивирования можно классифицировать. Простейшая классификация процессов суспензионного или глубинного культивирования:

- 1) периодическое культивирование;
- 2) продленное оптимизированное периодическое культивирование с подпиткой или без нее;
- 3) многоциклическое культивирование;
- 4) полунепрерывное культивирование;
- 5) непрерывно-синхронное культивирование;
- 6) непрерывное культивирование.

1.4 Периодическое культивирование

Культивирование бактерий представляет собой процесс увеличения концентрации некоторых или всех компонентов популяции. Обычно характеристики этого процесса устанавливаются путем измерений тех или иных его показателей.

Ранее более широкое применение находило культивирование микроорганизмов на поверхности плотных питательных сред. Применение жидких питательных сред позволило избежать некоторых недостатков, связанных с культивированием поверхностным способом, требуя постоянного перемешивания культуры с целью выравнивания условий роста организма в различных частях рабочего объема сосуда. Эту систему можно уже назвать динамической в отличие от описанной выше статической при стационарном культивировании.

В качестве характеристики периодического метода культивирования рассматривают:

1) внесение посевного материала в питательную среду (инокуляция клетками среды) в начале процесса и получение культуры по достижении заданной фазы развития популяции;

2) концентрацию микроорганизмов в периодической культуре, которая нарастает и останавливается либо из-за лимитирования субстратом, либо из-за ингибирования токсичными продуктами жизнедеятельности;

3) непрерывное изменение физиологического состояния клеток, вызванное изменениями условий, производимыми жизнедеятельностью самих клеток;

4) периодическая система может поддерживать размножение клеток только в течение ограниченного времени. После фазы экспоненциального (логарифмического) роста популяция начинает испытывать недостаток элементов питания и угнетается продуктами метаболизма, что ведет к нарушению физиологического состояния клеток;

5) периодические культуры находятся в неустойчивом состоянии, что является серьезным недостатком, особенно когда их применяют при изучении свойств микроорганизмов.

Практически все системы периодического культивирования являются закрытыми, поскольку микроорганизмы в них размножаются и проходят все фазы развития без притока питательной среды и оттока культуральной жидкости. Т. е. периодическая культура – популяция клеток в ограниченном жизненном пространстве.

В период сбалансированного роста удвоение биомассы сопровождается удвоением всех других учитываемых параметров популяции, например, количества белка, ДНК, РНК и внутриклеточной воды. Иными словами, культуры, растущие сбалансировано, сохраняют постоянный химический состав.

Поэтому при сбалансированном росте легко определить скорость роста бактериальной популяции в каждый момент времени, если измерить прирост любого компонента клетки по отношению к исходному количеству этого компонента. Другими словами, в культуре, растущей сбалансировано, скорость прироста вещества клетки в данный момент пропорциональна числу или массе

имеющихся в это время бактерий. Коэффициент пропорциональности (μ) называют удельной скоростью роста. Она различна для разных культур и даже для одной культуры удельная скорость может меняться в зависимости от условий выращивания клетки.

При изучении динамики роста культур микроорганизмов необходимо строго соблюдать некоторые условия:

- 1) жизнеспособность засева;
- 2) наличие в среде культивирования всех необходимых питательных веществ;
- 3) отсутствие в среде ингибиторов, подавляющих рост клеток;
- 4) поддержание в среде всех физико-химических условий на оптимальном уровне.

Почему же необходимо соблюдать все эти условия? Рост – это согласованное увеличение количества всех химических компонентов, формирующих клеточные структуры. Обычно сопровождается увеличением массы и размеров клетки. Однако это необязательно, т.к. клетка может накапливать запасные резервные вещества, т.е. мы можем наблюдать увеличение массы клетки, но роста при этом наблюдаться не будет.

Однако, в подходящей среде, к которой бактерии полностью адаптированы, они будут находиться в состоянии сбалансированного роста.

В простой гомогенной периодической культуре можно выделить несколько фаз роста (рисунок 1), построив график, по оси абсцисс отложив время, а по оси ординат – десятичный логарифм числа жизнеспособных клеток. Типичная кривая роста имеет S-образную форму.

I Лаг-фаза (фаза задержанного роста). При внесении клеток из культуры, находящейся в стационарной фазе, в свежую среду того же состава они приобретают способность к возобновлению роста только после определенного периода, в течение которого происходит изменение их химического состава. Т. е. в клетках бактерий в эту фазу идут в основном процессы, связанные с приспособлением их к условиям культивирования (среда, температура, рН и др.). Продолжительность периода

адаптации может быть различной, но обычно она прямо пропорциональна длительности предшествующей стационарной фазы.

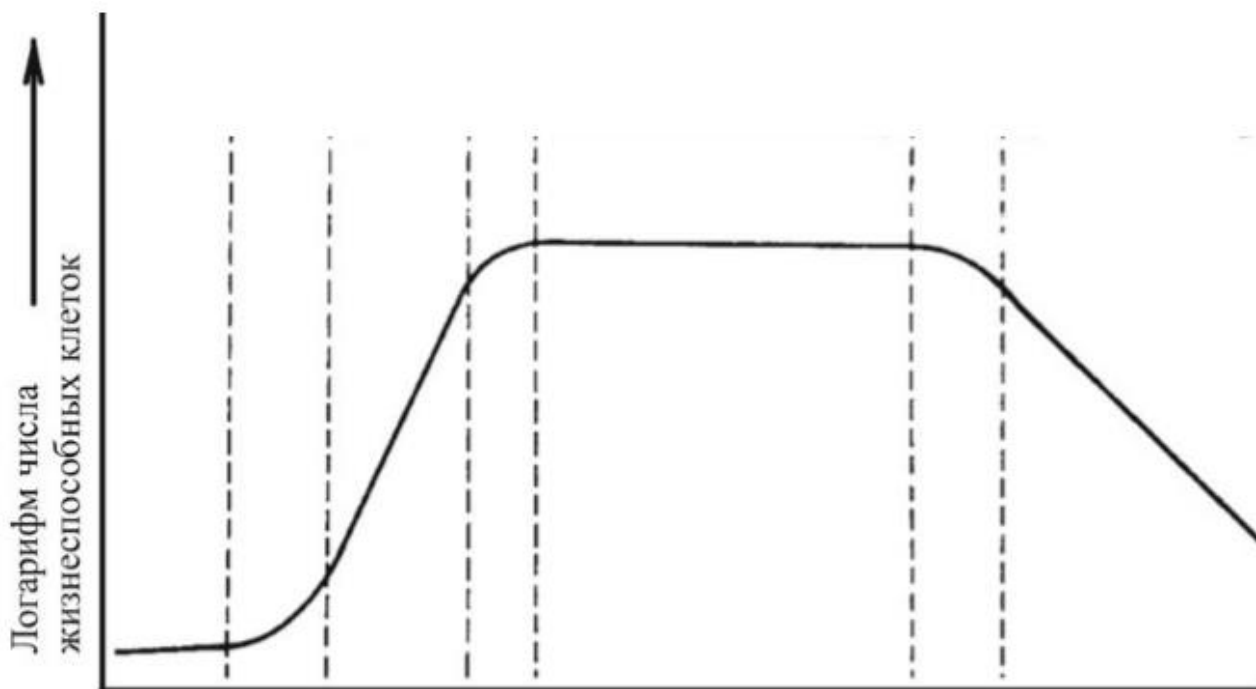


Рисунок 1 – Основные фазы кривой роста периодической культуры микроорганизмов

В свежей среде длительность лаг-фазы зависит

1) от изменений состава и концентрации питательных компонентов при внесении инокулята;

2) от количества и возраста посевного материала. Внесение небольшого количества инокулята в большой объем свежей среды может привести к диффузии из клеток витаминов, кофакторов и ионов, которые необходимы для поддержания активности многих внутриклеточных ферментов. Если клетки инокулируют из богатой среды в минимальную, то продолжительность лаг-фазы значительно зависит от объема инокулята, поскольку он содержит микроэлементы, попадающие при инокуляции в ростовую среду;

3) от возраста инокулята. Это связано с тем, что в процессе развития в клетках накапливаются токсические вещества и недостаточно питательных веществ, необходимых для первоначального роста. Как правило, при переносе клеток из

бедной среды в богатую с увеличением возраста инокулята лаг-фаза удлиняется. Чем старше культура, которую используют для инокуляции новой питательной среды, тем больше продолжительность лаг-фазы. Однако при значительном количестве молодого материала культура может развиваться без лаг-фазы;

4) от предшествующих условий культивирования инокулята (посевого материала). Если источники энергии и углерода в новой среде отличаются от тех, которые были в предшествующей культуре, то приспособление к новым условиям среды может быть связано с синтезом новых ферментов, которые ранее не были нужны и поэтому не синтезировались (а образование новых ферментов будет индуцироваться новым субстратом). Наконец, изменения состава питательных компонентов, а также их концентрации при переносе инокулята в свежую среду могут оказывать воздействие на длительность лаг-фазы, влияя на регуляцию активности ферментов и морфологическую дифференцировку клеток. Если клетки переносят с бедной среды в богатую, то питательные компоненты и время расходуются на повышение активности ферментов, необходимых для повышения активности метаболизма в целом. Если же клетки переносят с богатой среды на среду с более низким уровнем питательных веществ, то они способны немедленно, хотя и с низкой скоростью, вступить в экспоненциальную фазу роста. Если проанализировать количественный состав бактериальной клетки в течение лаг-фазы, то можно отметить, что во время нее происходит быстрое увеличение количества РНК (в 8-12 раз). Это подтверждает тот факт, что в эту фазу происходит синтез индуцибельных ферментов, нужных для использования нового субстрата среды.

Длительность лаг-периода (L) для многих целей удобно определять методом Лоджа и Хиншельвуда.

Если на графике зависимости логарифма биомассы от времени (рисунок 2) прямую линию экстраполировать до уровня начальной биомассы, то отрезок, отсекаемый при этом на оси абсцисс, и будет соответствовать L .

II Начальная фаза размножения или фаза ускорения роста, когда клетки начинают делиться сначала медленно, а затем все быстрее. Длительность этого периода для большинства микроорганизмов составляет 2 часа и зависит от

температуры, состава питательной среды, качества посевного материала. Многие авторы эти две фазы рассматривают вместе. Число клеток остается постоянным по причине отсутствия в этот период клеточного деления. Общее состояние микробных клеток характеризуется как состояние приспособления к питательной среде. В этот период усиливается синтез вещества клеток, они увеличиваются в размере, в них образуется большое количество индуцибельных ферментов.

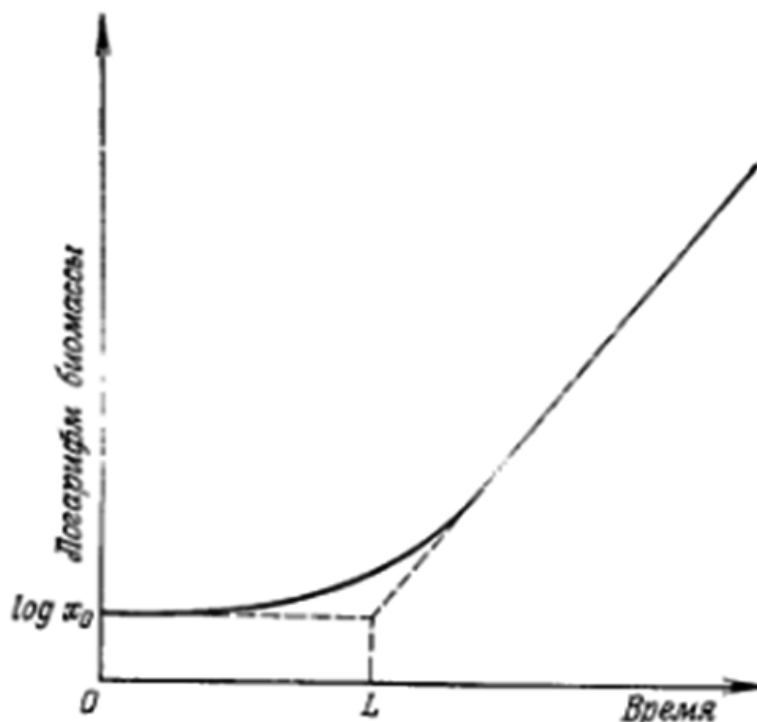


Рисунок 2 – Определение длительности лаг-периода

III Фаза экспоненциального роста. Продолжительность этой фазы зависит от запасов питательных веществ в среде, от условий аэрации, от перемешивания и др. факторов. Характеризуется постоянной максимальной скоростью деления клеток или скоростью роста. Эта скорость зависит от вида бактерий. Например, бактерии *E. coli* при 37 °С делятся примерно каждые 20 минут, для сальмонелл продолжительность этой фазы равна 20-30 мин., для стрептококков и стафилококков – 25-35 мин, а для бактерий *Nitrobacter* и *Nitrosomonas* – 5-10 ч. На продолжительность генерации влияют температура, рН среды, состав среды и т. д. Высокая скорость развития микроорганизмов сохраняется на всей экспоненциальной стадии. Однако эта зависимость наблюдается в течение ограниченного времени. По мере роста культуры

в среде постепенно потребляются питательные вещества, накапливаются продукты обмена, затрудняется транспорт питательных веществ (в первую очередь кислорода) и метаболитов вследствие увеличения плотности популяции. Во время экспоненциальной фазы все клетки имеют приблизительно один размер, содержание белков в них постоянно. Клетки содержат максимальное количество РНК. Во время экспоненциальной фазы клетки наиболее жизнеспособны и обладают высокой биохимической активностью. Экспоненциальный рост с высокими скоростями обычно не поддерживается в микробной популяции длительное время. В норме он ограничивается вследствие исчерпания доступных источников питания, или накопления токсичных продуктов обмена веществ в ростовой среде, или из-за некоторых изменений в физических свойствах среды. В результате этого скорость роста снижается и, в конечном счете, рост прекращается.

IV Фаза отрицательного ускорения. Переход из экспоненциальной фазы в стационарную включает период несбалансированного роста, когда разные клеточные компоненты синтезируются с разными скоростями. В эту фазу скорость размножения замедляется, а время генерации увеличивается. Наступление данной фазы обусловлено истощением питательной среды и накоплением в культуральной жидкости токсических веществ, которые начинают ингибировать развитие культуры. Кроме того, в эту фазу происходит наивысшее накопление микробной массы в единице объема. Такой переход связан не только с нехваткой субстрата, но также с большой плотностью популяции и низким парциальным давлением кислорода.

V Стационарная фаза. Изменения в физическом и химическом составе среды приводят к переходу культуры в стационарную фазу, в которой увеличения количества клеток не происходит, но клетки еще нуждаются в источниках энергии для поддержания своей жизнедеятельности.

Поэтому в стационарной фазе химический состав клеток отличается от их состава в экспоненциальной фазе. Клетки меньше по размеру и менее чувствительны к физическим и химическим воздействиям. В стационарной фазе количество биомассы остается постоянным. В этот период в клетке и в среде нередко накапливаются продукты вторичного метаболизма (антибиотики, пигменты,

бактериоцин и др.). Продолжительность этой фазы может быть от нескольких часов до недели в зависимости от вида микроорганизмов.

В стационарную фазу роста поведение клеток в бактериальной популяции регулирует такое явление как апоптоз. Суть его сводится к тому, что при исчерпании питательного субстрата голодающая популяция разделяется на две субпопуляции, одна из которой гибнет и подвергается автолизу, а клетки другой субпопуляции, используя продукты автолиза как субстрат, продолжают развиваться и размножаться. Механизм генетического контроля апоптоза у бактерий *E. coli* осуществляется особым опероном *maz*, состоящим из двух генов: *mazE* и *mazF*. Продукт гена *mazF* – стабильный цитотоксический белок-киллер, а продукт гена *mazE* – нестабильный белок *MazE*, регулирующий белок-киллер. Истощение фонда аминокислот в питательной среде приводит к блокированию оперона *maz*, в результате чего синтез белка *MazE* прекращается, а белок-киллер вызывает гибель и автолиз части популяции. За счет этого пополняется фонд аминокислот, синтез белка *MazE* у оставшихся живых клеток активизируется и они продолжают размножаться.

VI-VIII Фазы отмирания: логарифмической гибели клеток, постоянной скорости отмирания и замедленной скорости отмирания. К гибели клеток приводит ряд факторов, важнейшим из которых является исчерпание запасов энергии в клетке. Наблюдается резкое экспоненциальное уменьшение числа жизнеспособных клеток. Скорость отмирания зависит от видовых особенностей организма, а также условий культивирования. Например, энтеробактерии отмирают медленно в отличие от некоторых видов бактерий рода *Bacillus*, которые отмирают быстро. Причины отмирания клеток могут быть разными. Это и накопление органических кислот (как у бактерий родов *Escherichia*, *Lactobacillus*), и автолиз (лизис под действием собственных факторов), и накопление антибиотиков, бактериоцинов, и другие причины. В этот период в культуре наблюдается значительное уменьшение клеток. У них уменьшается биохимическая и антигенная активность. Учитывая это, для изготовления ряда биопрепаратов отбирают культуры микроорганизмов чаще всего в фазе отрицательного ускорения роста или

в начале стационарной фазы роста, когда концентрация живых микробных клеток приближается или равна концентрации мертвых микробных клеток.

Микроорганизмы, которые в условиях окружающей среды, подходящих для роста, теряют способность к росту, должны быть либо мертвыми, либо покоящимися клетками. Отметим существенную разницу между этими двумя понятиями: покоящиеся клетки в определенных условиях могут регенерировать в нормальные растущие клетки или их «вегетативные» формы, а мертвые клетки не могут. Примерами покоящихся форм служат споры бактерий и грибов и цисты простейших. Образование покоящихся форм, как правило, представляет собой свойственный некоторым родам процесс, продолжительность которого длиннее, чем минимальное время удвоения у вегетативных форм. Такое изменение типа клеток в чем-то аналогично дифференцировке тканей у высших животных и растений, хотя было бы неоправданно заходить в этой аналогии слишком далеко, и дифференцировки тканевых клеток здесь мы касаться не будем.

Отмирание микроорганизмов может происходить при воздействии неблагоприятных факторов, таких, как высокая температура, токсические соединения, истощение, или «ошибки» в автосинтезе. В растущей культуре покоящиеся и мертвые клетки ведут себя одинаково, не внося никакого вклада в рост популяции.

Для некоторых целей вполне достаточно качественной характеристики роста, т. е. простого наблюдения, имеет ли место вообще рост культуры. В случае ориентировочной оценки кривой I (возрастания биомассы одноклеточных микроорганизмов) выделяют только четыре фазы: лаг-фазу (соответствует начальной стационарной фазе), фазу ускоренного размножения – логарифмическую, стационарную фазу (соответствует заключительной стационарной фазе) и фазу отмирания. Для бактерий фазы размножения часто (но менее точно) называют фазами роста. При графическом изображении процесса размножения клеток прокариот в ряде случаев могут выявляться две лаг-фазы, предшествующие логарифмической фазе. Это связано с регуляторными процессами в клетках, селективно и последовательно потребляющих вначале доступный субстрат, а затем

– менее доступный. Так, клетки *E. coli* вначале потребляют глюкозу из смеси ее с сорбитолом, и лишь после исчерпания моносахарида используют многоатомный спирт. Это явление называют диауксией (от греч. δι (σ) – дважды, αυξανω – увеличиваю, расту), двухфазным или двуциклическим ростом (рисунок 3).

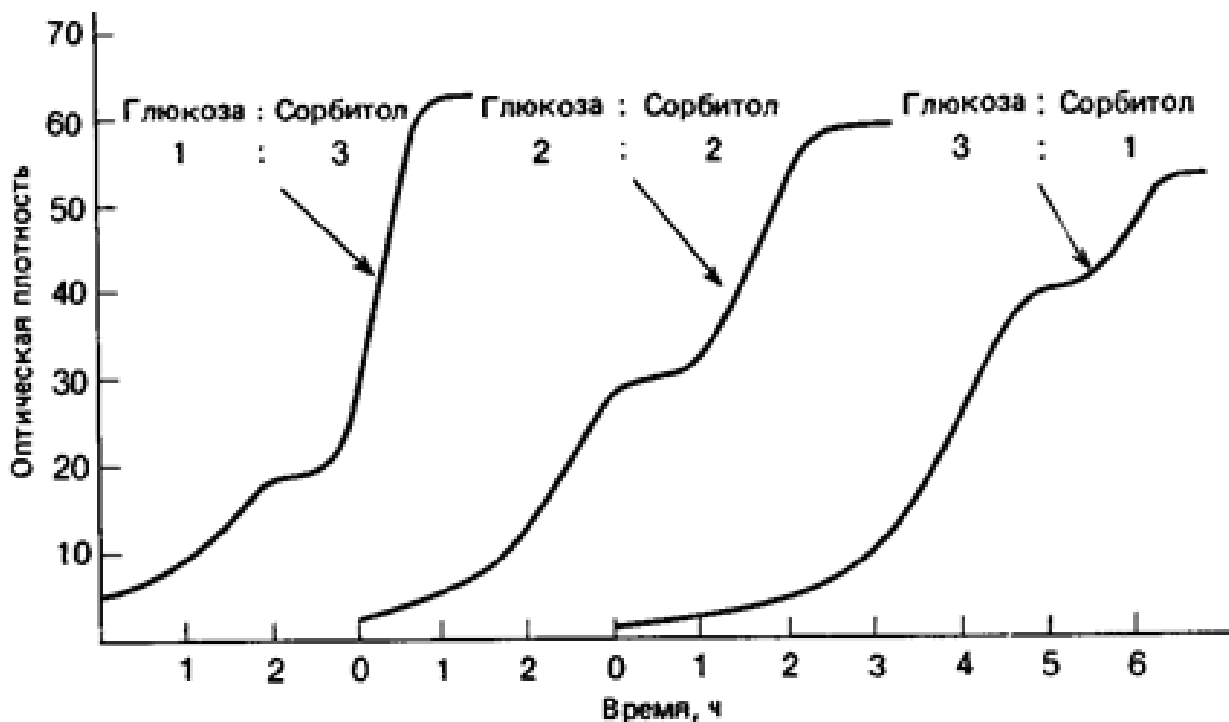


Рисунок 3 – Двухфазный рост микроорганизмов *E. coli* в питательных средах, содержащих глюкозу и сорбитол в разных соотношениях

У нитчатых грибов отсутствует логарифмическая фаза, хотя она не исключается для растущих верхушек гиф. В поверхностных культурах выявляется прямолинейная зависимость между возрастом культуры и кубическим корнем из показателя массы мицелия. У таких организмов растущие мицелиальные верхушки конкурируют за питательные вещества более выражено, чем погруженные культуры одноклеточных организмов.

Но для того чтобы иметь дальнейшую более полную информацию, необходимо измерять рост количественно. Если рост периодической культуры прослеживается по увеличению бактериальной массы, то для получения точной информативной картины роста культуры клеток анализируются разные

количественные параметры роста: скорость роста, экономический коэффициент, выход бактериальной биомассы, время генерации и другие.

При определении параметров роста исследуют рост простой гомогенной периодической культуры. Предполагается, что такая система состоит из хорошо перемешиваемой, засеянной питательной среды.

1.4.1 Глубинное периодическое культивирование

Жидкие питательные среды даже без перемешивания позволили избежать недостатков, связанных с примесями агара в смываемой суспензии, и увеличили выход процесса за счет использования больших емкостей для культивирования (бутыли, ферментеры). Применение же для культивирования клеток жидких питательных сред с принудительным перемешиванием культуры с целью выравнивания условий роста в различных частях рабочего объема культивационного сосуда привело к появлению динамических систем глубинного культивирования, оснащенных специальным оборудованием.

Для выращивания больших количеств микроорганизмов способом периодического культивирования наиболее часто применяется глубинное выращивание в ферментере с принудительной аэрацией и перемешиванием.

Глубинное культивирование в ферментерах по сравнению со статическим и поверхностным имеет ряд достоинств:

1) ускоряет рост и развитие микроорганизмов за счет устранения «голодной зоны» вокруг микробной клетки;

2) позволяет получать гомогенную культуру «идеального смешения». Клетки в такой системе равномерно распределены по объему ферментера и в каждый момент времени находятся в одинаковых условиях, т. е. питательные субстраты и продукты метаболизма распределены также равномерно. «Идеальное смешение» особенно важно для изучения процессов роста и развития микробной популяции в целом.

Применение динамических глубинных систем культивирования позволило более рационально получать не только биомассу и эндометаболиты, но и экзопродукты микробного синтеза, выделяемые клеткой в окружающую среду.

Получивший первоначальное распространение в производстве дрожжей и антибиотиков в дальнейшем метод глубинного культивирования зарекомендовал себя как наиболее пригодный для промышленного и лабораторного выращивания микроорганизмов.

Периодические процессы культивирования находят применение в технической микробиологии при получении продуктов второй фазы роста и при культивировании патогенных бактерий в производстве вакцин и анатоксинов.

Дальнейшее усовершенствование процесса глубинного культивирования было направлено на разработку систем контроля условий культивирования.

1.4.2 Продленное периодическое культивирование

Продленный периодический процесс культивирования, как и периодический, предусматривает одноразовую загрузку и разгрузку ферментера. Однако цикл развития микроорганизмов в продленном периодическом процессе удлиняется либо за счет подпитки (периодической или непрерывной), либо за счет длительного удержания клеток в системе (диализная культура).

Известно, что зависимость концентрации микроорганизмов и удельной скорости роста от времени в продленном периодическом процессе более растянута во времени по сравнению с таковыми в периодическом процессе. При этом продлевается как экспоненциальная фаза, так и, в особенности, фаза линейного роста.

Существует несколько способов создания продленного периодического культивирования. Первый способ – это культура с добавлением источников питания, в результате происходит рост, лимитированный субстратом. При этом экономический коэффициент в культуре с подпиткой выше по сравнению с простой периодической культурой. Подпитка переводит периодический процесс в

продленный периодический и используется в основном для получения продуктов биосинтеза, что существенно увеличивает производительность процесса.

Второй способ – процесс диализа. В периодической культуре, как известно, постепенно накапливаются продукты метаболизма, которые приостанавливают рост. Для увеличения выхода продуктов или с целью повышения концентрации биомассы применяют процесс диализа. Суть этого метода заключается в том, что культура развивается в пространстве, ограниченном полупроницаемой мембраной, а продукты диффундируют во внешний раствор. Наиболее простым диализным методом является культивирование в целлофановых мешках, погруженных в питательную среду. Метод был разработан рядом авторов для получения экзотоксинов и позволил получать высокоактивные препараты, но не нашел широкого практического применения из-за сложности осуществления его в производственных масштабах и невозможности получения токсина в больших количествах.

К третьему способу создания продленного периодического процесса относят культивирование микроорганизмов в диализной системе с протоком среды, поскольку проток удлиняет период роста и развития микробной популяции, но система не является непрерывной из-за отсутствия оттока биомассы. В диализной системе с протоком среды общая биомасса увеличивается до тех пор, пока плотность культуры не станет такой, что дальнейшее перемешивание биомассы будет невозможным. Таким образом, метод дает возможность выращивать культуру до достижения высокой плотности биомассы.

Диализные культуры применяют в основном для концентрирования недиффундирующего продукта, для уменьшения концентрации диффундирующего продукта, ингибирующего рост, и повышения выхода биомассы, для накопления и отделения от клеток диффундирующего продукта.

1.5 Многоциклическое культивирование

Многоциклическими процессами культивирования называют такие, в которых цикл выращивания культуры повторяется многократно без многократной стерилизации емкости.

Зависимость концентрации микроорганизмов и удельной скорости роста от времени в каждом цикле многоциклического процесса имеет характер, аналогичный таковому в периодическом процессе.

Многоциклическое культивирование может быть различным – как одностадийным, так и двухстадийным. Его можно вести в одном ферментере, многократно повторяя полный цикл развития культуры без перерыва на стерилизацию. В одном ферментере можно повторять и укороченный цикл, заканчивая его, например, экспоненциальной фазой роста. Процессы, осуществляемые в одном ферментере, называются одностадийными. Возможны и многостадийные многоциклические процессы, основанные на принципе повторного и последовательного периодического культивирования, протекающего в нескольких ферментерах, соединенных в «батарею», с целью длительного использования культуры. Существует несколько вариантов многоциклического многостадийного культивирования. Суть одного из них заключается в том, что культуру выращивают в одном реакторе; при прохождении в своем развитии экспоненциальной фазы, из нее берется инокулят для засева следующего реактора. В первом реакторе культура доращивается до необходимой фазы роста. Когда культура во втором реакторе достигает экспоненциальной фазы, из нее также делается пересев в третий реактор и т. д. Поскольку культура все время пересеивается в экспоненциальной фазе, не происходит ее старения и вырождения. Кроме того, отмечается выигрыш во времени, так как одновременно работают несколько ферментеров.

Многоциклические процессы культивирования микроорганизмов применяют как для получения биомассы, так и продуктов микробного синтеза – токсинов, антибиотиков, внеклеточных ферментов, аминокислот. Применение подобного

метода позволяет сократить в несколько раз затраты труда на производство продукта по сравнению с получением его периодическим способом.

1.6 Полунепрерывное культивирование

В полунепрерывных системах полная загрузка и разгрузка ферментера осуществляются однократно, однако в процессе роста культуры часть ее сливается, а освободившийся объем заливается свежей питательной средой. Таким образом, функционирует сливно-доливная система. Следовательно, полунепрерывное культивирование характеризуется частотой и объемом сливаемой выросшей культуры и добавлением свежей питательной среды в рабочую емкость ферментера.

Установившиеся режимы полунепрерывного культивирования характеризуются колебанием концентрации микроорганизмов около одной и той же постоянной величины и постоянством средней удельной скорости роста популяции.

Полунепрерывное культивирование микроорганизмов осуществляется в открытой динамической гомогенной одностадийной системе в любом ферментере для периодического культивирования, оснащенном системой перемешивания и аэрации.

Различные варианты полунепрерывных систем используются в производстве дрожжей, водорослей, антибиотиков, лимонной кислоты и др.

1.7 Непрерывное культивирование

В отличие от периодического культивирования в непрерывных процессах питательная среда подается непрерывно, удаление биомассы и продуктов ее жизнедеятельности также осуществляется непрерывно.

Установившиеся режимы непрерывного культивирования характеризуются постоянством концентрации микроорганизмов и удельной скорости роста популяции.

Непрерывное культивирование проводится в открытой динамической системе, которая может быть как гомогенной, так и гетерогенной. Эта система способна к длительной работе в постоянном установившемся режиме.

1.7.1 Гомогенные системы идеального смешения

В системе идеального смешения микроорганизмы растут в культуральной среде, постоянной по своему составу, и, следовательно, в каждый данный момент времени находятся в одном и том же физиологическом состоянии, т. е. в состоянии установившегося динамического равновесия, которое называют «steady state».

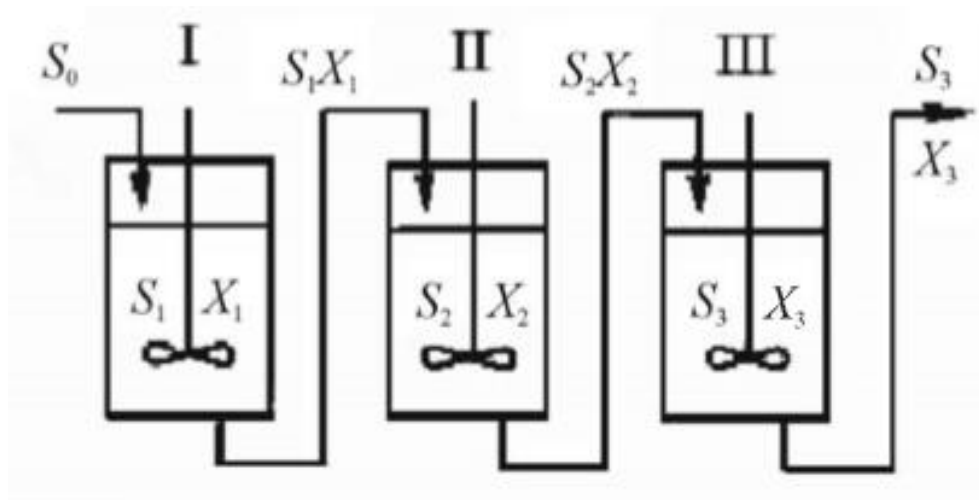
По количеству ферментеров (стадий, ступеней) гомогенные системы могут быть одностадийными, двухстадийными и многостадийными.

Основным аппаратом для выращивания непрерывной гомогенной культуры является ферментер идеального смешения с устройством для потока среды и слива культуры, поддерживающий постоянный уровень среды. Питательная среда подается в ферментер обычно с помощью насоса. Концентрация всех продуктов внутри ферментера и в вытекающей жидкости одинакова, а скорость разбавления равна удельной скорости роста в состоянии установившегося равновесия.

Указанные процессы имеют технологические преимущества по сравнению с периодическими, поскольку теоретически их можно осуществлять неограниченно длительное время. На практике они обычно прерываются в связи с инфицированием культуры посторонней микрофлорой.

Любой периодический процесс можно перевести в непрерывнопроточный. Непрерывно-проточное культивирование открывает возможности для поддержания постоянных условий роста путем создания такого состава питательной среды, чтобы только один желаемый фактор лимитировал рост. Если в таком процессе плотность популяции определяется химическим составом среды (концентрацией лимитирующего рост фактора), его называют хемостатным культивированием. Изменяя концентрацию лимитирующего рост фактора, можно изменять плотность популяции. Изменяя скорость разбавления, можно получать режимы,

обеспечивающие различную скорость роста популяции. При медленном протоке среды, т. е. при медленном росте, культура испытывает сильную лимитацию, глубокое голодание по данному субстрату. При быстром протоке среды, т. е. при быстром росте, степень голодания слабая, приближающаяся к условиям экспоненциального роста. Хемостатный способ культивирования в строго контролируемых условиях является основным для изучения физиологии, биохимии и вообще всех свойств микробных клеток и культур (рисунок 4).



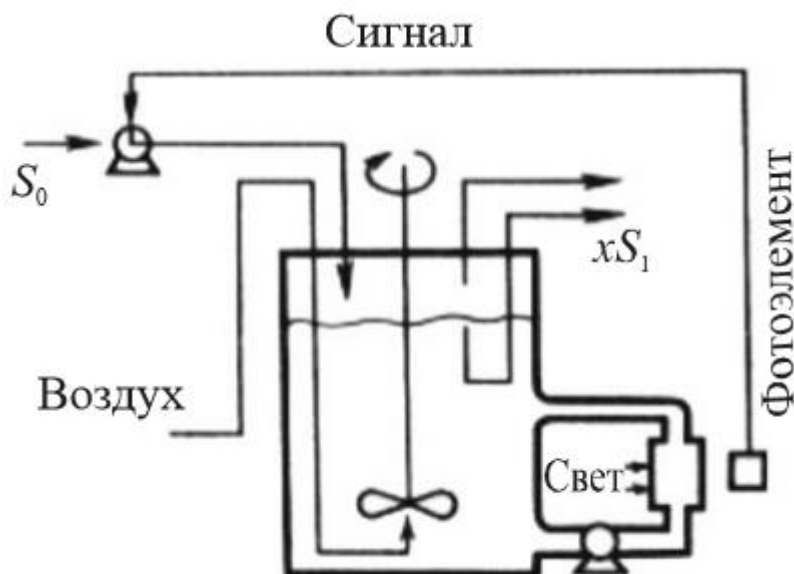
I, II, III – номера ферментеров;
 S_0 – концентрация субстрата в подаваемой среде;
 S_1, S_2, S_3 – концентрация субстрата в ферментерах;
 X_1, X_2, X_3 – концентрация клеток в ферментерах

Рисунок 4 – Схема функционирования трехстадийного хемостата

Хемостат имеет аналоги в природе. Аналогия заключается в том, что подобные устройства – это открытые непрерывные системы, через которые постоянно идут потоки энергии и веществ. Поэтому при непрерывном культивировании в лаборатории можно моделировать природные условия (например, в водоеме, в пищеварительном тракте), что поможет изучению вопросов экологии. При этом за короткое время можно наблюдать явления, происходящие в природе длительное время, и выявить экологические закономерности.

Другой широко известный принцип управления процессом – турбидостат (рисунок 5). В нем подача питательной среды осуществляется по команде

фотоэлектрического элемента, регистрирующего оптическую плотность культуры. Скорость разбавления сама устанавливается в соответствии с заданной плотностью популяции. Этим турбидостат отличается от хемостата, в котором фиксируется скорость разбавления, соответственно которой устанавливается концентрация биомассы. Хотя теоретически взаимосвязь между концентрацией биомассы и скоростью разбавления подчиняется одним и тем же закономерностям в хемостате и турбидостате, методы управления процессами различны. Турбидостат позволяет получать скорости роста, равные максимальной скорости, которые применяются при изучении культур, фиксированных в стадии экспоненциального роста.



S_0 – концентрация субстрата в подаваемой среде;
 S_1 – концентрация субстрата в вытекающей культуре;
 X – концентрация клеток

Рисунок 5 – Схема работы турбидостата

Хемостаты же применяют при скоростях разбавления от самой низкой до только приближающейся к максимальной удельной скорости роста. Поскольку в турбидостате скорость роста не фиксирована, при избытке субстрата и постоянных условиях среды в культуре могут отбираться быстро растущие мутанты. Турбидостат также может использоваться для получения мутантов, более устойчивых к ингибирующим рост факторам.

В случае длительного культивирования применение турбидостата связано с определенными трудностями, обусловленными прилипанием клеток к поверхности оптического элемента.

В настоящее время разработаны различные варианты непрерывного культивирования микроорганизмов, работающие по принципу турбидостата – рН-стат, оксистат, CO₂-стат, теплостат, вискозистат и т. д., названия которых соответствуют задаваемому параметру. Любой параметр, который изменяется в периодической культуре и на который существует датчик, может быть использован для управления ростом по типу турбидостата.

Необходимо отметить, что управляющими параметрами могут быть комплексные параметры, например, содержание кислорода и углекислоты в отходящем воздухе, характеризующее дыхательный коэффициент.

Непрерывно-проточное культивирование может осуществляться в одном ферментере (одностадийный процесс) или в двух и более ферментерах (многостадийный, многоступенчатый процесс).

В промышленности одностадийный процесс культивирования применяется для получения микробной массы или тех продуктов, кинетика накопления которых повторяет кинетику роста биомассы.

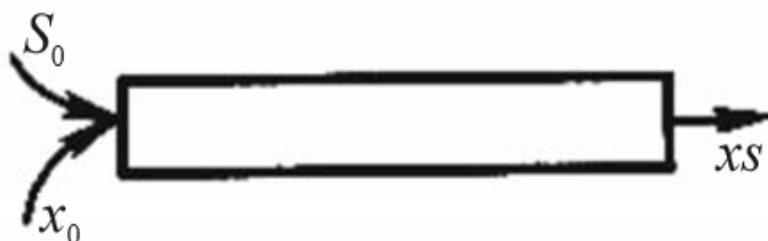
Для получения высоких концентраций биомассы могут быть использованы одностадийные системы с возвратом клеток, в которых клетки, отделенные от культуральной жидкости с помощью насоса, возвращаются обратно в ферментер. Возврат клеток (рециркуляция) имеет значение в тех процессах, в которых за время пребывания в ферментере клетки не успевают реализовать свои потенциальные возможности в отношении синтеза целевого продукта.

Применение многостадийных систем позволяет получать культуру при любой скорости роста – от лаг-фазы до экспоненциальной и стационарной. Многостадийные системы обычно используются для получения вторичных продуктов микробного синтеза, накопление которых в той или иной степени отстает от кинетики роста биомассы. Многостадийное культивирование с успехом применяется при получении молочной кислоты, этилового спирта и т. д. «Батарей»

ферментеров применяется также для переработки высоких концентраций субстрата при получении продуктов как первой, так и второй фазы роста.

1.7.2 Системы культивирования полного вытеснения

Этот способ культивирования используется для анаэробных условий. Открытая система полного вытеснения отличается от системы идеального смешения тем, что культура в ней не перемешивается и представляет собой поток жидкости через трубку. Наиболее распространенным аппаратом является трубчатый реактор (рисунок 6).



S_0 – концентрация субстрата в поступающей среде;

S – концентрация субстрата в вытекающей среде;

X_0 – начальная концентрация биомассы;

X – концентрация вытекающей биомассы

Рисунок 6 – Трубчатый ферментер полного вытеснения

Он может иметь различную форму (прямую, S-образную, спиральную) и устанавливается горизонтально или вертикально. Система полного вытеснения представляет собой пространственный, проточный вариант периодической культуры. Такая культура за время от посева до выгрузки проходит через все стадии периодической культуры, т. е. фазы роста распределены не во времени, а в пространстве, причем каждой части ферментера в установившемся режиме соответствует определенный отрезок кривой роста. Засев осуществляется непрерывно на входе в ферментер одновременно с подачей среды. По такому

принципу ведут стадию брожения при производстве пива в башенных проточных емкостях.

Необходимо отметить, что в настоящее время появились ферментационные аппараты, обеспечивающие процессы с режимом, приближающимся к полному вытеснению и при аэробном культивировании. Это вращающиеся трубчатые реакторы с насадкой или внутренними аэрирующими элементами, а также многосекционные колоночные аппараты.

1.7.3 Системы твердожидкостного типа

К системам твердожидкостного типа относят многофазные системы, в которых культура растет на границе разных фаз: жидкость – твердая фаза, жидкость – твердая фаза – газ. В этих системах клетки удерживаются путем прилипания к твердой основе – наполнителю и размножаются на нем, образуя пленку биомассы. Типичным примером является производство уксуса в стружечных аппаратах.

В процессах аэробного роста лимитирующими факторами, вероятно, являются кислород и субстрат. В тонких пленках биомассы каждая из прикрепленных к поверхности микробных клеток полностью обеспечена питательной средой и способна расти и размножаться с максимальной экспоненциальной скоростью. По мере того как клетки образуют более толстую пленку биомассы, рост их лимитируется диффузией субстрата и кислорода внутрь этой пленки.

Культивирование микроорганизмов, образующих пленки из биомассы, осуществляется в ферментере типа колонки с наполнителем. В качестве наполнителя может использоваться макроноситель (кокс, прутья, стружка, стеклянные шарики и т. д.) или микроноситель (амберлитовые смолы, частички сефадекса и т. д.). Клетки, культивируемые таким образом, называются иммобилизованными.

В промышленной микробиологии системы твердожидкостного типа нашли применение в «оросительных фильтрах» при очистке сточных вод, в производстве

органических растворителей и кислот, в сбраживании гидролизатов древесины на спирт и т. д.

Культивирование на твердом носителе используется также при изучении метаболической активности природных микробных популяций. При пропускании различных растворов через колонку из образца почвы, служащего носителем, получают модели условий, близких к природным. Широкое применение нашли многофазные системы в производстве пива.

К многофазным системам твердожидкостного типа относятся и такие, в которых твердой фазой является сама культура, образующая пленки на поверхности жидкой протекающей питательной среды. Рост микроорганизмов в этом случае осуществляется в специальной горизонтальной емкости. Эта система используется, например, для получения винного уксуса в горизонтально лежащих бочках и лимонной кислоты при выращивании пленки в кюветах.

Таким образом, между периодическим и непрерывным культивированием существует большое разнообразие типов процессов культивирования (рисунок 7). Каждый из промежуточных типов можно использовать в зависимости от задачи исследования или цели производства.

1.8 Синхронно делящиеся культуры микроорганизмов

Культуры микроорганизмов, даже взятые в один и тот же срок от посева, представляют собой совокупность клеток, находящихся на разных стадиях своего индивидуального развития.

Изучение физиологических свойств и метаболической активности таких культур приводит к получению средних результатов. А модель изолированной живой клетки не может быть использована для изучения ее биологии не только из-за малых количеств биомассы, но и потому, что не отражает свойств клетки, находящейся обычно в условиях популяции.



Рисунок 7 – Основные методы культивирования микроорганизмов

Стремление получить культуры, все клетки которых в данный момент находятся в одной фазе развития, привело исследователей к разработке метода синхронизации деления микроорганизмов. Этот метод позволяет отдельно и поэтапно изучать физиологические и биохимические процессы, протекающие на разных стадиях развития клетки.

Сущность метода синхронизации заключается в том, что путем различных воздействий микробная популяция искусственно приводится в однородное физиологическое состояние. Наиболее легко определяемым показателем такого состояния популяции является одновременное (синхронное) деление почти всех клеток культуры.

Синхронизации деления подвергались различные объекты: грибы, бактерии, простейшие, водоросли, а также клетки культуры ткани и т. п. Среди бактерий синхронное размножение изучалось главным образом на популяциях *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Corynebacterium diphtheriae* и других.

1.8.1 Периодическое синхронное культивирование

Для синхронизации деления обычно применяют популяции в фазе экспоненциального роста, когда клетки наиболее однородны по продолжительности периода генерации.

Степень участия клеток популяции в синхронном делении называют степенью синхронизации. Она выражается значениями индекса синхронизации, который характеризует степень однородности популяции и позволяет сравнить эффективность различных синхронизирующих воздействий. Для определения степени синхронизации наибольшее распространение получил «индекс синхронизации» Шербаума (I_s), вычисляемый по формуле:

$$I_s = (N_1/N_0 - 1) \times (1 - T/g), \quad (1)$$

где N_0 – число клеток непосредственно перед взрывом синхронного деления;

N_1 – число клеток после синхронного деления;

T – время, в течение которого происходит синхронное деление;

g – продолжительность одной генерации.

Способы, вызывающие синхронное деление, весьма разнообразны и многочисленны. В зависимости от характера воздействия их можно разделить на 3 большие группы:

- 1) механический отбор (селективные методы);
- 2) действие физических факторов;
- 3) химико-биологические воздействия.

Методы, основанные на механическом отборе однородных по некоторым признакам клеток из асинхронно делящейся популяции, называются естественными, или селективными. Некоторые из них получили наиболее широкое распространение в микробиологических исследованиях, например, фракционное фильтрование и дифференциальное центрифугирование.

К этой же группе методов можно отнести исследования ученых, получивших синхронное размножение *Bacillus cereus* за счет развития популяции из отобранных спор.

Таким образом, первая группа методов синхронизации заключается в механическом отборе клеток из популяции в зависимости от их объема, массы или определенной формы существования, как это имеет место в случае отбора спор. Применение селективных методов основано на предположении, что такие свойства, как объем и масса клеток, отражают в известной мере определенное физиологическое состояние. Эти методы имеют то преимущество, что не создают никакого препятствия в обмене веществ у отдельных клеток, как это бывает при использовании других методов.

Вторая группа методов связана с физическими воздействиями, также ведущими популяцию к синхронному размножению. В этом направлении наибольшее распространение получили температурные воздействия. Синхронизация популяций с помощью изменения температуры культивирования достигается однократным (шок) или многократным (сдвиги температуры между двумя уровнями) действием более высокой или более низкой температуры по сравнению с оптимальной для данного вида микроорганизмов. Такое температурное воздействие, блокируя процесс деления, не останавливает роста и развития клеток, что в конечном итоге приводит популяцию в однородное состояние. После снятия шока от 70 % до 90 % клеток делится синхронно. Этот вид воздействия в основном применяется для синхронизации бактерий, простейших и клеток культуры ткани.

Одним из методов физического воздействия, применяемых для синхронизации деления, является обработка клеток сублетальными дозами рентгеновских лучей.

К физическому типу воздействий можно отнести также периодическую смену света и темноты, использованную для получения синхронного деления *Euglena gracilis* и хлореллы. Этот метод считается наиболее естественным, так как основан на цикличности развития водорослей в связи с суточной фотопериодичностью.

Третья группа факторов, вызывающих синхронное размножение, основана на изменениях питательной среды путем введения ингибиторов или лишения среды веществ, необходимых для деления.

Одним из наиболее распространенных методов синхронизации этой группы является так называемый метаболический шок.

Можно получить эффект синхронизации, применяя «голодные» среды, из которых полностью удалены важнейшие компоненты или снижено их содержание. Последующее добавление недостающего вещества или перенесение клеток в полноценную среду вызывает синхронное деление.

Несмотря на разнообразие методов, могущих привести культуру к синхронному размножению, не всегда удается в достаточной степени синхронизировать деление клеток. В таких случаях принято сочетать различные методы.

1.8.2 Непрерывно-синхронное культивирование

Общим и весьма существенным недостатком периодических синхронных культур является быстрая потеря синхронности, наступающая через 2-3 генерации.

Причина подобного явления может заключаться в том, что не все клетки популяции делятся, достигнув одного и того же размера, возраста или момента времени, прошедшего после предыдущего деления. Принято считать, что решающая роль принадлежит фазе развития исходной синхронизируемой культуры. Десинхронизация наступает быстрее при воздействии на культуру синхронизирующим агентом в фазе замедления скорости размножения, т. е. более гетерогенную в отношении продолжительности генерации отдельных клеток.

С середины 60-х гг. XX в. началась разработка методов получения синхронизированных культур на протоке. Такой способ известен как непрерывно-синхронный, или фазовый, метод культивирования, гарантирующий поддержание синхронного деления клеток неограниченно долгое время.

Метод основан на периодическом сливе из ферментера половины объема выросшей культуры через промежутки времени, равные одной генерации, и одновременном добавлении такого же количества свежей питательной среды, что обеспечивает импульсную подачу источников питания. Состав среды подбирается таким образом, чтобы при удвоении биомассы происходило исчерпание питательных веществ, вследствие чего рост культуры должен быть приостановлен.

Добавление свежей среды приводит к восстановлению роста, т. е. синхронизация деления достигается голоданием клеток по какому-либо лимитирующему рост субстрату. Лимитирующими факторами могут служить источники азота, углерода, минеральных солей и т. д.

Имеются также данные, свидетельствующие о том, что синхронное деление клеток может быть индуцировано изменением рН, температуры и других условий культивирования, оказывающих воздействие на ряд метаболических процессов клеток.

1.9 Тестовые задания к разделу «Культивирование клеток микроорганизмов»

1 Метод культивирования зависит от

- а) потребностей организма;
- б) для чего будет использована культура;
- в) конечной цели эксперимента;
- г) все ответы верны;
- д) все ответы неверны.

2 Все известные процессы культивирования микроорганизмов различаются по таким параметрам как

- а) состояние питательной среды;
- б) наличие среды;
- в) наличие или отсутствие перемешивания;
- г) содержание кислорода;
- д) содержание водорода;
- е) количество ферментеров.

3 Простая периодическая культура, содержащая ограниченное первоначальное количество питательного субстрата, служит примером

- а) закрытой системы;
- б) открытой системы;
- в) смешанной системы;
- г) проточной системы.

4 Получение накопительных культур

- а) позволяет получить чистые культуры;
- б) позволяет получить смешанную культуру;
- в) дает возможность оценить присутствие антибиотиков в популяции;
- г) дает возможность оценить различные воздействия факторов окружающей среды на смешанную микробную популяцию.

5 К физическим методам накопления чистой культуры следует относить

- а) регуляцию роста температурой;
- б) регуляцию роста рН;
- в) тепловую и ультразвуковую обработку;
- г) обработку формалином;
- д) обработку антибиотиками;
- е) ультрафиолетовое облучение.

6 Накопительные культуры получают в

- а) закрытых системах;
- б) открытых системах;
- в) смешанных системах;
- г) проточных системах.

7 Массовая культура бактерий на твердой среде имеет ряд преимуществ по сравнению с культурой, выращиваемой в жидкой среде

- а) нет необходимости использовать центрифугу;
- б) нет необходимости использовать термостатные установки;

в) твердые культуры относительно свободны от макромолекулярных компонентов;

г) твердые культуры полностью свободны от питательной среды.

8 Характеристики периодического метода культивирования включают

а) внесение посевного материала в питательную среду (инокуляция клетками среды) в ходе процесса;

б) концентрацию микроорганизмов, которая нарастает и останавливается;

в) концентрацию микроорганизмов, которая нарастает в ходе всего процесса;

г) непрерывное изменение физиологического состояния клеток;

д) неустойчивое состояние культуры;

е) устойчивое состояние культуры.

9 Системы периодического культивирования являются

а) закрытыми системами;

б) открытыми системами;

в) смешанными системами;

г) проточными системами.

10 Культуры, растущие сбалансировано, характеризуются

а) постоянным химическим составом;

б) постоянным физическим составом;

в) непостоянным химическим составом;

г) непостоянным физическим составом.

11 При изучении динамики роста культур микроорганизмов необходимо строго соблюдать некоторые условия:

а) жизнеспособность засева;

б) наличие в среде культивирования всех необходимых питательных веществ;

в) наличие в среде ингибиторов, подавляющих рост клеток;

г) поддержание в среде всех оптимальных физико-химических условий.

12 Бактерии, внесенные в питательную среду, интенсивно растут, скорость их деления невысока, к концу этой фазы клетки увеличиваются по объему, синтезируют новые ферменты:

- а) фаза стационарного роста;
- б) лаг-фаза;
- в) фаза отрицательного ускорения.

13 Рост в периодической культуре характеризуется

- а) постоянной сменой условий;
- б) увеличением концентрации субстрата;
- в) возрастанием плотности популяции;
- г) уменьшением концентрации субстрата;
- д) постоянной концентрацией субстрата;
- е) постоянной плотностью популяции.

14 В регуляции процессов роста и клеточного деления участвует

- а) наружная мембрана;
- б) цитоплазматическая мембрана;
- в) клеточная стенка;
- г) пептидогликановый слой;
- д) все ответы верны;
- е) все ответы не верны.

15 В процессе репликации происходит...генетического материала

- а) удвоение;
- б) уменьшение;
- в) синтез;
- г) утроение.

16 Бактерии размножаются с наибольшей скоростью, число клеток увеличивается в геометрической прогрессии.

- а) фаза отрицательного ускорения;
- б) стационарная фаза;
- в) фаза экспоненциального роста.

17 Рост в непрерывной культуре характеризуется

- а) постоянной сменой условий;
- б) увеличением концентрации субстрата;
- в) возрастанием плотности популяции;
- г) уменьшением концентрации субстрата;
- д) постоянной концентрацией субстрата;
- е) постоянной плотностью популяции.

18 Продолжительность периода адаптации

- а) прямо пропорциональна длительности предшествующей стационарной фазы;
- б) обратно пропорциональна длительности предшествующей стационарной фазы;
- в) прямо пропорциональна длительности предшествующей фазы отмирания;
- г) обратно пропорциональна длительности предшествующей фазы отмирания.

19 Если же клетки переносят с богатой среды на среду с более низким уровнем питательных веществ, то они

- а) способны немедленно с высокой скоростью вступить в экспоненциальную фазу роста;
- б) способны немедленно, хотя и с низкой скоростью, вступить в экспоненциальную фазу роста;
- в) не способны сразу вступить в экспоненциальную фазу роста.

20 В период фазы ускорения роста происходит

- а) высокое потребление питательных веществ;
- б) накопление продуктов обмена;
- в) усиление синтеза вещества;
- г) накопление метаболитов;
- д) все ответы верны.

21 Поведение клеток в эту фазу регулирует такое явление как апоптоз

- а) лаг-фаза;
- б) стационарная фаза;
- в) логарифмическая фаза;
- г) адаптационная фаза;
- д) все ответы неверны.

22 Явление диауксии характерно для

- а) лаг-фазы;
- б) стационарной фазы;
- в) логарифмической фазы;
- г) адаптационной фазы;
- д) все ответы верны.

23 Глубинное культивирование в ферментерах по сравнению со статическим и поверхностным имеет ряд отличий

- а) ускоряет рост и развитие микроорганизмов;
- б) замедляет рост и развитие микроорганизмов;
- в) позволяет получать гомогенную культуру «идеального смешения»;
- г) не позволяет получать биомассу.

24 Продленный периодический процесс культивирования предусматривает

- а) одноразовую загрузку и разгрузку ферментера;

- б) многократную загрузку ферментера;
- в) однократную разгрузку ферментера;
- г) многократную разгрузку ферментера.

25 Одностадийный непрерывно-проточный метод культивирования может осуществляться

- а) в одном ферментере;
- б) в двух и более ферментерах.

26 Система полного вытеснения представляет собой проточный вариант

- а) закрытой системы;
- б) открытой системы;
- в) смешанной системы.

27 Продленный периодический процесс культивирования предусматривает

- а) однократную загрузку и однократную разгрузку ферментера;
- б) многократную загрузку и многократную разгрузку ферментера;
- в) однократную загрузку и многократную разгрузку ферментера;
- г) многократную загрузку и однократную разгрузку ферментера.

28 Процесс диализа – это вариант

- а) системы полного вытеснения;
- б) непрерывно-проточного метода;
- в) продленного периодического процесса;
- г) многоциклического культивирования;
- д) полунепрерывного культивирования.

29 Сливно-доливная система функционирует при

- а) непрерывно-проточном методе;
- б) продленном периодическом процессе;

- в) глубинном культивировании;
- г) многоциклическом культивировании;
- д) полунепрерывном культивировании.

30 Для синхронизации деления обычно применяют популяции в фазе

- а) лаг-фазы;
- б) отмирания;
- в) экспоненциального роста;
- г) адаптации.

2 Методы получения протопластов микроорганизмов

Выбор метода получения протопластов определяется видовыми особенностями организмов и в первую очередь строением их клеточных стенок, потому что даже внутри прокариот есть существенные различия в строении клеточных стенок, не говоря уже о различиях в структуре прокариотических и эукариотических организмов.

Тем не менее, методы получения протопластов у трех различных групп микроорганизмов – бактерий, дрожжей и грибов – могут быть объединены в две основные группы:

- 1) ферментативный лизис ригидного слоя клеточной стенки;
- 2) использование факторов, подавляющих нормальный синтез основных полимеров стенки.

2.1 Получение протопластов у бактерий

В 1800 г. А. Фишер впервые показал явление «плазмолиза» – выхода содержимого клеток в окружающую среду при их помещении в гипертонический раствор – для бактерий *Bacillus subtilis* и *Vibrio proteus*. При этом протоплазма обособлялась в виде шарообразных тел, очень быстро исчезающих.

Основная работа по получению протопластоподобных тел у бактерий началась в начале 1950-х гг. В эти годы с использованием гипертонических растворов различных солей было обнаружено влияние условий культивирования клеток на выход шарообразных форм. Было установлено значение концентрации шаров (чем гуще суспензия, тем интенсивнее образование шаров) и влияние рН среды (слабокислая и нейтральная реакции способствовали образованию шаров, в то время как при кислой и щелочной реакции шары не образовывались). Однако целостность полученных шарообразных форм сохранять не удавалось, они быстро лизировались.

Следующим шагом в получении протопластоподобных структур явилось ферментативное растворение бактериальной клеточной стенки при помощи

гидролитического фермента лизоцима. Толчком к этому послужил установленный М. Сальтоном факт растворения под действием лизоцима клеточных стенок грамположительных бактерий. Однако и в этих экспериментах протопластоподобные тела оказывались очень неустойчивыми.

Этого удалось избежать К. Вейбулу, который обрабатывал бактериальные клетки лизоцимом в гипертоническом растворе сахарозы. Полученные им сферические тела долгое время сохраняли свою целостность при условии помещения их в среду со стабилизатором осмотического давления. К. Вейбул назвал полученные сферические образования протопластами, употребив термин, применявшийся ранее в цитологии растений.

Установлено, что на активность лизоцима могут оказывать влияние вещества, используемые в качестве стабилизаторов осмотического давления. Например, использование 0,5 % NaCl тормозит действие лизоцима на клетки. Лучшими стабилизаторами для получения бактериальных протопластов считаются углеводы. Чаще всего применяют 0,1-0,6 М растворы сахарозы, глюкозы, раффинозы, мелибиозы, трегалозы. Иногда используют и более высокие концентрации сахаров.

Для получения протопластов грамположительных бактерий достаточна простая обработка клеток лизоцимом в гипертоническом растворе. Под действием этого фермента растворяется ригидный пептидогликановый слой клеточной стенки. При этом чувствительность к лизоциму неодинакова не только у разных видов бактерий, но и среди разных штаммов.

Для получения протопластов грамотрицательных бактерий простая обработка лизоцимом малоэффективна. В клеточных стенках этих бактерий тонкий слой пептидогликана окружен внешним слоем, состоящим из лигопротеинов, фосфолипидов, липополисахаридов, что делает его недоступным действию лизоцима. Для проникновения фермента к субстрату необходимо нарушение поверхностных слоев клеточной стенки.

Подготовка клеток грамотрицательных бактерий для воздействия лизоцимом проводится с помощью различных методов, повышающих чувствительность клеток: путем предварительной инкубации бактерий в жидкой питательной среде при

щелочном рН или в присутствии высоких концентраций сахарозы; обработка клеток хелатирующими соединениями (например, Na-ЭДТА) или одно- и дивалентными катионами; применение предварительного замораживания-оттаивания.

Наиболее удачным оказался метод, предложенный Р. Репаске и до сих пор применяемый для получения протопластов у разных видов грамотрицательных бактерий. Данный метод предполагает возможность получения протопластов при совместном действии лизоцима и ЭДТА в среде с рН 7,6-8,0.

В 1976 г. Р. Вейсс предложил ускоренный метод получения протопластов кишечной палочки с использованием ЭДТА, модифицировав метод Репаске. Он применил не совместное действие на клетки лизоцима и ЭДТА, а последовательное.

Вместо лизоцима в качестве факторов, лизирующих клеточные стенки бактерий, можно использовать также литические ферменты микробного происхождения.

Вторая группа методов получения протопластов у бактерий предусматривает не разрушение готовых клеточных стенок, а ингибирование их синтеза (методы «несбалансированного роста»). Метаболические нарушения при синтезе клеточных стенок происходят в двух случаях:

- 1) в результате мутации может возникнуть генетический блок в цепи реакций, ведущих к синтезу полимеров клеточной стенки;
- 2) при нарушении синтеза клеточной стенки под действием агентов, предотвращающих образование ригидного мукополимера.

Целостность клеточных стенок у некоторых бактерий зависит от наличия в ростовой среде мукополимерных аминокислот: ДАП, цистеина, аланина, лизина, глицина, орнитина и глутаминовой кислоты. Когда они исчерпываются в процессе роста клеток, синтез клеточных стенок приостанавливается (*Streptococcus faecalis*).

Одним из широко распространенных методов получения протопластов, впервые предложенным К. Ледермейстером и Е. Келленбергером в 1956 г., у грамотрицательных бактерий является так называемый пенициллиновый метод, основанный на свойстве пенициллина нарушать синтез пептидогликана. Пенициллиновый метод неэффективен в тех случаях, когда в клетках подавлен

синтез активных цитоплазматических компонентов, например, при воздействии на клетки хлорамфениколом, стрептомицином или хлортетрациклином. Действие пенициллина на активно растущие клетки сводится к торможению реакции транспептидирования на последней стадии синтеза пептидогликана, после того как этот полимер почти построен.

Для получения протопластов грамположительных бактерий пенициллиновый метод непригоден. Объясняется это тем, что мукополимерный слой в клеточной стенке этих бактерий не защищен дополнительными слоями, как у грамотрицательных бактерий, и при культивировании с антибиотиком клетки претерпевают лизис. Однако имеются отдельные сообщения об успешном применении метода для получения протопластов у *Corynebacterium glutamicum*, для которых другие методы были неэффективны.

Помимо указанных способов, протопласты у бактерий могут быть получены и другими методами: под влиянием глицина, фагового литического фермента, нормальной и иммунной сывороток, комплемента, методом автолиза и т. д.

Протопласты, полученные из грамотрицательных и грамположительных бактерий, по качеству оставшихся поверхностных структур различаются между собой. У протопластов грамположительных бактерий клеточная стенка отсутствует полностью, и их сферические тела окружены лишь цитоплазматической мембраной. Сферические тела грамотрицательных бактерий сохраняют значительную часть сложноорганизованной клеточной стенки и называются сферопластами.

2.2 Получение протопластов у грибов

Первой в данной области явилась работа Дж. Таджи, который показал, что пищеварительный сок виноградной улитки способен растворять клеточные стенки дрожжей. Анализ химического состава выявил наличие целого комплекса ферментов: глюканаз, маннаназ, протеаз, липазы, хитиназы, полигалактуроназы и др. Первые дрожжевые протопласты под действием улиточного сока были получены в 1957 г. двумя учеными Л. Эдди и В. Р. Вильямсоном.

При воздействии на клеточную стенку литических ферментов образуется пора, через которую затем протоплазма выходит в окружающую среду и в присутствии стабилизатора осмотического давления благодаря поверхностному натяжению мембраны приобретает сферическую форму – образуется протопласт. У дрожжевых клеток пора обычно образуется на одном из полюсов клетки или в экваториальной зоне.

Большинство исследователей считает, что основную роль при лизисе грибных клеточных стенок играют глюканазы. В этом явлении нет ничего необычного, так как именно глюканы являются одними из главных компонентов клеточных стенок дрожжей. Однако для быстрого и эффективного лизиса сложной в плане химического состава и структуры грибной стенки необходимо также присутствие в литическом комплексе и других ферментов. При совместном воздействии нескольких ферментов проявляется синергический эффект.

Для получения грибных протопластов широко и успешно применяется литический комплекс *Streptomyces spp.* и некоторые другие. Для лизиса клеточных стенок при помощи ферментов микробного происхождения применяют или культуральную жидкость после инкубирования микроорганизма, или энзимный препарат, полученный осаждением комплекса ферментов сульфатом аммония или ацетоном. Перед употреблением в смесь ферментов вносят стабилизатор осмотического давления и стерилизуют фильтрацией через мембранный фильтр. Процесс растворения клеточных стенок под действием литического комплекса может продолжаться от нескольких часов до 2 суток.

На образование протопластов, особенно у грибов и дрожжей, сильно влияет возраст культуры. Поэтому рекомендуется использовать молодые дрожжевые клетки и мицелий. По мнению многих авторов, различная возрастная чувствительность грибных клеток к действию литических ферментов объясняется скорее количественными изменениями в клеточной стенке, чем качественными.

Для облегчения процесса получения грибных протопластов можно использовать воздействие редуцирующих веществ (меркаптоэтанола, цистеина-HCl, сульфида натрия). Хотя механизм их действия на клетки полностью не выяснен,

предполагается, что эти соединения разрывают дисульфидные связи в поверхностном маннан-протеиновом слое, облегчая этим доступность глюкоановой матрицы действию литических ферментов.

Лизис грибных клеточных стенок может быть облегчен также обработкой клеток хелатирующими соединениями (Na-ЭДТА) или применением таких приемов, как замораживание-оттаивание. Лучшими стабилизаторами осмотического давления оказались 1 М раствор хлористого натрия и смесь 1 М раствора хлористого натрия с 1 М раствором маннита в соотношении 1:1.

В процессе культивирования протопласты и сферопласты способны увеличиваться в размерах, иногда даже на треть своей величины, и делиться. Деление протопластов может быть как равновеликое, так и неравновеликое, в виде почкования. Дочерние протопласты обычно меньшего размера. Протопласты, полученные из микробных клеток, сохраняют большинство их свойств. Они жизнеспособны в изотонической питательной среде при близких величинах осмотического давления среды и содержимого протопласта, способны метаболизировать и продуцировать различные вещества, поддерживать развитие бактериофагов, расти и делиться. Отсутствие оболочки исключает один из важных барьеров нескрещиваемости микроорганизмов, создает возможность объединения геномов и цитоплазмы для получения гибридного потомства даже у отдаленных форм микроорганизмов.

2.3 Регенерация клеточной стенки и реверсия к клеточным формам

Исследование реверсии протопластов бактерий и грибов выявило сходство протекания у них данного процесса. Условно он может быть разделен на три этапа:

- 1) регенерация клеточной стенки;
- 2) реверсия, появление клеток-ревертантов;
- 3) восстановление нормального цитокинеза и появление клеток исходной формы.

Вместе с тем каждой группе микроорганизмов присущи свои особенности протекания реверсии протопластов, связанные со строением клеток и клеточных стенок, характером метаболизма и цитокинеза.

2.3.1 Реверсия бактериальных протопластов

Если при обработке лизоцимом или пенициллином в изотонической среде клеточная стенка с бактериальной клетки полностью не удалена, то при исключении этих агентов из среды происходит быстрое восстановление клеток. Если же клеточная стенка удалена полностью, образовавшийся истинный протопласт неспособен в обычных условиях ее регенерировать. Одним из условий, позволяющих таким формам ревертировать к исходному состоянию, является наличие в среде культивирования твердой или полутвердой основы. Ею могут быть желатин (5-30 %), агар (0,7-2 %), мембранные фильтры, убитые бактериальные клетки или клеточные стенки. Причем использование твердого субстрата предпочтительнее.

2.3.2 Реверсия протопластов мицелиальных грибов

Реверсия к мицелиальным формам у грибных протопластов происходит как в жидкой, так и на поверхности твердой среды, или в слое полужидкого агара. Многие исследователи показали, что реверсия грибных протопластов может проходить тремя способами, различающимися характером формирования первичного мицелия. При первом способе протопласты первоначально образуют цепочку из дрожжеподобных клеток (до 20 клеток). Затем терминальная, уже осмотически устойчивая, продуцирует первичную гифу, образующую мицелий. Вторым способом реверсии начинается с регенерации протопластами клеточной стенки, вследствие чего они становятся резистентными к осмотическому шоку. После чего протопласт образует зародышевую трубку. Третий способ реверсии грибных протопластов необычен. Протопласт, сохраняя сферическую форму, формирует новую оболочку в

виде полочки, затем туда переносится содержимое материнского протопласта. Если появляется цепочка таких оболочек, то цитоплазма передвигается по этой цепочке, оставляя позади себя «тени» из клеточных стенок. Последняя клетка цепочки образует первичную гифу. Грибные протопласты могут ревертировать одним из трех способов, или у одного вида наблюдается все три способа реверсии. Трудно сказать, что влияет на выбор способа реверсии, возможно, видовые особенности организма, тип его цитокинеза, метод получения и условия инкубации протопластов или состав регенерационной среды.

Растущие и ревертирующие протопласты – хорошая модель для изучения биосинтеза клеточной стенки и взаимоотношений между ростом и ядерным делением клетки.

2.4 Тестовые задания по разделу «Методы получения протопластов микроорганизмов»

1 Выбор метода получения протопластов определяется

- а) строением их клеточных стенок;
- б) строением протопластов;
- в) расположением жгутиков;
- г) наличием запасных веществ.

2 Наиболее удачным методом получения протопластов микроорганизмов оказался метод

- а) К. Вейбулу;
- б) М. Сальтона;
- в) Р. Репаске;
- г) А. Фишера.

3 Обработка клеток лизоцимом достаточна для получения протопластов

- а) грамотрицательных бактерий;

- б) грамположительных бактерий;
- в) эффективна для всех бактерий;
- г) неэффективна для всех бактерий.

4 «Пенициллиновый» метод получил широкое распространение для получения протопластов

- а) грамотрицательных бактерий;
- б) грамположительных бактерий;
- в) эффективен для всех бактерий;
- г) неэффективен для всех бактерий.

5 Сферопластами называют протопласты

- а) грамотрицательных бактерий;
- б) грамположительных бактерий;
- в) грибов;
- г) все ответы верны;
- д) все ответы неверны.

6 Первые дрожжевые протопласты были получены

- а) Дж. Таджи;
- б) Л. Эдди;
- в) В. Р. Вильямсоном;
- г) М. Сальтоном.

7 Для получения протопластов грибов применяет

- а) ампициллин;
- б) комплекс ампициллина и ЭДТА;
- в) ферменты микробного происхождения;
- г) ферменты растительного происхождения.

8 Дочерние протопласты

- а) меньшего размера;
- б) большего размера;
- в) одинакового размера;
- г) возможны все варианты.

9 Первым этапом прохождения реверсии к клеточным формам является

- а) появление клеток-ревертантов;
- б) регенерация клеточной стенки;
- в) восстановление нормального цитокинеза;
- г) восстановление нормального кариогенеза.

10 Вторым этапом прохождения реверсии к клеточным формам является

- а) появление клеток-ревертантов;
- б) регенерация клеточной стенки;
- в) восстановление нормального цитокинеза;
- г) восстановление нормального кариогенеза.

11 Третьим этапом прохождения реверсии к клеточным формам является

- а) появление клеток-ревертантов;
- б) регенерация клеточной стенки;
- в) восстановление нормального цитокинеза;
- г) восстановление нормального кариогенеза.

12 Реверсия грибных протопластов может проходить

- а) одним способом;
- б) двумя способами;
- в) тремя способами;
- г) четырьмя способами.

3 Параметры роста

Для многих целей вполне достаточно качественной характеристики роста, т. е. простого наблюдения, имеет ли место вообще рост в культуре. Дальнейшую информацию, которую получают, измеряя рост количественно, обычно выражают в форме графика зависимости биомассы от времени, о котором мы уже говорили ранее. При этом именно количественное изучение роста в процессе биотехнологических производств имеет первостепенное значение.

Однако результаты количественного изучения роста могут быть представлены более информативно и точно, если анализируются различные параметры роста: удельная скорость роста или время удвоения биомассы, лаг-период, или фаза задержки роста, экономический коэффициент, метаболический коэффициент, характеризующий использование субстрата и образование продукта, сродство субстрата и максимум биомассы.

При определении параметров роста исследуют рост простой гомогенной периодической культуры. Предполагается, что такая система состоит из хорошо перемешиваемой засеянной среды. Предлагается также, что перемешивания достаточно для диспергирования биомассы и что в среде нет перепада концентраций. Конечно, гетерогенная культура, например, растущая на поверхности, имеет более сложную природу. Однако в биотехнологическом производстве такую культуру используют редко или вообще не используют.

3.1 Скорость роста

3.1.1 Удельная скорость роста

Благоприятные условия, необходимые для успешного роста биомассы в культуре, включают жизнеспособность посевного материала, наличие источника энергии, внесение пищевых добавок/факторов роста (должны содержать все компоненты, необходимые для биосинтеза клеточного материала), отсутствие в

среде ингибиторов роста клеток микроорганизмов, а также создание и поддержание на оптимальном уровне всех физико-химических условий.

При удовлетворении всех потребностей в течение бесконечно малого промежутка времени dt произойдет увеличение биомассы dx пропорционально количеству биомассы x и интервалу времени, т. е.

$$dx = \mu x \times dt, \quad (2)$$

откуда

$$dx/dt = \mu x. \quad (3)$$

Дифференциальное отношение dx/dt выражает скорость роста популяции. Параметр μ , обозначающий скорость роста единицы биомассы $(1/x) \times (dx/dt)$, называется удельной скоростью роста и измеряется в единицах, обратных времени ($1/t$). Этот параметр аналогичен сложным процентам. Так, например, удельная скорость роста $0,1 \text{ ч}^{-1}$ эквивалентна скорости 10 % за 1 ч.

Если μ постоянна, то интегрирование уравнения (3) дает

$$\ln x = \ln x_0 + \mu \times t, \quad (4)$$

где x_0 – биомасса в начальный момент времени $t=0$. График зависимости $\ln x$ от времени будет иметь вид прямой линии с наклоном μ . Приведя логарифмы к основанию 10, из уравнения (4) получаем

$$\lg x = (\mu \times t / 2,30) + \lg x_0. \quad (5)$$

Из уравнения (4) следует, что

$$\ln(x/x_0) = \mu t, \quad (6)$$

тогда

$$x = x_0 \times e^{\mu t}. \quad (7)$$

Рост, подчиняющийся этому закону, называется экспоненциальным, или логарифмическим ростом. Основным параметром, характеризующим скорость роста, служит удельная скорость роста. Остальные параметры роста, которые рассматриваются ниже, могут быть выражены через удельную скорость роста.

3.1.2 Время удвоения биомассы

Зависимость между удельной скоростью роста и временем удвоения (t_d) биомассы можно получить, подставив в уравнение (6) $x = 2x_0$ и $t = t_d$,

тогда

$$t_d = \ln 2 / \mu = 0,693 / \mu. \quad (8)$$

3.1.3 Степень размножения

Степень размножения определяется отношением x/x_0 , которое равно $e^{\mu t}$ (уравнение (7)). С другой стороны, если биомасса претерпевает n удвоений или генераций, мы можем записать

$$x/x_0 = 2^n. \quad (9)$$

Таким образом,

$$n = 3,32 \log(x/x_0). \quad (10)$$

В экспериментах по культивированию целесообразно использовать посев, количество которого составляет 10 % конечного количества биомассы. Тогда n будет равно 3,32.

3.1.4 Обратное время удвоения

Поскольку число удвоений биомассы за время t будет равно t/t_d , мы можем записать

$$x = x_0 2^{t/t_d}. \quad (11)$$

Взяв логарифм по основанию 2 от обеих частей уравнения (11), получим

$$\log_2 x = \log_2 x_0 + t/t_d. \quad (12)$$

Наклон графика ($1/t_d$) зависимости $\log x$ от времени и есть обратное время удвоения. Некоторые исследователи предпочитают выражать скорость роста через $1/t_d$, а не через удельную скорость роста. Однако μ кажется нам предпочтительнее, поскольку этот член входит в основание уравнения роста (3). Об удобстве этого

показателя свидетельствует универсальность его применения в теории непрерывного культивирования. Важно четко представлять, какого из этих двух способов следует придерживаться.

3.2 Справедливость закона экспоненциального роста

Закон постоянно экспоненциального роста выполняется, если условия окружающей среды и состав биомассы остаются постоянными. Другими словами, если скорость роста не подчиняется этому закону, то не выполняется либо одно, либо оба вышеуказанные условия. Наличие экспоненциальной фазы роста хорошо известно в случае бактериальных и дрожжевых культур, но закон постоянного экспоненциального роста универсален и для всех прокариот и эукариот при условии, что указанные выше условия выполняются. Справедливость закона применительно к простейшим продемонстрировал Филпс, а применительно к животным клеткам – Берч и Перт. Перт и Каллоу установили, кроме того, применимость экспоненциального закона к культурам плесневых грибов в гомогенной перемешиваемой культуре. Рост нитчатых грибов может отклоняться от экспоненциального, что может объясняться либо образованием шаровидных колоний, в которых биомасса распределена не гомогенно в среде, либо тем обстоятельством, что доставка кислорода становится лимитирующим фактором. Изменения в окружающей среде, пожалуй, чаще всего являются основной причиной, из-за которой не удается поддерживать постоянным экспоненциальный рост. Это неизбежно происходит в периодической культуре – раньше или позже. Вероятно, в дальнейшем изменения в окружающей среде вызовут соответствующие изменения в составе биомассы. Так в ответ на изменение условий соотношение различных компонентов биомассы будет автоматически подстраиваться так, чтобы скорость роста была максимальной в данных условиях.

3.3 Экономический коэффициент

Экономический коэффициент (или выход биомассы) определяют из уравнения

$$\Delta x / \Delta s = Y, \quad (13)$$

где Δx – увеличение биомассы, соответствующее потреблению субстрата в количестве Δs .

Более строго экономический коэффициент определяется пределом, к которому стремится отношение $\Delta x / \Delta s$ при $\Delta s \rightarrow 0$, т. е.

$$Y = - dx/ds. \quad (14)$$

Знак «минус» вводится потому, что значения x и s изменяются в разные стороны.

Важность экономического коэффициента состоит в том, что он выражает количественные потребности организма в пище. Экономический коэффициент был использован Ролэном для выражения пищевых потребностей грибов. Последующие исследователи-микологи имели тенденцию использовать величину, обратную Y , называя ее экономическим коэффициентом. В 1942 г. Моно впервые показал, что если внешние условия в бактериальной культуре поддерживаются постоянными, то экономический коэффициент тоже будет постоянной, количественно воспроизводимой величиной. Таким образом, если x_0 и s_0 – начальные концентрации биомассы и субстрата соответственно, а x и s – соответствующие концентрации во времени роста в культуре, то

$$x - x_0 = Y (s_0 - s). \quad (15)$$

Когда биомасса достигает своего максимума x_m , концентрация лимитирующего субстрата равна приблизительно 0, т. е. можно записать

$$x_m - x_0 = Y s_0. \quad (16)$$

Следовательно, для лимитирующего субстрата график зависимости x_m от s_0 должен быть прямой линией с тангенсом угла наклона, равным Y .

3.4 Метаболический коэффициент

Скорость потребления субстрата культурой в данный момент выражается отношением

$$ds/dt = q \times x, \quad (17)$$

где x – биомасса, а коэффициент q известен как метаболический коэффициент, или удельная скорость метаболизма.

В качестве хорошо известных примеров можно привести q_o и $q_{\text{глюк}}$ для потребления кислорода и глюкозы соответственно. Метаболический коэффициент аналогичен ферментативной активности. Если состав биомассы и окружающая среда постоянны, то и q должен быть величиной постоянной.

Для потребления субстрата в небольшой промежуток времени dt можно записать

$$ds = (\mu x / Y) \times dt. \quad (18)$$

Откуда

$$ds/dt = \mu x / Y. \quad (19)$$

Сравнивая уравнения (19) и (17) видно, что

$$q = \mu / Y. \quad (20)$$

Уравнение (20) используется для определения потребностей в субстрате, особенно в кислороде, при различных скоростях роста.

3.5 Влияние концентрации субстрата на скорость роста

Существование фазы экспоненциального роста в периодической культуре доказывает, что скорость роста может в довольно широких пределах не зависеть от концентрации субстрата. Следовательно, рост в этом случае характеризуется кинетикой нулевого порядка. Можно предположить, что кинетика потребления субстрата будет соответствовать кинетике ферментативной реакции. Тогда, если s – концентрация субстрата, а q – метаболический коэффициент, то

$$q = q_m \times s / (s + K_s), \quad (21)$$

где K_s , называемая константой насыщения, эквивалентна константе Михаэлиса-Ментен, а q_m – максимальное значение q , полученное при $s = K_s$.

Подставив в уравнение (21) значения q и q_m из уравнений $q = \mu/Y$ и $q_m = \mu_m/Y$, получаем

$$\mu = \mu_m \times s / (s + K_s). \quad (22)$$

Уравнение (22) часто называют отношением Моно, так как Моно в 1942 г. эмпирически установил, что это выражение хорошо соответствует зависимости скорости роста бактерий от концентрации субстрата (рисунок 8). Значение K обратно пропорционально сродству организма субстрату. Преобразуя уравнение (22), получаем

$$1/\mu = (K_s/s \times \mu_m) + (1/\mu_m). \quad (23)$$

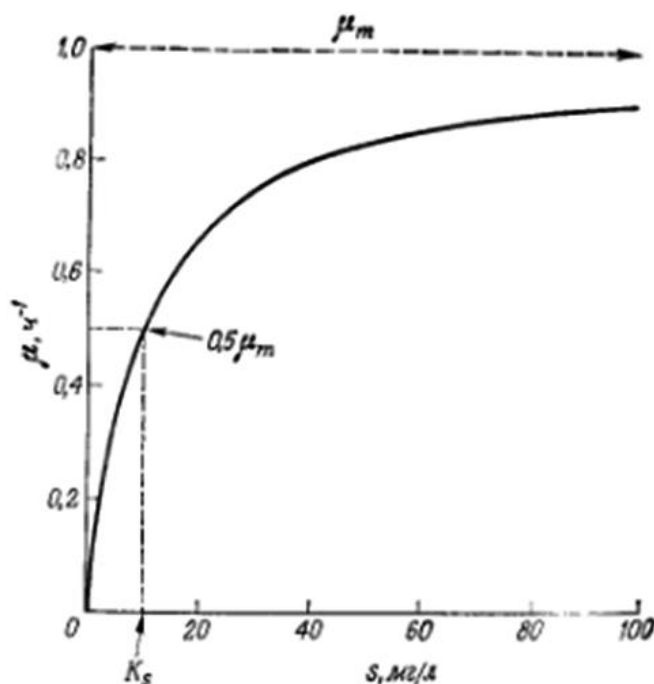


Рисунок 8 – Удельная скорость роста μ как функция концентрации s субстрата в соответствии с уравнением Моно $\mu = \mu_m \times s / (s + K_s)$ при $\mu_m = 1 \text{ ч}^{-1}$ и $K_s = 10 \text{ мг/л}$. При $s = K_s$ и $\mu = 0,5\mu_m$

Т. е., построив график зависимости $1/\mu$ от $1/s$, получаем прямую линию, которая пересекает ось абсцисс в точке $1/K_s$, а ось ординат – в точке $1/\mu_m$ (рисунок 9). Линейность графика в случае, когда по оси ординат откладывают обратные величины, служит удобным методом для проверки гиперболической зависимости.

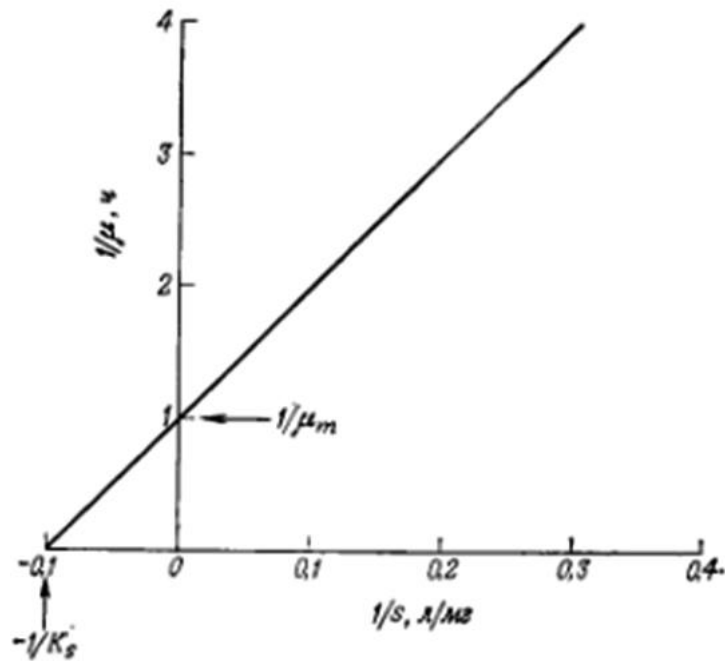


Рисунок 9 – Данные рисунка 8 в обратных координатах

3.6 Значения константы насыщения K_s

Данные об определении K_s немногочисленны, поскольку значения K_s крайне малы, часто ниже чувствительности химических методов определения. К тому же, если отбор пробы или сам анализ не будут проведены практически мгновенно, то уровень субстрата может существенно упасть в процессе анализа. Для измерения s при различных скоростях роста обычно используются следующие определения:

1) мгновенно измеряют концентрации лимитирующего субстрата при различных скоростях роста в культуре (например, в хемостате, как это сделал для кислорода Джонсон);

2) измеряют начальные скорости роста при различных начальных концентрациях субстрата в периодических культурах;

3) измеряют скорость роста в конце периодического культивирования, а концентрацию субстрата определяют из известной концентрации биомассы с помощью уравнения (15);

4) измеряют критические скорости разбавления (скорости вымывания) в хемостате при различных концентрациях лимитирующего субстрата в поступающей питательной среде;

5) применяют метод Буттона (рисунок 10).

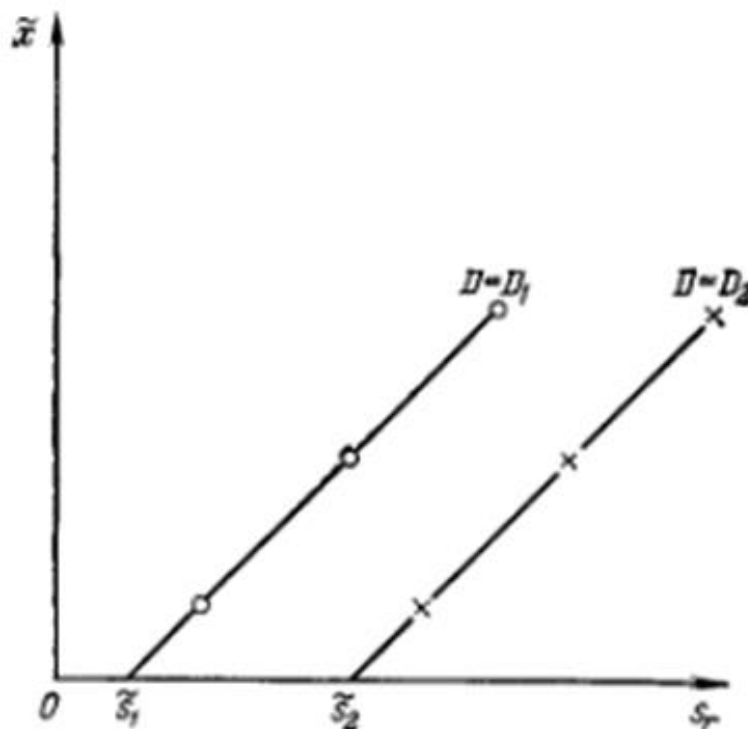


Рисунок 10 – Метод Буттона для определения концентрации лимитирующего субстрата S при данной удельной скорости роста $\mu = D$ в хемостате

Каждая прямая линия изображает зависимость стационарной концентрации биомассы при данной скорости разбавления от различных концентраций лимитирующего субстрата в поступающей среде. Эта прямая линия может быть выражена уравнением, где Y – экономический коэффициент.

Значения K_s для источника углерода и энергии близки к 10^{-5} М (таблица 1). Значения K_s для ионов калия, магния и фосфат-ионов тоже составляют примерно 10^{-5} М, а для кислорода – от 10^{-6} до 10^{-5} М. Значения этого коэффициента для аминокислот и витаминов значительно ниже. Из молекулярных расчетов кажется, что значения K_s для высокомолекулярного крахмала и мономера у *K. aerogenes* приблизительно одни и те же. По расчетам, сделанным на основе веса, значения K_s

для бактериального субстрата у протозоа *Tetrahymena* (таблица 1) сравнимы со значением K_s для малых растворимых молекул.

Таблица 1 – Константы насыщения (значения K_s) для роста организмов на различных субстратах

Организм (род)	Субстрат	K_s	
		мг/л	10^{-3} М
<i>Escherichia</i>	Глюкоза	$6,8 \times 10^{-2}$	$3,8 \times 10^{-2}$
Неизвестная бактерия	Фенол	9×10^{-1}	1
<i>Escherichia</i>	Маннит	2	1,1
<i>Escherichia</i>	Глюкоза	4	2,2
<i>Aspergillus</i>	Глюкоза	5	2,8
<i>Candida</i>	Глицерин	4,5	4,9
<i>Tetrahymena</i>	Бактерин	12	-
<i>Escherichia</i>	Лактоза	20	5,9
<i>Saccharomyces</i>	Глюкоза	25	14
<i>Pseudomonas</i>	Метанол	0,7	2
<i>Pseudomonas</i>	Метан	0,4	2,6
<i>Klebsiella</i>	Двуокись углерода	0,4	9×10^{-1}
<i>Escherichia</i>	Фосфат-ионы	1,6	1,7
<i>Klebsiella</i>	Ионы магния	$5,5 \times 10^{-1}$	2,3
<i>Klebsiella</i>	Ионы калия	$3,9 \times 10^{-1}$	1
<i>Klebsiella</i>	Ионы сульфата	2,7	$2,8 \times 10^{-1}$
<i>Candida</i>	Кислород	$4,5 \times 10^{-1}$	1,4
<i>Aspergillus</i>	Аргинин	5×10^{-1}	$2,9 \times 10^{-1}$
<i>Escherichia</i>	Триптофан	$1,1 \times 10^{-1}$	$5,4 \times 10^{-1}$
<i>Cryptococcus</i>	Тиамин	$1,4 \times 10^{-1}$	$4,7 \times 10^{-1}$

В общем, можно считать, что результаты соответствуют отношению Моно (уравнение (22)), однако имеются данные, что при высоких скоростях роста наблюдаются отклонения от этого отношения. Это, возможно, объясняется тем, что при различных скоростях роста изменяется средство организма к лимитирующему субстрату.

3.7 Определение длительности лаг-периода

Максимальному уровню удельной скорости роста часто предшествует лаг-период. Длительность лаг-периода (L) для многих целей удобно определять методом Лоджа и Хиншельвуда.

Если на графике зависимости логарифма биомассы от времени (рисунок 11) прямую линию экстраполировать до уровня начальной биомассы, то отрезок, отсекаемый при этом на оси абсцисс, и будет соответствовать L . Соответственно, уравнение для роста культуры имеет вид

$$\ln x = \mu \times (t - L) + \ln x_0. \quad (24)$$

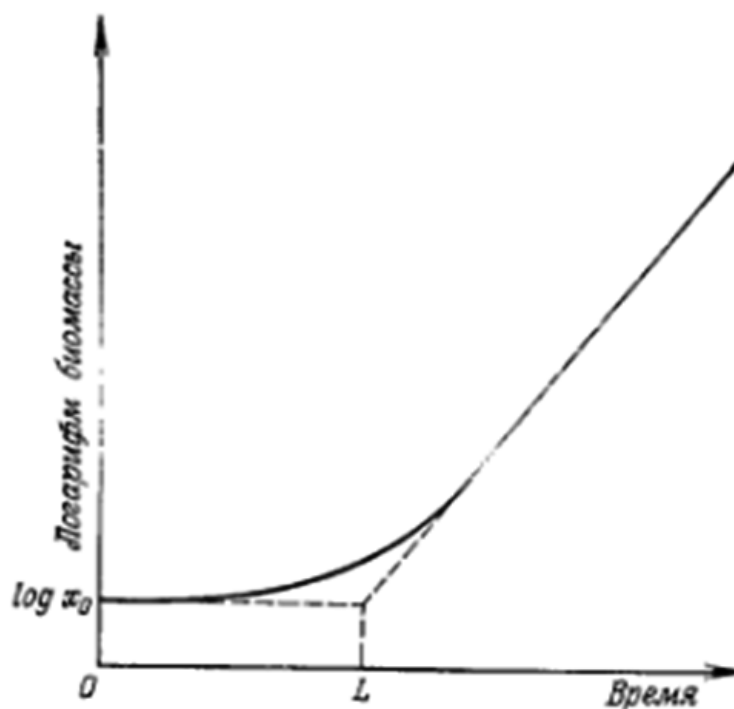


Рисунок 11 – Определение длительности лаг-периода

3.8 Предельные границы максимальной концентрации биомассы

О какой бы культуре ни шла речь, максимальная плотность биомассы, которая может быть достигнута в данной среде, определяется одним из четырех условий:

- 1) количеством лимитирующего субстрата в среде;

- 2) накоплением ингибирующего продукта;
- 3) максимальной плотностью упаковки биомассы;
- 4) отмиранием клеток.

Бейл высказал предположение, что максимальная плотность бактерий, или концентрация M , в культуре определяется требованиями к «жизненному» или биологическому пространству, т. е. биологическое пространство значительно шире физического пространства, занимаемого организмом. Ясно, однако, что подразумеваемая при этом концентрация M может быть обусловлена концентрацией компонентов среды (особенно кислорода) или наличием ингибирующего продукта в культуре. Идея Бейла интересна в историческом аспекте, поскольку в течение долгих лет она господствовала среди бактериологов. Эта идея параллельна концепции двуконтактного угнетения роста в культурах клеток животных тканей.

Таблица 2 – Максимальная плотность упаковки некоторых микроорганизмов (клетка/см³)

Организм	Принимаемая форма	Радиус, мкм	Длина, мкм	Объем, мкм	Максимальная плотность, клетка/см ³
<i>Serratia marcescens</i>	палочка	0,5	1,7	1,34	$7,5 \times 10^{11}$
<i>Klebsiella aerogenes</i>	палочка	0,86	5,4	12,5	$8,0 \times 10^{10}$
<i>Bacillus megaterium</i>	палочка	1,2	7,6	34,4	$2,9 \times 10^{10}$
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	сферическая форма	3,5	-	179	$5,6 \times 10^9$
L-клетки	сферическая форма	10,0	-	4190	$2,4 \times 10^8$

Предположим, что ингибирования нет, популяция остается жизнеспособной, а с помощью диффузии через полунепроницаемую мембрану осуществляется неограниченная доставка питательных элементов. Тогда концентрация биомассы будет ограничена только максимально возможной плотностью упаковки организмов или клеток в биомассе. Это предельное состояние устанавливается в растительных и животных тканях. Максимальная плотность упаковки клеток (число клеток в 1 см³)

составляет около $10^{12}/v$, где v – объект индивидуальной клетки в $\mu\text{м}^3$. В таблице 2 приводятся некоторые максимальные плотности упаковки, вычисленные по этой формуле для различных микроорганизмов. Эта максимально возможная плотность популяции соответствует примерно 10 % сухого веса от общего объема (вес/объем).

3.9 Определение биомассы

Биомасса – это общий термин, используемый для обозначения организмов в культуре. При употреблении других терминов, таких как «организмы, клетки, мицелий, плазмодий», подразумевается определенный тип биомассы. Параметр «биомасса» отражает степень интенсивности роста; он входит в очень важные производные параметры, такие, как экономический коэффициент и метаболический коэффициент. Несмотря на фундаментальную важность биомассы, опубликованные результаты исследований, посвященных культивированию микробов, часто не дают точных сведений о количестве образованной биомассы. Это серьезно ограничивает количественную интерпретацию результатов.

В основе методов для измерения биомассы лежит определение восьми параметров: массы, объема или линейных размеров, массы некоторых компонентов биомассы, массы потребленного субстрата или образованного продукта, скорости метаболизма, светорассеяния, прямой подсчет клеток, результатов окрашивания.

Выбор методов измерения имеет решающее значение для успешного применения того или иного подхода к решению проблем исследования культур. Ограничения, свойственные каждому методу, часто затрудняют этот выбор. На выбор метода измерения влияют следующие факторы:

- 1) свойство биомассы;
- 2) свойство культуральной жидкости;
- 3) требуемая точность;
- 4) требуемая чувствительность;
- 5) скорость измерения.

Свойство биомассы, влияющее на выбор, заключается в том, содержит ли она нити или частицы, легко ли биомасса отделяется от среды, зависит от возраста биомассы и скорость ее роста.

На результаты определения биомассы могут воздействовать такие факторы, как вязкость и цвет культуры, присутствие твердого или растворимого вещества, реагирующего подобно биомассе; присутствие в клетках запасных веществ (гликоген или поли-бетта-оксимасляная кислота). Все методы значительно отличаются друг от друга по своей чувствительности, по необходимым затратам времени и по точности. Сравнение наиболее распространенных методов с точки зрения их чувствительности приведено в таблице 3. Наименее чувствительный метод – определение веса сухой биомассы, наиболее чувствительный – подсчет клеток.

Таблица 3 – Сравнение чувствительности некоторых методов определения бактериальной биомассы

Определяемый параметр	В миллиграммах	
	Минимум веса сухой биомассы бактерий, требуемый для определения с ошибкой меньше 2 %	
Вес биомассы	50	
Белок (по биуретовой реакции)	1	
ДНК	1	
Белок (по реакции Фолина-Чиокальто)	10^{-1}	
Оптическая плотность	10^{-1}	
Подсчет клеток	10^{-5}	

3.9.1 Измерение массы и объема

Прямое определение количества сухой биомассы включает в себя отделение организма от среды, отмывание и высушивание его. Отмывание организмов следует проводить так, чтобы избежать лизиса организмов из-за разрыва, вызванного осмотическим шоком. Это может произойти, если биомасса отмывается водой, особенно в том случае, если организмы взяты из быстро растущей культуры. Для

предотвращения лизиса отмывание биомассы следует проводить в солевом растворе, близком к изотоническому. При расчетах необходимо учитывать вес солей, присутствующих после высушивания. Обычно биомасса сушится в печи при 103-107 °С.

Данный метод пригоден, если помимо биомассы, среда содержит неизвестное количество каких-либо твердых веществ. Иногда следует вносить поправку в вычисленный вес биомассы из-за отсутствия в них запасных веществ, доля которых может составлять до 50 % веса сухой биомассы. Вес биомассы является более четким и ясным параметром биомассы. Главный недостаток этого метода сводится к тому, что для проведения теста требуется большой объем отбираемых проб и много времени.

Если определение биомассы проводят путем прямого взвешивания, опуская этап высушивания, то в результате получаю *вес сырой биомассы*. В сырой биомассе заключена и внутриклеточная и внеклеточная, или интерстициальная, вода. Робертс и другие установили, что объем интерстициальной воды в культуре *Escherichia coli* составляет от 10 % до 25 % полного объема плотно спрессованных клеток и на долю сухой биомассы приходится около 25 % сырой биомассы. Центрифугирование или любой другой метод, использованный для получения уплотненной биомассы, следует тщательно стандартизировать. Метод определения количества сырой биомассы не так точен, как метод определения сухой массы, но он требует меньше времени.

Количество биомассы можно сравнить, измеряя *объемы* клеток, т. к. по плотности биомассы разных микроорганизмов различаются незначительно. Для измерения небольших объемов клеток можно использовать гематокрит. Для определения объемной биомассы (особенно при работе с культурами грибов) для быстрого измерения объема используют мерные центрифужные пробирки. Этот метод удобен в том случае, когда среда содержит другие твердые частицы, плотность которых выше плотности биомассы (например, карбонат кальция). Недостатком данного метода является необходимость стандартизации, как и в случае с методом определения сырой биомассы.

Рост обычных или шаровидных колоний биомассы можно проследить, измеряя их *линейные размеры*.

Для измерения биомассы можно определить количество некоторого компонента клетки (*масса клеточного компонента*), содержание которого относительно всей биомассы постоянно. Для этих целей можно определять клеточный азот, белок и ДНК. Содержание РНК в клетке может служить параметром биомассы лишь в том случае, если скорость роста и температура постоянны.

Содержание *клеточного азота* можно определять с точностью до 1 % методом Кьельдаля. Прямая зависимость между количеством азота и количеством биомассы наблюдается только в ограниченном диапазоне условий. Например, содержание азота в сухом мицелии *Penicillium chrysogenum* может измениться от 10 % в активно растущих организмах до 6 % в мицелии из стационарной фазы.

Для *определения белка* биомассы после его солубилизации в щелочных растворах используются обычно два метода: в основе одного из них лежит биуретовая реакция на пептидные связи, в основе другого – реакция тирозиновых и триптофановых остатков на реактив Фолина-Чиокальто. Перспективен третий метод, основанный на связывании красителя бромсульфалеина основными группами белка. Используемые для определения реактивы обычно стандартизуют по альбумину сыворотки бычьей крови. Результат определения зависит от аминокислотного состава белка, однако этот состав не всегда остается постоянным. Метод Фолина-Чиокальто более чувствителен, чем биуретовая реакция (таблица 3). Однако для определения белка в грибах лучше использовать метод Лоури.

Определение ДНК в биомассе основано на колориметрическом определении дезоксирибозы. Использование этого метода применительно к бактериальной массе описали Мейнелл и Мейнелл, а к тканевым культурам – Пол. Поскольку содержание ДНК в биомассе специфично и постоянно, то определение ДНК могло бы служить удобным методом измерения биомассы. Однако этот метод мало используется, что объясняется его более низкой чувствительностью и большими затратами времени.

3.9.2 Экономические эффекты

Образованное количество биомассы Δx можно определить из количества потребленного субстрата (Δs) или количества образовавшегося продукта (Δp). В идеале должна была бы существовать прямая пропорциональность $\Delta x = Y_{x/s} \times \Delta s$ или $\Delta x = Y_{x/p} \times \Delta p$, где экономические коэффициенты $Y_{x/s}$ и $Y_{x/p}$ постоянны: однако этого может и не быть, если изменяются условия культивирования. Для определения выхода биомассы можно исходить из накопления конечных продуктов энергетического обмена, таких, как молочная кислота и двуокись углерода.

Потребление субстрата можно оценивать по убыли источников углерода, энергии, азота или факторов роста. Часто экономический эффект зависит от скорости роста, однако в хеостате, где скорость роста поддерживается постоянной, это влияние можно исключить.

3.9.3 Скорость метаболических процессов

Количество биомассы (x) можно соотносить со скоростью определенного метаболического процесса. Если q – метаболический коэффициент, а скорость метаболического процесса dy/dt , где e – количество некоторого субстрата или продукта, то $x = (1/q) \times (dy/dt)$. Примерами процессов, которые можно использовать подобным образом, являются восстановление красителя и образование газа.

3.9.4 Метод светорассеяния

Введение в практику измерения количества биомассы бактерий на основе данных о светорассеянии сыграло важную историческую роль: впервые появилась возможность мгновенного измерения биомассы, сослужившая неоценимую службу в объяснении природы роста клеток. Суспензии организмов рассеивают свет и кажутся мутными, если показатель преломления организма отличается от показателя преломления среды. Видимая мутность начинает проявляться, когда

плотность бактерий достигает 10^4 ед/мл. Мутность можно измерять, определяя либо количество света, прошедшего через суспензию (абсорбциометрия), либо количество света, рассеянного суспензией (нефелометрия). Метод светорассеяния применим к суспензиям бактерий, дрожжей, спор и клеток млекопитающих.

На степень мутности суспензии организмов может оказывать влияние целый ряд важных физических и биологических факторов, из которых не все поддаются учету. Соотношение между концентрацией организмов x и длиной светового пути l , а также интенсивность света, падающего l_0 и прошедшего l_t выражается уравнением

$$\log(l_0/l_t) = A \times x \times l. \quad (25)$$

Значение $\log(l_0/l_t)$ называется непрозрачностью, оптической плотностью или экстинкцией. Коэффициент A – величина постоянная при небольших концентрациях бактерий, но при больших начинает увеличиваться вследствие вторичного рассеяния, так как свет наталкивается больше, чем на одну частицу. В нефелометрии l_s – интенсивность рассеянного света, $\log(l_0/l_t) = -B \times x \times l$, где B – константа. Абсорбциометрия используется чаще, чем нефелометрия, из-за большей доступности абсорбциометров.

Степень и направление рассеянного света зависит от размера и формы частицы, длины световой волны и разницы между показателем преломления частиц и среды. Эти влияния были выражены Пауэллом в виде двух законов:

1) общее количество рассеянного света увеличивается с увеличением отношения размера частиц к длине световой волны. С этой точки зрения следует выбирать свет с наиболее низкой длиной волны. На практике обычно используются зеленый свет с длиной волны около 540 нм, так как в случае световых волн с более низкой длиной волны может быть избыточное поглощение света;

2) общее количество рассеянного света тем больше, чем больше различие между показателем преломления u частиц и среды. О влиянии показателя преломления свидетельствует различие в контрасте между колониями разных бактерий и средой на пластинке агара. Стафилококки, например, более контрастны, чем *Escherichia coli*, так как они характеризуются более высоким показателем преломления. Концентрация твердых частиц в среде может значительно влиять на ее

показатель преломления. Гильби и Фью рекомендуют при определении оптической плотности вносить поправку на показатель преломления. Осмотическое набухание бактерий в гипотонической среде может привести к значительному уменьшению оптической плотности, вероятно вследствие уменьшения показателя преломления клеток. Набухание указывает на эластичность клеточных стенок некоторых организмов. Например, у *Escherichia coli* этот эффект наблюдается, а у стафилококков – нет. Чтобы избежать влияния коэффициента показателя преломления и осмотического давления на оптическую плотность, тоничность добавляемой жидкости и клеточной суспензии должна быть одна и та же.

Существует предположение, что оптическая плотность пропорциональна концентрации клеток независимо от их числа. Однако относительно этой точки зрения нельзя сделать каких-либо общих утверждений, хотя это справедливо в некоторых специальных случаях.

Розенбургер и Элсен установили, что отношение оптической плотности к весу сухой биомассы *Streptococcus faecalis* не зависело от удельной скорости роста, которая должна изменять это отношение, поскольку с увеличением скорости роста увеличивается и размер клеток. Было установлено, что в периодической культуре *Klebsiella aerogenes* это отношение падает на 8 % при достижении культурой стационарной фазы. Иногда, прежде чем измерять оптическую плотность, необходимо добавлять в клеточную суспензию токсичные соединения. Для этой цели часто используют раствор формалина (1 %). Обработка формалином предотвращает изменение оптической плотности при изменении токсичности среды. Следовательно, обработка формалином может быть использована для стабилизации оптической плотности.

Предложен метод определения биомассы в эмульсии углеродов, основанный на измерении мутности. Эмульсия нефть-вода делается прозрачной при добавлении пропионовой кислоты.

3.9.5 Подсчет клеток и органелл

Биомассу можно определить двумя путями:

1) подсчетом общего числа индивидуальных организмов с помощью микроскопов или некоторых электронных приборов;

2) подсчетом жизнеспособных колоний, вырастающих из индивидуальных клеток. Недостаток метода подсчета состоит в том, что если число клеток в пробе мало, то ошибка выборки неизбежна. Преимуществом метода является его специфичность и более высокая (по сравнению с другими методами) чувствительность (таблица 3).

Выборки из сосчитанного числа клеток подчиняются закону распределения Пуассона. Если n – число сосчитанных организмов, то стандартное отклонение $\delta = n^{1/3}$ и с вероятностью 95 % границы доверительного интервала лежат в пределах $0 < n < 2\delta$. Это означает, что n должно быть больше 400, если мы хотим иметь 95-ый доверительный интервал и меньше, чем на 10 % среднего значения.

Электронные приборы для счета, такие, как счетчик Коултера, удобны при большом числе измерений и уменьшают ошибку выборки, так как дают возможность просчитать большое число проб. При работе с клетками малых размеров, таких как бактерии, следует соблюдать особые предосторожности, чтобы избавиться от помех, вносимых фоновым шумом.

Наиболее важный метод, основанный на способности индивидуальных организмов к размножению и образованию колоний, которые можно подсчитать, описан Мейнеллом и Мейнелл. Для подсчета живых клеток должны использоваться не минимальные, а богатые среды, поскольку изолированные индивидуальные клетки более требовательны к питанию, среде, чем плотная популяция в целом. С помощью методов элективных сред можно пересчитать организмы разных типов, которые присутствуют в смеси.

Метод подсчетов, основанный на разбавлении и используемый при бактериологическом анализе воды, состоит в учете не проросших разведений после высева суспензии организмов в ряд пробирок со средой. Преимущество данного

метода состоит в том, что он дает возможность определять малые концентрации организмов (< 1 клетка/мл). Однако, поскольку размер пробы мал, то велика ошибка измерения. Вместо метода подсчета с помощью разбавления используется метод фильтрации через мембранные фильтры и выращивание видимых колоний на фильтре.

3.9.6 Методы окрашивания

Наиболее бесспорный метод определения числа живых и мертвых клеток состоит в сравнении числа колоний и общего числа клеток. В некоторых случаях мертвые и живые клетки могут быть дифференцированы с помощью окрашивания красителями. Например, живые дрожжевые клетки непроницаемы для эозина, а мертвые клетки воспринимают эту окраску. Красители, окрашивающие живые клетки, называются витальными красителями.

3.10 Тестовые задания по разделу «Параметры роста»

1 При удовлетворении всех потребностей в течение бесконечно малого промежутка времени dt произойдет увеличение биомассы dx пропорционально количеству биомассы x и интервалу времени

- а) $dx = \mu x \times dt$;
- б) $dx = \mu x \times dx/dt$;
- в) $dx = (\ln x_0 + \mu t) \times dx$;
- г) $dx = \mu x/dt$.

2 Зависимость между удельной скоростью роста и временем удвоения (t_d) биомассы можно получить

- а) $t_d = \ln 2 / \mu$;
- б) $t_d = \ln 2 / \mu$;
- в) $t_d = \ln 3 / \mu$;

г) $t_d = \ln 2 / \mu$.

3 Если биомасса претерпевает n удвоений или генераций, то

а) $n = 3,32 \log(x/x_0)$;

б) $n = 4,42 \log(x/x_0)$;

в) $n = 6,42 \log(x/x_0)$;

г) $n = 6,32 \log(x/x_0)$.

4 Закон постоянно экспоненциального роста выполняется, если

а) условия окружающей среды и состав биомассы непостоянны;

б) условия окружающей среды и состав биомассы остаются постоянными;

в) условия окружающей среды остаются постоянными, а состав биомассы может изменяться;

г) состав биомассы остается постоянным, а условия окружающей среды могут изменяться.

5 Применительно к простейшим закон постоянно экспоненциального роста продемонстрировал

а) Берч;

б) Филпс;

в) Перт;

г) Фишер.

6 Применительно к животным клеткам закон постоянно экспоненциального роста продемонстрировал

а) Берч;

б) Филпс;

в) Перт;

г) Каллоу.

7 Применительно к плесневым грибам закон постоянно экспоненциального роста продемонстрировал

- а) Берч;
- б) Филпс;
- в) Перт;
- г) Каллоу.

8 Экономический коэффициент (или выход биомассы) определяют из уравнения

- а) $\Delta x / \Delta s = Yx$;
- б) $2\Delta x / \Delta s = Y$;
- в) $\Delta x / \Delta s = 4Y$;
- г) $\Delta x / \Delta s = Y$.

9 Какое уравнение используется для определения потребностей в субстрате, особенно в кислороде, при различных скоростях роста?

- а) $ds/dt = \mu x / Y$;
- б) $ds/dt = qx$;
- в) $ds = (\mu x / Y) dt$;
- г) $q = \mu / Y$.

10 Константа насыщения для роста на манните для кишечной палочки

- а) ниже роста на глюкозе;
- б) выше роста на глюкозе;
- в) ниже роста на фосфат-ионе;
- г) выше роста на лактозе.

11 Константа насыщения для роста на ионах магния для *Klebsiella*

- а) ниже роста на ионах калия;
- б) выше роста на сульфатах;

- в) ниже роста на фосфат-ионе;
- г) ниже роста на диоксиде углерода.

12 Наиболее чувствительный метод для определения биомассы – это

- а) подсчет клеток;
- б) определение веса сухой биомассы;
- в) определение веса сырой биомассы;
- г) определение белка.

13 Наименее чувствительный метод для определения биомассы – это

- а) подсчет клеток;
- б) определение веса сухой биомассы;
- в) определение веса сырой биомассы;
- г) определение белка.

14 При определении количества сухой биомассы первым этапом является

- а) отмывание;
- б) отделение организма от среды;
- в) высушивание;
- г) лизис.

15 При определении количества сухой биомассы вторым этапом является

- а) отмывание;
- б) отделение организма от среды;
- в) высушивание;
- г) лизис.

16 При определении количества сухой биомассы третьим этапом является

- а) отмывание;
- б) отделение организма от среды;

- в) высушивание;
- г) лизис.

17 Чаще всего сушка биомассы происходит при температуре

- а) 50-60 °С;
- б) 103-107 °С;
- в) 130-170 °С;
- г) 203-207 °С.

18 Вес сырой биомассы помимо веса сухой биомассы включает

- а) вес питательной среды;
- б) вес продуктов распада;
- в) вес внутриклеточной воды;
- г) вес внеклеточной воды.

19 Объем интерстициальной воды, например, в культуре *Escherichia coli* составляет примерно

- а) 10-25 %;
- б) 25-35 %;
- в) 34-45 %;
- г) 45-55 %.

20 Гематокрит можно использовать для измерения

- а) любых размеров клеток;
- б) небольших размеров клеток;
- в) больших размеров клеток;
- г) для измерения размеров клеток не подходит.

21 Содержание азота в клетке можно определять с точностью до

- а) 0,5 %;
- б) 1 %;
- в) 1,5 %;
- г) 5 %.

22 Определение ДНК колориметрическим методом применительно к бактериальной массе описал

- а) Мейнелл;
- б) Пол;
- в) Лоури;
- г) Кьельдаль.

23 Определение ДНК колориметрическим методом применительно к тканевым культурам описал

- а) Мейнелл;
- б) Пол;
- в) Лоури;
- г) Кьельдаль.

24 Значение $\log(I_0/I_t)$ называется

- а) прозрачностью;
- б) мутностью;
- в) непрозрачностью;
- г) рассеянностью.

4 Субстраты для культивирования биообъектов

4.1 Принципы составления питательных сред

Все живые клетки нуждаются в экзогенных источниках питания, содержащихся в питательных средах. Питательная среда обеспечивает жизнедеятельность, рост и развитие биообъектов.

Прежде чем начинать работы по культивированию разных типов клеток, необходимо точно знать их питательные потребности и зависимости.

Постоянным компонентом питательных сред является вода, в которой нуждаются все живые клетки. Питательные вещества образуют в воде истинные (минеральные соли, сахара, аминокислоты, карбоновые кислоты, спирты, альдегиды) или коллоидные (белки, липиды, неорганические соединения) растворы. Некоторые компоненты питательных сред, находящиеся в твердом агрегатном состоянии, могут либо образовывать придонный осадок, либо равномерно распределяться по всему объему в виде взвеси, либо плавать на поверхности раствора (частицы угля). Жидкие углеводороды при внесении в воду образуют несмешивающуюся фракцию.

В питательной среде должны присутствовать все элементы, необходимые для построения компонентов живых клеток в доступной для усвоения форме. В больших количествах клеткам необходимы макроэлементы: углерод, азот, кислород, водород, фосфор, сера, калий, кальций, магний. Снабжение клеток кислородом и водородом осуществляется за счет воды. Углерод является составной частью всех органических соединений и его источники многочисленны и многообразны: чаще всего сахара, многоатомные спирты и органические кислоты. В качестве азотистого субстрата для изготовления питательных сред служат в основном белки животного и растительного происхождения.

Помимо макроэлементов, клетки в незначительных количествах нуждаются также и в некоторых микроэлементах: натрий, марганец, никель, кобальт, хлор, цинк, медь, кремний, молибден, бор, ванадий и некоторые другие.

При этом, спектр потребляемых органических веществ у некоторых микроорганизмов очень широк (например, у *Pseudomonas*, *Actinomyces*), у других – достаточно узок (например, у облигатных метилотрофов). В то же время имеются микроорганизмы, способные использовать сложные неприродные соединения типа пластиков, красителей, пестицидов.

Микроорганизмам необходимо разное количество питательного субстрата в среде обитания для их роста и развития. Так, олиготрофные микроорганизмы растут только при низких концентрациях питательных веществ (от долей до 100 мг/л), а обычные концентрации (от 1 до 100 г/л) лимитируют их рост. При этих концентрациях растут микроорганизмы – копиотрофы. Истинно олиготрофными считаются организмы, эволюционно приспособленные к эксплуатации экониш с постоянно низкими потоками вещества и энергии. Такой рост обеспечивается высокоэффективными транспортными системами и экономным расходованием полученного вещества и энергии.

К особенностям метаболизма олиготрофов относят:

- 1) аэробность;
- 2) высокое соотношение поверхности к объему;
- 3) образование различных выростов;
- 4) малые размеры;
- 5) отсутствие покоящихся стадий;
- 6) высокое сродство к субстрату;
- 7) транспортные системы с широкой субстратной специфичностью, одновременное поглощение всех доступных субстратов;
- 8) способность к накоплению резервных веществ;
- 9) высокая гибкость катаболизма;
- 10) низкие скорости роста в оптимальных условиях;
- 11) регуляция анаболизма скоростью поглощения веществ;
- 12) низкие скорости эндогенного метаболизма.

По способности использовать биологические полимеры, часто нерастворимые в воде, микроорганизмы подразделяются на функциональные группы гидролитиков

и диссипотрофов. Первые обладают мощными литическими ферментами, разрушающими высокомолекулярные соединения, и обеспечивают субстратами себя и микроорганизмы, не имеющие гидролаз, а также способствуют возвращению элементов в глобальные циклы. Диссипотрофы (микрофлора рассеяния) не имеют экзогидролаз и потребляют те вещества, которые по различным причинам остались неиспользованными гидролитиками и имеются в незначительных количествах.

У некоторых микроорганизмов потребности в питании так сложны, что они растут только внутри живого организма (например, внутриклеточные паразиты риккетсии и хламидии).

До сих пор предполагалось, что микроорганизмы способны сами синтезировать все необходимые для роста органические вещества. На самом же деле существуют С-автотрофные бактерии, получающие углерод для синтеза клеточных компонентов клеток исключительно из CO_2 (например, *Alcaligenes eutrophus* и *Nitrobacter winogradskyi*), и С-гетеротрофы, растущие на средах с такими простыми источниками углерода, как глюкоза (например, *Escherichia coli*, *Bacillus megenterium* и *Clostridium pasterianum*). Однако многие бактерии лишены способности синтезировать все органические соединения, необходимые для роста, и зависят от наличия в среде определенных факторов роста.

Факторы роста – необходимые для жизнедеятельности бактериальной клетки органические вещества, которые она не способна синтезировать самостоятельно и должна получать в готовом виде. На существование факторов роста впервые обратил внимание Л. Пастер.

Факторы роста – соединения различной химической природы; большинство из них относится к водорастворимым витаминам группы В; функции факторов роста несут также гемин, холин, пуриновые и пиримидиновые основания и многие аминокислоты. Отсутствие их в среде приводит к бактериостатическому эффекту – бактериостазу, который в ряде случаев сопровождается цитологическими изменениями. Факторы роста не служат для микробной клетки пластическими или энергетическими материалами и используются бактериями в ничтожных количествах в неизмененном виде. Некоторые факторы в качестве активных групп

(коферментов) входят в структуру различных клеточных энзимов. К важнейшим факторам роста относятся: тиамин (витамин В₁) – составная часть некоторых коферментов, играющих важную роль в углеводном обмене; рибофлавин (витамин В₂) – участвует в окислительно-восстановительных процессах; пантотеновая кислота – участвует в построении ферментных систем бактериальной клетки, в частности кофермента А; пиридоксин (витамин В₆) – производные этого фактора роста играют важную роль в обмене аминокислот; витамин В₁₂ – входит в состав активной группы ферментов, участвующих в реакциях синтеза нуклеотидов; фолиевая кислота – в виде одного из своих производных входит в состав ферментов, катализирующих процессы синтеза пуриновых и пиримидиновых оснований, а также некоторых аминокислот; биотин – участвует в азотистом обмене, а также катализирует синтез ненасыщенных жирных кислот; никотиновая кислота (витамин РР) и ее амид – участвуют в синтезе коферментов; парааминобензойная кислота – компонент фолиевой кислоты, по-видимому, выполняет и самостоятельные функции в обмене веществ; гемин – входит в состав некоторых ферментов, участвующих в реакциях окисления; холин – участвует в синтезе клеточных липидов, а также является донатором метильной группы в различных биосинтетических реакциях; пуриновые и пиримидиновые основания (аденин, гуанин, ксантин, гипоксантин, цитозин, тимин и урацил) – необходимы, главным образом, в качестве компонентов нуклеиновых кислот; аминокислоты – служат компонентами клеточных белков; некоторые из них выполняют и биокаталитические функции.

Факторы роста необходимы всем микроорганизмам, однако многие (прототрофы) синтезируют их сами, другие (ауксотрофы) не способны к синтезу одного или нескольких факторов, и для обеспечения их роста недостающее соединение должно быть внесено питательную среду.

В генетике штамм называется ауксотрофным, если он несет мутацию, которая делает его неспособным к синтезу одного или нескольких существенных соединений. Например, мутант дрожжей, в котором инактивированный ген в цепочке синтеза урацила – урациловый ауксотроф. Такой штамм не в состоянии

синтезировать урацил и может расти только если урацил будет добавлен в окружающую среду. Это противоположность урациловому прототрофу или, в данном случае, дикому типу штамма, который может расти в отсутствие урацила. Ауксотрофия часто используется в генетических маркерах.

Исследователи использовали ауксотрофный штамм *E. coli* для введения искусственных аналогов аминокислот внутрь белков. Например, клетки ауксотрофного фенилаланинового образца могут быть выращенными на среде с его аналогом, например, пара-азидофенилаланином. Аминоацил-тРНК-синтетаза распознает аналог и катализирует скрепления с тРНК, которая впоследствии перемещает аминокислоту (не природную в данном случае) в полипептидную цепочку, растущую в течение трансляции белка.

Прототрофные микроорганизмы не требуют, в отличие от ауксотрофов, для своего развития готовых витаминов, аминокислот или других факторов роста, а синтезируют их из минеральных или органических соединений. Один и тот же микроорганизм может быть прототрофным по одному фактору роста, но ауксотрофным по другому. Термин «прототрофы» предложен немецким учёным А. Фишером и сначала использовался как синоним автотрофных организмов для характеристики бактерий, не нуждающихся в органических веществах и растущих на минеральных средах. К прототрофам относятся большинство бактерий, для которых источником углерода является сахар, дрожжи, а также зеленые растения, которые используют двуокись углерода.

Потребность бактерий в различных факторах роста разнообразна: у большинства сапрофитов она сводится к минимуму, тогда как патогенные микробы (возбудители бруцеллеза, дифтерии, туляремии и др.) могут расти только на синтетических средах, содержащих многие аминокислоты и другие вещества.

Эти факторы роста можно объединить в три группы: витамины и родственные соединения, требующиеся в малых количествах; аминокислоты; пурины и пиримидины.

Количество и природа факторов роста, которые должны присутствовать в инкубационной среде, различны для разных микроорганизмов. Для роста

молочнокислых бактерий требуется практически все аминокислоты, пурины, пиримидины и витамины. Способность к процессам биосинтеза у этих микроорганизмов довольно ограничена.

Общим свойством всех микроорганизмов является потребность в витаминах и родственных соединениях. Некоторые из этих соединений, а также их функции в обмене веществ приведены в таблице 4.

Таблица 4 – Витамины и близкие к ним соединения и соответствующие функции в метаболизме

Соединение	Функция метаболизма
п-Аминобензойная кислота	Предшественник тетрагидрофолиевой кислоты, кофермент, участвующий в переносе одноуглеродных единиц
Биотин	Простетическая группа ферментов, катализирующих реакции карбоксилирования
Кофермент М	Кофермент, участвующий в образовании метана
Фолиевая кислота	Тетрагидрофолиевая кислота является коферментом, участвующим в переносе одноуглеродных единиц
Гемин	Предшественник цитохромов
Липоевая кислота (дитиооктановая кислота)	Простетическая группа пируватдегидрогеназного комплекса
Никотиновая кислота	Предшественник NAD и NADP, являющихся коферментами многих дегидрогеназ
Пантатеновая кислота	Предшественник кофермента А и простетическая группа ацилпереносящих белков
Пиридоксин (витамин В ₆)	Пиридоксальфосфат служит коферментом трансаминаз и декарбоксилаз аминокислот
Рибофлавин (витамин В ₂)	Предшественник флавиномононуклеотида (FMN) и флавинаденина (FAD), являющихся простетическими группами флавопротеидов
Тиамин (витамин В ₁)	Тиаминпирофосфат служит простетической группой декарбоксилаз, трансальдолаз и транскетолаз
Витамин В ₁₂ (цианокобаламин)	Кофермент В ₁₂ участвует в реакциях перегруппировок (например, глутаматмутаза)
Витамин К	Предшественник менахинона, функционирующего как переносчик электронов (например, в фумаратредуктазе)

Потребность в факторах роста точно установлена не для всех микроорганизмов. Поэтому микробиологи часто добавляют в среду дрожжевой

экстракт и пептон в качестве полноценных и дешевых источников таких факторов. При использовании специальных синтетических сред (то есть сред известного состава) удалось установить потребность в факторах роста у ряда микроорганизмов. Так, *Clostridium kluveri* растет на среде, содержащей биотин и п-аминобензойную кислоту. В среды для многих фототрофных бактерий добавляют раствор витаминов, содержащий никотиновую кислоту, тиамин, п-аминобензойную кислоту, биотин и витамин В₁₂. Некоторые микроорганизмы характеризуются особыми потребностями. Так, у видов *Haemophilus* среда должна содержать гемин для биосинтеза цитохромов, а также NAD. Гемин требуется представителям рода *Bacteroides*. *Methanobacterium ruminantum* растет только в присутствии кофермента М (2-меркаптоэтансульфоновой кислоты) и 2-метил-п-масляной кислоты. Эти несколько примеров свидетельствуют о том, что у микроорганизмов могут быть нарушены процессы биосинтеза различных соединений и что многие из них нуждаются в определенных факторах роста.

Пусковые факторы роста выделяют в особую категорию. Они имеют существенное значение для начала роста культуры. Позднее клетки культуры синтезируют все необходимые для их роста продукты самостоятельно. В качестве примера можно привести необходимость следовых количеств гистидина для роста ревертантов *Salmonella his-* и их обратной мутации в *his+* (гистидин-положительные). Хотя прототрофы *his+* не нуждаются в факторах роста, деление исходного ауксотрофа *his-*, необходимое для закрепления обратной мутации, может протекать только в присутствии гистидина.

Основной источник энергии на Земле – это солнечный свет; среди прокариот его способны использовать фототрофные бактерии, цианобактерии и некоторые археи. К фототрофным организмам относятся представители двух больших групп: анаэробные фототрофные бактерии, не выделяющие молекулярного кислорода, и аэробные фототрофные цианобактерии, водоросли и зеленые растения, которые на свету выделяют кислород.

В настоящее время фототрофные бактерии широко используют для исследования фотосинтеза в различных аспектах, особенно начальных стадий,

поскольку они удобны для изучения этого сложного вопроса. Кроме того, пурпурные и зеленые бактерии интересны для выяснения организации фотосинтезирующего аппарата, путей биосинтеза пигментов, метаболизма углерода, эволюции фотосинтеза и фотосинтезирующих форм. Привлекают они к себе внимание и в связи с другими биологическими проблемами, в частности фиксацией молекулярного азота, а также круговоротом углерода и серы в природе. Сделаны первые шаги для практического использования фототрофных бактерий при очистке сточных вод и для получения дешевого корма. Фотоавтотрофы наиболее распространены в пресных и соленых водоемах, и включают микроводоросли, цианобактерии и фотосинтезирующие бактерии. Благодаря пигментам, похожим на хлорофиллы растений, они имеют красный или сине-зеленый цвет. Поэтому эти бактерии получили названия «пурпурные бактерии» и «сине-зеленые бактерии».

Особенно часто фотоавтотрофы встречаются в водных объектах, содержащих сероводород. В почве фототрофных бактерий мало, но во влажных почвах они могут расти весьма интенсивно. Фототрофные бактерии легко обнаруживаются благодаря способности образовывать ярко окрашенные пленки, а также обрастать подводные предметы. Такие макроскопические скопления наблюдаются в серных источниках, лиманах, бухтах, озерах и прудах. Иногда в результате массового развития фототрофных бактерий меняется даже цвет всей воды в водоеме или отдельные ее слои становятся окрашенными. Такое явление можно наблюдать, например, в Черном море. Это характерно для озер и морей, содержащих в придонных слоях сероводород.

Пурпурные серобактерии нередко образуют налеты, окрашенные во всевозможные оттенки красного цвета, от нежно-розового до темно-красного, на поверхности ила или на каком-нибудь разлагающемся растительном материале. Иногда они роятся над поверхностью ила, образуя слой толщиной около дециметра.

Такое «цветение» воды в мелких водоемах вызывают в первую очередь крупные представители пурпурных бактерий – *Chromatium okenii*, *C. warmingii*, *C. weissii* и *Thiospirillum jenense*, однако встречаются и мелкие представители *Chromatiaceae* и *Chlorobiaceae*.

Микроорганизмы, не использующие свет, получают энергию для роста путем окисления или сбраживания химических веществ (хемотрофы). К хемолитоавтотрофам относят представителей родов *Nitrosospina*, *Nitrosococcus*, *Thiobacillus* и других. Выделяют также хемоорганогетеротрофы, использующие органические соединения и как источники углерода, и как доноры электронов (восстановители). Для окисления, как правило, необходим O_2 в качестве акцептора электронов, но многие бактерии способны к анаэробному дыханию. Таким образом, для роста бактерий, осуществляющих дыхание, необходимо присутствие в среде кислорода или другого окислителя.

У прокариот с хемотрофным типом энергетического метаболизма одно и то же соединение служит донором электронов, большая часть которых перемещается в соответствии с термодинамическим градиентом, что приводит к выделению свободной энергии, а меньшая – используется для образования восстановителя, потребляемого в конструктивном метаболизме. Это положение справедливо в отношении прокариот с энергетикой бродильного и дыхательного типов, при использовании в качестве энергетических ресурсов органических и неорганических соединений. У фототрофов использование света в качестве источника энергии требует дополнительного подключения химических соединений, служащих донорами электронов для образования восстановителя. Это связано со спецификой света как энергетического ресурса для живых систем.

В качестве доноров электронов для дыхания и биосинтеза литотрофные микроорганизмы используют неорганические соединения (H_2 , NH_3 , H_2S , S , CO , Fe^{2+} и др.), органотрофные микроорганизмы – органические вещества.

В конструктивном метаболизме основная роль принадлежит углероду, поскольку все соединения, из которых построены живые организмы, – это соединения углерода. Их известно около миллиона. Прокариоты способны воздействовать на любое известное углеродное соединения, т. е. использовать его в своем метаболизме. По потребности в углероде бактерии делятся на две большие группы: автотрофы и гетеротрофы. Впервые понятия «автотрофия» и «гетеротрофия» были введены для противопоставления растительного и животного

образа жизни. Позднее их распространили на все другие организмы, в том числе прокариотные. Термин «автотрофия» означает питающийся самостоятельно, а «гетеротрофия» – питающийся другими, от греческих слов *autos* – сам, *heteros* – другой, *trophe* – пища.

Понятия «авто-» и «гетеротрофия» характеризуют, таким образом, тип конструктивного метаболизма. Если автотрофия – довольно четкое и узкое понятие, то гетеротрофия – понятие весьма широкое и объединяет организмы, резко различающиеся своими потребностями в питательных веществах.

Наибольшая степень гетеротрофности присуща прокариотам, относящимся к облигатным внутриклеточным паразитам, т. е. организмам, которые могут жить только внутри других живых клеток. Паразитический образ жизни привел к редукции некоторых метаболических путей у этих прокариот, что и обусловило полную их зависимость от метаболизма клетки хозяина.

Другие паразитические прокариотные организмы удается выращивать на искусственных средах, но состав таких сред необычайно сложен. Они содержат, как правило, белки и продукты их неглубокого гидролиза (пептиды), полный набор витаминов, фрагменты нуклеиновых кислот и т. д. Для приготовления питательных сред такого состава используют мясные гидролизаты, цельную кровь или ее сыворотку. Формы, способные расти при создании подходящих условий вне клетки хозяина, называют факультативными паразитами.

Следующую крупную группу прокариот составляют так называемые сапрофиты – гетеротрофные организмы, которые непосредственно от других организмов не зависят, но нуждаются в готовых органических соединениях (термин «сапрофиты» происходит от греческих слов *sapros* – гнилой и *phyton* – растение). Они используют продукты жизнедеятельности других организмов или разлагающиеся растительные и животные ткани. К сапрофитам относится большая часть бактерий. Степень требовательности к субстрату у сапрофитов различна. В эту группу входят организмы, которые могут расти только на достаточно сложных субстратах (молоко, трупы животных, гниющие остатки растительного происхождения), т. е. им нужны в качестве обязательных элементов питания

углеводы, органические формы азота в виде набора аминокислот, пептидов, белков, все или часть витаминов, нуклеотиды или готовые компоненты, необходимые для синтеза последних (азотистые основания, пятиуглеродные сахара). Чтобы удовлетворить потребность этих гетеротрофов в элементах питания, их обычно культивируют на средах, содержащих мясные гидролизаты, автолизаты дрожжей, растительные экстракты, молочную сыворотку.

Есть прокариоты, требующие для роста весьма ограниченное число готовых органических соединений в основном из числа витаминов и аминокислот, которые они не в состоянии синтезировать сами, и, наконец, гетеротрофы, нуждающиеся только в одном органическом источнике углерода. Им может быть какой-либо сахар, спирт, кислота или другое углеродсодержащее соединение. Описаны бактерии рода *Pseudomonas*, способные использовать в качестве единственного источника энергии и углерода любое из 200 различных органических соединений, и бактерии, для которых источником углерода и энергии может служить узкий круг довольно экзотических органических веществ. Например, *Bacillus fastidiosus* может использовать только мочевую кислоту и продукты ее деградации, а некоторые представители рода *Clostridium* растут только в среде, содержащей пурины. Использовать другие органические субстраты для роста они не могут. Биосинтетические способности этих организмов развиты в такой степени, что они сами могут синтезировать все необходимые им углеродные соединения.

Таким образом, бактерии-автотрофы способны получать энергию путем окисления неорганических соединений, они, как правило, используют CO_2 как основной источник, содержащий углерод в наиболее окисленной форме. Поэтому при культивировании автотрофов необходимо обеспечить клетки углекислотой, так как концентрация CO_2 в воздухе не превышает 0,03 %, и ее поступление в среду за счет диффузии недостаточно для роста микроорганизмов. В питательные среды для культивирования автотрофов вносят карбонат кальция (CaCO_3) или бикарбонат натрия (NaHCO_3). Иногда через питательную среду продувают воздух, обогащенный 1-5 % CO_2 . Бактерии-гетеротрофы получают углерод из органических соединений. В зависимости от индивидуальных особенностей микроорганизмов источником

углерода могут быть разные органические соединения – спирты, углеводы, ароматические соединения, органические кислоты.

Как можно видеть из вышеизложенного, в мире прокариот не существует резкой границы между авто- и гетеротрофными организмами, также как ее нет в ряду одноуглеродных соединений (CO_2 , CO , HCOOH , HCOH , CH_3OH , CH_4), каждое из которых может служить источником углерода для определенной группы прокариот. Однако использование термина «автотрофия» удобно для обозначения конкретного типа конструктивного метаболизма, поскольку в процессе эволюции он оказался специфически связанным с определенными видами энергетических процессов, что привело к проявлению у прокариот таких форм жизни, которые отсутствуют у более высокоорганизованных форм.

4.2 Типы питания микроорганизмов

В соответствии с принятой сейчас классификацией микроорганизмы по типу питания разделяют на ряд групп в зависимости от источников энергии и источника углерода.

Следовательно, по способу получения энергии и углерода микроорганизмы могут быть разделены на фотоавтотрофов, фотогетеротрофов, хемоавтотрофов и хемогетеротрофов. Каждая из этих групп микроорганизмов, в свою очередь, подразделяется в зависимости от природы окисляемого субстрата, называемого донором электронов ($-H$ -донором), используемого в обмене веществ, на органотрофы, потребляющие как энергетический источник органические вещества, и литотрофы (от греч. литос – камень), получающие энергию за счет окисления неорганических веществ. Поэтому в зависимости от используемого микроорганизмами источника энергии и донора электронов следует различать фотоорганотрофы, фотолитотрофы, хемоорганотрофы и хемолитотрофы.

Таким образом, выделяют восемь возможных типов питания указанных в таблице 5.

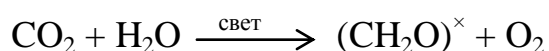
Таблица 5 – Классификации микроорганизмов по типам питания

Источник энергии	Окисляемый субстрат	Источник углерода	
		Органические соединения	Углекислота
Свет	органические соединения	фотоорганогетеротрофия	фотоорганоавтотрофия
	неорганические соединения	фотолитогетеротрофия	фотолитоавтотрофия
Органические соединения	органические соединения	хемоорганогетеротрофия	хемоорганоавтотрофия
Неорганические соединения	неорганические соединения	хемолитогетеротрофия	хемолитоавтотрофия

Всем способам питания соответствуют реально существующие прокариотные организмы. Однако число видов, относящихся к группам, характеризующимся разными способами питания, далеко не одинаково. Далее поговорим о наиболее распространенных типах питания с кратким перечнем микроорганизмов их осуществляющих.

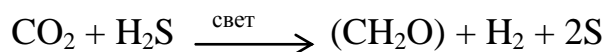
Фотолитоавтотрофия – тип питания, характерный для микроорганизмов, использующих энергию света для синтеза веществ клетки из CO_2 и неорганических соединений (H_2O , H_2S , S), то есть осуществляющих фотосинтез. К данной группе относятся цианобактерии, пурпурные серные бактерии и зеленые серные бактерии.

Цианобактерии, так же как зеленые растения, восстанавливают CO_2 до органического вещества фотохимическим путем с помощью водорода воды, то есть осуществляют реакцию:



Пурпурные серные бактерии (сем. *Chromatiaceae*) содержат бактериохлорофиллы а и b, обуславливающие способность их к фотосинтезу, и различные каротиноидные пигменты.

Пурпурные серные бактерии для восстановления CO_2 в органическое вещество используют водород, входящий в состав H_2S . При этом в их цитоплазме накапливается сера в виде гранул, которая затем окисляется до серной кислоты, то есть протекают следующие реакции:



Пурпурные серные бактерии в большинстве случаев являются облигатными анаэробами.

Зеленые серные бактерии (сем. *Chlorobiaceae*) содержат зеленые бактериохлорофиллы с и d, в небольшом количестве бактериохлорофилл а, а также различные каротиноиды. Как и пурпурные серные бактерии, они являются строгими анаэробами и способны окислять в процессе фотосинтеза сероводород, сульфиды и сульфиты, накапливая серу, которая в большинстве случаев окисляется до SO_2 .

Фотоорганогетеротрофия – тип питания, характерный для микроорганизмов, которые для получения энергии, помимо фотосинтеза, могут использовать еще и простые органические соединения. К этой группе относятся пурпурные несерные бактерии.

Пурпурные несерные бактерии (сем. *Rhodospirillaceae*) содержат бактериохлорофиллы а и b, а также различные каротиноиды. Они не способны окислять сероводород (H_2S), накапливать серу и выделять ее во внешнюю среду.

Хемолитоавтотрофия – тип питания, характерный для микроорганизмов, получающих энергию при окислении неорганических соединений, таких как H_2 , NH_4^+ , NO_2^- , Fe^{2+} , H_2S , S^0 , SO_3^{2-} , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, CO и др. Этот процесс называется хемосинтезом. Углерод для синтеза всех компонентов клеток хемолитоавтотрофы получают из углекислоты.

Хемолитоавтотрофные микроорганизмы являются важнейшим звеном биогеохимических циклов углерода и других биогенных элементов. Способность хемолитоавтотрофов осуществлять первичную продукцию органического вещества обуславливает существование автономных микробных сообществ, вероятно сыгравших существенную роль в формировании ранней биосферы Земли. Хемолитоавтотрофные серобактерии обнаружены на глубине 2600-6000 м в местах, где на поверхность дна океана из недр земной коры выходят горячие источники.

Явление хемосинтеза у микроорганизмов (железобактерий и нитрифицирующих бактерий) было открыто в 1887-1890 гг. известным русским микробиологом С. Н. Виноградским.

Хемолитоавтотрофия осуществляется нитрифицирующими бактериями (окисляющими аммиак или нитриты), серными бактериями (окисляющими сероводород, элементарную серу и некоторые простые неорганические соединения серы), бактериями, окисляющими водород до воды, железобактериями, способными окислять соединения двухвалентного железа, и т. д.

Хемоорганогетеротрофия – тип питания, характерный для микроорганизмов, получающих необходимую энергию и углерод из органических соединений. Сюда относятся многие аэробные и анаэробные микроорганизмы, обитающие в почвах и других субстратах.

К хемоорганогетеротрофам относятся представители родов *Azotobacter*, *Salmonella*, *Yersinia*, а также некоторые другие редуценты и паразитические микроорганизмы. Хемоорганогетеротрофный тип метаболизма характерен также для царств животных и грибов. Нитрифицирующие бактерии, встречающиеся в жирной почве, навозе, окисляют аммоний до нитрита, а нитрит – до нитрата. Они завершают распад органических азотистых веществ, возвращая азот в соединения, усваиваемые растениями. В то же время удаляется аммиак – неизбежный продукт разложения белков. Тионовые бактерии, широко распространённые в почвах, окисляют серу до сульфатов, делая её доступной для растений, которые не могут усваивать элементарную серу. За счет освобождающейся энергии ассимилируется углерод из угольной кислоты. Образуемая ими серная кислота подкисляет почву, способствуя переводу некоторых важных для растений элементов в доступную форму. Водородные бактерии, присутствующие в разных почвах и во многих водоёмах, способны расти за счёт окисления водорода в аэробных условиях. К ним относятся представители более 30 систематических групп. В последнее время активно используются в биотехнологии для получения кормового белка, ряда полисахаридов и некоторых аминокислот. К хемосинтезирующим бактериям относятся также железобактерии.

Хемоорганогетеротрофы существенно различаются по степени требовательности к субстрату. Среди них есть свободноживущие формы, основное место обитания которых – пресные и соленые озера, среда с высоким содержанием H_2S ; комменсалисты, обитающие в желудочно-кишечном тракте пресноводных и морских моллюсков, и паразиты. Некоторые виды патогенны: *Treponema pallidum* – возбудитель сифилиса, *Borrelia recurrentis* – возбудитель возвратного тифа. Среди хемоорганогетеротрофов выделяют сапрофитов, живущих за счет мертвых органических материалов, и паразитов, растущих и развивающихся в тканях живых организмов. В последнем случае имеются в виду паратрофия и паратрофы, облигатные внутриклеточные паразиты, которые вне клетки хозяина не растут (риккетсии и др.).

Считают, что из известных типов питания наиболее широко распространены в живом мире два типа – фотолитоавтотрофия и хемоорганогетеротрофия. Первый тип питания характерен для высших растений, водорослей и ряда бактерий, второй – для животных, грибов и многих микроорганизмов. Остальные типы питания присущи некоторым группам бактерий, живущим в особых, специфических условиях среды.

Для многих микроорганизмов установлена способность переходить с одного типа питания на другой. Например, водородокисляющие бактерии в соответствующих условиях (при наличии O_2 , на средах с углеводами или органическими кислотами) способны переключаться с хемолитоавтотрофии на хемоорганогетеротрофию. Поэтому их называют факультативными хемолитоавтотрофами. Микроорганизмы, которые не могут расти в отсутствие специфических неорганических доноров электронов (например, нитрифицирующие и некоторые другие бактерии), называются облигатными хемолитоавтотрофами.

У микроорганизмов отмечена и так называемая *миксотрофия*. Это такой тип питания, когда микроорганизм – миксотроф – одновременно использует свои различные возможности, например, сразу окисляя органические и минеральные соединения, или источником углерода для него одновременно может служить углекислота и органическое вещество и т. д.

Примером организма с миксотрофным получением углерода и энергии является бактерия *Paracoccus pantotrophus* из семейства *Rhodobacteraceae* – хемоорганогетеротроф, также способная существовать по хемолитоавтотрофному типу. В случае *P. pantotrophus* серосодержащие соединения выступают в качестве доноров электронов. Органогетеротрофный метаболизм может протекать как в аэробных, так и в анаэробных условиях.

В природе широко распространены микроорганизмы, использующие для роста в качестве источников энергии и углерода одноуглеродные соединения (метан, метанол, формиат, метиламин и др.). Эти микроорганизмы называют метилотрофами, а тип питания – *метилотрофией*.

Метилотрофы, или метилобактерии – аэробные или анаэробные бактерии, использующие в качестве источников углерода и энергии окисленные или замещённые производные метана, не имеющие С-С связи (около 50 соединений), но неспособные расти на самом метане. Ростовыми субстратами для метилобактерий служат метанол, метиламин, диметиламин, триметиламин, галометаны (хлорметан и дихлорметан), серосодержащие соединения – метансульфоновая кислота, диметилсульфид и многие другие. Некоторые из этих соединений, например, триметиламин – $(\text{CH}_3)_3\text{N}$, содержат более одного атома углерода, но не имеют С-С связи. Метилобактерии, в отличие от метанотрофов, не имеют сложной системы внутрицитоплазматических мембран (ВЦМ). По типу питания различают три группы метилобактерий: облигатные – растут только на C_1 -соединениях; ограниченно-факультативные – используют наряду с C_1 -субстратами одно или несколько полиуглеродных (C_n) соединений; факультативные – используют, кроме C_1 -соединений, широкий спектр C_n -соединений.

Также существуют *метазотрофы*. Это микроорганизмы, способные только окислять, либо ассимилировать, но не расти на C_1 -соединениях, то есть не могут использовать их одновременно как источник углерода и энергии.

В последние годы установлено, что аэробные метилобактерии повсеместно распространены в природе и вносят жизненно важный вклад в биосферные циклы углерода, азота, фосфора и других биогенных макро- и микроэлементов. Наряду с

метанотрофами, метиловобактерии являются важнейшим звеном в цепи метаболических превращений летучих C_1 -соединений, также своеобразным биофильтром на их пути в тропосферу, уменьшающим опасную вероятность истощения озонового слоя Земли. В связи с тем, что растения являются глобальными продуцентами метанола на Земле, метиловобактерии часто ассоциированы с растениями, влияя на их рост и развитие. Доступность метанола как возобновляемого субстрата и успехи в расшифровке биохимической и генетической структуры уникальных путей C_1 -метаболизма у метиловобактерий создали научную основу для промышленной реализации их биотехнологического потенциала.

4.3 Потребность микроорганизмов в химических элементах

Основную часть микробной клетки составляет вода (80-90 % общей массы клетки). В состав клеток микроорганизмов входят следующие элементы (в % от массы сухого вещества): углерод – 50, кислород – 20, азот–14, водород – 8, фосфор – 3, сера – 1, калий – 1, натрий – 1, кальций – 0,5, магний – 0,5, хлор – 0,5, железо – 0,2, другие элементы – 0,3. Как видно, некоторые элементы – углерод, кислород и азот – находятся в клетках в больших количествах. Значительно беднее представлены сера и фосфор. Еще меньше содержится калия, натрия, кальция, магния, железа и хлора. В виде следов в состав клетки входят микроэлементы (цинк, медь, кобальт, стронций, марганец и др.) (таблица 6).

Только небольшое число элементов периодической системы требуется микроорганизмам в относительно высоких концентрациях. Это десять главных биологических элементов, которые наряду с некоторыми из выполняемых ими функций приведены в таблице 6. Углерод, кислород, водород и азот – основные компоненты органических соединений, содержащихся в тканях различных организмов. Сера требуется для синтеза аминокислот цистеина и метионина и некоторых коферментов. Фосфор входит в состав нуклеиновых кислот, фосфолипидов, тейхоевых кислот и таких нуклеотидов, как ATP, GTP, NAD и FAD.

Остальные четыре главных биоэлемента – это ионы металлов, используемые в качестве кофакторов ферментов, а также в качестве компонентов металлокомплексов. Так, например, большинство биоактивных фосфорных эфиров находится в клетках в виде комплексов с магнием. Фосфолипиды клеточной стенки бактерий также образуют хелатные комплексы с ионами магния.

Таблица 6 – Главные биоэлементы, их источники и некоторые из выполняемых ими функций у микроорганизмов

Элемент	Источник	Функция в метаболизме
Углерод	Органические соединения, CO ₂	Основные компоненты клеточного материала клетки
Кислород	O ₂ , H ₂ O, органические соединения	
Водород	H ₂ , H ₂ O, органические соединения	
Азот	NH ₄ ⁺ , NO ₃ ⁻ , N ₂ , органические соединения	
Сера	SO ₄ ²⁻ , HS ⁻ , S ⁰ , S ₂ O ²⁻ , органические соединения серы	Компонент цистеина, метионина, тиаминпирофосфата, кофермента А, биотина и α-липоевой кислоты
Фосфор	HPO ₄ ²⁻	Компонент нуклеиновых кислот, фосфолипидов и нуклеотидов
Калий	K ⁺	Основной неорганический катион в клетке, кофактор некоторых ферментов
Магний	Mg ²⁺	Кофактор многих ферментов (например, киназ); присутствует в клеточных стенках, мембранах и эфирах фосфорной кислоты
Кальций	Ca ²⁺	Кофактор ферментов, присутствует в экзоферментах (в амилазе, протеазе); Са-дипиколинат является важным компонентом эндоспор
Железо	Fe ²⁺ , Fe ³⁺	Содержится в цитохромах, ферредоксинах и других железосеропротеидах, кофактор ферментов (некоторые дегидратазы)

Экзоферменты, такие, как амилазы и протеазы, представляют собой кальцийсодержащие белки, а дипиколинат кальция служит важным компонентом

эндоспор. Ионы двух- и трехвалентного железа входят в состав компонентов электронпереносящей цепи, таких, как цитохромы и железосеропротеиды.

Помимо этих десяти главных биоэлементов микроорганизмам требуется еще и ряд других элементов, но в малых количествах (таблица 7). Ионы цинка и марганца необходимы всем микроорганизмам. Цинк имеет особенно важное значение, поскольку РНК- и ДНК-полимеразы относятся к цинкпротеидам.

Таблица 7 – Минорные биоэлементы, их источники и некоторые из выполняемых ими функций у микроорганизмов

Элемент	Источник	Функция в обмене веществ
Цинк	Zn^{2+}	Содержится в алкогольдегидрогеназе, щелочной фосфатазе, альдолазе, РНК- и ДНК- полимеразе
Марганец	Mn^{2+}	Содержится в бактериальной пероксиддисмутазе; кофактор некоторых ферментов (фосфоенолпируват-карбоксикиназы, цитрат(re)-синтетазы)
Натрий	Na^+	Необходимы галофильным бактериям
Хлор	Cl^-	
Молибден	MoO_4^{2-}	Содержится в нитратредуктазе и формиатдегидрогеназе
Селен	SeO_3^{2-}	Содержится в глицинредуктазе и формиатдегидрогеназе
Кобальт	Co^{2+}	Содержится в коферменте витамин- B_{12} -ферментов (глутаматмутаза, метилмалонил- CoA-мутаза)
Медь	Cu^{2+}	Содержится в цитохромоксидазе и оксигеназах
Вольфрам	WO_4^{2-}	Содержится в некоторых формиатдегидрогеназах
Никель	Ni^{2+}	Содержится в уреазе; требуется для автотрофного роста водородных бактерий

Галофильным микроорганизмам требуются высокие концентрации хлористого натрия. Однако, эти организмы составляют исключение. У большинства микроорганизмов потребность в ионах натрия и хлора невелика. Специфические функции могут выполнять и другие металлы, приведенные в таблице 7. Молибденпротеиды играют важную роль в азотном обмене и в окислении формиата. Ксантиндегидрогеназа также содержит молибден. Из селенпротеидов, приведенных в таблице 7, глицеринредуктаза содержит селен в форме селенцистеина. Кобальт требуется всем тем микроорганизмам, у которых протекают реакции, зависящие от

витамина В₁₂. Медь присутствует в ряде ферментов, переносящих электроны от субстратов к кислороду. И наконец, в некоторых редких случаях микроорганизмам требуются вольфрам и никель.

В природе большинство биологических элементов находится в виде солей; микроорганизмы их поглощают соответственно в виде катионов и анионов. Большое разнообразие соединений, используемых микроорганизмами, наблюдается только в отношении первых пяти элементов, приведенных в таблице 6: серы, азота, кислорода, водорода и углерода.

Среди всех питательных элементов наибольшее значение имеет углерод, которого в сухом веществе клеток микроорганизмов содержится около 50 %. Он входит в состав всех органических веществ, имеющих в микробных клетках.

Потребности различных микроорганизмов в источниках углерода весьма разнообразны. Фотосинтезирующие организмы, использующие энергию солнечного света, и бактерии, получающие энергию при окислении неорганических веществ, потребляют наиболее окисленную форму углерода – СО₂ как единственный или главный источник клеточного углерода. Превращение СО₂ в органические соединения клетки представляет собой восстановительный процесс, который идет со значительным потреблением энергии. Поэтому значительную часть энергии, получаемой от солнечного света или от окисления восстановленных неорганических соединений, эти физиологические группы микроорганизмов расходуют на восстановление СО₂ до уровня органического вещества.

Все другие организмы получают углерод главным образом из органических веществ, а необходимую им энергию – путем окисления органических соединений. Следовательно, органические вещества служат одновременно и источником углерода, и источником энергии.

Питательная ценность источников углерода зависит от строения их молекул. Для большинства микроорганизмов лучшие источники углерода – органические соединения, содержащие частично окисленные атомы углерода (СНОН, СН₂ОН, СОН). Отсюда можно сделать вывод о высокой питательной ценности веществ, содержащих спиртовые группы. Значительно хуже ассимилируются вещества с

большим количеством полностью восстановленных углеродов (радикалы CH_3 и CH_2). К числу соединений, содержащих метиловые и метиленовые радикалы, относятся газообразные углеводороды, парафин, высшие жирные кислоты и т. д. Почти совсем не усваиваются органические соединения, содержащие углерод только в форме карбоксила – COOH (например, щавелевая кислота).

Считают, что питательная ценность органических соединений связана с легкостью их перехода в углеводы или близкие к ним соединения, которые затем превращаются в вещества с тремя атомами углерода. Усвояемость органических соединений зависит не только от их растворимости и степени окисленности атомов углерода, но и пространственной конфигурации их молекул. Большинство активных компонентов клетки микроорганизма – соединения оптически деятельные, причем клетка обычно усваивает только определенные оптические изомеры, например сахара, относящиеся к D-ряду, аминокислоты – к L-ряду. Очень мало микроорганизмов обладают ферментами, превращающими один оптический изомер в другой.

Поглощенные микробной клеткой органические вещества вовлекаются в сопряженные окислительно-восстановительные процессы. Часть атомов углерода окисляется до CO- и COOH , из которых затем образуется CO_2 , другая часть, восстановившись до $-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2$ и $-\text{CH}$, входит в состав таких соединений, как аминокислоты, пуриновые и пиримидиновые основания, высшие жирные кислоты и т. д.

Микроорганизмы значительно различаются способностью усваивать разные соединения углерода и синтезировать из них составные части клетки. Некоторые виды удивительно всеядны и могут использовать для питания разнообразные соединения. С другой стороны, известно множество различных специализированных типов микробов, которые нуждаются в специфических соединениях. Существуют микробы, использующие нефть, газообразные углеводороды, парафины. Даже резина, гудрон, капрон и многие другие синтетические материалы, а также пестициды и т. д. после попадания в почву

начинают разлагаться микроорганизмами. Практически не существует органических соединений, которые не усваивались бы микроорганизмами.

Специфичность набора органических соединений, свойственная каждому виду микроорганизмов, используется для физиологической характеристики вида и для классификации микроорганизмов.

Водород и кислород могут использоваться бактериями в форме органических и неорганических соединений. Кислород и водород – наиболее доступные для микроорганизмов элементы. Они входят в состав воды, многих солей, всех органических соединений. Однако многим микроорганизмам и, прежде всего, строгим аэробам, необходим и молекулярный кислород (O_2), поступающий из воздуха. Главная функция O_2 состоит в том, что он служит конечным акцептором электронов при аэробном дыхании; O_2 при этом восстанавливается до воды. Вещество клетки атомы кислорода, происходящие из O_2 , включаются только в том случае, если источниками углерода служат метан, углеводороды с длинной цепью или ароматические углеводороды. По отношению к молекулярному кислороду можно выделить по меньшей мере три группы организмов. Облигатные аэробы способны получать энергию только путем дыхания и поэтому нуждаются в O_2 . Облигатные анаэробы могут расти только в среде, лишенной кислорода; O_2 для них токсичен. Факультативные анаэробы растут как в присутствии, так и в отсутствие O_2 . Среди них следует различать два типа: аэротолерантные молочнокислые бактерии могут расти в присутствии атмосферного кислорода, но не способны его использовать – они получают энергию исключительно с помощью брожения; другие факультативно-анаэробные бактерии (*Enterobacteriaceae*) и многие дрожжи могут переключаться с дыхания (в присутствии O_2) на брожение (в отсутствие O_2). Многие аэробные бактерии (если не большинство их) – микроаэрофилы, то есть они хотя и нуждаются в кислороде для получения энергии, однако не переносят того парциального давления O_2 , которое существует в воздухе (0,20 бар) им нужно от 0,01 до 0,03 бар.

Ни одно из органических соединений, образующихся в результате жизнедеятельности различных организмов, на Земле не накапливается.

Следовательно, можно думать, что все они подвергаются процессам разложения. Важную роль в разложении этих соединений играют микроорганизмы. Многообразие процессов жизнедеятельности у микроорганизмов привело к формулированию «доктрины катаболической безотказности микробов», согласно которой любое имеющееся в природе соединение углерода используется каким-либо микроорганизмом. Метаболизм соединений, содержащих углерод, водород и кислород, имеет важное значение не только потому, что эти элементы являются основными компонентами клетки, но и потому, что эти соединения служат важными субстратами для получения микроорганизмами энергии.

Микроорганизмы нуждаются в источниках азотного питания, которые служат материалом для образования аминных – NH_2 и иминных – NH -групп в молекулах аминокислот, пуринов и пиримидинов, нуклеиновых кислот и других веществ, входящих в состав клетки. Самый доступный источник азота для многих микроорганизмов – ионы аммония (NH_4^+) и аммиак (NH_3), они достаточно быстро проникают в клетку микроорганизма и трансформируются в имино- и аминогруппы.

Аммонийные соли органических кислот более благоприятны для питания, чем минеральные аммонийные соли. Последние являются физиологически кислыми – при потреблении NH_3 в среде накапливаются минеральные анионы, что влечет за собой сильное снижение pH.

Соли азотной кислоты в противоположность минеральным аммонийным солям не обладают физиологической кислотностью, и после использования NO_3^- микробами остаются ионы металлов (K^+ , Mg^{2+} , Na^+), что способствует подщелачиванию среды. Не все микроорганизмы могут восстанавливать окисленные соединения азота и питаться нитратами или нитритами. Большинство микробов ассимилируют минеральные формы азота.

Существуют микроорганизмы, способные усваивать молекулярный азот воздуха и строить из него необходимые компоненты клетки. Эти виды имеют большое значение в обогащении пахотного слоя связанными соединениями азота. В настоящее время известно большое число групп микроорганизмов (бактерий, актиномицетов, цианобактерий) с азотфиксирующей способностью.

Наряду с минеральными источниками азота многие микроорганизмы могут потреблять азот органических соединений, которые одновременно служат и источником углерода.

Потребление органических источников азота связывается обычно с отщеплением от них NH_3 и поглощением последнего микробной клеткой. Некоторые микроорганизмы могут ассимилировать аминокислоты, используя их как строительные блоки.

Усвояемость органических источников азота весьма различна. Белки, представляющие собой высокомолекулярные соединения, не проникают в клетку микробов. Поэтому белками могут питаться только микроорганизмы, выделяющие в среду экзоферменты, расщепляющие молекулы белков до пептидов и аминокислот. Этими свойствами обладают многие микроорганизмы.

Обычно микроорганизмам, питающимся только органическими соединениями азота – аминокислотами и т. п., требуется определенный набор этих веществ. Высокая чувствительность подобных организмов к наличию в среде некоторых аминокислот позволила разработать микробиологический метод их качественного и количественного определения.

Сера, как и азот, – необходимый компонент клеточного материала для всех организмов, в которых она встречается главным образом в восстановленной форме, в виде сульфидной группы. Оба элемента содержатся в клетке главным образом в восстановленной форме (сульфгидрильные группы, аминогруппы). Большинство микроорганизмов способно поглощать эти элементы в их окисленной форме, в виде сульфата и нитрата, которые они могут восстанавливать. Определенные группы микроорганизмов нуждаются в восстановленных соединениях серы. Некоторые метанообразующие бактерии растут только в присутствии сероводорода, используемого в качестве источника серы. Тиобациллы и ряд фототрофных бактерий нуждаются в сульфиде, элементарной сере или тиосульфате в качестве донора электронов. Наиболее обычный источник азота для микроорганизмов – соли аммония и аминокислоты.

Большинство микроорганизмов может использовать сульфаты в качестве питательного вещества, но имеются бактерии, требующие для биосинтеза источники восстановленной серы. Для таких организмов источником серы могут служить неорганические сульфиды, тиосульфаты и содержащие серу органические соединения.

Наряду с углеродом, азотом и серой микроорганизмы используют значительные количества калия и фосфора и небольшие – натрия, магния, кальция, железа.

Калий необходим для нормальной жизнедеятельности микроорганизмов. Он играет существенную роль в углеводном обмене и синтезе клеточного вещества.

В организме калий выполняет, прежде всего, каталитическую роль. Недостаток калия способствует накоплению щавелевой кислоты у *Aspergillus niger*. Очень низкая концентрация калия в среде вызывает снижение потребления сахара этим грибом.

Калий выступает в качестве активатора некоторых ферментов (амилазы, инвертазы), он способствует увеличению гидратации протоплазмы клетки. Он играет существенную роль в углеводном обмене и синтезе клеточного вещества.

Фосфор необходим для жизнедеятельности всех организмов, так как он входит в состав важнейших соединений клетки: нуклеопротеидов, нуклеиновых кислот, полифосфатов, фосфолипидов, а также обнаруживается в некоторых промежуточных продуктах обмена. Помимо этого соединения фосфора играют определенную роль в различных химических превращениях и, в особенности в углеводном обмене и в переносе энергии.

Большинство микроорганизмов легко использует в качестве источников фосфора неорганические ортофосфаты. Отдельные виды могут наряду с использованием фосфатов потреблять и фитаты (соли инозитфосфорных кислот). К числу таких организмов относятся некоторые грибы, например, *Penicillium chrysogenum*.

Недостаток фосфора в среде приводит к резкому изменению у актиномицетов обмена веществ, связанного с нарушением потребления и усвоения углеводов и

азота. В свою очередь избыток фосфора в среде также резко влияет на метаболизм организмов.

При избытке минерального источника фосфора в среде происходит изменение в биохимическом составе протоплазмы мицелия актиномицетов, нарушаются физиологические функции клетки; иногда это резко сказывается на процессе образования антибиотиков.

Продуцент стрептомицина *Streptomyces griseus* весьма чутко реагирует на изменение концентрации фосфора в среде; изменяется содержание в цитоплазме РНК и ДНК в ядерном веществе, что приводит к смещениям в жизненном цикле актиномицета.

Оптимальное содержание фосфора в среде, в зависимости от ее состава, от 14 до 140 мкг/мл обеспечивает хорошее развитие актиномицета и образование стрептомицина. При повышении концентрации фосфора происходит резкое снижение выхода антибиотика.

Натрий участвует в поддержании осмотического давления в клетке.

Основная функция магния – активация ферментов, необходимых для нормального обмена веществ и роста микроорганизмов.

Ведущая роль Mg^{2+} связана с гликолитическим циклом, где важное значение отводится переносу фосфатов. Довольно часто Mg^{2+} выступает как связующее звено между ферментом (энзимом) и субстратом. Он принимает участие в стабилизации двойной спирали ДНК. Ионы магния играют важную роль в процессе фосфорилирования. Оптимальный эффект действия магния зависит от концентрации источников углерода, от образования организмом оксикислот, от концентрации других ионов, в отношении которых магний является антагонистом. Магний принадлежит к числу весьма физиологически активных металлов.

Ионы кальция регулируют активную кислотность (рН) среды, а также выступают в качестве фактора, связывающего остатки фосфорной кислоты. Вместе с тем, не входя в состав простетической группы ферментов, ионы кальция активируют некоторые из них (липазы, аденозинтрифосфатазы и др.). Кальций

может выступать в качестве ингибитора некоторых ферментов, активируемых магнием.

При наличии в среде ионов кальция наблюдается снижение лизиса некоторых бактериальных клеток.

Термоустойчивость бактериальных спор связана с наличием в спорах дипиколиновой (пиридин-2,6-дикарбоновой) кислоты, которая в процессе прорастания спор полностью из них исчезает. Ионы же кальция играют каталитическую роль в синтезе дипиколиновой кислоты и, таким образом, определяют термостабильность спор. Известно, что кальций оказывает существенное влияние на азотный, углеводный и фосфорный обмен микроорганизмов.

Ионы железа играют в жизнедеятельности микроорганизмов главным образом каталитическую роль. Железо входит в состав ферментов – активаторов кислорода, первое место среди которых занимает система цитохромов. Недостаток или избыток железа в среде приводит к нарушению тех или иных сторон метаболизма.

Установлено, что существует конкуренция между железом и марганцем за положение в геме железосодержащих ферментов.

Железо наряду с другими металлами, входя в состав окислительно-восстановительных ферментов, играет большую роль в окислительно-восстановительных процессах.

Известно также, что железо и медь угнетают процесс спорообразования у бактерий.

Минеральные микроэлементы добавляются в среду для выращивания микроорганизмов в виде катионов неорганических солей. Микроэлементы чаще всего нет необходимости специально вносить в среду, т. к. большинство микроэлементов являются примесью солей макроэлементов или попадают в среду с частицами пыли, из стеклянной посуды или в составе водопроводной воды.

Для многих микроорганизмов нужны в малых дозах еще органические соединения, называемые факторами роста. К ним относятся вещества, способность синтезировать которые утрачена у некоторых микроорганизмов, и поэтому в среду

для их выращивания факторы роста добавляются в готовом виде. Все другие организмы синтезируют эти соединения самостоятельно. Такими веществами для микроорганизмов являются отдельные аминокислоты, пурины, пиримидины, жирные кислоты, и др., а также соединения, хорошо известные как витамины для высших организмов; они необходимы микроорганизмам как составная часть простетических групп или активных центров различных ферментов.

4.4 Питательные среды

Питательные среды могут иметь неопределенный состав, т. е. включать биогенные добавки (растительного, животного или микробного происхождения), например, мясной экстракт, дрожжевой экстракт, кукурузную муку, морские водоросли и т. д. Такие питательные среды называются натуральными. Применяют также среды, приготовленные из чисто химических соединений в заранее определенных соотношениях. Это так называемые синтетические среды. Применение находят и полусинтетические питательные среды, сочетающие в своем составе компоненты как натуральных, так и синтетических сред.

Среды данных типов имеют как преимущества, так и недостатки. С экономической точки зрения наиболее целесообразно использование природного, более дешевого сырья, чем веществ в чистом виде, полученных химическим путем. Однако только применение сред строго определенного состава позволяет точно регистрировать и регулировать протекающие в культуральной среде процессы, добиваясь их оптимизации. Компромиссным подходом является использование полусинтетических сред, в состав которых наряду с соединениями известной химической природы входят биогенные добавки.

4.4.1 История открытия питательных сред

История питательных сред имеет многовековой опыт. Начинается она с открытия Л. Пастера. В 1861 г. он доказал, что брожение есть процесс, тесно

связанный с жизнедеятельностью дрожжевых грибков, которые питаются и размножаются за счёт бродящей жидкости, т. е. положил начало культивированию в жидких питательных средах.

В 1883 г. Р. Кох разработал метод выделения чистых культур микробов путем посева на пластинки желатина. Другой состав плотной питательной среды, который используется до сих пор, предложил в 1884 г. немецкий микробиолог В. Хессе. Основным компонентом этой среды был агар-агар, который его жена использовала для приготовления фруктового желе.

Осталось только найти форму, в которую удобно заливать плотные питательные среды, и наблюдать за ростом микробов. Такая форма в виде донышка, отрезанного от лабораторной бутылки, была предложена в 1887 г. Ю. Петри и получила название – чашка Петри. Эти открытия положили основу для разработки, а затем промышленного выпуска и широкого практического использования жидких, полужидких и плотных питательных сред. Эти среды и чашки Петри до сих пор являются неотъемлемым атрибутом каждой микробиологической лаборатории.

В 1905 г. бактериолог А. Мак-Конки разработал первую хромогенную среду. В состав питательной среды входят селективные компоненты (кристаллический фиолетовый и соли желчных кислот), которые ингибируют рост грамположительных микробов, и специфический субстрат – лактоза.

4.4.2 Требования, предъявляемые к средам

Любые питательные среды должны соответствовать следующим условиям:

1) быть питательными, т. е. содержать в легко усвояемом виде все вещества, необходимые для удовлетворения пищевых и энергетических потребностей. Ими являются источники органических и минеральных (неорганических) веществ, включая микроэлементы. Минеральные вещества не только входят в структуру клетки и активизируют ферменты, но и определяют физико-химические свойства сред (осмотическое давление, рН и др.). При культивировании ряда

микроорганизмов в среды вносят факторы роста – витамины, некоторые аминокислоты, которые клетка не может синтезировать;

2) иметь оптимальную концентрацию водородных ионов рН, так как только при оптимальной реакции среды, влияющей на проницаемость оболочки, микроорганизмы могут усваивать питательные вещества.

Для большинства патогенных бактерий оптимальна слабощелочная среда (рН 7,2-7,4). Исключение составляют холерный вибрион – его оптимум находится в щелочной зоне (рН 8,5-9,0) и возбудитель туберкулеза, нуждающийся в слабокислой реакции (рН 6,2-6,8).

Чтобы во время роста микроорганизмов кислые или щелочные продукты их жизнедеятельности не изменили рН, среды должны обладать буферностью, т. е. содержать вещества, нейтрализующие продукты обмена;

3) быть изотоничными для микробной клетки, т. е. осмотическое давление в среде должно быть таким же, как внутри клетки. Для большинства микроорганизмов оптимальна среда, соответствующая 0,5 %-ному раствору натрия хлорида;

4) быть стерильными, так как посторонние микробы препятствуют росту изучаемого микроба, определению его свойств и изменяют свойства среды (состав, рН и др.);

5) плотные среды должны быть влажными и иметь оптимальную для микроорганизмов консистенцию;

б) обладать определенным окислительно-восстановительным потенциалом, т. е. соотношением веществ, отдающих и принимающих электроны, выражаемым индексом RH_2 . Этот потенциал показывает насыщение среды кислородом. Для одних микроорганизмов нужен высокий потенциал, для других – низкий. Например, анаэробы размножаются при RH_2 не выше 5, а аэробы – при RH_2 не ниже 10. Окислительно-восстановительный потенциал большинства сред удовлетворяет требованиям к нему аэробов и факультативных анаэробов;

7) быть по возможности унифицированным, т. е. содержать постоянные количества отдельных ингредиентов. Так, среды для культивирования большинства патогенных бактерий должны содержать 0,8-1,2 г аминного азота NH_2 , т. е.

суммарного азота аминокрупп аминокислот и низших полипептидов; 2,5-3,0 г общего азота N; 0,5 % хлоридов в пересчете на натрия хлорид; 1 % пептона.

Желательно, чтобы среды были прозрачными – удобнее следить за ростом культур, легче заметить загрязнение среды посторонними микроорганизмами.

4.4.3 Этапы приготовления сред

Приготовление сред включает в себя следующие этапы:

- 1) варка;
- 2) установление оптимальной величины рН;
- 3) осветление;
- 4) фильтрация;
- 5) разлив;
- 6) стерилизация;
- 7) контроль.

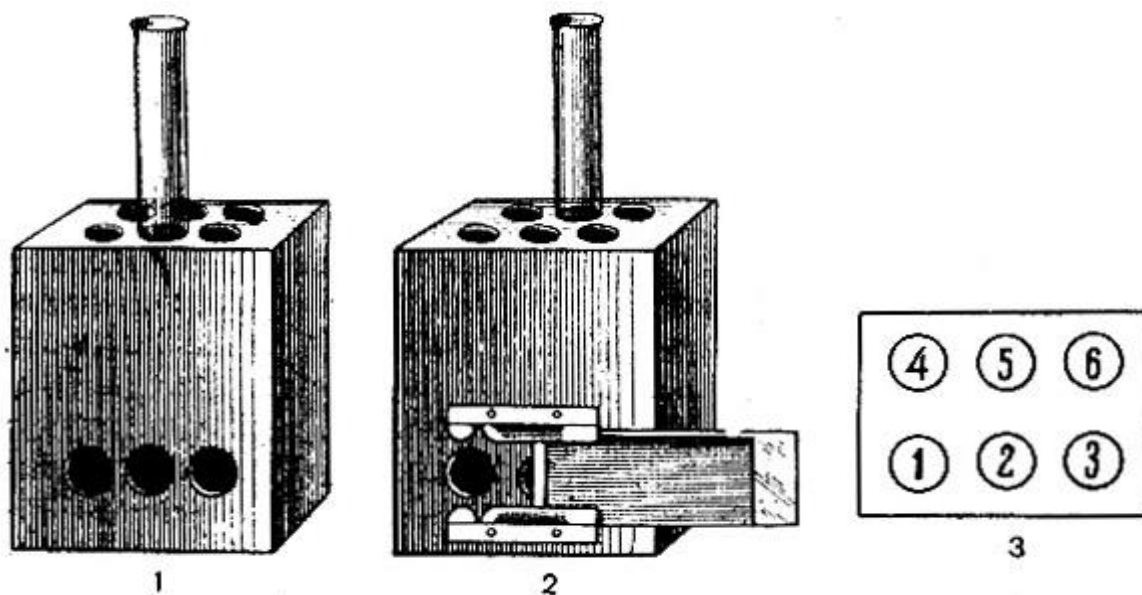
Варят среды на открытом огне, водяной бане, в автоклаве или варочных котлах, подогреваемых паром.

Установление рН сред ориентировочно производят с помощью индикаторных бумажек. Для точного определения рН пользуются потенциометром, применяя стеклянные электроды в соответствии с инструкцией или компаратором (аппаратом Михаэлиса), состоящим из штатива с гнездами для пробирок (рисунок 12) и набора стандартов определенного рН. При приготовлении сред пользуются обычно индикатором метанитрофенолом, изменяющим свой цвет в диапазоне рН 6,8-8,4.

Осветление сред производят, если при варке они мутнеют или темнеют. Для осветления в среду, подогретую до 50 °С, вливают белок куриного яйца, взбитый с двойным количеством воды, перемешивают и кипятят. Свертываясь, белок увлекает в осадок взвешенные в среде частицы. Таким же способом можно вместо яичного белка использовать сыворотку крови (20-30 мл на 1 л среды).

Фильтрацию жидких и расплавленных желатиновых сред производят через влажный бумажный или через матерчатые фильтры. Фильтрация агаровых сред

затруднена, – они быстро застывают. Обычно их фильтруют через ватно-марлевый фильтр (в воронку помещают марлевую салфетку и на нее пышный комок ваты). Можно пользоваться бумажными или матерчатыми фильтрами, если проводить фильтрацию в горячем автоклаве или в воронках с подогревом.



- 1 – вид спереди;
- 2 – вид сзади;
- 3 – схема расположения пробирок в штативе

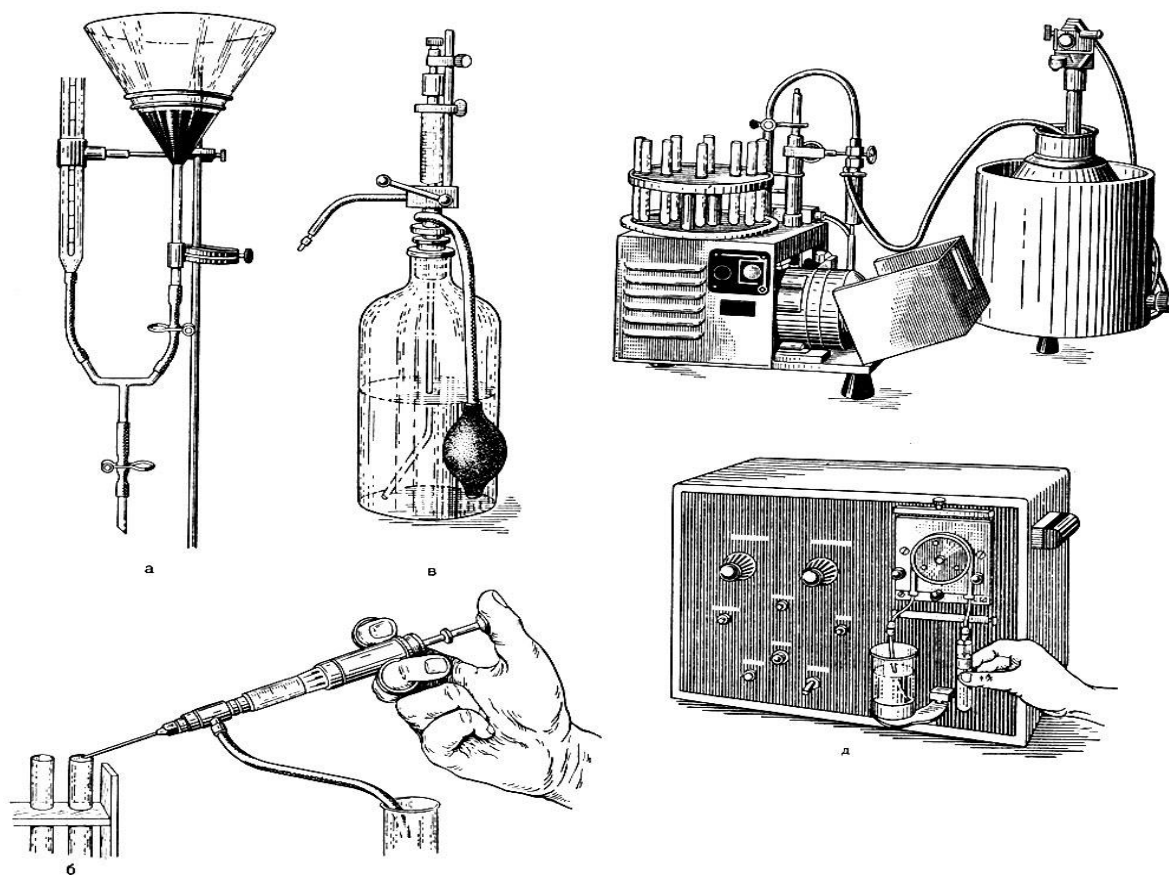
Рисунок 12 – Аппарат Михаэлиса

Фильтрацию агаровых сред можно заменить отстаиванием. Среду наливают в высокий цилиндрический сосуд и расплавляют в автоклаве. При медленном остывании среды в выключенном приборе взвешенные в ней частицы оседают на дно. На следующий день агаровый сгусток извлекают из сосуда (для этого сосуд ненадолго помещают в горячую воду) и отрезают ножом нижнюю часть со скопившимся осадком. Верхнюю часть растапливают и разливают в соответствующие емкости.

Разливают среды в пробирки (по 3-5 мл или по 10 мл), флаконы, колбы, матрасы и бутылки не более чем на $\frac{2}{3}$ емкости, так как при стерилизации могут намокнуть пробки и среды утратят стерильность.

Среды, которые стерилизуют при температуре выше 100 °С, разливают в чистую сухую посуду. Среды, стерилизуемые при более низкой температуре, обязательно разливают в стерильную посуду.

Разливают среды с помощью воронки, на конец которой надета резиновая трубка с зажимом Мора. Для мерного разлива применяют мензурки, бюретки, дозаторы, шприцы-пипетки и т. п. (рисунок 13).



- а – лабораторный монтаж;
- б – автоматический шприц-пипетка;
- в – дозатор;
- г – полуавтомат;
- д – автоматический дозатор

Рисунок 13 – Приспособления для мерного разлива сред

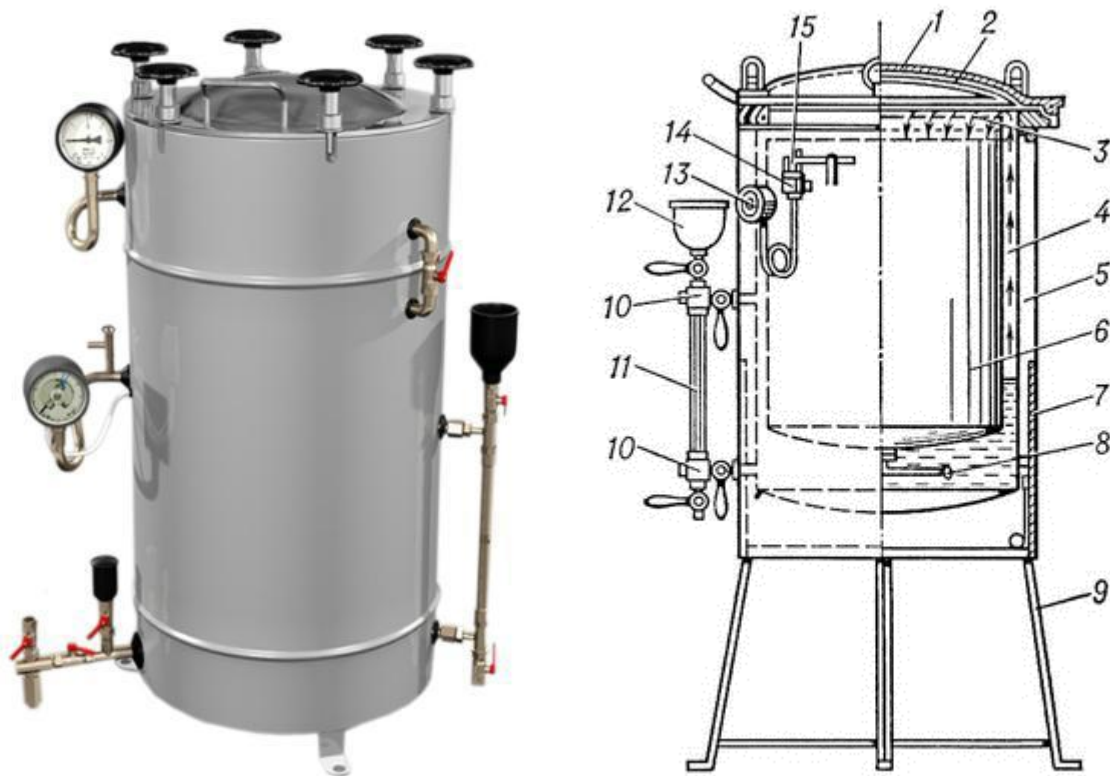
В микробиологии используют, как правило, только стерильные питательные среды. В настоящее время известно много способов их стерилизации, которые разделяют на две основные группы: термическую и холодную стерилизацию. Из

термических способов наиболее широко используются стерилизация насыщенным паром под давлением (автоклавирование), стерилизация текучим паром, тиндализация и кипячение.

Стерилизация насыщенным паром под давлением – один из наиболее эффективных методов, основанный на прогревании субстрата насыщенным паром в автоклавах – аппаратах, работающих под давлением выше атмосферного, так как с повышением давления пара повышается и его температура (рисунок 14). Совместное действие высокой температуры и пара обеспечивает надежность стерилизации: при автоклавировании погибают и вегетативные клетки, и споры микроорганизмов. Среды, предназначенные для стерилизации в автоклаве, наливают не выше половины высоты сосуда, сосуд закрывают ватно-марлевой пробкой или резиновой пробкой, которую завальцовывают. Температура и длительность автоклавирования определяются, прежде всего, составом питательной среды. Обычно стерилизация проводится при температуре 121 °С в течение 15 минут. Тем не менее, необходимо помнить, что такая стерилизация не всегда является безвредной для питательной среды: длительное автоклавирование при повышенном давлении часто приводит к гидролизу в ее составе некоторых питательных компонентов.

Стерилизация текучим паром применяется для стерилизации сред, содержащих вещества, разлагающихся при температуре выше 100 °С (аммиачные соли, молоко, желатин, картофель, некоторые углеводы). Стерилизацию проводят в автоклаве при открытом спускном кране и незавинченной крышке или в аппарате Коха. Флаконы или колбы со средой загружают в камеру неплотно, чтобы обеспечить возможность наибольшего контакта их с паром. Началом стерилизации считается время с момента закипания воды и поступления пара в стерилизационную камеру. Обработку питательных сред текучим паром проводят по 15-30 минут ежедневно в течение 3 дней подряд. При первой стерилизации погибают вегетативные формы микроорганизмов, некоторые споры при этом сохраняются и прорастают в вегетативные особи в процессе хранения питательных сред при

комнатной температуре. Последующая стерилизация достаточно надежно обеспечивает стерильность среды.



- 1 – крышка;
- 2 – резиновая прокладка;
- 3 – отверстия для поступления пара;
- 4 – водопаровая камера;
- 5 – металлический кожух;
- 6 – стерилизационная камера;
- 7 – слой асбеста;
- 8 и 14 – спускные краны;
- 9 – подставка;
- 10 и 12 – краны для заправки воды;
- 11 – водоуказательное стекло;
- 13 – манометр;
- 15 – предохранительный клапан

Рисунок 14 – Автоклав и его устройство

Тиндализация – дробная стерилизация с применением температуры ниже 100 °С, предложенная Тиндалем. Тиндализация применяется для стерилизации питательных сред, имеющих в своем составе вещества, легко разрушающиеся при высокой температуре (сыворотки, витамины). Прогревание стерилизуемой

питательной среды производят в водяной бане, снабженной терморегулятором, по часу, при температуре 60-65 °С в течение 5 дней или при 70-80 °С в течение 3 дней. В промежутках между прогреваниями среды выдерживают при температуре 25-37 °С для прорастания спор в вегетативные формы, которые погибают при последующих прогреваниях. Следует учитывать, что эффективность тиндализации, как и в ряде случаев стерилизации текучим паром, зависит от того, прорастают ли споры. Поэтому она не достигает цели, если споры находятся в среде, непригодной для роста или содержащей ингибиторы, или если среда в промежутках между нагревами инкубируется при температуре, неблагоприятной для прорастания спор.

Основными способами холодной стерилизации являются различные типы фильтрования и облучения. Такой стерилизации подвергают растворы веществ, которые при нагревании разрушаются или существенно изменяют свои свойства. К ним относятся многие витамины, антибиотики, ферменты, сыворотки, лекарственные препараты и др.

Для стерилизации фильтрованием используют фильтры, изготавливаемые из материалов с различными физико-химическими свойствами, пропускной и адсорбционной способностями. В микробиологической практике наиболее широко применяются фильтры мембранные, асбестовые (фильтры Зейца), фарфоровые (фильтры-свечи) и стеклянные различных конструкций. Область применения фильтров определяется, главным образом, диаметром их пор. О пригодности фильтра для стерилизации судят не только по имеющемуся на нем индексу, но и путем предварительной (контрольной) фильтрации через него суспензии относительно небольших бактерий, например, *P. aeruginosa*, *P. diminuta*, *S. marcescens*.

Летальное действие на клетки микроорганизмов оказывают многие виды излучений – ультрафиолетовое, рентгеновские лучи, α -, β - и γ - лучи радиоактивных элементов и другие. Стерилизация такими средствами называется холодной стерилизацией. Чувствительность микроорганизмов к облучению зависит от очень многих факторов – источника излучений, времени экспозиции, вида микроорганизма, его концентрации и физиологического состояния, состава среды, в

которой он находится, и многого другого. В целях стерилизации используют УФ-облучение с длиной волны 254 нм, однако, его применение ограничено из-за малой проникающей способности. От УФ-лучей микроорганизмы могут быть защищены органическими веществами, пылью, стеклом или другим покрытием, в то время как воздействие на микробные клетки должно быть непосредственным и продолжительным. В силу этого ультрафиолетовые лучи применяют для облучения биологических жидкостей в тонком слое, например, крови, плазмы, вакцин для уничтожения вирусов, но, главным образом, для стерилизации воздуха закрытых помещений, поверхностей, лабораторного оборудования, потолков, стен и полов.

4.4.4 Классификация питательных сред

В зависимости от видовой принадлежности микробов и целей культивирования консистенция и составы культуральных сред бывают разными и варьируют в широких пределах. Среда, отвечающая биологическим особенностям микроба и обеспечивающая его рост и размножение, называется полноценной, не имеющая какого-либо компонента, необходимого для его жизнедеятельности – дефицитной. В настоящее время предложено огромное количество сред, в основу классификации которых положены следующие признаки.

По исходным компонентам питательные среды бывают:

1) естественные питательные среды – это натуральный продукт животного или растительного происхождения. Растительные: исходные продукты – соя, горох, картофель, морковь и т. п. Животные: исходные продукты – мясо, рыба, яйца, молоко, животные ткани, желчь, сыворотка крови и т. п.

В качестве примера питательной среды, полностью состоящей из естественных компонентов, можно назвать среду Бакли, предложенную для выращивания клеточных культур из почечного эпителия обезьян. В эту среду входит коровья амниотическая жидкость (85 %), лошадиная сыворотка (10 %) и коровий эмбриональный экстракт (5 %).

Все естественные продукты малостандартны, их использование связано с большой опасностью микробной и вирусной контаминации клеточных культур;

2) синтетические среды (известного химического состава) состоят из химически чистых соединений в точно установленных концентрациях (с добавлением углеводов, солей, аминокислот, витаминов и т. п.). На основе этих сред, добавляя к ним естественные или искусственные среды, получают полусинтетические среды.

Питательная среда 199 предназначена для культивирования первичных и перевиваемых клеток человека и животных, также может быть использована для культур клеток в санитарно-профилактических, лечебно-профилактических и научно-исследовательских учреждениях при диагностике вирусных инфекций и в вирусологических исследованиях.

Основными действующими веществами набора являются аминокислоты, витамины и глюкоза. Набор реагентов представляет собой растворенную в воде очищенной или в воде для инъекций смесь неорганических солей, аминокислот, витаминов, глюкозы, индикатора фенолового красного (или без индикатора), стерилизованную методом мембранной фильтрации с использованием фильтров с конечным размером пор 0,22 мкм. Набор хранят при температуре от 2 °С до 80 °С в защищенном от прямых солнечных лучей месте в течение всего срока годности (1 год). Транспортируют при температуре от 2 °С до 8 °С всеми видами крытого транспорта. Возможно транспортирование при температуре от 9 °С до 25 °С в течение не более 7 суток.

Питательная среда Игла для культивирования клеток млекопитающих включает сбалансированный солевой раствор, источник питательных веществ и ростстимулирующих факторов в виде растительного гидролизата, аминокислот и витаминов. В качестве растительного гидролизата она содержит ферментативный гидролизат рисовой муки с рН 6,2-6,7, содержанием аминного азота 2,2-2,8 мас. %, остаточного азота 3,0-4,2 мас. % и/или соевой муки с рН 6,2-6,7, содержанием аминного азота 2,9-3,5 мас. %, остаточного азота 5,6-6,6 мас. % при следующем содержании компонентов: ферментативный гидролизат рисовой и/или соевой муки

3-20 г/л, аминокислоты 0,11-0,86 г/л, витамины 0,55-22,5 мг/л, сбалансированный солевой раствор до 1 л. Это обеспечивает стандартизованность и удешевление питательной среды специально для культивирования клеток MDCK и Vero, используемых в производстве культуральных противогриппозных вакцин.

Однако использование для культивирования клеток питательной среды Игла MEM с добавлением 5-10 % фетальной сыворотки приводит к внесению в конечный продукт (вакцину) компонентов сырья животного происхождения, которые могут являться источником посторонних вирусов, микоплазм, прионов, а также вызывать дополнительную аллергизацию иммунизируемого организма.

Наряду с натуральными и синтетическими средами выделяют так называемые полусинтетические среды. Главными компонентами полусинтетических сред являются соединения известного химического состава – углеводы, соли аммония, фосфаты и т. д. Однако в их состав всегда включаются вещества неопределенного состава, такие как дрожжевой автолизат, почвенный экстракт или гидролизат казеина. Эти среды находят широкое применение в промышленной микробиологии для получения аминокислот, витаминов, антибиотиков и других важных продуктов жизнедеятельности микроорганизмов.

Мясо-пептонный бульон (МПБ) является белковой основой всех сред (рисунок 15). Существует несколько способов приготовления МПБ. В одном случае бульон готовится на мясной воде с добавлением готового пептона – это так называемый мясо-пептонный бульон, в другом – на переварах продуктов гидролиза исходного сырья при помощи ферментов (трипсина – бульон Хоттингера, пепсина – бульон Мартена).

Мясо-пептонный агар (МПА) – получают путем добавления к МПБ агар-агара (1,5-3 %). Если МПА распределен по диагонали пробирки или флакона – это скошенный агар. Для его получения пробирки для застывания среды оставляют в наклонном положении. Если среда распределена в пробирке вертикально высотой 5-7 см, это агар столбиком. МПА, застывший в чашках Петри в виде пластинки – пластинчатый агар. Если среда имеет вертикальный слой высотой 2-3 см и диагональный слой такой же величины – это полускошенный агар.



Рисунок 15 – Мясо-пептонный бульон

Агар АРТ – твердая среда общего назначения, используемая для культивирования ферментативных молочно-кислых бактерий, которые вызывают порчу мясных продуктов (позеленение мяса) и требуют высокого уровня тиамина (рисунок 16).



Lactobacillus lactis ATCC 19435



Lactobacillus fermentum ATCC 9338

Рисунок 16 – Рост микроорганизмов на среде АРТ

Среда общего назначения (АРТ общего назначения с полисорбатом 80), разработанная Evans и Niven, успешно применяется для выделения и культивирования молочнокислых бактерий, которые влияют на качество и состав пищевых продуктов (особенно мяса) и для роста которых необходимы высокие концентрации тиамин. Поэтому в среду добавлено больше тиамин. Обе версии среды – жидкая и твердая – обеспечивают успешное выявление лактобактерий, из-за которых мясо приобретает зеленый оттенок. Кроме того, если в среду добавить 5 % фруктового сока, она становится незаменимой средой для любых пищевых образцов. Однако если не вводить ингибиторные агенты в пропись среды, она не обладает селективными свойствами и поэтому на ней могут расти почти все микроорганизмы.

По консистенции (степени плотности) питательные среды подразделяются на жидкие, полужидкие, плотные, сыпучие, сухие питательные среды.

Жидкие среды чаще применяют для изучения физиолого-биохимических особенностей микроорганизмов, для накопления биомассы или продуктов обмена, а также поддержания и хранения многих микроорганизмов, плохо развивающихся на плотных средах.

Полужидкие среды обычно используют для хранения культур, реже – для накопления биомассы (например, анаэробов).

Плотные питательные среды готовят из жидких с добавлением уплотнителя. В качестве уплотнителя обычно применяют агар-агар. Агар-агар – продукт, получаемый из морских водорослей, представляет собой желтоватый порошок или пластинки, содержит высокомолекулярные полисахариды, не расщепляется большинством микроорганизмов, не разрушается при автоклавировании, питательную ценность сред не изменяет, не подавляет рост микробов. Для иммунологических и бактериологических целей используется вымороженный, осветленный агар, который при кипячении или автоклавировании смеси порошка с водой расплавляется при температуре 85-100 °С, а при охлаждении до 45-48 °С образует гель.

Для приготовления, плотных питательных сред агар-агар добавляют в концентрации от 1,5 % до 3 %. Ряд естественных питательных сред (свернутая сыворотка крови, свернутый яичный белок) сами по себе являются плотными. Плотные среды используют для выделения чистых культур микроорганизмов, изучения морфологии колоний, диагностических целей, для хранения культур, количественного учета микроорганизмов, определения их антагонистических свойств и в ряде других случаев.

Сыпучие среды обычно используют для хранения посевного материала, культур-продуцентов в микробиологической и медицинской промышленности. К ним относятся, например, разваренное пшено, отруби, кварцевый песок, пропитанные питательным раствором.

Сухие питательные среды представляют собой порошки или гранулы с влажностью, не превышающей 10 % и легко растворимые в воде. Они выпускаются по соответствующим технологиям на производствах в различных масштабах, удобны для хранения, транспортировки и приготовления готовых к употреблению сред.

Также существует еще классификация питательных сред по целевому назначению. По этой классификации все среды делят на основные, обогащенные, специальные, дифференциально-диагностические и транспортные среды.

Основные среды применяют для культивирования относительно неприхотливых микроорганизмов.

Для получения мясной воды мясной фарш заливают водопроводной водой 1:2, кипятят 1 ч, затем фильтруют, доливают водой до первоначального объема, разливают по емкостям, плотно закрывают и стерилизуют автоклавированием при 120 °С 20 мин.

Перевар Хоттингера готовят из мясных отходов путем их триптического гидролиза. Жир, фасции, сухожилия нарезают, заливают кипящей водой 1:2, кипятят, охлаждают до 45 °С, добавляют панкреатин, подщелачивают раствором карбоната натрия, встряхивают, добавляют хлороформ, закрывают и выдерживают в теплом месте 10 дней [14].

Мясо-пептонная желатина. К 1 литру МПБ добавляют желатин до конечной концентрации 10-20 %, нагревают, устанавливают слабо-щелочную рН, кипятят, фильтруют, разливают по пробиркам и стерилизуют в кипятильнике Коха текучим паром 3 дня или однократно автоклавированием при 120 °С при 1 атм. в течение 20 мин.

Полужидкий мясо-пептонный агар (ПЖА) готовят, как МПА, но добавляют 0,25 % агара, кипятят до его расплавления, устанавливают требуемую рН, фильтруют в горячем виде и стерилизуют автоклавированием.

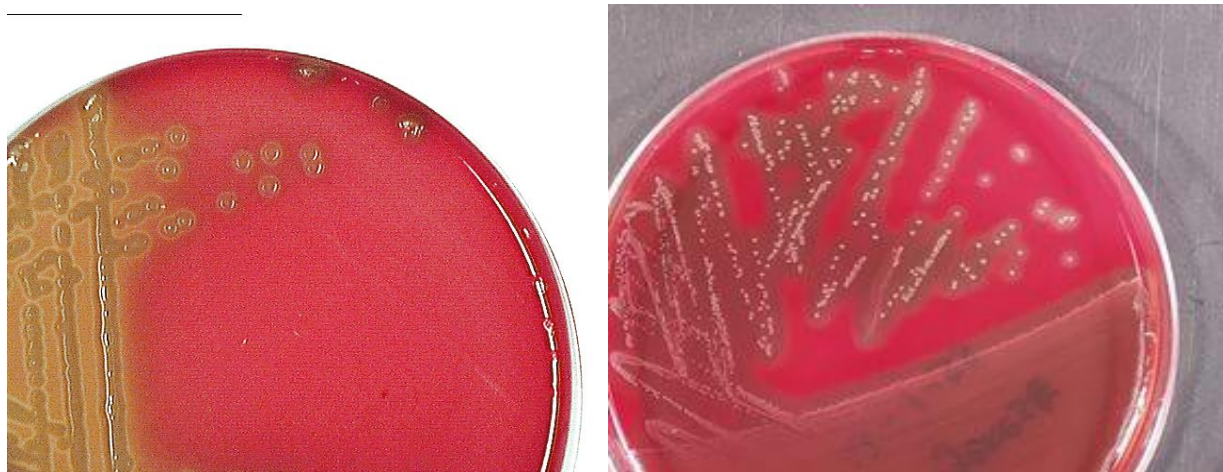
Агар Хоттингера готовят, добавляя к бульону Хоттингера 2 % агар-агара. Агар Хоттингера предназначен для культивирования различных микроорганизмов, таких как энтеробактерии, синегнойная палочка, стафилококки. При необходимости может быть обогащен кровью, сывороткой крови, углеводами, солями. Представляет собой непрозрачный студень светло-коричневого цвета. Совокупность компонентов, входящих в состав среды, обеспечивает питательные потребности для роста культур в виде соответствующих колоний на поверхности плотной питательной среды.

Многие виды болезнетворных бактерий плохо растут на общепотребительных средах, поэтому в основные среды добавляют кровь, сыворотку крови, углеводы и т. д. Такие среды получили название обогащенных.

Кровяной агар – специальная бактериологическая среда, служащая для выделения бактерий (напр., стрептококков) и установления их гемолитической активности (рисунок 17). Для приготовления К. а. к расплавленному и охлажденному до 45 °С (не выше) 2 % МП А добавляют 5-10 % подогретой стерильной дефибрированной крови барана, кролика, лошади, человека, смешивают и разливают по чашкам Петри, выдерживают сутки в термостате на возможную бактериальную контаминацию. Культуру засевают штрихом или бляшкой. Среда содержит кровь, что позволяет определить тип гемолиза – один из основных ориентировочных тестов при идентификации бактерий.

Кровяной агар можно также использовать для пересева (поддержания) культур и выделения чистой культуры.

Для приготовления *сывороточного агара* к расплавленному и охлажденному до 48 °С 2,5 % МПА, рН 7,4, приливают 15-20 % лошадиной или бычьей сыворотки, осторожно, предупреждая вспенивание, размешивают и разливают по чашкам Петри. Контролируют на стерильность.



Слева – *Streptococcus pneumoniae*: α-гемолиз, зеленоватый ореол вокруг колонии;
справа – *Streptococcus pyogenes*: β-гемолиз, зона лизиса вокруг или под колонией

Рисунок 17 – Пример характерного гемолиза

На сывороточном агаре пневмококки образуют мелкие, нежные едва желтоватые колонии (рисунок 18).



Рисунок 18 – Рост пневмококков на сывороточном агаре

На сывороточном агаре колонии менингококка мелкие, диаметром 0,5-1 мм, нежные, слегка выпуклые, полупрозрачные, голубоватые в проходящем свете, с ровным краем и гладкой поверхностью.

Сывороточный и кровяной бульоны готовят аналогично.

Растворы углеводов стерилизуют текучим паром или фильтрованием и добавляют в количестве 0,5-1 % к питательной среде.

Специальные питательные среды предназначены для избирательного культивирования определенных видов микроорганизмов, изучения их свойств и хранения. Различают следующие виды специальных сред: элективные (избирательные), дифференциально-диагностические (индикаторные), консервирующие.

Элективные среды обеспечивают развитие одного вида или группы родственных микроорганизмов и менее пригодные или совсем не пригодные для развития других. Их применяют главным образом для выделения микроорганизмов из мест их естественного обитания и получения накопительных культур. Элективные среды чрезвычайно разнообразны по своему составу. По консистенции среды данного типа могут быть плотными и жидкими. Жидкие среды называются средами обогащения или накопления, их применяют, когда ставят цель увеличить количество искомого микроорганизма смешанной популяции. Среда стерилизуют автоклавированием текучим паром или в автоклаве под давлением при 1 атм. 12-30 мин.

Молочно-солевой агар предназначен для избирательного культивирования стафилококков.

Среда Шустовой предназначена для выделения сальмонелл.

Рапопорт-Вайнтрауба среда (М. А. Рапопорт, А. Вайнтрауб) – элективная жидкая среда, используемая для дифференциации гемокультур бактерий тифопаратифозной группы.

Незасеянная простерилизованная среда имеет слегка желтоватый оттенок, а после засева 5-20 мл крови вследствие гемолизирующего действия желчи

окрашивается в коричневый цвет. В поплавке же в связи со слабой диффузией среда сохраняет желтоватую окраску.

При росте возбудителя брюшного тифа происходит отчетливое помутнение и вследствие сбраживания глюкозы покраснение среды, что особенно заметно в трубочке-поплавке (рисунок 19). При росте паратифозных бактерий помутнение и изменение цвета среды сопровождается накоплением в поплавках пузырьков газа, а также выпадением значительного осадка.

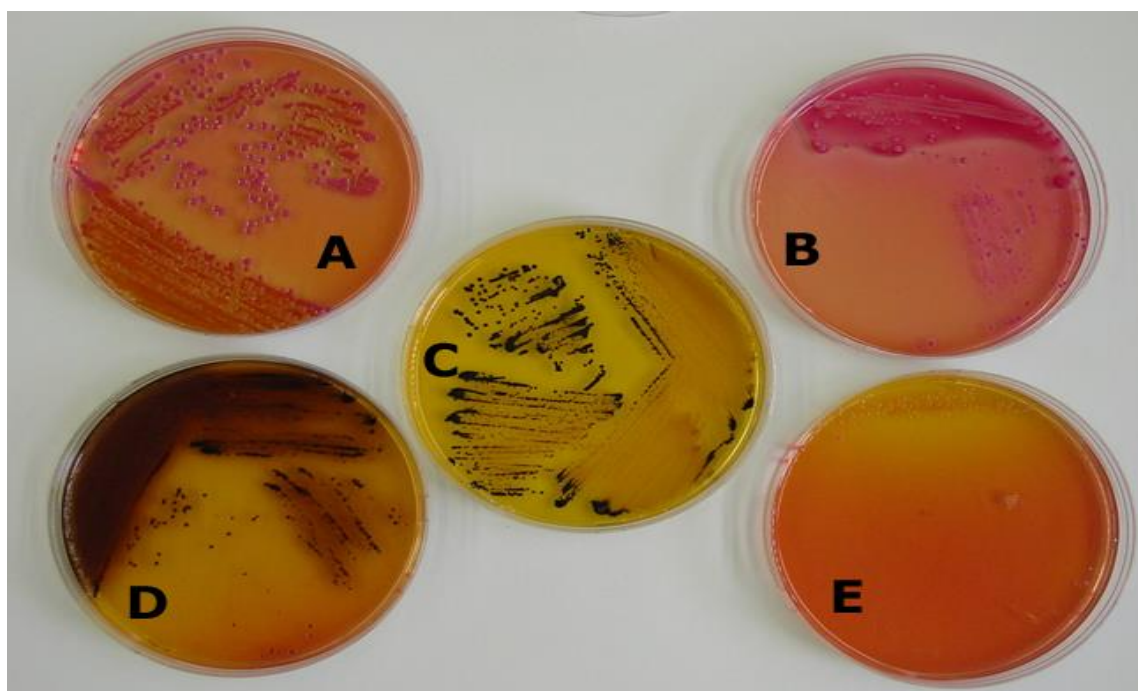


Рисунок 19 – Рапорт-Вайнтрауба среда, засеянная *Salmonella typhi*

Использование в среде Рапорта-Вайнтрауба вместо глюкозы маннита в ряде случаев облегчает дифференцирование патогенных тифо-паратифозных бактерий от некоторых встречающихся в виде загрязнения сапрофитов, не ферментирующих данный углевод.

Агар Сальмонелла-Шигелла (SS) – плотная селективная среда для выделения сальмонелл и шигелл из различных клинических образцов, еды и т. д. Селективность обеспечена высокой концентрацией солей желчных кислот и бриллиантового зеленого, которые подавляют рост грамположительных бактерий. Что касается грамотрицательной флоры, ее рост подавляется солями лимонной кислоты и тиосульфата. Однако некоторые колиформные микроорганизмы все же могут расти на этой среде. В этом случае отличить патогенные энтеробактерии от условно

патогенных можно по цвету выросших колоний. Окрашивание колоний обусловлено наличием или отсутствием у микроорганизмов фермента, утилизирующего лактозу. Так, на данной среде лактозопозитивные микроорганизмы растут в виде розовых колоний, при этом цвет среды изменяется на красный, а лактозонегативные растут в виде бесцветных колоний, меняя цвет среды на желтый. Если микроорганизмы продуцируют H_2S , то выросшие колонии приобретают черный цвет (рисунок 20).



- A – *Klebsiella pneumoniae*;
- B – *Escherichia coli*;
- C – *Salmonella sp.*;
- D – *Proteus mirabilis*;
- E – *Pseudomonas aeruginosa*

Рисунок 20 – Рост различных микроорганизмов на SS Агаре

Пептон и мясной экстракт обычно стимулируют рост большинства патогенных энтеробактерий, однако некоторые шигеллы очень разборчивы и растут плохо.

Агар Плоскирева – селективная среда для выделения шигелл и сальмонелл. Готовая среда прозрачна, имеет розовато-желтоватый цвет. Среда Плоскирева относится к плотным средам для выделения чистых культур.

В состав среды Плоскирева входят ингибирующие вещества (желчные соли, бриллиантовый зеленый, йод), вследствие чего она должна полностью подавлять рост грамположительной флоры, значительно задерживать (первые 24 ч) рост эшерихий и другой сопутствующей микрофлоры, подавлять роение протей.

Дифференцирующие свойства агара Плоскирева основаны на изменении pH в кислую сторону при росте лактозоферментирующих бактерий, которые образуют колонии брусничного цвета (индикатор нейтральный красный).

Лактозоотрицательные бактерии вырастают в виде бесцветных или слабоокрашенных колоний. Вегетирующие свойства среды недостаточны для роста *S. dysenteriae* и некоторых сальмонелл (*S. choleraesuis*, *S. pullorum*) (рисунок 21).



Рисунок 21 – Рост различных микроорганизмов на агаре Плоскирева

Агар Плоскирева гигроскопичен, светочувствителен. Хранить герметически закрытым в помещении с относительной влажностью воздуха не более 60 % и температурой от 2 °С до 25 °С. Срок годности среды Плоскирева указан на упаковке.

Висмут-сульфит агар – строго селективная среда для выделения сальмонелл. Готовая среда непрозрачна, зеленовато-горохового цвета. Висмут-сульфит агар относится к плотным средам для выделения чистых культур.

Бриллиантовый зеленый и висмут, который находится в среде в виде основного сульфита, подавляют рост грамположительной флоры и многих энтеробактерий, в том числе шигелл.

Рост сальмонелл также может быть несколько задержан, вследствие чего чашки с посевами просматривают через 24 и 48 ч. Агглютинабельность сальмонелл, выросших на этой среде, значительно снижена.

Дифференцирующее действие среды основано на том, что образуемый бактериями из сульфата железа сероводород вызывает почернение индикатора – бесцветного сульфита висмута – вследствие перехода его в сульфид висмута, вещество черного цвета. Поэтому бактерии, образующие сероводород, формируют совсем черные или черные с коричневым или темно-зеленым оттенком колонии, обладающие часто металлическим блеском. Среда под колониями при этом окрашена в черный цвет (рисунок 22).



Рисунок 22 – Висмут-сульфит агар, 24 ч инкубации *Salmonella typhi*

Бактерии, не образующие сероводород, могут вырастать в виде мелких бесцветных, зеленоватых или коричневых колоний.

Висмут-сульфит агар гигроскопичен, светочувствителен.

Хранить герметически закрытым в помещении с относительной влажностью воздуха не более 60 % и температурой от 2 °С до 25 °С. Срок годности висмут-сульфит агара указан на упаковке

Дифференциально-диагностические среды предназначены для выявления ферментов у микроорганизмов. В состав этих сред входит основная питательная среда, обеспечивающая рост изучаемого микроорганизма, субстрат для обнаружения фермента и индикатор, по изменению цвета которого судят о сдвиге рН среды в результате расщепления субстрата.

Среды Гисса используют для изучения ферментации различных углеводов с целью дифференциации чистых культур микроорганизмов. Эти среды рекомендованы для изучения ферментации различных углеводов чистыми культурами микроорганизмов с целью их дифференциации.

После добавления углевода в случае положительной реакции продукты ферментации закисляют среду и она становится желтой. На газообразование при этом указывают пузырьки газа в поплавках. В основу среды входят все компоненты, кроме углеводов. Ее используют в качестве отрицательного контроля или как основу, в которую вносят необходимые углеводы.

Протеозопептон и мясной экстракт обеспечивают присутствие в среде азотистых питательных веществ. Феноловый красный является индикатором рН, который в кислой среде становится желтым. Хлорид натрия обеспечивает оптимальное осмотическое давление.

Сокращенный ряд Гисса: лактоза, глюкоза, мальтоза, сахароза и маннит.

Развернутый ряд: арабиноза, глюкоза, дульцит, галактоза, инозит, лактоза, мальтоза, раффиноза, рамноза, салицин, сорбит, крахмал, сахароза, трегалоза, ксилоза и манит.

Эндо среда – дифференциально-диагностическая среда для выделения и идентификации кишечных бактерий при бактериологических исследованиях пищевых продуктов, сточных вод и пр.

Состав среды Эндо: пептона – 1 %, лактозы – 1 %, двузамещенного фосфорнокислого калия (K_2HPO_4) – 0,35 %, агар-агара – 1,5 %. Все ингредиенты, за

исключением лактозы, растворяют в воде при кипячении или в автоклаве. Во избежание карамелизации сахара лактозу добавляют после растворения всех остальных компонентов среды. Кроме лактозы, среда не должна содержать никаких других углеводов, поэтому при ее изготовлении не рекомендуется использование мясной воды; можно применять любой пептон или гидролизат белков. Индикатор готовят *ex tempore* и добавляют к расплавленной питательной основе. Среда может быть использована сразу после приготовления без предварительной стерилизации; при необходимости ее стерилизуют в течение 30 мин при температуре 110 °С; рН готовой среды 7,4-7,6.

Индикатором служит соединение основного фуксина с сернистокислым натрием. Приготовление индикатора: 0,25 г безводного сернистокислового натрия или 0,5 г кристаллического (из расчета на 100 мл среды) растворяют в 5 мл дистиллированной воды и добавляют спиртовой (1-2 %) раствор основного фуксина до тех пор, пока раствор из красного не превратится в бледно-розовый.

Приготовленный индикатор добавляют к расплавленной питательной основе и после тщательного перемешивания среду разливают в стерильные чашки Петри, которые подсушивают в термостате при 37 °С в течение 30 мин в открытом состоянии. Готовая к употреблению среда Эндо имеет бледно-розовый цвет, либо бесцветна; она должна быть использована в течение суток, так как при длительном хранении происходит покраснение среды и она становится непригодной.

Колонии бактерий, сбраживающих лактозу, на среде Эндо приобретают интенсивно красный цвет с зеленым металлическим блеском (рисунок 23). Бактерии, не сбраживающие лактозу, формируют бесцветные, либо цвета окружающей среды колонии.

В среде Эндо основной фуксин, в химическом отношении являющийся производным солянокислого розанилина, при соединении с сернистокислым натрием вследствие редуцирования обесцвечивается. При росте бактерий, разлагающих лактозу, промежуточный продукт (ацетальдегид), возникающий в результате окисления сахара, реагирует с сернистокислым натрием и фуксин вновь приобретает красный цвет.

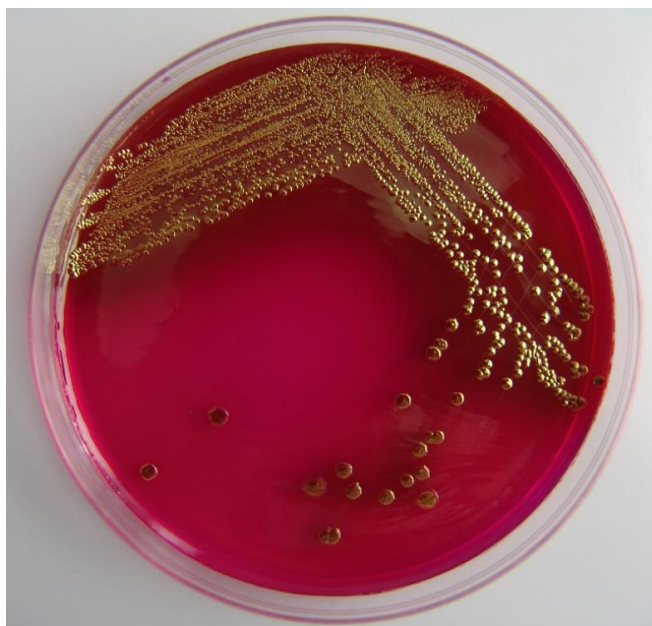


Рисунок 23 – Рост *E. coli* на агаре Эндо

Среда Левина, по целевому назначению аналогична среде Эндо, но содержит другой индикатор. Левина среда (M. Levine; синоним эозин-метиленблау агар) – цветная селективная питательная среда, применяемая для дифференцирования микроорганизмов кишечной группы при микробиологической диагностике кишечных инфекций – брюшного тифа, сальмонеллезов, дизентерии, колиэнтеритов. Стабильна при хранении в течение нескольких дней. Наличие в среде лактозы позволяет выделять патогенную микрофлору, не способную разлагать этот углевод. Входящие в состав среды Левина органические красители задерживают рост сапрофитов, что позволяет использовать среду для непосредственного засева исследуемого материала.

Патогенные бактерии – возбудители брюшного тифа, сальмонеллезов, дизентерии, – не разлагая лактозы, растут на среде Левина в виде мелких, круглых, прозрачных, чаще бесцветных колоний, иногда с розоватым или голубоватым оттенком.

Кишечная палочка образует небольшие гладкие колонии темно-синего цвета (рисунок 24). У молодых колоний окраска может наблюдаться только в центре. Протей растет в виде небольших оранжево-желтых колоний, цвет среды вокруг колоний изменяется.

Колонии других бактерий подобной картины не дают.

Если посев невозможен, то срок транспортировки и хранения в зависимости от вида материала и вероятного микроба при соблюдении определенных условий могут быть увеличены, но не более, чем до суток. Одним из приемов, содействующих сохранению микрофлоры, причем не только при отсрочке посева, но и сразу же при взятии биоматериала, является применение специальных транспортных систем, содержащих транспортные питательные среды. В настоящее время в клинике в качестве транспортных сред (консервантов) используются различные по составу композиции с разной степенью питательной ценности. Использование той или иной из них определяется соответствующими инструкциями, методическими рекомендациями и указаниями, в том числе утвержденными Минздравом РФ. Это могут быть буферные растворы, содержащие только минеральные соли – изотонический раствор хлорида натрия или фосфатно-буферный раствор, а также консерванты, содержащие органические вещества – буферно-глицериновый солевой раствор, глицериновый консервант, 0,15 %-ная пептонная вода, буферно-казеиново-дрожжевая среда.



Рисунок 24 – Рост кишечной палочки на среде Левина

Среда Кери-Блейра была предложена разработчиками в 1954 году. За прошедший длительный период ее рецептура фактически не менялась. Транспортная среда Кери-Блейра предупреждает гибель микробных клеток,

сохраняет их жизнеспособность, но при этом препятствует размножению. Эти свойства среды обеспечиваются ее компонентным составом. Низкая питательная ценность и, прежде всего, отсутствие источников азота и углерода, как ключевых элементов развития популяции, ограничивает процессы роста и размножения микроорганизмов. Процедура использования этой среды заключается в следующем: расплавленную среду Кери-Блейра разливают в стерильные пробирки по 6-9 мл (рисунок 25). Объем среды в пробирках определяется техникой посева.



Рисунок 25 – Транспортная система со средой Кери-Блейра

При посеве мазка, взятого тампоном на тампонодержателе, достаточен небольшой столбик среды – 6 мл. При прямом посеве биоматериала (без тампона) объем среды в пробирке увеличивают. В таком виде среду можно длительно хранить при температуре 2-8 °С. Биологический материал погружают в столбик среды таким образом, чтобы он не оставался на ее поверхности. После этого пробирку с засеянной средой помещают в контейнер и направляют в лабораторию. Среда Кери-Блейра сохраняет жизнеспособность требовательных бактерий около суток, после чего отмечают постепенную гибель клеток. Поэтому пересев с транспортной среды на обогащенные, дифференциально-диагностические или иные питательные среды необходимо проводить в максимально доступные сроки. Вместе с тем, есть данные о

том, что сальмонеллы в этой среде сохраняют жизнеспособность несколько месяцев. Среда Кери-Блейра предназначена для кишечных микроорганизмов.

Среда Эймса используется как транспортная для широкого круга микроорганизмов самых разнообразных биологических субстратов (гной, раневое отделяемое, мокрота, СМЖ и др.), кроме кала. Среда Эймса может быть с углем и без него.

Уголь добавляют в среду Эймса для сорбции микробных метаболитов, негативно влияющих на высокочувствительные патогенные микроорганизмы. В частности, это условие особенно важно для сохранения жизнеспособности гонококков. Техника посева на среду Эймса такая же, как и на среду Кери-Блейра.

4.5 Культивирование грибов

Лучший рост грибов отмечен на средах с содержанием углеводов от 1 % до 4 %. При первичной изоляции для подавления роста различных сопутствующих бактерий в питательные среды часто добавляют различные антибиотики.

Агар Чанека используют для культивирования грибов многих видов.

Сусло-агар предназначен для культивирования возбудителей дерматомикозов и кандидомикоза (рисунок 26).

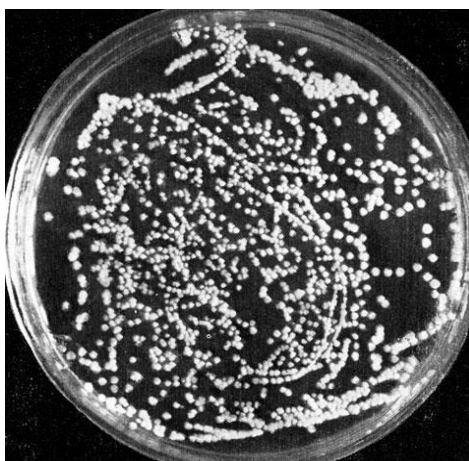


Рисунок 26 – Молочно-белые округлые колонии *Candida albicans* на сусло-агаре

Агар Литмана пригоден для культивирования дерматофитов.

Среда Ван-Итерсона предназначена для выделения из кормов токсичных грибов, вызывающих стахиботриотоксикоз, дендродохитоксикоз и др.

Среда Билай предназначена для получения макроконидий грибов.

Культивирование на волосах по Ванбрейзегему применяют при выделении дерматофитов. Здоровые стерильные волосы прикрепляют коллодием к стеклянной трубочке. На середину волос наносят культуру гриба. Трубочку помещают в цилиндр, на дно которого для влажности наливают небольшое количество воды. Культивируют при 25 °С 5-10 дней и более.

Для выделения возбудителей гистоплазмоза, эпизоотического лимфангита применяют кровяной агар.

4.6 Тестовые задания к разделу «Субстраты для культивирования биообъектов»

1 Постоянным компонентом питательных сред является

- а) кислород;
- б) вода;
- в) углерод;
- г) сера.

2 Клеткам в большом количестве необходимы

- а) биогенные элементы;
- б) макроэлементы;
- в) микроэлементы;
- г) ультрамикроэлементы.

3 При низких концентрациях питательных веществ (от долей до 100 мг/л) растут

- а) прототрофы;

- б) копиотрофы;
- в) олиготрофы;
- г) ауксотрофы.

4 При концентрациях питательных веществ от долей до 100 мг/л растут

- а) прототрофы;
- б) копиотрофы;
- в) олиготрофы;
- г) ауксотрофы.

5 К особенностям метаболизма олиготрофов относят

- а) аэробность;
- б) анаэробность;
- в) малые размеры;
- г) большие размеры.

6 Микроорганизмы, которые обладают мощными литическими ферментами, разрушающими высокомолекулярные соединения, не имеющие гидролаз, называют

- а) прототрофы;
- б) олиготрофы;
- в) гидролитики;
- г) диссипотрофы.

7 Микроорганизмы, не имеющие экзогидролаз и потребляющие те вещества, которые по различным причинам остались неиспользованными гидролитиками и имеются в незначительных количествах, называют

- а) прототрофы;
- б) олиготрофы;
- в) гидролитики;
- г) диссипотрофы.

8 Микроорганизмы, получающие углерод для синтеза клеточных компонентов клеток исключительно из CO_2 , называются

- а) С-автотрофы;
- б) С-органотрофы;
- в) С-литотрофы;
- г) С-гетеротрофы.

9 Микроорганизмы, растущие на средах с такими простыми источниками углерода, как глюкоза, называются

- а) С-автотрофы;
- б) С-органотрофы;
- в) С-литотрофы;
- г) С-гетеротрофы.

10 Отсутствие в среде факторов роста приводит к

- а) бактерицидному эффекту;
- б) бактериостатическому эффекту;
- в) гибели клетки;
- г) остановке роста и развития;

11 Тиамин (витамин B_1) входит в состав

- а) активной группы ферментов, участвующих в реакциях синтеза нуклеотидов;
- б) некоторых коферментов, играющих важную роль в углеводном обмене;
- в) некоторых ферментов, участвующих в реакциях окисления;
- г) клеточных белков.

12 Витамин B_{12} входит в состав

- а) активной группы ферментов, участвующих в реакциях синтеза нуклеотидов;

- б) некоторых коферментов, играющих важную роль в углеводном обмене;
- в) некоторых ферментов, участвующих в реакциях окисления;
- г) клеточных белков.

13 Аминокислоты входят в состав

а) активной группы ферментов, участвующих в реакциях синтеза нуклеотидов;

- б) некоторых коферментов, играющих важную роль в углеводном обмене;
- в) некоторых ферментов, участвующих в реакциях окисления;
- г) клеточных белков.

14 Пиридоксин (витамин В₆)

а) участвует в синтезе клеточных липидов;

б) производные этого фактора роста играют важную роль в обмене аминокислот;

в) участвует в построении ферментных систем бактериальной клетки, в частности кофермента А;

г) входит в состав некоторых ферментов, участвующих в реакциях окисления.

15 Пантотеновая кислота

а) участвует в синтезе клеточных липидов;

б) производные этого фактора роста играют важную роль в обмене аминокислот;

в) участвует в построении ферментных систем бактериальной клетки, в частности кофермента А;

г) входит в состав некоторых ферментов, участвующих в реакциях окисления.

16 Гемин

а) участвует в синтезе клеточных липидов;

б) производные этого фактора роста играют важную роль в обмене аминокислот;

в) участвует в построении ферментных систем бактериальной клетки, в частности кофермента А;

г) входит в состав некоторых ферментов, участвующих в реакциях окисления.

17 Микроорганизмы, которые могут самостоятельно синтезировать факторы роста, называются

а) прототрофы;

б) олиготрофы;

в) ауксотрофы;

г) литотрофы.

18 Микроорганизмы, которые не способны синтезировать факторы роста, называются

а) прототрофы;

б) олиготрофы;

в) ауксотрофы;

г) литотрофы.

19 Термин «прототрофы» предложен

а) К. Вейбулу;

б) М. Сальтоном;

в) Р. Репаске;

г) А. Фишером.

20 Микроорганизмы, использующие солнечный свет для своего роста и развития, называют

а) фототрофы;

б) органотрофы;

в) литотрофы;

г) хемотрофы.

21 Микроорганизмы, использующие энергию химических связей для своего роста и развития, называют

а) фототрофы;

б) органотрофы;

в) литотрофы;

г) хемотрофы.

22 Особенно часто фотоавтотрофы встречаются

а) в водных объектах;

б) в почве;

в) в атмосфере;

г) везде распространены.

23 Особенно мало фотоавтотрофы встречаются

а) в водных объектах;

б) в почве;

в) в атмосфере;

г) везде распространены.

24 «Цветение» воды в мелких водоемах вызывают в первую очередь крупные представители пурпурных бактерий

а) *Chromatiaceae*;

б) *Chlorobiaceae*;

в) *Chromatium*;

г) *Thiospirillum*.

25 Для роста бактерий, осуществляющих дыхание, необходимо присутствие в среде

- а) диссоциатора;
- б) окислителя;
- в) восстановителя;
- г) гидролитика.

26 Микроорганизмы, в качестве доноров электронов для дыхания и биосинтеза использующие неорганические соединения, называют

- а) фототрофы;
- б) органотрофы;
- в) литотрофы;
- г) хемотрофы.

27 Микроорганизмы, в качестве доноров электронов для дыхания и биосинтеза использующие органические соединения, называют

- а) фототрофы;
- б) органотрофы;
- в) литотрофы;
- г) хемотрофы.

28 Наибольшая степень гетеротрофности присуща

- а) сапрофитам;
- б) паразитам;
- в) водным прокариотам;
- г) почвенным прокариотам.

29 Микроорганизмы, использующие в качестве источника углерода органические соединения, в качестве окисляемого субстрата органические соединения и в качестве источника энергии свет, относятся к типу питания

- а) фотоорганогетеротрофия;
- б) фотоорганоавтотрофия;

- в) фотолитогетеротрофия;
- г) хемоорганогетеротрофия;
- д) хемолитогетеротрофия.

30 Микроорганизмы, использующие в качестве источника углерода органические соединения, в качестве окисляемого субстрата неорганические соединения и в качестве источника энергии свет, относятся к типу питания

- а) фотоорганогетеротрофия;
- б) фотоорганогетеротрофия;
- в) фотолитогетеротрофия;
- г) фотолитогетеротрофия;
- д) хемоорганогетеротрофия.

31 Микроорганизмы, использующие в качестве источника углерода углекислый газ, в качестве окисляемого субстрата органические соединения и в качестве источника энергии свет, относятся к типу питания

- а) фотоорганогетеротрофия;
- б) фотоорганогетеротрофия;
- в) фотолитогетеротрофия;
- г) фотолитогетеротрофия;
- д) хемолитогетеротрофия.

32 Микроорганизмы, использующие в качестве источника углерода углекислый газ, в качестве окисляемого субстрата неорганические соединения и в качестве источника энергии свет, относятся к типу питания

- а) фотоорганогетеротрофия;
- б) фотоорганогетеротрофия;
- в) фотолитогетеротрофия;
- г) фотолитогетеротрофия;
- д) хемоорганогетеротрофия.

33 Микроорганизмы, использующие в качестве источника углерода органические соединения, в качестве окисляемого субстрата неорганические соединения и в качестве источника энергии неорганические соединения, относятся к типу питания

- а) фотоорганогетеротрофия;
- б) хемоорганогетеротрофия;
- в) хемоорганоавтотрофия;
- г) хемолитогетеротрофия;
- д) хемолитоавтотрофия.

34 Микроорганизмы, использующие в качестве источника углерода углекислый газ, в качестве окисляемого субстрата неорганические соединения и в качестве источника энергии неорганические соединения, относятся к типу питания

- а) фотоорганогетеротрофия;
- б) фотоорганоавтотрофия;
- в) хемоорганоавтотрофия;
- г) хемолитогетеротрофия;
- д) хемолитоавтотрофия.

35 Микроорганизмы, использующие в качестве источника углерода органические соединения, в качестве окисляемого субстрата органические соединения и в качестве источника углерода органические соединения, относятся к типу питания

- а) фотоорганогетеротрофия;
- б) хемоорганогетеротрофия;
- в) хемоорганоавтотрофия;
- г) хемолитогетеротрофия;
- д) хемолитоавтотрофия.

36 Микроорганизмы, использующие в качестве источника углерода углекислый газ, в качестве окисляемого субстрата органические соединения и в качестве источника энергии органические соединения, относятся к типу питания

- а) фотоорганогетеротрофия;
- б) фотоорганоавтотрофия;
- в) хемоорганоавтотрофия;
- г) хемолитогетеротрофия;
- д) хемолитоавтотрофия.

37 Для цианобактерий характерен тип питания

- а) фотоорганогетеротрофия;
- б) фотоорганоавтотрофия;
- в) фотолитогетеротрофия;
- г) фотолитоавтотрофия;
- д) хемоорганогетеротрофия.

38 Для пурпурных серных бактерий характерен тип питания

- а) фотоорганогетеротрофия;
- б) фотоорганоавтотрофия;
- в) фотолитогетеротрофия;
- г) фотолитоавтотрофия;
- д) хемоорганогетеротрофия.

39 Для пурпурных несерных бактерий характерен тип питания

- а) фотоорганогетеротрофия;
- б) фотоорганоавтотрофия;
- в) фотолитогетеротрофия;
- г) фотолитоавтотрофия;
- д) хемоорганогетеротрофия.

40 Для железобактерий характерен тип питания

- а) фотоорганогетеротрофия;
- б) фотоорганоавтотрофия;
- в) хемоорганоавтотрофия;
- г) хемолитогетеротрофия;
- д) хемолитоавтотрофия.

41 Для нитрифицирующих бактерий характерен тип питания

- а) фотоорганогетеротрофия;
- б) фотоорганоавтотрофия;
- в) хемоорганоавтотрофия;
- г) хемолитогетеротрофия;
- д) хемолитоавтотрофия.

42 Для представителей рода *Azotobacter* характерен тип питания

- а) хемоорганогетеротрофия;
- б) хемоорганоавтотрофия;
- в) хемоорганоавтотрофия;
- г) хемолитогетеротрофия.

43 Для тионовых бактерий характерен тип питания

- а) хемоорганогетеротрофия;
- б) хемоорганоавтотрофия;
- в) хемоорганоавтотрофия;
- г) хемолитогетеротрофия.

44 Вода в микробной клетке составляет от общей массы клетки

- а) 60-70 %;
- б) 70-80 %;
- в) 80-90 %;

г) 90-100 %.

45 Какой процент от массы сухого вещества в клетке составляет углерод?

а) 10 %;

б) 20 %;

в) 30 %;

г) 40 %;

д) 50 %.

46 Какой процент от массы сухого вещества в клетке составляет фосфор?

а) 15 %;

б) 10 %;

в) 8 %;

г) 5 %;

д) 3 %.

47 Галофильным бактериям необходим для роста и развития

а) хлор;

б) магний;

в) натрий;

г) марганец;

д) сера.

48 Какой элемент содержится в цитохромах, ферредоксинах и других железосеропротеидах, кофакторах ферментов (некоторых дегидратаз)?

а) железо;

б) калий;

в) магний;

г) фосфор;

д) сера.

49 Какой элемент является основным неорганическим катионом в клетке, кофактором некоторых ферментов?

- а) железо;
- б) калий;
- в) магний;
- г) фосфор;
- д) сера.

50 Компонентом цистеина, метионина, тиаминпирофосфата, кофермента А, биотина и α -липоевой кислоты является

- а) железо;
- б) калий;
- в) магний;
- г) фосфор;
- д) сера.

51 Осветление питательной среды проводят

- а) всегда;
- б) после варки;
- в) до варки;
- г) после помутнения.

52 Наиболее эффективным методом стерилизации является стерилизация

- а) сухим паром;
- б) влажным паром под давлением;
- в) фильтрацией;
- г) УФ-облучением.

53 В качестве примера питательной среды, полностью состоящей из естественных компонентов, можно назвать

- а) МПА;
- б) агар Эндо;
- в) среду Гисса;
- г) среду Бакли;
- д) среда Игла.

54 Для культивирования клеток млекопитающих используется

- а) МПБ;
- б) агар Эндо;
- в) среда Гисса;
- г) среда Бакли;
- д) среда Игла.

55 Мясо-пептонный агар получают путем добавления агар-агара к

- а) МПБ;
- б) агару Эндо;
- в) среде Гисса;
- г) среде Бакли;
- д) среде Игла.

56 Твердая среда общего назначения, используемая для культивирования ферментативных молочно-кислых бактерий, которые вызывают порчу мясных продуктов (позеленение мяса) и требуют высокого уровня тиамин, называется

- а) агар Эндо;
- б) среда Гисса;
- в) среда Бакли;
- г) среда Игла;
- д) агар АРТ.

57 Элективная жидкая среда, используемая для дифференциации гемокультур бактерий тифопаратифозной группы, называется

- а) агар Плоскирева;
- б) Рапорт-Вайнтрауба среда;
- в) среда Бакли;
- г) среда Игла;
- д) агар АРТ.

58 Селективная среда для выделения шигелл и сальмонелл, называется

- а) агар Плоскирева;
- б) Рапорт-Вайнтрауба среда;
- в) среда Бакли;
- г) среда Игла;
- д) агар АРТ.

59 Для лучшего роста грибов содержание углеводов должно находиться в пределах

- а) 1-4 %;
- б) 5-9 %;
- в) 10-14 %;
- г) 15-19 %.

60 Для культивирования возбудителей дерматомикозов и кандидомикоза предназначен

- а) агар Эндо;
- б) среда Ван-Итерсона;
- в) сусло-агар;
- г) висмут-сульфит агар;
- д) агар Литмана.

61 Для культивирования возбудителей дерматофитов предназначен

- а) агар Эндо;
- б) среда Ван-Итерсона;
- в) сусло-агар;
- г) висмут-сульфит агар;
- д) агар Литмана.

62 Для выделения из кормов токсичных грибов, вызывающих стахиботриотоксикоз, дендродохитоксикоз и др., предназначен

- а) агар Эндо;
- б) среда Ван-Итерсона;
- в) сусло-агар;
- г) висмут-сульфит агар;
- д) агар Литмана.

5 Факторы, влияющие на рост и размножение микроорганизмов

Все существующие микроорганизмы живут в непрерывном взаимодействии с внешней средой, в которой они находятся, поэтому подвергаются разнообразным влияниям. В одних случаях это может способствовать лучшему развитию, в других – подавлять их жизнедеятельность. Необходимо помнить, что изменчивость и быстрая смена поколений позволяет приспособливаться к разным условиям жизни. Поэтому быстро закрепляются новые признаки.

Находясь в процессе развития в тесном взаимодействии со средой, микроорганизмы не только могут изменяться под её воздействием, но могут изменять среду в соответствии с особенностями. Так микробы в процессе дыхания выделяют продукты обмена, которые в свою очередь изменяют химический состав среды, поэтому меняется реакция среды и содержание различных химических веществ.

Изменение условий внешней среды оказывает воздействие на жизнедеятельность микроорганизмов. Физические, химические и биологические факторы среды могут ускорять или подавлять развитие микробов, могут изменять их свойства или даже вызывать гибель.

Результаты действия факторов внешней среды на микроорганизмы могут быть различными:

- 1) благоприятными;
- 2) неблагоприятными (бактериостатическое и бактерицидное действие);
- 3) изменяющими свойства микроорганизмов;
- 4) индифферентными (не оказывающими влияния).

Бактериостатическое действие – подавление размножения бактерий.

Бактерицидное действие вызывает необратимую гибель микроорганизмов. Механизм бактерицидного действия, как правило, связан с повреждающим воздействием этих веществ на клеточные стенки микроорганизмов, ведущим к их гибели.

5.1 Физические факторы, оказывающие влияние на рост и размножение микроорганизмов

Жизнедеятельность каждого микроорганизма ограничена определенными температурными границами. Оптимальная температура обычно приравнивается к температуре окружающей среды. На графике показано, что для каждого организма существует минимальная температура, ниже которой рост не наблюдается; максимальная температура, выше которой рост невозможен, а оптимальная температура всегда ближе к максимальной, чем к минимальной (рисунок 27).

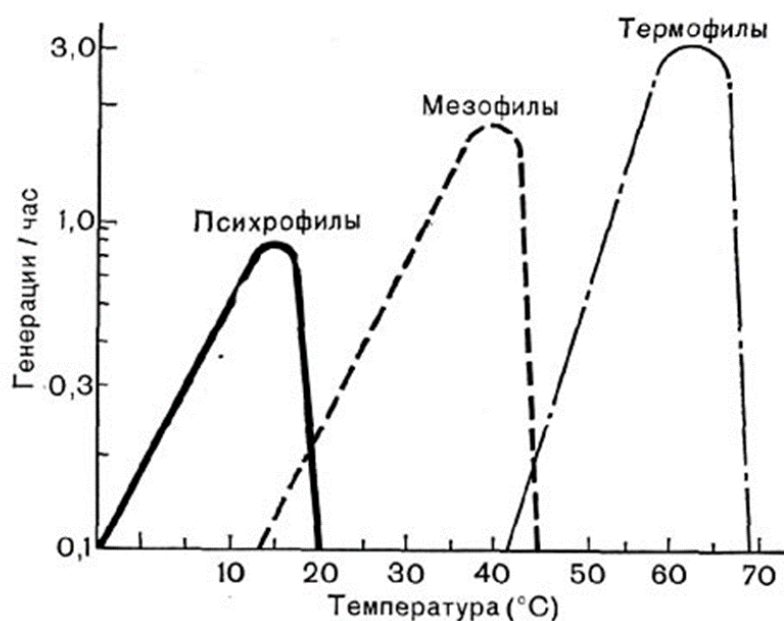


Рисунок 27 – Зависимость скорости роста микроорганизмов от температуры

По отношению к температуре бактерии делят на три группы: психрофилы (греч. *psychria* – холод, *phileo* – люблю), относительно быстро размножающиеся при температуре 0 °С; термофилы (греч. *therme* – жара, тепло), растущие при температуре выше 45-50 °С, мезофилы (греч. *mesos* – средний, промежуточный), развивающиеся в диапазоне умеренных температур (таблица 8).

Таким образом, психрофилы – это холодолюбивые микроорганизмы, растут при низких температурах: $\min t$ – 0 °С, $\text{opt } t$ – от 10 °С до 20 °С, $\max t$ – до 40 °С. К таким микроорганизмам относятся обитатели северных морей и водоемов. К

действию низких температур многие микроорганизмы очень устойчивы. Некоторые микроорганизмы выдерживают температуру до минус 190 °С, а споры бактерий могут выдерживать до минус 250 °С. При низких температурах микроорганизмы впадают в состояние анабиоза, при котором замедляются все процессы жизнедеятельности, протекающие в клетке.

Таблица 8 – Классификация микроорганизмов по отношению к температуре
В °С

Микроорганизмы	min t	opt t	max t
Психрофилы	от – 8 до 10	от 10 до 15	от 15 до 20
Мезофиллы	от 5 до 10	от 30 до 37	от 40 до 45
Термофилы	от 15 до 20	от 40 до 55	от 60 до 70
Экстремальные термофилы	60	от 80 до 105	110

Ко второй группе относятся мезофилы – это наиболее обширная группа бактерий, в которую входят сапрофиты и почти все патогенные микроорганизмы, так как opt температура для них 37 °С (температура тела), min t – 10 °С, max t – 45 °С. Мезофиллами являются все патогенные и условно-патогенные микроорганизмы и большинство сапрофитных.

К третьей группе относятся термофилы – теплолюбивые бактерии, развиваются при t выше 55 °С, min t для них равна 30 °С, max t – от 70 °С до 76 °С. Эти микроорганизмы обитают в горячих источниках. Среди термофилов встречается много споровых форм. Споры бактерий гораздо устойчивей к высоким температурам, чем вегетативные формы бактерий. Например, споры бацилл сибирской язвы выдерживают кипячение в течение 10-20 с. Все микроорганизмы, включая и споровые, погибают при температуре от 165 °С 170 °С в течение часа.

Для экстремальных термофилов характерны следующие температурные параметры: оптимум в области от 80 °С до 105 °С, минимальная граница роста – 60 °С и выше, максимальная – до 110 °С. К экстремальным термофилам относятся организмы из группы архебактерий (представители родов *Thermoproteus*, *Pyrococcus*, *Pyrodictium* и др.).

Для нормальной жизнедеятельности микроорганизмов нужна вода. Высушивание приводит к обезвоживанию цитоплазмы, нарушается целостность цитоплазматической мембраны, что ведет к гибели клетки. Устойчивыми к высушиванию являются возбудители туберкулеза, которые могут сохранять свою жизнеспособность до 9 месяцев, а также капсульные формы бактерий.

Особенно устойчивыми к высушиванию являются споры. Например, споры сибирской язвы могут сохраняться в почве до 100 лет.

Для хранения микроорганизмов и изготовления лекарственных препаратов из бактерий применяется метод лиофильной сушки. Сущность метода состоит в том, что микроорганизмы сначала замораживают при минус 273 °С, а потом высушивают в условиях вакуума. При этом микробные клетки переходят в состояние анабиоза и сохраняют свои биологические свойства в течение нескольких лет. Таким способом изготавливают биопрепарат «Колибактерин», содержащий штаммы *E. coli* (рисунок 28).



Рисунок 28 – Замороженные бактерии (I этап лиофильного высушивания)

Если режим лиофильного высушивания не соблюдался (а для разных видов бактерий он различен), то клеточная стенка у бактерий разрывается и они гибнут (рисунок 29).

Существуют разные формы лучистой энергии, характеризующиеся различными свойствами, силой и характером действия на микроорганизмы.

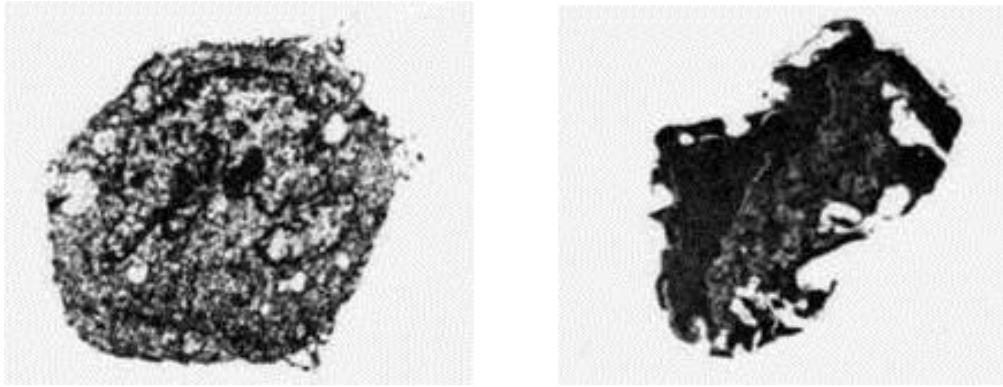


Рисунок 29 – Лиофильно высушенные живая (слева) и погибшая (справа) бактерии

Действие излучений различных диапазонов:

- 1) ИК – нагревание;
- 2) видимый свет – фотосинтез, фототаксис, фотореактивация, фотохимические окислительные процессы, синтез веществ;
- 3) ультрафиолетовое излучение (УФ) – бактерицидный и мутагенный эффекты (чем длина волны (λ) меньше, тем энергия (E) больше);
- 4) ионизирующее излучение – бактерицидный и мутагенный эффекты (рисунок 30).

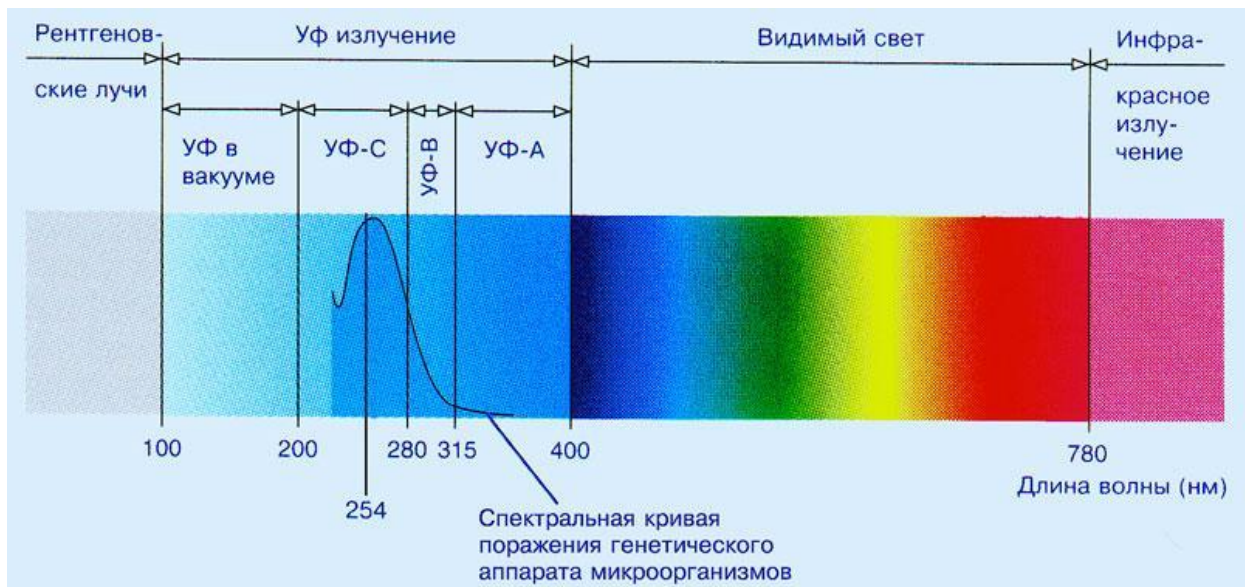


Рисунок 30 – Шкала электромагнитных волн

Вследствие присущей УФ-лучам высокой химической и биологической активности, они вызывают у микроорганизмов инактивацию ферментов, коагуляцию белков, разрушают ДНК, в результате чего наступает гибель клетки. Механизм действия УФ-лучей связан с образованием тиминных димеров в ДНК бактериальных клеток. Сублетальные дозы УФ-лучей оказывают мутагенное действие на бактерии и вирусы (рисунок 31).

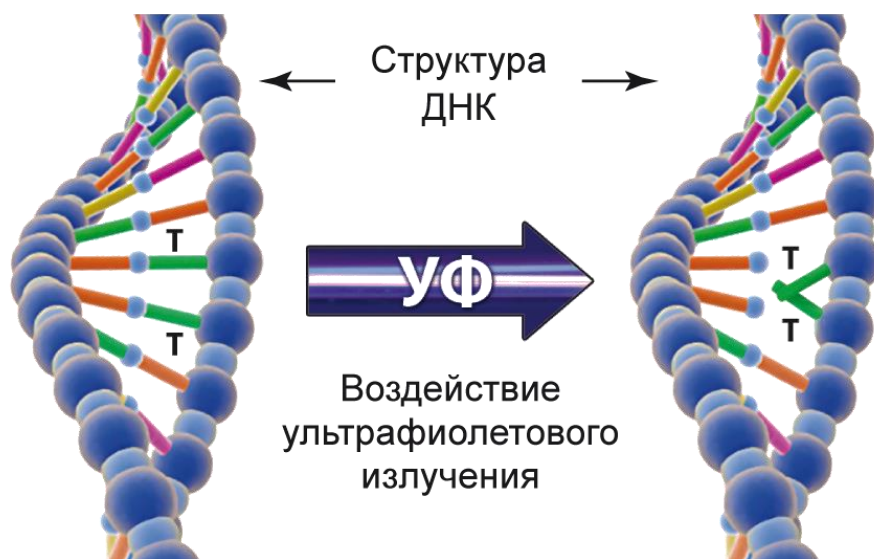


Рисунок 31 – Образование тиминных димеров

Патогенные бактерии более чувствительны к действию УФ-лучей, чем сапрофиты, поэтому в бактериологической лаборатории микроорганизмы выращивают и хранят в темноте.

Бактерицидное действие УФ-лучей используют для стерилизации закрытых помещений: операционных, микробиологических боксов, учебных аудиторий кафедры микробиологии. Для этого применяют бактерицидные лампы ультрафиолетового излучения.

На микроорганизмы оказывают влияние и рентгеновское излучение, α -, β - и γ -лучи, которые оказывают губительное действие на микроорганизмы только в больших дозах. Эти лучи разрушают ДНК клетки. Малые дозы излучений, наоборот, могут стимулировать рост микроорганизмов и вызывать у них мутации.

Сильное влияние оказывает на микроорганизмы и ионизирующее излучение.

Источники ионизирующего излучения:

- 1) естественная радиация (нестабильные изотопы в почве, атмосферных осадках, радиоактивные минералы);
- 2) вторичные космические лучи;
- 3) искусственные ионизирующие излучения: работа АЭС, испытания ядерного оружия и др.

Механизмы повреждающего действия ионизирующего излучения подразделяются на:

- 1) непосредственные повреждения – разрывы;
- 2) опосредованные повреждения возникают в связи с образованием радикалов, вызывающих разрывы или изменения молекул в растворе, вызванные продуктом радиационного разложения воды, а не энергией излучения.

Степень радиоустойчивости некоторых, бактерий значительно превышает предельный уровень радиации, с которым организмы могут сталкиваться в природе.

Степень радиорезистентности зависит от работы систем репарации и регуляции (например, *Deinococcus radiodurans* способен репарировать даже двунитевые разрывы ДНК).

Вызывая нагрев среды, СВЧ-энергия действует губительно на микроорганизмы, при этом происходит повреждение клетки.

СВЧ-энергия влияет на генетические признаки микроорганизмов, на изменение интенсивности деления клетки, активность некоторых ферментов, гемолитические свойства.

Упругие звуковые (УЗ) колебания, частота которых превышает 20 000 герц, т. е. лежит за пределами частот, воспринимаемых человеческим ухом, получили в акустике название ультразвука. Новейшие современные ультразвуковые излучатели дают возможность получать ультразвуковые волны с частотой порядка 300 млн. Гц и выше. От обычных звуковых волн ультразвуковые отличаются значительно меньшей длиной волны и очень большой интенсивностью. Они несут с собой громадный запас механической энергии. Объекты, которые подвергались ультразвуковому воздействию, называются «озвученными».

УЗ-волны могут быть использованы в пищевой промышленности для смешения и гомогенизации продуктов, фильтрации, предотвращения накипеобразования, для стерилизации и пастеризации продуктов, а также для очистки, мойки и дезинфекции оборудования и тары.

Исследования стерилизующего и пастеризующего действия УЗ-волн показали, что УЗ-колебания малой мощности при кратковременном озвучивании не вызывают отмирания микробов. Не погибают микроорганизмы и при продолжительном воздействии слабых УЗ-волн. Кратковременное озвучивание среды УЗ-колебаниями малой мощности способствует механическому разделению скоплений микробных клеток: пакеты сарцин, цепочки стрептококков, скопления стафилококков распадаются на отдельные жизнеспособные клетки; каждая клетка образует новую колонию. Летальное действие УЗ-волн на бактерии и вирусы начинает проявляться при их интенсивности от $1 \text{ Вт/см}^2 \times \text{с}$ и частотой колебаний порядка сотен килогерц. А при озвучивании мощными УЗ-колебаниями наблюдается почти мгновенный разрыв клеточных оболочек, разрушение внутреннего содержимого микробной клетки, вплоть до полного ее растворения. Бактерии более крупные разрушаются полнее и быстрее, чем мелкие; палочковидные бактерии погибают быстрее, чем кокки. Споры бактерий более устойчивы, чем вегетативные клетки.

Механизм бактерицидного действия ультразвука объясняют явлением кавитации. Оно заключается в том, что в озвучиваемой среде возникают быстрые попеременные сжатия и расширения отдельных ее участков. В местах сжатия давление резко возрастает и может достигнуть $10\ 000 \text{ атм}$ ($9,81 \times 10^8 \text{ Н/м}^2$). В местах разрежения в этот же момент происходит разрыв вещества с образованием мельчайших пустот – каверн. В озвучиваемой жидкости каверны заполняются парами данной жидкости или растворенными в ней газами. Каверны непрерывно перемещаются в озвучиваемом субстрате. На месте прежней каверны возникают зоны высокого давления, а рядом образуется новая каверна, где наблюдается почти полный вакуум (рисунок 32).

Микроорганизмы могут выдерживать очень высокие давления, но в зонах кавитации (в кавернах) происходит моментальный разрыв клеточных оболочек

микробов, не выдерживающих высокого внутриклеточного осмотического давления. Не исключена возможность образования кавитационных полостей и в цитоплазме клеток, что приводит к разрушению цитоплазматических структур.

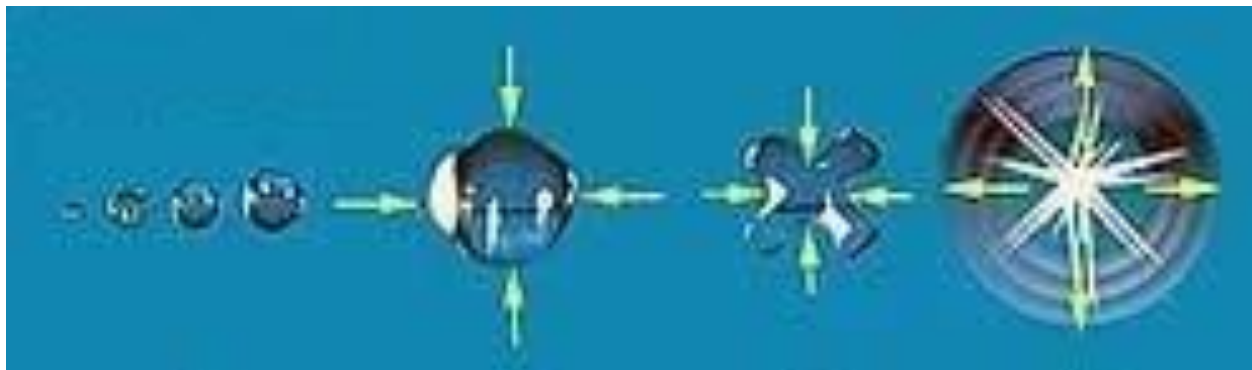


Рисунок 32 – Стадии развития кавитационной полости

То, что в ультразвуковом поле происходит преимущественно механическое разрушение микробов, подтверждают снимки, полученные при помощи электронного микроскопа: у бактерий, подвергавшихся озвучиванию, ясно видны повреждения или даже полное разрушение клеточных оболочек и плазмолиз.

К высокому атмосферному или гидростатическому давлению бактерии очень устойчивы. Споры бактерий переносят давление до 20000 атм. При таком высоком давлении снижается активность бактериальных ферментов и токсинов.

По отношению к гидростатическому давлению микробы делятся на пьезофилов, которые лучше развиваются при давлении выше обычного, а при снижении давления замедляется их скорость роста и нарушаются процессы деления; облигатных пьезофилов, не растущих при обычном давлении; экстремально пьезотолерантных микроорганизмов, которые хорошо растут при давлении больше 600 атм.

При давлении, которое значительно ниже атмосферного, жизнеспособность бактерий обычно не нарушается, однако при падении давления неизбежно уменьшается содержание в среде O_2 , H_2 , CO_2 и других газообразных веществ, что может сильно влиять на рост бактерий. В условиях глубокого вакуума субстрат высыхает и жизнь невозможна.

Сочетанное действие повышенных температур и повышенного давления используется в паровых стерилизаторах для стерилизации паром под давлением.

Нормально процессы питания у микроорганизмов протекают при наличии в субстрате необходимых питательных веществ не только в доступной для данного микроба форме, но и при соответствующих концентрациях, определяющих тургор в живой клетке и осмотическое давление в растворе.

Очень высокая концентрация растворенных в питательной среде веществ приводит к плазмолизу микробных клеток: цитоплазма клетки теряет воду, в клетке нарушается нормальный обмен веществ, изменяется структура цитоплазмы, и в конечном итоге микробная клетка гибнет. Правда, отмирание микробов в растворах с высокой концентрацией солей наступает не сразу.

Благодаря высокой проницаемости цитоплазмы некоторые микроорганизмы могут приспосабливаться к изменению осмотического давления. Способность микроорганизмов развиваться в средах с широко варьирующей осмолярностью называют осмолотерантностью.

У дрожжей и плесеней наблюдается даже способность к активной осморегуляции: в клеточном соке этих микробов накапливаются осмотически активные резервные питательные вещества, благодаря чему они могут сохранять свою жизнеспособность в средах с довольно широкими пределами колебания осмотического давления. Способными к осморегуляции оказываются только клетки, находящиеся в состоянии активной жизнедеятельности. Голодающие клетки и клетки с нарушенным дыхательным обменом к осморегуляции не способны и при повышении осмотического давления сравнительно быстро погибают. Явление плазмолиза микробных клеток в средах с высоким осмотическим давлением лежит в основе консервирования пищевых продуктов концентрированными растворами соли и сахара.

Растворы небольшой концентрации сахара для многих микробов являются хорошей питательной средой, и гибель микробов может быть обусловлена лишь высокой концентрацией сахара, превышающей 65-70 %.

Микроорганизмы, обитающие в условиях высокой солёности, называются галофилами (*Halococcus*).

Влияние осмотического давления на микробную клетку:

1) плазмолиз (потеря воды и гибель клетки) происходит с микроорганизмами, если их помещают в среду с более высоким осмотическим давлением;

2) плазмолиз (поступление воды в клетку и разрыв клеточной стенки) – происходит с микроорганизмами при перемещении их в среду с низким осмотическим давлением (рисунок 33).

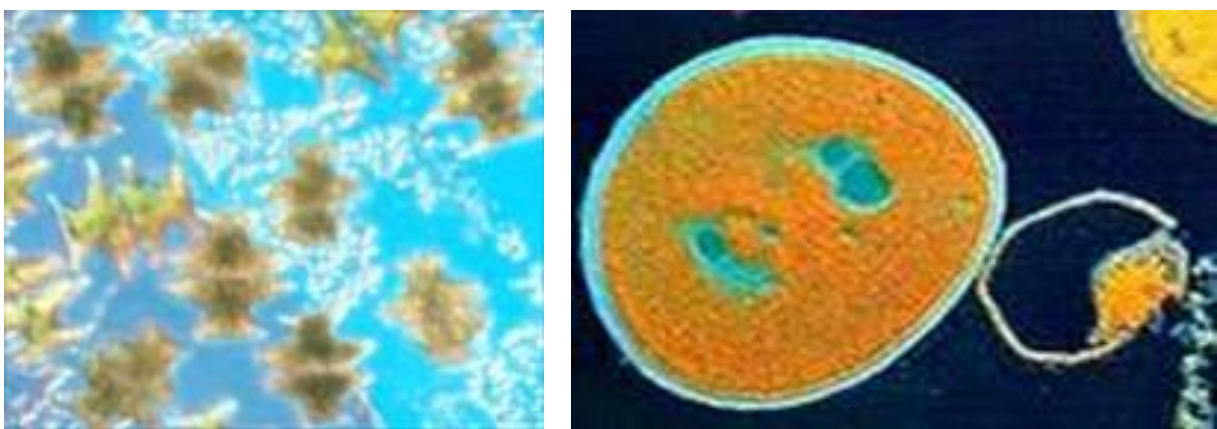


Рисунок 33 – Влияние осмотического давления на микробную клетку: плазмолиз (слева) и плазмолиз (справа)

Доказательств возможности прямого влияния силы гравитации на бактериальные клетки пока не получено. У бактерий не обнаружен геотаксис, то есть способность различать верх и низ, которой обладают некоторые одноклеточные эукариоты. Вместе с тем имеются свидетельства способности бактерий к определенной ориентации в пространстве – об этом говорят, в частности, геометрически правильная форма плодовых тел миксобактерий, к тому же определенным образом ориентированных относительно подлежащего субстрата.

Специфика взаимодействия бактерий с окружающей средой связана с их незначительными размерами. Бактериальная клетка только примерно в 10^4 раз крупнее окружающих ее молекул. Она подвергается постоянной бомбардировке молекулами в результате их беспорядочного теплового движения, и эти удары ощутимы. Неравномерность пространственного распределения ударов приводит к

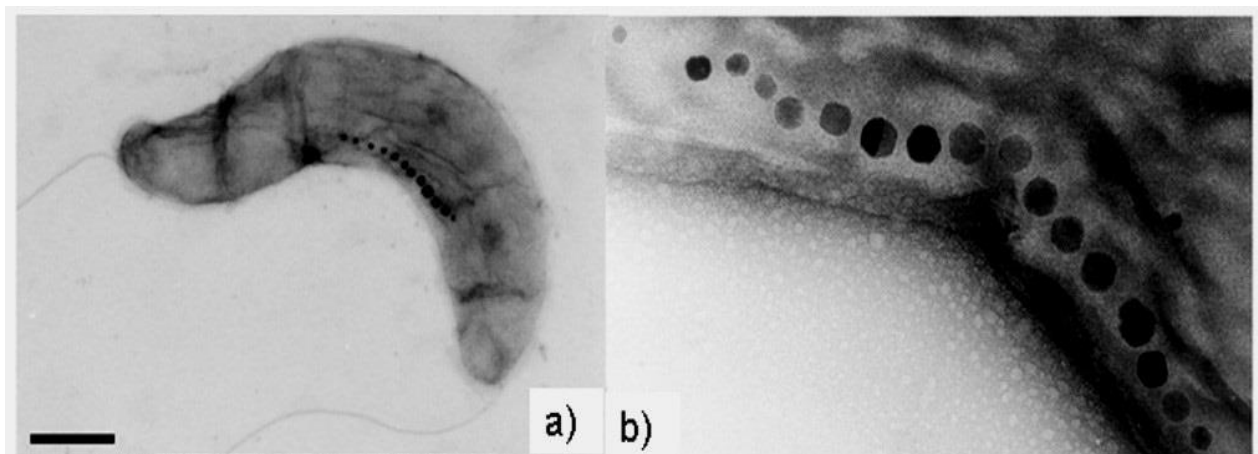
беспорядочным перемещениям клетки каждую секунду на расстояние, примерно соответствующее ее диаметру, и к повороту примерно на 60° . Приобретаемое клеткой при этом ускорение в сотню раз превышает ее ускорение за счет силы земного притяжения. Таким образом, молекулярные взаимодействия, связанные с тепловым движением молекул, действуют на бактерию значительно эффективнее, чем сила земного притяжения.

Есть данные как о стимуляции жизнедеятельности микроорганизмов дополнительными мощными полями, так и об угнетении.

Магнитное поле Земли, видимо, не оказывает заметного влияния на развитие микроорганизмов. Существуют бактерии, имеющие магнитосомы, движение которых направлено вдоль магнитных полей Земли. Они обитают в водоемах с малоподвижной водой. Направление силовых линий магнитного поля Земли таково, что при движении вдоль этих линий бактерии оказываются у поверхности ила, где много пищи и мало O_2 .

В северном полушарии они плывут к Северному полюсу, в южном – к Южному.

В лабораторных условиях магнитобактерии легко утрачивают магнитосомы. Видимо, в природе эта структура полезна для ряда бактерий (рисунок 34).



а – одиночная клетка;

б – увеличенное изображение магнитосомной цепи

Рисунок 34 – Электронограммы клеток *Magnetospirillum gryphiswaldense*

5.2 Химические факторы, оказывающие влияние на рост и размножение микроорганизмов

Важным условием нормальной жизнедеятельности микроорганизмов является поддержание постоянного значения внутриклеточного рН (концентрации водородных ионов).

Классификация микроорганизмов по отношению к концентрации водородных ионов в среде (рН):

- 1) ацидофилы;
- 2) алкалофилы;
- 3) нейтралофилы.

Для ацидофилов оптимальная для жизни рН от 6,0 до 7,0; для алкалофилов – от 9,0 до 10,0; для нейтралофилов – 7,5.

Воздействие рН на микроорганизмы:

1) при низких значениях рН растворимость углекислоты, являющейся основным или даже единственным источником углерода для автотрофных прокариот, понижается, а растворимость некоторых ионов (Cu^{2+} , Mo^{2+} , Mg^{2+} , Al^{3+}) возрастает и достигает уровней, токсичных для многих прокариот;

2) наоборот, при высоких значениях рН растворимость многих катионов (Fe^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+}), необходимых клетке, резко понижается, они выпадают в осадок и, таким образом, становятся недоступными для организмов;

3) рН влияет на состояние веществ в окружающей среде. Органические кислоты в кислой среде находятся в недиссоциированной форме, в которой легко проникают в клетку, становясь токсичными для нее.

Концентрация H^+ (катионов) внешней среды влияет и на равновесие электрических зарядов на поверхности клетки: при низких значениях рН увеличивается суммарный положительный заряд, при высоких – суммарный отрицательный заряд.

Прокариоты, для роста которых O_2 необходим, называют облигатными (обязательными) аэробами. Они не способны получать энергию путем брожения. Их

ферменты осуществляют перенос электронов от окисляемого субстрата к кислороду. К ним относится большинство прокариотных организмов, например, *B. subtilis*, микрококки и др.

Некоторые микроорганизмы не способны к росту при концентрации O_2 , равной атмосферной, но могут расти, если содержание O_2 в окружающей среде будет значительно ниже (порядка 2 %). Такие облигатно аэробные прокариоты получили название микроаэрофилов.

Облигатные анаэробы не используют молекулярный кислород. Более того, он для них токсичен. Многие ферменты этих бактерий денатурируют при контакте с молекулярным кислородом (род *Clostridium*).

Факультативные анаэробы могут жить как при наличии, так и в отсутствии кислорода. Типичными представителями этой группы являются кишечная палочка, стрептококк, стафилококк. Кишечная палочка на среде с углеводами развивается как анаэроб, сбраживая сахара, а затем начинает использовать кислород, как типичный аэробный организм, окисляя до CO_2 и H_2O образовавшиеся продукты брожения (например, молочную кислоту).

Аэротолерантные анаэробы – не способны «переключиться» с анаэробного типа дыхания на аэробный, но не гибнут в присутствии молекулярного кислорода (молочнокислые, маслянокислые бактерии) (рисунок 35).



Рисунок 35 – Классификация бактерий по отношению к кислороду

Молекулярный кислород может использоваться клеткой в энергетическом метаболизме (сопровождается фосфорилированием, если нет – ведет к образованию протондвижущей силы) или включаться в обмен вне связи с получением энергии (свободное ферментативное окисление). Является субстратом для аэробных микроорганизмов.

Многие химические соединения, оказывающие выраженное противомикробное действие, используются в качестве дезинфицирующих веществ и антисептиков.

Степень воздействия химического агента на микроорганизм может быть различной. Она зависит от химического соединения, его концентрации, продолжительности воздействия, а также от индивидуальных свойств микроорганизма.

По механизму действия их можно подразделить на несколько групп:

1) поверхностно-активные вещества, или детергенты. Они представляют собой синтетические соединения с высокой поверхностной активностью, которые обладают моющими, дезинфицирующими и растворяющими свойствами. Детергенты снижают поверхностное натяжение и нарушают регулируемую функцию ЦПМ. Они широко применяются для приготовления дезинфицирующих, бактерицидных, фунгицидных и противовирусных средств.

К ним относятся жирные кислоты, обычные мыла, многие полимерные соединения, содержащие от 8 до 20 атомов углерода (додецилсульфат, сульфанола и др.);

2) фенол, крезол и их производные. Эти вещества обладают бактерицидными, фунгицидными и противовирусными свойствами вследствие коагуляции микробных белков;

3) окислители. К ним относится ряд хлорпроизводных дезинфицирующих веществ (хлорная известь, хлорамин), применяют йод, перманганат калия, перекись водорода. Механизм антимикробного действия окислителей состоит в их взаимодействии с микробными белками, что сопровождается инактивацией и денатурацией последних;

4) формальдегид. Применяется в виде 40 %-ного раствора (формалин) для дезинфицирующих целей; формалин блокирует аминокруппы белков и вызывает их денатурацию.

5) соли тяжелых металлов (ртути, свинца, серебра и др.). Эти соли коагулируют белки микробной клетки, вследствие чего клетки погибают. Они обладают также противовирусным свойством. Изделия из серебра при контакте с водой придают ей бактерицидные свойства: увеличивают проницаемость клеточной стенки ЦПМ (рисунок 36);



Рисунок 36 – Влияние ионов серебра на бактериальную клетку

б) красители (бриллиантовый зеленый, риванол, трипофлавин, метиленовая синь) – обладают сродством к фосфорнокислым группам нуклеиновых кислот и нарушают процесс деления бактерий. Многие красители используются в составе антисептиков.

Бактерицидный эффект кислот (салициловая, борная) и щелочей (едкий натр) на микроорганизмы обуславливается:

- дегидратацией микроорганизмов;
- изменением рН среды;
- гидролизом коллоидных систем;

- образованием кислотных и щелочных альбуминатов.

Новое поколение дезинфицирующих средств – четвертичные аммонийные соединения (ЧАС) и их соли.

Одним из наиболее эффективных дезинфицирующих средств на сегодняшний день является «Велтолен» – жидкий концентрат на основе уникальной отечественной запатентованной субстанции «Велтон» (клатрат ЧАС с карбамидом).

«Велтолен» оказывает бактерицидное, фунгицидное, спорулицидное и вирулицидное действие в невысоких концентрациях, безвреден для животных и человека, экологически безопасен (рисунок 37).



Рисунок 37 – Механизмы противомикробного действия «Велтолена»

Антимикробное действие 0,5 %-ного раствора «Велтолена» на возбудителя сибирской при экспозиции 15 мин вызывает отслоение клеточной стенки, ее разрыв и вакуолизацию цитоплазмы (рисунок 38).

Химические вещества, способные оказывать бактерицидное действие на разные группы микроорганизмов, используют для дезинфекции.

Дезинфекция (уничтожение инфекции, обеззараживание объектов окружающей среды) – это комплекс мероприятий, направленный на уничтожение возбудителей инфекционных болезней в окружающей среде.

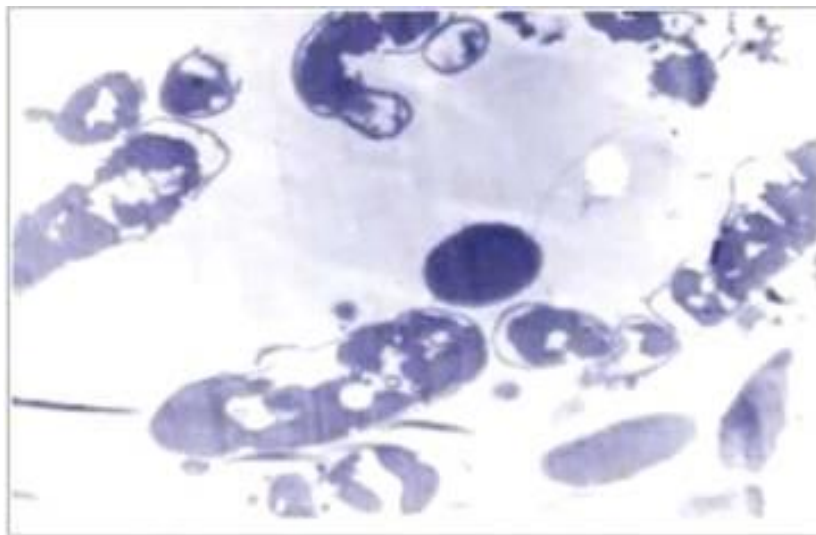


Рисунок 38 – Антимикробное действие 0,5 %-ного раствора «Велтолена» на *B. anthracis* при экспозиция 15 мин

Другими словами, дезинфекция – это уничтожение патогенных микроорганизмов во внешней среде с помощью химических веществ, обладающих антимикробным действием.

Дезинфекция с помощью химических веществ в качестве составляющей входит в совокупность мер, направленных на уничтожение микроорганизмов не только в окружающей среде, но и в макроорганизме, например, в ране и является основой асептики и антисептики.

Асептика – это комплекс профилактических мероприятий, направленных на предупреждение попадания микроорганизмов в рану или организм человека и животного.

Антисептика – это комплекс мероприятий, направленных на уничтожение микроорганизмов в ране или в организме в целом, на предупреждение и ликвидацию воспалительного процесса.

К антисептическим химическим веществам относятся красители (метиленовый синий, бриллиантовый зеленый), которые обладают денатурирующим

и литическим эффектом, и производные 8-окси-хинолина (хинозол, нитроксалин, хинолон) и нитрофурана (фурацилин, фуразолидон), которые нарушают биосинтетические и ферментативные процессы в бактериальной клетке.

5.3 Биологические факторы, оказывающие влияние на рост и размножение микроорганизмов

Во внешней среде и в организме человека и животных обитает огромное количество разных видов микроорганизмов, которые по-разному взаимодействуют между собой (таблица 9).

Таблица 9 – Основные виды взаимоотношений микроорганизмов

Тип взаимодействия	Значимость для 1 вида	Значимость для 2 вида
Нейтрализм	0	0
Антагонизм – продукция антибактериальных веществ	0 (+)	-
Аменсализм	-	-
Паразитизм	+	-
Мутуализм	+	+
Метабиоз	+/0	+/+
Симбиоз	+	+

Основным видом взаимоотношений является симбиоз («symbiosis» – совместная жизнь) – охватывает все формы тесного сожительства организмов разных видов, включая и паразитизм, который в этом случае называется антагонистическим симбиозом.

Основой для возникновения симбиоза могут быть трофические, пространственные и другие типы взаимоотношений. Симбиоз бывает факультативным, когда каждый из организмов при отсутствии партнера может жить самостоятельно, и облигатным, когда один из организмов (или оба) оказывается в такой зависимости от другого, что самостоятельное существование невозможно.

Антагонизм – подавление одних видов микроорганизмов другими (конкуренция, паразитизм, антибиоз).

Конкуренция – один микробный вид обладает большей приспособляемостью к условиям среды и при интенсивном размножении вызывает истощение питательной среды, тем самым препятствует росту других микроорганизмов (конкуренция за источник питания).

Паразитизм – пользу от сожительства получает лишь паразит, нанося вред хозяину (гибель хозяина).

Антибиоз – способность одного вида микроорганизма выделять токсические вещества, угнетающие жизнедеятельность других видов (антибиотики).

Под влиянием бактерий-антагонистов:

- 1) микроорганизмы перестают расти и размножаться;
- 2) клетки микроорганизмов лизируются (растворяются);
- 3) тормозятся или останавливаются биохимические процессы внутри клеток, например дыхание, синтез аминокислот.

Метабиоз – один из микроорганизмов использует продукт жизнедеятельности другого и создает условия для его развития. Например, почвенные бактерии аммонификаторы ферментируют питательный субстрат с образованием аммиака, который усваивают нитрификаторы, в результате чего бурно размножаются.

Комменсализм – сосуществование двух разных микроорганизмов, полезное для одного из них (комменсала) и безразличное для другого (хозяина).

Мутуализм – такие взаимоотношения между микроорганизмами, которые основаны на взаимной выгоде. Например, совместное существование в природе анаэробных и аэробных микроорганизмов.

Хищничество – нападение одного вида бактерии на другой с целью использования другого вида в качестве пищи.

Bdellovibrio bacteriovorus – мелкие вибрионы диаметром от 0,2 до 0,5 и длиной от 0,5 до 1,4 мкм, прикрепляются к наружной мембране и проникают в периплазматическое пространство жертвы. Клетка жертвы раздувается и округляется, превращаясь в так называемый «бделлобласт» (рисунок 39).

Используя бактериальную клетку в качестве пищи *Bdellovibrio bacteriovorus* растёт, но не делится – превращается в длинную спиральную клетку. Израсходовав запасы пищи, она делится на множество коротких подвижных клеток, которые выходят наружу через оболочку жертвы (рисунок 40).

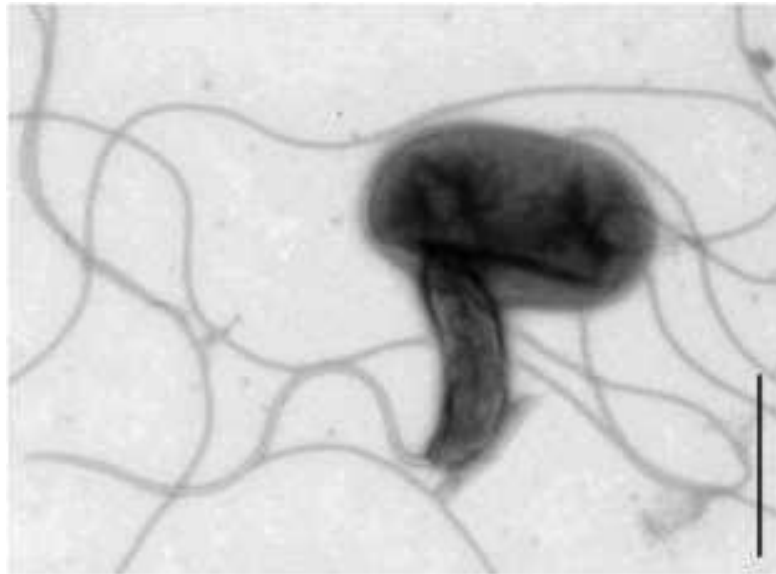


Рисунок 39 – *Bdellovibrio bacteriovorus* проникает в сальмонеллу



Рисунок 40 – Жизненный цикл бделловибрионов – хищных бактерий

Нейтрализм – микроорганизмы не оказывают друг на друга никакого влияния.

5.4 Антибиотики

Наибольший интерес для науки и практики представляют различные биологически активные вещества, образующиеся в процессе жизнедеятельности микроорганизмов, и одними из них являются антибиотики.

Антибиотики – продукты метаболизма живых организмов или их аналоги, получаемые синтетическим путем, способные избирательно подавлять рост микроорганизмов.

Термин «антибиотик» был предложен В. Вьюиеном в 1889 г., чтобы обозначить действующий агент процесса «антибиоза», т. е. сопротивления, оказываемого одним живым организмом другому.

Антибиотики обладают избирательной токсичностью, они нарушают жизненно важные функции бактерий, не оказывая влияния (или оказывая минимальное влияние) на клетки инфицированного организма.

Причина такой избирательности заключается в том, что бактерии обладают специализированной и особым образом построенной клеточной стенкой, тогда как клетки млекопитающих – обычной клеточной мембраной. В связи с этим вещества, нарушающие синтез или целостность стенки бактериальной клетки, являются токсичными для бактерий, но безвредными для клеток организма-хозяина (рисунок 41).

«Феномен жемчужного ожерелья» у возбудителя сибирской язвы при выращивании его на питательной среде с пенициллином. В результате действия на *B. anthracis* пенициллина, у возбудителя разрушается клеточная стенка, образуются шаровидные протопласты, соединенные между собой в виде нитки бус (рисунок 42).

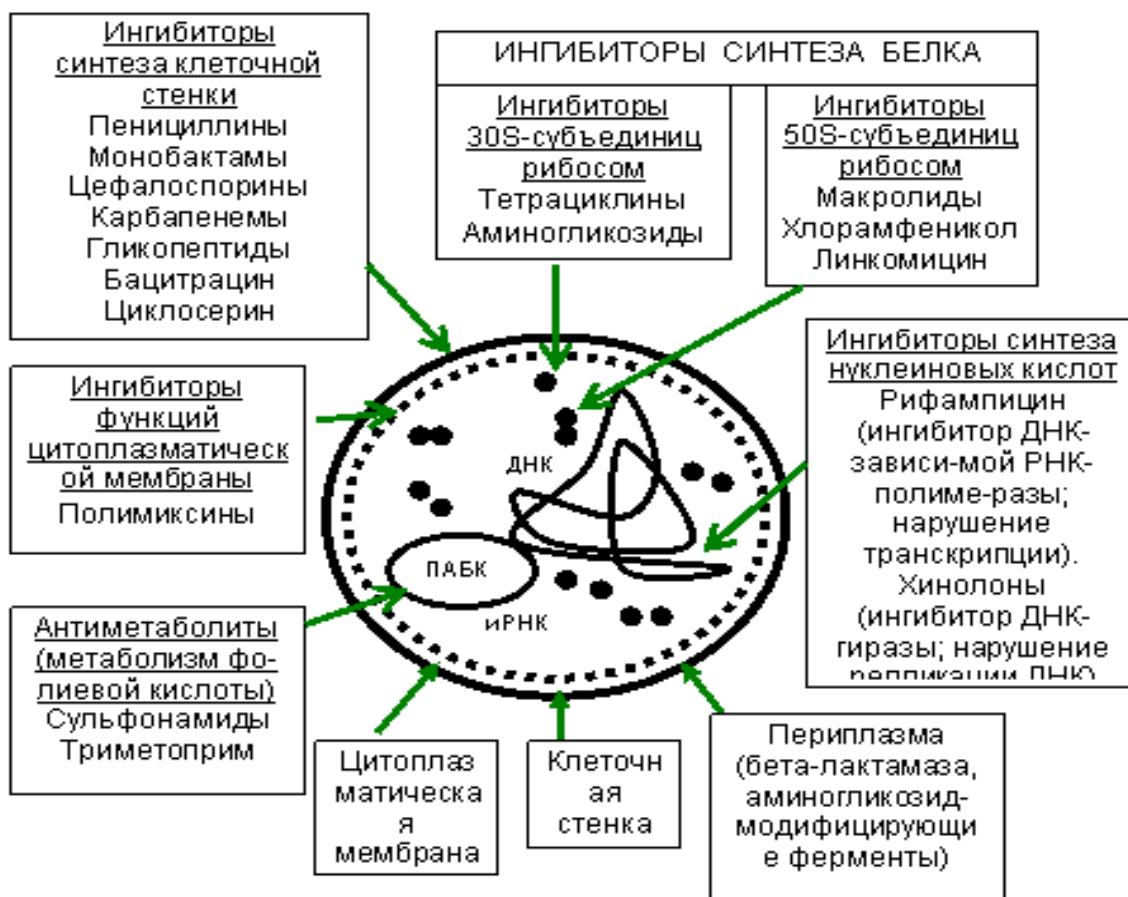


Рисунок 41 – Механизмы действия антибиотиков на бактерии



Рисунок 42 – «Феномен жемчужного ожерелья» у возбудителя сибирской язвы при выращивании его на питательной среде с пенициллином

5.5 Пробиотики

Наряду с антибиотиками на микроорганизмы негативно влияют бактерии-антагонисты, на основе которых созданы биопрепараты, называемые пробиотиками.

Пробиотики – это биопрепараты, которые содержат живые, антагонистически активные в отношении патогенных и условно-патогенных микроорганизмов «полезные» бактерии (лактобациллы, бифидобактерии и др.), применяемые для профилактики и лечения инфекционных (в основном, желудочно-кишечных) болезней человека и животных.

Пробиотики широко используются в медицине и ветеринарии для профилактики дисбактериоза, восстановления кишечного биоценоза при стрессах и антибиотикотерапии.

Возможные механизмы действия пробиотиков:

- 1) подавление живых патогенных и условно-патогенных микроорганизмов:
 - а) продукция антибактериальных веществ – бактериоцинов;
 - б) конкуренция за источники питания;
 - в) конкуренция за рецепторы адгезии;
- 2) влияние на микробный антагонизм:
 - а) уменьшение ферментативной активности;
 - б) увеличение ферментативной активности;
- 3) стимуляция иммунитета:
 - а) увеличение уровня антител;
 - б) увеличение активности макрофагов.

5.6 Бактериофаги

Бактериофаги – это вирусы, обладающие способностью проникать в бактериальные клетки, репродуцироваться в них и вызывать их лизис.

Фаги более устойчивы во внешней среде, чем бактерии. Выдерживают давление до 6000 атм., устойчивы к действию радиации, до 13 лет не теряют своих литических свойств, находясь в запаянных ампулах.

Некоторые вещества, например, хлороформ и ферментативные яды (цианид, фторид), не оказывают влияния на фаги, но вызывают гибель бактерий. Однако фаги быстро погибают при кипячении, действии кислот, УФ-лучей.

По механизму взаимодействия с клетками фаги подразделяются на вирулентные и умеренные.

Феномен бактериофагии, вызываемый вирулентными фагами, проходит в 5 фаз:

- 1) адсорбция с помощью нитей хвостового отростка;
- 2) проникновение в клетку;
- 3) репродукция белка и нуклеиновой кислоты внутри клетки;
- 4) сборка и формирование зрелых фагов;
- 5) лизис клетки, выход фага из клетки.

Лизогенизация бактерий сопровождается изменением их морфологических, культуральных, ферментативных, антигенных и биологических свойств (рисунок 43).

Умеренные фаги не лизируют все клетки, а с некоторыми вступают в симбиоз. Клетка выживает. Умеренный фаг превращается в профаг, который не обладает литическим действием.

Т. о. микроорганизмы подвержены постоянному воздействию факторов внешней среды. Изучение благоприятных факторов позволяет создать необходимые условия для культивирования микроорганизмов. Неблагоприятные воздействия могут приводить к гибели, то есть оказывать микробицидный эффект, либо подавлять размножение микробов, оказывая статическое действие. Некоторые воздействия оказывают избирательный эффект на отдельные виды, другие – проявляют широкий спектр активности. На основе этого созданы методы подавления жизнедеятельности микробов, которые используются в биотехнологическом производстве.



Рисунок 43 – Разрушенная фагами бактерия (выход бактериофагов из бактериальной клетки методом взрыва)

5.7 Тестовые задания к разделу «Факторы, влияющие на рост и размножение микроорганизмов»

1 Бактериостатическое действие факторов относят к

- а) благоприятным воздействиям
- б) неблагоприятным воздействиям
- в) индифферентным воздействиям
- г) воздействиям, изменяющим свойства микроорганизмов

2 Микроорганизмы, относительно быстро размножающиеся при температуре 0 °С, называются

- а) психрофилы
- б) мезофилы
- в) термофилы
- г) экстремальные термофилы

3 Микроорганизмы, растущие при температуре выше 45-50 °С, называются

- а) психрофилы
- б) мезофилы
- в) термофилы
- г) экстремальные термофилы

4 Микроорганизмы, развивающиеся в диапазоне умеренных температур, называются

- а) психрофилы
- б) мезофилы
- в) термофилы
- г) экстремальные термофилы

5 Микроорганизмы, развивающиеся при температурах выше 60 °С, называются

- а) психрофилы
- б) мезофилы
- в) термофилы
- г) экстремальные термофилы

6 Обитатели северных морей и водоемов являются

- а) психрофилами
- б) мезофилами
- в) термофилами
- г) экстремальными термофилами

7 Сапрофиты и почти все патогенные микроорганизмы являются

- а) психрофилами
- б) мезофилами
- в) термофилами

г) экстремальными термофилами

8 Микроорганизмы, обитающие в горячих источниках, называются

а) психрофилами

б) мезофилами

в) термофилами

г) экстремальными термофилами

9 Организмы из группы археобактерий (например, представители родов *Thermoproteus*, *Pyrococcus*, *Pyrodictium* и др.) относятся к

а) психрофилам

б) мезофилам

в) термофилам

г) экстремальным термофилам

10 Высушивание микроорганизмов приводит к

а) обезвоживанию цитоплазмы

б) нарушению ядра

в) распаду рибосом

г) нарушению целостности цитоплазматической мембраны

11 Ультрафиолетовое излучение вызывает

а) фотохимические окислительные процессы

б) синтез веществ

в) бактерицидный и мутагенный эффекты

г) нагревание

12 Инфракрасный свет вызывает

а) фотохимические окислительные процессы

б) синтез веществ

- в) бактерицидный и мутагенный эффекты
- г) нагревание

13 Видимый свет вызывает

- а) фотохимические окислительные процессы
- б) синтез веществ
- в) бактерицидный и мутагенный эффекты
- г) нагревание

14 Ионизирующее излучение вызывает

- а) фотохимические окислительные процессы
- б) синтез веществ
- в) бактерицидный и мутагенный эффекты
- г) нагревание

15 Образование тиминовых димеров – результат действия

- а) ультрафиолетового излучения
- б) видимого света
- в) ионизирующего излучения
- г) инфракрасного света

16 Явление кавитации объясняет действие

- а) ультрафиолетового излучения
- б) видимого света
- в) ионизирующего излучения
- г) инфракрасного света
- д) УЗ-волн

17 Микроорганизмы, для которых оптимальная для роста и развития рН составляет от 6,0 до 7,0, называются

- а) ацидофилы
- б) алкалофилы
- в) нейтралофилы

18 Микроорганизмы, для которых оптимальная для роста и развития рН составляет от 9,0 до 10,0, называются

- а) ацидофилы
- б) алкалофилы
- в) нейтралофилы

19 Микроорганизмы, для которых оптимальная для роста и развития рН составляет 7,5, называются

- а) ацидофилы
- б) алкалофилы
- в) нейтралофилы

20 Микроорганизмы, не использующие молекулярный кислород, который для них еще и токсичен, называют

- а) микроаэрофилы
- б) облигатные анаэробы
- в) факультативные анаэробы
- г) аэротолерантные анаэробы

21 Микроорганизмы, которые могут жить как при наличии, так и в отсутствии кислорода, называют

- а) микроаэрофилы
- б) облигатные анаэробы
- в) факультативные анаэробы
- г) аэротолерантные анаэробы

22 Микроорганизмы, которые не способны к росту при концентрации O_2 , равной атмосферной, но могут расти, если содержание O_2 в окружающей среде будет значительно ниже (порядка 2 %), называют

- а) микроаэрофилы
- б) облигатные анаэробы
- в) факультативные анаэробы
- г) аэротолерантные анаэробы

23 Микроорганизмы, которые не способны «переключиться» с анаэробного типа дыхания на аэробный, но не гибнут в присутствии молекулярного кислорода, называют

- а) микроаэрофилы
- б) облигатные анаэробы
- в) факультативные анаэробы
- г) аэротолерантные анаэробы

24 Один микробный вид обладает большей приспособляемостью к условиям среды и при интенсивном размножении вызывает истощение питательной среды, тем самым препятствует росту других микроорганизмов – это

- а) симбиоз
- б) антагонизм
- в) конкуренция
- г) паразитизм
- д) антибиоз

25 Подавление одних видов микроорганизмов другими, называют

- а) симбиоз
- б) антагонизм
- в) конкуренция
- г) паразитизм

д) антибиоз

26 Пользу от сожительства получает лишь паразит, нанося вред хозяину (гибель хозяина) – такой вид взаимоотношений получил название

а) симбиоз

б) антагонизм

в) конкуренция

г) паразитизм

д) антибиоз

Список использованных источников

- 1 Алешукина, А. В. Медицинская микробиология : учебное пособие для вузов / А. В. Алешукина. – Ростов н/Д : Феникс, 2003. – 437 с.
- 2 Асонов, Н. Р. Микробиология / Н. Р. Асонов. – М. : Колос, 2007. – 352 с.
- 3 Безбородов, А. М. Микробиологический синтез / А. М. Безбородов, Г. И. Квеситадзе. – СПб. : Проспект науки, 2011. – 140 с.
- 4 Бирюков, В. В. Основы промышленной биотехнологии / В. В. Бирюков. – М. : Колосс, 2004. – 296 с.
- 5 Борисов, Л. Б. Медицинская микробиология, вирусология, иммунология / Л. Б. Борисов. – М. : Медицинское информационное агентство, 2002. – 736 с.
- 6 Варфоломеев, С. Д. Биотехнология: кинетические основы микробиологических процессов : учеб. пособие / С. Д. Варфоломеев, С. В. Калюжный. – М. : Высш. шк., 1990. – 296 с.
- 7 Воробьев, А. А. Медицинская и санитарная микробиология : учеб. пособие для студ. мед. вузов / А. А. Воробьев, Ю. С. Кривошеин, В. П. Ширококов. – 3-е изд., стер. – М. : Академия, 2008. – 464 с.
- 8 Воробьев, А. А. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология / А. А. Воробьев. – М. : МИА, 2004. – 690 с.
- 9 Горохова, С. С. Основы микробиологии, производственной санитарии и гигиены / С. С. Горохова, Н. А. Прокопенко, Н. В. Косолапова. – М. : ИЦ Академия, 2012. – 64 с.
- 10 Градова, Н. Б. Лабораторный практикум по общей микробиологии / Н. Б. Градова, Е. С. Бабусенко, И. Б. Горнова. – М. : Дели принт, 2004. – 144 с.
- 11 Грачев, Ю. П. Математические методы планирования экспериментов / Ю. П. Грачев, Ю. М. Плаксин. – М. : Дели принт, 2005. – 296 с.
- 12 Громова, Н. Ю. Технология синтеза и биосинтеза биологически активных веществ / Н. Ю. Громова, Ю. Ю. Косивцов, Э. М. Сульман. – Тверь : ТГТУ, 2006. – 84 с.

- 13 Громовых, Т. И. Методы выделения и культивирования бактерий и грибов. Общая биотехнология : учебное пособие / Т. И. Громовых. – М. : Первый МГМУ им. И. М. Сеченова, 2014. – 112 с.
- 14 Грязнева, Т. Н. Физиология микроорганизмов / Т.Н. Грязнева. – М. : ФГОУ ВПО МГАВМиБ, 2011. – 23 с.
- 15 Гусев, М. В. Микробиология : учеб. для вузов / М. В. Гусев, Л. А. Минеева. – 9-е изд., стер. – М. : Академия, 2010. – 464 с
- 16 Дроздова, Т. Е. Основы биотехнологии / Т. Е. Дроздова, Е. П. Иванова. – М. : МГОУ, 2001. – 204 с.
- 17 Емцев, В. Т. Микробиология / В. Т. Емцев, Е. Н. Мишустин. – М. : Дрофа, 2008. – 448 с.
- 18 Каменный, В. И. Подготовка питательных сред и культивирование микроорганизмов : учебное пособие / В. И. Каменный. – Архангельск : АГТУ, 2008. – 175 с.
- 19 Ленгелер, Й. Современная микробиология. Прокариоты / Й. Ленгелер, Г. Дреус, Г. Шлегель. – М. : Мир, 2005. – 656 с.
- 20 Нетрусов, А. И. Микробиология : учебник для вузов / А. И. Нетрусов, И. Б. Котова. – 3-е изд., испр. – М., 2009. – 352 с.
- 21 Нетрусов, А. И. Экология микроорганизмов / А. И. Нетрусов, Е. А. Бонч-Осмоловская, В. М. Горленко. – М. : Издательский центр «Академия», 2004. – 272 с.
- 22 Пиневиц, А. В. Микробиология. Биология прокариотов / А. В. Пиневиц. – СПб. : Изд-во С.-Петербур., 2006. – 352 с.
- 23 Поляк, М. С. Питательные среды для медицинской микробиологии / М. С. Поляк, В. И. Сухаревич, М. Э. Сухаревич. – Санкт-Петербург : изд-во НИЦФ, 2002. – 80 с.
- 24 Прозоркина, Н. В. Основы микробиологии, вирусологии и иммунологии / Н. В. Прозоркина, Л. А. Рубашкина. – Ростов н/Д : Феникс, 2012. – 387 с.
- 25 Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии с основами асептики и биотехнологии : учеб. пособие / Н. А. Заикина [и др.]. – Курск : КГМУ, 2002. – 236 с.

26 Тец, В. В. Руководство к практическим занятиям по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии / В. В. Тец. – М. : «Медицина», 2002. – 361 с.

27 Физиология роста микроорганизмов : учеб. пособие / И. Ф. Каримов [и др.]. – Оренбург : изд-во ООО ИПК «Университет», 2014. – 260 с.

28 Филина, Н. Ю. Экологическая физиология микроорганизмов : учебное пособие / Н. Ю. Филина, Н. В. Верховцева. – Ярославль : Ярославский гос. ун-т, 2001. – 92 с.

29 Шлегель, Г. Общая микробиология / Г. Шлегель. – М. : «Мир», 1987. – 235 с.

Учебное пособие

Елена Сергеевна Алешина

Елена Александровна Дроздова

Наталья Александровна Романенко

**КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ
КАК ОСНОВА БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО
ПРОЦЕССА**

ISBN 978-5-7410-1658-9



9 785741 016589