

## ВВЕДЕНИЕ

В биологических технологиях используют большое биологическое разнообразие организмов *прокариот* и *эукариот*, размеры которых очень малы и измеряются тысячными долями миллиметров и менее. При работе с различными по физиологии группами организмов часто используются одинаковые методы, основными из которых являются выделение – изоляция определенного микроорганизма из существующих в природе смешанных популяций, и культивирование – выращивание микробной популяции в искусственной среде в лабораторных или производственных условиях. Они в принципе одинаковы при изучении бактерий (прокариот), микроскопических грибов, водорослей, простейших (эукариот). Более того, в последние годы аналогичные методы стали применяться и при работе с линиями клеток или тканей высших растений и животных.

Основой большинства биотехнологических процессов является управляемый биосинтез с использованием микроорганизмов как традиционных биологических агентов. В связи с этим, для получения культур микроорганизмов необходимо изучение методов их выделения, поддержания и культивирования. Кроме того, для управляемого культивирования необходимо знание процессов планирования эксперимента.

В условиях увеличения объема научно-технической информации, быстрого обновления знаний необходима подготовка в высшей школе высококвалифицированных специалистов в области биотехнологии, способных к самостоятельной творческой работе и внедрению в производственный процесс новейших научных результатов. Учебное пособие составлено в соответствии с действующими программами дисциплин специальности «Биотехнология» и позволяет осуществить основные рекомендуемые работы. В учебном пособии даются некоторые работы, выходящие за пределы программ; рекомендуется их использование в практикуме или в исследованиях по курсовым и дипломным работам.

# 1 КУЛЬТУРЫ МИКРООРГАНИЗМОВ

## 1.1 Общая характеристика

При изучении отдельных клеток микроорганизмов можно получить лишь ограниченную информацию. Поэтому обычно микробиологи и биотехнологи изучают популяции, состоящие из миллионов и миллиардов особей. Такие популяции, или *культуры*, получают, выращивая микроорганизмы при определенных условиях. Культуру, содержащую микроорганизмы только одного вида, называют *чистой* или *аксенической*, а культуру, в которой содержится более одного вида микроорганизмов – *смешанной*. Если же в культуре растут только два вида микроорганизмов, причем их специально поддерживают в ассоциации друг с другом, то такая культура называется *двухкомпонентной*. Выделяют также *накопительные* культуры, в которых преобладают представители одной группы или даже одного вида микроорганизмов.

Различают культуру *первичную* – только что изолированную из природной популяции; *субкультуру* – полученную в результате клонирования первичной культуры; *пассированную* – культуру, прошедшую много пассажей на средах; *аэробную* и *анаэробную* – культуры, выросшие соответственно в аэробных и анаэробных условиях; *контаминированную* – культуру, которая загрязнена посторонними, обычно воздушными, микроорганизмами; культуры с указанием *времени инкубации* (например, четырехчасовая, суточная и т.д.); *слайд-культуру* – культура, которая выращена на предметном стекле, покрытом тонким слоем питательной среды.

Идентифицированную чистую культуру какого-либо вида, подвида, варианта и выделенную из того или иного источника (организма, внешней среды и т.д.), называют *штаммом*. Один штамм от другого может отличаться одним или несколькими малозначительными признаками, в том числе источником выделения. Обозначают штаммы, как правило, произвольно: по месту выделения, порядковому номеру регистрации, отличительному признаку и т.д. Штаммы, имеющие выдающиеся свойства и полезные для народнохозяйственных и научных целей, сохраняют в государственных коллекциях культур, на них выдают авторские свидетельства.

Совокупность особей, происходящих из одной клетки, называют *клоном*. Культуры, полученные клонированием, генетически идентичны и фенотипически относительно однородны. Клоны выделяют из одной изолированной клетки путем ее культивирования или из одной изолированной колонии. Последний способ наиболее прост, но наименее надежен. Для повышения надежности клонирование следует вести на неселективных средах и повторять многократно.

Получение чистой культуры не сводится только к тому, чтобы выделить данный вид из смешанной природной популяции микробов. Необходимо поддерживать выделенную чистую культуру в искусственных условиях, которые исключали бы загрязнение культуры другими видами. Обычно чистые культуры поддерживают на питательных средах в пробирках, колбах или

чашках Петри. Культуральный сосуд сначала должен быть простерилизован (т.е. в нем должно быть уничтожено все живое), а затем, после того как в него будут внесены исследуемые микроорганизмы, защищен от загрязнения извне. Основным источником загрязнения – воздух, в котором всегда содержатся микроорганизмы. Крышка, накрывающая чашку Петри, специально предназначена для того, чтобы предотвращать попадание внутрь микробов из воздуха. Пробирки и колбы с той же целью закрывают ватными пробками, металлическими колпачками или пластмассовыми завинчивающимися крышками.

Наружная поверхность культурального сосуда, конечно, тоже может быть источником загрязнения, когда колбу или пробирку открывают, чтобы внести в нее материал или взять пробу. Поэтому сразу же после открытия сосуда и еще раз непосредственно перед его закрыванием горлышко обжигают в пламени.

Обычно *инокулят* (микробный материал, используемый для засева или инокуляции среды в культуральном сосуде) вносят на металлической проволочке, называемой *петлей*, которую перед самым использованием быстро стерилизуют в пламени. Жидкие культуры переносят с помощью пипетки. Пипетки предварительно стерилизуют, заворачивая в бумагу или помещая в стеклянный или металлический пенал. Бумага или пенал предотвращают загрязнение как внутренней, так и внешней поверхности пипеток вплоть до их использования. Чтобы еще больше снизить вероятность случайного загрязнения, можно пересевать культуры в настольном боксе или в небольшой закрытой комнате, куда поступает специально обработанный воздух с пониженным содержанием микроорганизмов.

## 1.2 Правила работы с культурами микроорганизмов

Основной принцип лабораторной безопасности работы с культурами микроорганизмов заключается в хорошей организации. Важно иметь полное представление о риске, возможном при работе с культурами микроорганизмов, знать механизмы опасного воздействия микроорганизмов, соблюдать меры безопасности и быть бдительными в отношении компромиссов и вероятных ошибок. Очевидность возможности бактериального или грибного заражения в лабораторных условиях требует соблюдения мер предосторожности при обращении с любыми микроорганизмами независимо от того, «патогенны» они или нет.

При работе с культурами микроорганизмов необходимо тщательно выполнять следующие меры предосторожности.

1. Держать двери лаборатории закрытыми.
2. Дезинфицировать рабочие поверхности ежедневно и каждый раз после проливания растворов, содержащих суспензии культур микроорганизмов.
3. Перед мытьем или повторным употреблением загрязненные предметы, такие как стеклянная посуда, клетки для животных, лабораторное оборудование, автоклавировать или дезинфицировать.

4. Использовать механические устройства для набирания в пипетки жидкостей.
5. Не есть, не пить и не курить в лаборатории.
6. Часто мыть руки и всегда – перед выходом из лаборатории.
7. Все процедуры и манипуляции выполнять осторожно, сводя к минимуму образование аэрозолей.
8. На соответствующих лабораторных дверях установить знаки биологической опасности. Морозильники, холодильники и другие места хранения патогенных бактерий также должны быть снабжены этим знаком.
9. Надевать нательное лабораторное белье, защитную одежду или халаты. Не носить эту одежду вне лаборатории.
10. Избегать по возможности использования игл и шприцев.

### 1.3 Выделение чистых культур

Чистые культуры, как правило, получают из накопительных культур вида или физиологической группы микроорганизмов. Разработанные методы накопления имеют целью добиться относительного качества данного микроорганизма благодаря созданию лучших условий для его роста и выживания по сравнению с другими или путем пространственного отделения его от других членов популяции.

Условия, обеспечивающие преимущественное развитие определенной группы или вида микроорганизмов, называются *элективными*. При создании элективных условий учитывают особенности физиологии и обмена веществ микроорганизмов: требования их к источникам питания, отношение к кислотности среды, аэрации, температуре, способность к образованию эндоспор и др. Особенно часто элективные условия создают путем подбора соответствующей для выделяемых микроорганизмов среды. Элективные условия не всегда оптимальны для роста исследуемого организма, но они все же лучше переносятся ими, чем сопутствующими формами.

Учение об элективных средах создано С.Н. Виноградским и основано на экологических принципах. В некоторых случаях используют принцип «отрицательной» селекции и так называемые селективные среды, в которые вносят избирательно действующие ингибиторы. Например, на питательной среде с азидом натрия (концентрация 0,02 %) в аэробных условиях достаточно хорошо развиваются молочнокислые бактерии, тогда как рост аэробных микроорганизмов подавлен.

Различают биофизические, биохимические и биологические методы получения накопительных культур. К биофизическим методам следует отнести регуляцию роста температурой, тепловую обработку и физические облучения, приводящие к гибели или подавлению роста других организмов, которые присутствуют в смешанной популяции. Можно также использовать преимущества некоторых физических свойств, такие как размеры и подвижность; это позволяет в значительной мере отделить данный микроорганизм от других в популяции.

В биохимических методах используют токсические вещества, которые убивают или избирательно подавляют рост оставшейся популяции, не влияя на выделяемый организм. Широко применяется метод роста на средах с источниками питания, которые преимущественно утилизирует выделяемая популяция вида.

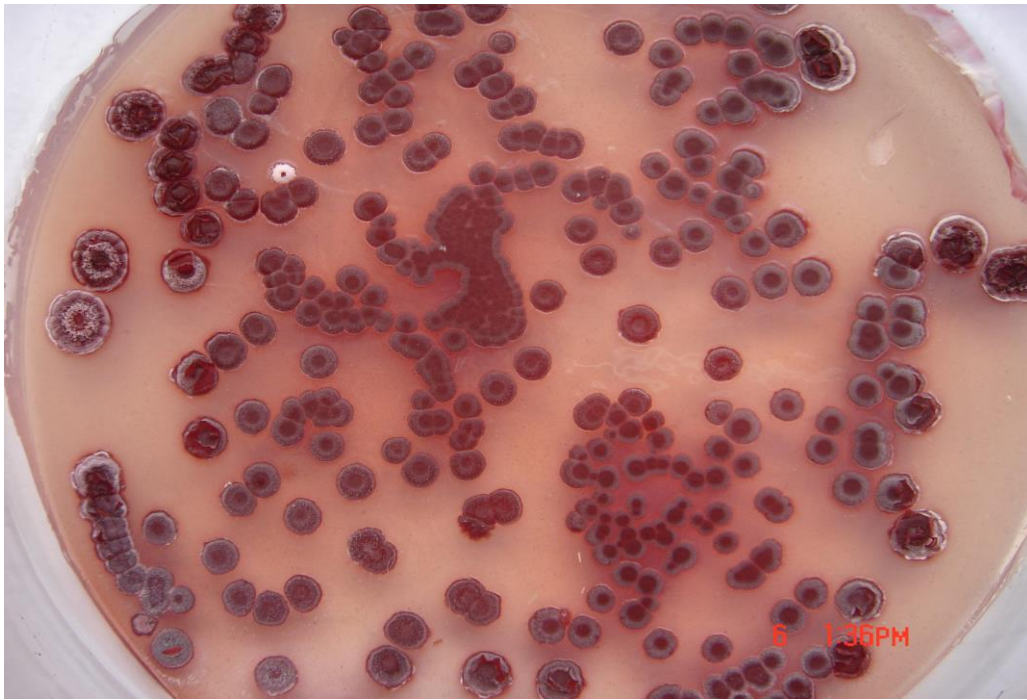
Биологические методы включают использование специфических хозяев для выделяемого организма, а также преимуществ некоторых патогенных свойств микроорганизма (например, его инвазивность), которыми не обладают другие представители популяции. Во многих случаях для получения максимального эффекта накопления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

Чистые культуры микроорганизмов, образующих на твердых средах отдельные колонии (т.е. большинство бактерий, дрожжей, многих мицелиальных грибов и одноклеточных водорослей), проще всего выделять, используя одну из модификаций метода высева на чашки Петри. Этот метод основан на том, что отдельные организмы иммобилизуются на поверхности или в глубине питательной среды, в которую добавлен агар или какое-либо другое гелеобразующее вещество. Рост каждого жизнеспособного организма приводит к образованию отдельной колонии, из которой легко сделать пересев на новую среду.

Часто для этой цели используют посев на чашки *штрихом*. Стерилизованную изогнутую проволочку окунают в разведенную надлежащим способом взвесь микроорганизмов и затем проводят ею ряд параллельных несоприкасающихся штрихов по поверхности уже застывшего слоя агара в чашке. При каждом последующем штрихе происходит постепенное разведение инокулята, так что даже если первые штрихи и дадут сплошной рост, то вдоль последующих штрихов вырастут обособленные колонии (рисунк 1).

Выделение также можно проводить методом *глубинного посева*. Для этого последовательные разведения инокулята смешивают с расплавленной, но уже охлажденной агаризированной средой, а затем эти пробы выливают в стерильные чашки Петри, в которых они застывают. В результате колонии образуются в глубине агара.

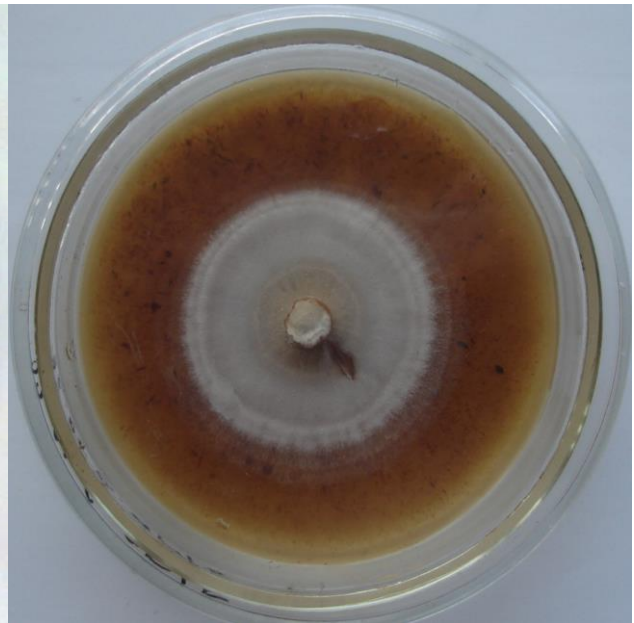
Особые проблемы возникают при выделении и культивировании строго (облигатно) анаэробных бактерий. Если контакт с кислородом не приводит сразу же к гибели исследуемых организмов, то можно производить посев как обычно, но затем инкубировать их в закрытых контейнерах, из которых путем химической абсорбции или сжиганием горючего материала удален кислород. Для выделения более чувствительных к кислороду анаэробов лучше использовать модификацию глубинного посева, известную под названием культуры, разведенной размешиванием.



**а**



**б**



**в**

**Рисунок 1 – Изолированные колонии бактерий (а) и грибов (б и в) на чашках Петри**

При использовании этого метода засевают пробирку с расплавленной и охлажденной агаровой средой, содержимое пробирки перемешивают и примерно одну десятую его переносят в следующую пробирку с агаровой средой. Содержимое этой пробирки также перемешивают и используют для засева третьей пробирки и так далее. После 6–10 последовательных разведений пробирки быстро охлаждают и запечатывают, нанося на поверхность слой

стерильного вазелина и парафина, что препятствует проникновению воздуха в столбик агара. В таких культурах колонии вырастают внутри агара. Для переноса такой колонии из пробирки с помощью стерильной иглы удаляют слой вазелина, а столбик агара осторожно выдувают из пробирки в стерильную чашку Петри, пропуская не содержащий кислород газ через капиллярную пипетку, опущенную между стенкой пробирки и агаровой средой. Чтобы можно было изучить и переносить колонии, столбик агара разрезают стерильным ножом на диски.

Если используется подходящая методика, то при выделении микроорганизмов из смешанной природной популяции часто уже в первой серии чашек или культур, разведенных размешиванием, вырастают хорошо отделенные друг от друга колонии. Микроорганизмы сильно различаются по своим потребностям, и поэтому не существует единой среды и единого комплекса условий, которые обеспечивали бы рост всех имеющихся в природной популяции видов. Вероятно, лишь очень небольшая их часть оказывается способной образовывать колонии на данной питательной среде. Поэтому в первой чашке, как правило, на каждую видимую колонию будет приходиться тысяча клеток других микроорганизмов, которые были нанесены на поверхность агара, но не дали макроскопически видимого роста, хотя они вполне могут быть жизнеспособными. *Для получения чистой культуры никогда не следует брать пробу с первой чашки.* Суспензию клеток, полученную из отдельной колонии в первой чашке, следует рассеять штрихом в новую чашку. Если все колонии во второй чашке будут идентичными, то хорошо обособленную колонию можно будет использовать для получения чистой культуры.

Не все микроорганизмы, способные расти на твердых средах, обязательно образуют изолированные колонии. Некоторые подвижные бактерии могут распространяться по слегка влажной поверхности агарового геля (например, скользящие миксобактерии, цианобактерии, спирохеты и т.д.). Этого можно избежать, если использовать среды с хорошо подсушенной поверхностью, по которой клетки передвигаться не могут. Способность подобных микроорганизмов к передвижению помогает очистке, так как они могут сами отделяться от других видов, иммобилизованных на агаровой среде.

Иногда при выделении организмов из природных популяций полезно включать в среду вещества, избирательно подавляющие рост тех или иных микробов. Особенно эффективны некоторые антибиотики ввиду их биологической специфичности. Бактерии сильно различаются по чувствительности к пенициллину, поэтому низкие его концентрации можно использовать для подавления роста пенициллиночувствительных бактерий. В более высоких концентрациях пенициллин токсичен для большинства бактерий, но не для эукариот. Поэтому его целесообразно использовать для очистки культур грибов и эукариотических водорослей, загрязненных бактериями. Наоборот, прокариоты нечувствительны к полиеновым антибиотикам (например, к нистатину), которые обычно токсичны для эукариот. Добавление таких антибиотиков в среду иногда можно с успехом

использовать для очистки бактериальных культур, сильно загрязненных грибами или простейшими. Чтобы облегчить выделение микроорганизмов, можно использовать и многие другие вещества, обладающие избирательной токсичностью.

Методы посева на чашки дают обычно удовлетворительные результаты при выделении бактерий, дрожжевых и мицелиальных грибов, так как подавляющее большинство этих организмов хорошо растет на твердых средах. Однако до сих пор не удается успешно культивировать на твердых средах некоторые виды бактерий с крупными клетками, многие простейшие и водоросли, которые растут только в жидкой среде.

Наиболее простой способ получения чистых культур на жидких средах – это *метод разведений*. Инокулят последовательно разводят стерильной водой и аликвотами из каждого разведения засевают большое число пробирок со средой. В результате такой операции получается настолько разведенная взвесь, что вероятность внесения в данную пробирку даже одну особь достаточно мала и составляет порядка 0,05. Если таким разведенным инокулятом засеивается много пробирок, то по теории вероятности можно вычислить, что в 95% всех засеянных пробирок не попадет ни одной клетки. По одной особи попадает в 4,8 % пробирок, по две – в 0,12 % пробирок, а в 0,00002 всех засеянных пробирок окажется по три особи. Поэтому, если в пробирке что-то выросло, то, скорее всего, этот рост обусловлен попаданием в нее всего лишь одного организма.

Вероятность того, что рост вызван попаданием в пробирку лишь одного организма, очень быстро падает с увеличением среднего числа организмов (клеток) в инокуляте. Поэтому важно, чтобы выделение производилось из той серии пробирок, где в подавляющем большинстве случаев вообще не обнаруживали роста.

Метод разведений имеет один существенный недостаток. Его можно использовать для выделения только тех организмов, которые *численно преобладают* в смешанной популяции микроорганизмов. Им нельзя с успехом пользоваться при выделении более крупных микроорганизмов (например, простейших или водорослей), так как в природных популяциях бактерии, как правило, сильно превосходят их по численности.

Если нельзя использовать ни метод разведений, ни метод посева на чашки, то остается использовать *метод выделения из смешанной популяции одной клетки* под микроскопом. Такая процедура называется выделением одной клетки. Техническая трудность ее обратно пропорциональна размерам выделяемого организма. Этот метод относительно прост, если микроорганизм обладает крупными клетками, например, при работе с водорослями или дрожжами, но пользоваться им для бактерий значительно сложнее.

Эти операции проводят вручную, контролируя их визуально при относительно большом увеличении. Отдельный организм захватывают в тонкую капиллярную пипетку, а затем промывают несколько раз в относительно больших объемах стерильной воды, чтобы удалить примесь мелких микроорганизмов.

При выделении мелких микроорганизмов, которые трудно рассмотреть при увеличении менее 100 раз, пользуются особым устройством – микроманипулятором и специально изготовленными очень тонкими стеклянными инструментами. Назначение микроманипулятора состоит в том, чтобы уменьшить амплитуду движений, производимых вручную. Это позволяет в небольшом рабочем пространстве (микрокапле) при постоянном наблюдении в микроскоп (x500–1000) осуществлять очень малые и точно контролируемые перемещения инструментов.

Процесс получения чистой культуры можно разделить на этапы. *Первый этап* – рассев накопительной культуры. Для этого 150 мл стерильной агаровой среды разливают в 6 стерильных чашек Петри. Посев проводят поверхностным способом, распределяя посевной материал по агаровой пластинке стерильным стеклянным шпателем. Делают два высева: непосредственно из накопительной культуры и из разведения ее в стерильной водопроводной воде. Для приготовления разведения вносят стерильной пипеткой одну каплю накопительной культуры в пробирку с 8–10 мл стерильной воды и тщательно перемешивают. В обоих случаях количество посевного материала – петля суспензии ("зеркальце"). Объем вносят на застывшую агаризированную среду в первую чашку, распределяют его стерильным шпателем по всей поверхности среды, а затем этим же шпателем проводят последовательно по поверхности среды еще в двух чашках Петри. Чашки помещают в термостат с температурой 30 °С крышками вниз. Продолжительность культивирования 3–5 суток.

*Второй этап* – описание и отсев выросших колоний. Просматривают колонии микроорганизмов, выросшие в чашках Петри, выбирая изолированные колонии. При описании колоний чашки Петри не открывают. Консистенцию определить можно при отсевах колоний. Признаки колоний характеризуют, после этого отсевают изолированную колонию в две пробирки на поверхность скошенного агара и культивируют в термостате.

*Третий этап* – проверка чистоты выделенных культур. Чистоту выделенных культур проверяют визуально, микроскопированием и рассевом на поверхность агаровой пластинки в чашках Петри.

Визуальный контроль. Просматривают рост по штриху на скошенной агаризованной среде. Для дальнейшей работы оставляют культуры, рост которых однороден по всему штриху. Если рост культуры по штриху неоднороден, культуру считают загрязненной и отбрасывают.

Микроскопический контроль. Готовят препараты фиксированных окрашенных клеток или препараты живых клеток. Последние микроскопируют, лучше с фазово-контрастным устройством. Чистые культуры морфологически однородны, допустимо лишь некоторое варьирование размеров клеток. Во многих случаях загрязнение культур посторонней микрофлорой выявляется уже с помощью микроскопического контроля. Загрязненные культуры отбрасывают.

Рассев на плотную среду. Это наиболее надежный способ проверки чистоты культур. Культуру пересевают в пробирку со свежей скошенной средой. Затем готовят суспензию культуры смывом стерильной водопроводной

водой. Полученную суспензию можно использовать для микроскопического контроля. Чистая культура характеризуется однородностью клеток и колоний.

В практике культивирования микроорганизмов иногда невозможно изолировать чистую культуру, поэтому получают *двухкомпонентную культуру*, содержащую всего лишь два вида микроорганизмов или микроорганизм-вирус. Как уже отмечалось, использование двухкомпонентных культур – единственный способ поддержания вирусов, так как это облигатные паразиты клеточных организмов. Облигатный внутриклеточный паразитизм характерен также для некоторых групп микроорганизмов, обладающих клеточной организацией (риккетсии, хламидии). Во всех этих случаях двухкомпонентная культура – наилучший достижимый вариант культивирования в контролируемых лабораторных условиях.

Двухкомпонентные культуры вполне приемлемы для поддержания микроорганизмов и для многих экспериментальных целей. Такую культуру получают в два этапа. Сначала необходимо получить чистую культуру питающего организма (хозяина в случае облигатных внутриклеточных паразитов или жертвы в случае простейших). Затем можно любым из многочисленных методов выделить паразита или хищника и ввести его в чистую культуру питающего организма.

Для успешного поддержания двухкомпонентных культур требуется значительное искусство, так как важно, чтобы сохранялось более или менее устойчивое биологическое равновесие между обоими компонентами. Используемая среда должна обеспечивать рост питающего организма, достаточный для удовлетворения потребностей паразита или хищника, но в то же время не должна быть слишком богатой, иначе развитие питающего организма может подавить рост ассоциированного с ним организма или привести к образованию вредных для него продуктов обмена.

#### **1.4 Основные принципы подбора условий для выделения культур**

Чтобы расти, организм должен получать из окружающей среды все те вещества, которые необходимы ему для синтеза структурных компонентов клетки и для получения энергии. Поэтому в питательной среде должны содержаться все эти питательные вещества в количестве, необходимом специфическим потребностям микроорганизма.

Для культивирования микроорганизмов предложены буквально тысячи различных сред, и часто при описании этих сред не указывается четко, зачем в них введены те или иные компоненты. Между тем состав среды для культивирования может и должен основываться на научных *принципах питания*. Из химического состава клеток, который в общих чертах одинаков у всех живых организмов, видно, какие вещества должны быть в первую очередь необходимы для их роста (таблица 1).

Таблица 1 – Приблизительный элементарный состав микробной клетки\*

Элемент	Содержание, % от сухого вещества	Элемент	Содержание,% от сухого вещества
Углерод	50	Натрий	1
Кислород	20	Кальций	0,5
Азот	14	Магний	0,5
Водород	8	Хлор	0,5
Фосфор	3	Железо	0,2
Сера	1	Все остальные элементы	0,3
Калий	1		
* Данные для бактерии <i>Escherichia coli</i> , приводимые С. Лурия (Мир микробов, т. 1, 1979)			

На долю шести элементов, приведенных в таблице, приходится около 95 % сухой биомассы клеток микроорганизмов, а остаток составляют различные другие элементы. Результаты изучения физиологии питания показали, что почти всем группам микроорганизмов необходимы калий, магний, кальций, железо, марганец, кобальт, медь, молибден и цинк. Они необходимы микроорганизмам, так как выполняют различные функции в их метаболизме.

Все необходимые металлы микроорганизмы могут получать в форме катионов неорганических солей. Калий, натрий, кальций и железо требуются в относительно больших количествах, и поэтому их соли всегда должны включаться в состав питательных сред. Один из неметаллов, фосфор, также можно добавлять в среду в неорганической форме – в виде фосфатов. Нужные количества марганца, кобальта, меди, молибдена и цинка вносят в следовых количествах, поэтому их часто называют микроэлементами (таблица 2).

Следует отметить, что у некоторых групп микроорганизмов имеются дополнительные, специфические потребности в минеральных веществах. Например, клеточные стенки диатомовых и некоторых водорослей сильно насыщены кремнием, и эти микроорганизмы нуждаются в больших количествах кремния, который добавляют в виде силикатов. Высоки потребности в ионах железа у железобактерий. Хотя у большинства микроорганизмов не удается выявить точную потребность в натрии: некоторым гетеротрофным, а также фототрофным бактериям, обитающим в морях, он необходим в относительно больших количествах. В этих случаях его нельзя заменить другими одновалентными катионами.

Потребности микроорганизмов в углероде, азоте, сере и кислороде невозможно охарактеризовать просто, поскольку различные группы микроорганизмов должны получать эти элементы в определенной химической форме (таблица 2).

Таблица 2 – Главнейшие физиологические функции в клетках микроорганизмов важнейших элементов

Элемент	Физиологическая роль
Водород	Входит в состав воды и органических веществ клетки
Кислород	Входит в состав воды и органических веществ клетки; в виде O <sub>2</sub> служит акцептором электронов при дыхании аэробных микроорганизмов
Углерод	Входит в состав органических веществ клетки
Азот	Входит в состав органических веществ клетки
Сера	Входит в состав белков, коферментов клетки
Фосфор	Входит в состав нуклеиновых кислот, фосфолипидов, коферментов клетки
Калий	Неорганический катион, участвующий в поступлении веществ в клетку, кофактор некоторых ферментов
Магний	Важный катион клетки; неорганический кофактор для многих ферментов, участвует в связывании ферментов с субстратами; входит в состав хлорофиллов
Кальций	Важный катион клетки; кофактор протеиназ
Железо	Входит в состав цитохромов и некоторых белков, не содержащих гем; кофактор для некоторых ферментов
Кобальт	Входит в состав витамина B <sub>12</sub> и его производных, служащих коферментами
Марганец	Неорганический кофактор для некоторых ферментов; иногда может заменять магний
Медь, цинк, молибден	Неорганические компоненты некоторых ферментов

*Потребность в углероде.* Фотосинтезирующие микроорганизмы и те прокариоты, которые получают энергию в результате окисления неорганических соединений – автотрофы, используют обычно в качестве единственного или главного источника углерода CO<sub>2</sub> – вещество, содержащее углерод в наиболее окисленной форме. Превращение CO<sub>2</sub> в органические компоненты клетки – восстановительный процесс, требующий затраты энергии. Соответственно у этих физиологических групп микроорганизмов значительная часть энергии, получаемой от света или при окислении неорганических соединений, должна затрачиваться на восстановление CO<sub>2</sub> до уровня органических веществ.

Все другие организмы – гетеротрофы – получают углерод в основном из органических питательных веществ. Большинство органических субстратов окислено до того же уровня, что и органические компоненты клетки. Поэтому, для того чтобы они могли служить источником углерода для построения компонентов клетки, обычно не требуется их предвари-тельного

восстановления. Однако органические субстраты требуются не только для целей биосинтеза: они должны также удовлетворять энергетические потребности клетки. Значительная часть углерода, содержащегося в органическом субстрате, направляется по тем путям метаболизма, которые доставляют энергию, и в конце концов выводятся из клетки в виде  $\text{CO}_2$  и органических соединений (типичных конечных продуктов брожения). Таким образом, органические питательные вещества обычно играют двойную роль: они служат одновременно и источником углерода, и источником энергии.

Многие микроорганизмы могут полностью удовлетворять свои потребности в углероде каким-либо одним органическим соединением. Другие же не способны расти в присутствии лишь одного органического вещества и нуждаются в добавочных органических компонентах питательных сред. Эти добавочные вещества нужны исключительно для целей биосинтеза и используются в качестве предшественника определенных органических компонентов клетки, которые микроорганизм не может полностью синтезировать сам. Они называются *ростовыми факторами*.

Микроорганизмы крайне разнообразны в отношении, как типа, так и числа тех органических соединений, которые они могут использовать в качестве основных источников углерода и энергии. Разнообразие это так велико, что любое природное соединение может использоваться каким-нибудь микроорганизмом. Поэтому кратко описать химическую природу органических источников углерода для микроорганизмов невозможно. Исключительное разнообразие потребностей в углероде – один из интереснейших аспектов физиологии микроорганизмов.

При этом одни микроорганизмы крайне «многоядны», тогда как другие отличаются высокой специализацией. Например, некоторые бактерии рода *Pseudomonas* способны использовать в качестве источника углерода и энергии в питательной среде более 90 различных органических соединений, а бактерии, окисляющие метан, могут использовать только два субстрата – метан и метанол. Некоторые бактерии способны расщеплять целлюлозу и использовать только субстраты, её содержащие.

Большинство организмов, которые зависят от органических источников углерода (а возможно, и все они), нуждаются также в очень небольших количествах  $\text{CO}_2$ , так как это соединение необходимо для некоторых биосинтетических реакций. Но так как обычно организмы, использующие органический субстрат, образуют в больших количествах углекислоту, потребность в ней для целей биосинтеза может быть удовлетворена за счет этого источника. Тем не менее полное удаление  $\text{CO}_2$  из среды часто задерживает, а иногда и полностью подавляет рост микроорганизмов на органических средах. Для того чтобы на таких средах удовлетворительно росли некоторые бактерии и грибы, нужно поддерживать относительно высокие концентрации  $\text{CO}_2$  в атмосфере.

*Потребность в азоте и сере.* Азот и сера входят в состав органических веществ клетки, главным образом, в восстановленной форме, т.е. соответственно в виде аминокрупп и сульфгидрильных групп. Большинство

фотосинтезирующих микроорганизмов поглощает эти два элемента в окисленном состоянии – в форме неорганических солей (нитратов и сульфатов). Поэтому они сначала восстанавливаются, а затем уже используются в биосинтезах. Многие нефотосинтезирующие бактерии и грибы удовлетворяют свои потребности в азоте и сере также в виде нитратов и сульфатов. Однако некоторые микроорганизмы не способны восстанавливать азот (или серу) соответствующих анионов, поэтому эти элементы необходимы им в восстановленной форме. Потребность в восстановленном азоте распространена довольно широко; для чего азот необходимо добавлять в питательные среды в виде солей аммония. Потребность в восстановленной сере встречается реже; источником такой серы могут служить сульфиды или какие-нибудь органические соединения, содержащие сульфгидрильные группы (например, цистеин).

Потребность в азоте и сере у микроорганизмов может быть удовлетворена за счет органических веществ, содержащих азот и серу в восстановленной форме (аминокислот или более сложных продуктов распада белка – пептонов). Такие соединения нередко могут служить одновременно также источником энергии и углерода; в этом случае они сразу же удовлетворяют потребности клетки в углероде, азоте, сере и в энергии.

Некоторые бактерии могут использовать молекулярный азот атмосферы ( $N_2$ ) – самый неограниченный источник азота в природе. Этот процесс называется *азотфиксацией*, и первая его стадия состоит в восстановлении  $N_2$  до аммиака.

*Факторы роста микроорганизмов.* Любое органическое соединение, которое необходимо организму в качестве предшественника или составной части органического материала клетки, но которое сам он не может синтезировать из более простых источников углерода, должно быть обеспечено в питании. Такого рода органические вещества называют *факторами роста*. По своей химической структуре и по своей роли в метаболизме эти вещества делятся на три класса:

- 1) аминокислоты, которые нужны для построения белков;
- 2) пурины и пиримидины, которые необходимы для построения нуклеиновых кислот;
- 3) витамины, к которым относятся самые различные органические соединения. Витамины входят в состав простетических групп или активных центров некоторых ферментов.

Так как ростовые факторы удовлетворяют лишь специфические потребности, связанные с процессами биосинтеза, они нужны лишь в небольших количествах по сравнению с главным источником углерода. В состав белков микроорганизмов входит примерно 20 различных аминокислот, так что потребность в любой отдельной аминокислоте, которую сама клетка не может синтезировать, не слишком велика. Это относится и к потребностям в каком-либо пурине или пиримидине, поскольку в состав нуклеиновых кислот входят пять различных азотистых оснований такого типа. Витамины нужны в еще меньших количествах, так как различные коферменты, для которых они

служат предшественниками, выполняют каталитические функции и поэтому их количество в клетке измеряется миллионными долями сухого вещества клетки.

Биосинтез аминокислот, пуринов и пиримидинов, а также витаминов, входящих в состав ферментов, включает сложные цепи реакций. Если организм неспособен осуществлять хотя бы одну из этих реакций, то он должен получать ее конечный продукт извне в виде фактора роста. Однако организму не всегда необходим этот фактор в готовом виде. Если блокирован один из ранних этапов в цепи биосинтеза, то специфическую потребность клетки можно удовлетворить теми органическими предшественниками, которые образуются в этой цепи после блокированного участка. Анализ потребности микроорганизмов в факторе роста обычно указывает, что они нуждаются в разных химических формах данного фактора. Например, некоторые микроорганизмы нуждаются в витамине В<sub>1</sub>, причем в качестве фактора роста нужна вся молекула; однако есть и такие, которым можно давать две половинки этого вещества, и они сами способны соединять их. Тогда эти микроорганизмы различают по *минимальной* потребности в факторе роста. Организмы, нуждающиеся в факторах роста, называют *ауксотрофными* и противопоставляют *прототрофным* организмам, которым такие факторы роста не нужны.

*Отношение микроорганизмов к кислороду.* Кислород входит в состав воды и многих органических соединений клетки. Будучи компонентом воды, всегда в больших количествах поступает в клетку. Однако многие организмы нуждаются и в молекулярном кислороде О<sub>2</sub>. К ним относятся те виды, которые удовлетворяют свою потребность в энергии за счет аэробного дыхания, при котором кислород играет роль терминального окислителя. Такие организмы называют *облигатными аэробами*.

Для микроорганизмов, растущих на агаре или в тонких слоях жидкости в присутствии воздуха, кислорода обычно вполне достаточно. В жидких средах при большом объеме жидкости аэробные микроорганизмы могут расти только на поверхности, образуя пленку, так как в более глубоких слоях по мере удаления от поверхности условия приближаются к анаэробным. Для нормального роста аэробных микроорганизмов в глубоких слоях жидкости требуется аэрация. Микроорганизмы способны использовать только растворенный кислород. В то время как минеральные соли и органические вещества можно добавлять к среде в концентрациях, обеспечивающих рост клеток на протяжении нескольких часов или даже суток, с молекулярным кислородом этого сделать нельзя, так как растворимость его очень мала. Литр воды, находящейся при температуре 20 °С в равновесии с атмосферным воздухом, содержит всего лишь 6,2 мл или 0,28 ммоль О<sub>2</sub>. Такого количества достаточно для окисления не более 0,046 ммоль или 8,3 мг глюкозы (т.е. примерно одной тысячной общего количества глюкозы, содержащейся в обычных питательных средах). Поэтому в среде невозможно создать значительный запас О<sub>2</sub>, и его приходится добавлять непрерывно. В целом, микроорганизмы приспособились к очень низким концентрациям

растворенного кислорода; однако недопустимо без ущерба для дыхания клеток доводить эти концентрации до уровня ниже критического.

Скорость перехода молекулярного кислорода в раствор возрастает с увеличением поверхности раздела между газовой и жидкой фазами и повышением парциального давления  $O_2$  в газовой фазе. Для аэрации жидких культур пользуются либо обычным воздухом, либо смесью  $O_2$ ,  $N_2$  и  $CO_2$ . Для увеличения поверхности раздела прибегают к различным способам, таким как: 1) культивирование в тонком слое; 2) перемещение жидкости путем встряхивания (прямого или кругового); 3) вращение лежащих сосудов вдоль продольной оси; 4) пропускание воздуха через жидкость под давлением с помощью газораспределителя (стеклянные фильтры, колбы Клюйвера); 5) перколяция; 6) механическое перемешивание.

Для глубинной культуры аэробных микроорганизмов принудительную аэрацию с помощью газораспределителей (стеклянных фильтров, доз) часто комбинируют с механическим перемешиванием. Следует учитывать, что даже в хорошо аэрируемых ферментерах или естественных водоемах кислород не всегда распределен равномерно. Если образуются скопления бактерий, то возникают локальные ниши с пониженным парциальным давлением кислорода. Затравками для возникновения таких полуанаэробных микростанций служат содержащиеся в природных водоемах взвешенные частицы. В эксперименте такие условия можно воспроизводить, добавляя к бактериальным взвесям мелкодисперсные частицы (глину, целлюлозу, хитин). В этих случаях микроорганизмы растут как «флора обрастания» - очень плотно друг к другу на поверхности частиц, и так же страдают от недостатка кислорода.

На другом физиологическом полюсе находятся микроорганизмы, которые получают энергию в результате реакций, не включающих использование молекулярного кислорода. Более того, для многих групп с такой физиологией молекулярный кислород токсичен – он убивает эти микроорганизмы или подавляет их рост. Такие микроорганизмы называют *облигатными (строгими) анаэробами*.

При выращивании строго анаэробных микроорганизмов необходимо исключать доступ кислорода. Техника культивирования анаэробных культур предусматривает: применение прокипяченных питательных сред и закрытых сосудов без пузырьков воздуха; создание бескислородной атмосферы в вакуумных эксикаторах или горшках Витта; применение адсорбентов кислорода (щелочного пирогаллола, дитионита, хлорида одновалентной меди) и других вспомогательных средств. Нередко удается ослабить или полностью нейтрализовать вредное для микроорганизмов действие кислорода, добавляя к среде восстановители (аскорбиновую кислоту, тиогликолат, цистеин или даже сульфид, если микроорганизмы его переносят).

Даже крайне чувствительные к кислороду микроорганизмы можно пересевать на воздухе, если путем непрерывной продувки азота через культуральные сосуды исключить возможность соприкосновения питательной среды с воздухом (техника Хангейта). Можно также использовать перевиночные боксы, наполненные азотом, аргоном или водородом без

примеси кислорода. В качестве цветного индикатора анаэробных условий в среду добавляют краситель резазурин (в присутствии кислорода он синий, а в анаэробных условиях бесцветен) или ставят в анаэробные инкубационные склянки сосудик с щелочным раствором глюкозы и метиленового синего (в анаэробных условиях он бесцветен).

Среди микроорганизмов существуют также *факультативные анаэробы*, способные расти и в присутствии, и в отсутствии молекулярного кислорода. По своему метаболизму факультативные анаэробы делятся на две подгруппы. Некоторые из них, например молочнокислые бактерии, получают энергию исключительно в результате брожения, но нечувствительны к присутствию кислорода, их называют *микроаэротолерантными* формами. У других (например, у многих дрожжей и энтеробактерий) метаболизм может переключаться с дыхания на брожение. Когда имеется молекулярный кислород, они используют его для терминального окисления, но в отсутствии кислорода могут получать энергию также с помощью брожения или анаэробного нитратного дыхания.

Некоторые из облигатных аэробов лучше растут при парциальных давлениях кислорода, значительно меньших, чем в воздухе (0,2 атм). Такие микроорганизмы называются *микроаэрофильными*. Возможно, что у них имеются ферменты, которые инактивируются в среде с сильными окислительными свойствами и потому могут действовать только при низких парциальных давлениях кислорода. Таковы многие бактерии, получающие энергию в результате окисления молекулярного водорода; известно, что гидрогеназа – фермент, участвующий в окислении водорода, – легко инактивируется кислородом. К ним также относят многие аэробные азотфиксирующие бактерии.

Первоначальное разделение микроорганизмов по способу питания было сделано на две группы: автотрофов (не нуждающихся в органических веществах) и гетеротрофов (нуждающихся в органических веществах). Многообразие использования различных источников углерода микроорганизмами показало, что деление на эти две группы недостаточно. Было сделано много попыток создать более сложные системы классификации. Наиболее приемлема и полезна оказалась классификация, основанная на двух параметрах – природе источника энергии и природе основного источника углеродного питания. По источнику энергии все организмы делятся на два типа: на фотосинтезирующие организмы, способные использовать энергию света и называемые *фототрофами*, и на микроорганизмы, которые нуждаются в химических источниках энергии и которые называют *хемотрофами*. Организмы, способные использовать в качестве основного источника углерода  $\text{CO}_2$ , называют *автотрофами*, а те, которые способны использовать органические соединения углерода, – *гетеротрофами*. На основе этих критериев можно разделить все организмы по типу питания на шесть главных групп:

1. *Фотоавтотрофы* – используют свет как источник энергии и  $\text{CO}_2$  в

качестве основного источника углерода. Эта группа включает большинство фотосинтезирующих микроорганизмов, высшие растения, водоросли.

2. *Фотогетеротрофы* – используют свет в качестве источника энергии и как основной источник углерода какое-нибудь органическое вещество. Сюда относят некоторые пурпурные и зеленые бактерии.

3. *Хемоорганогетеротрофы* – используют органические химические соединения как основной источник энергии и основной источник углерода.

4. *Хемолитоорганотрофы* – используют химические неорганические соединения как источник энергии (чаще  $H_2$ , восстановленное железо и марганец) и органические соединения как источник углерода.

5. *Хемоорганоавтотрофы* – используют в качестве источника энергии органические соединения (часто низкомолекулярные) и в качестве источника углеродного питания используют  $CO_2$ .

6. *Хемолитоавтотрофы* – используют в качестве источника энергии восстановленные химические соединения ( $NH_3$ ,  $NO_2$ ,  $H_2S$ ,  $S$ ,  $S_2O_3$ ) и  $CO_2$  как источник углеродного питания.

Следует подчеркнуть, что ввиду значительной гибкости многих микроорганизмов в отношении питания классификация их по этому признаку оказывается в известной степени произвольной. Например, многие фотоавтотрофные прокариоты могут так же расти в темноте как хемоорганогетеротрофы. Такие организмы относят обычно к категории с более простыми потребностями: например, фототрофность имеет в этом смысле преимущество перед хемотрофностью, а автотрофность – перед гетеротрофностью. Чтобы указать, что микроорганизм может (или не может) переключаться на иной тип питания, часто употребляют термины *облигатный* или *факультативный*. Например, *облигатному фотоавтотрофу* обязательно нужен свет для получения энергии и  $CO_2$  в качестве основного источника углерода, тогда как *факультативный фотоавтотроф* использует органические источники углерода.

Для указания потребности в факторах роста иногда используют два дополнительных термина – *прототрофность* и *ауксотрофность*. Прототрофы могут удовлетворять все свои потребности в углероде за счет основного источника. Ауксотрофы же нуждаются еще в одном или нескольких органических веществах (факторах роста). Как прототрофы, так и ауксотрофы могут встречаться среди организмов различных указанных шести групп. Например, для многих фотоавтотрофных водорослей и бактерий характерна ауксотрофность, которая выражается в том, что им абсолютно необходим какой-либо витамин или же несколько витаминов.

## 1.5 Подбор состава питательных сред для выделения культур

Главная цель при подборе среды для выращивания любого микроорганизма состоит в том, чтобы создать сбалансированную смесь необходимых питательных веществ в таких концентрациях, при которых рост

будет наилучшим. На первый взгляд может показаться, что нужно просто сделать среду как можно более богатой, добавив в нее все вещества в большом избытке. Однако это было бы неразумно. Во-первых, в повышенных количествах многие питательные вещества начинают подавлять рост или оказываются токсичными. При достаточно высоких концентрациях подобный эффект дают такие органические субстраты, как соли жирных кислот (например, уксусной) и даже сахара.

Подавлять рост могут и некоторые неорганические компоненты, если они окажутся в избытке. Например, многие цианобактерии очень чувствительны к повышенным концентрациям неорганического фосфата в среде, даже если микроорганизм может расти в среде с повышенным содержанием питательных компонентов, то в результате метаболической активности растущей популяции среда в конце концов изменится так, что условия будут весьма неблагоприятными и популяция станет физиологически аномальной или просто погибнет. Это может быть обусловлено сильными изменениями рН, накоплением токсичных органических метаболитов, а в случае строгих аэробов – истощением запасов кислорода.

Задача биотехнолога состоит в том, чтобы изучать популяции микроорганизмов в нормальном состоянии, поэтому разумно ограничить рост культуры, вводя одно из питательных веществ в лимитирующем количестве; в случае гетеротрофов для этой цели обычно используют основной источник углерода. При приготовлении питательных сред целесообразно сначала составить их минеральную основу, содержащую все те питательные вещества, которые можно дать любому организму в неорганической форме. Затем в эту основную среду можно ввести нужные добавки – источник углерода, источник энергии, источник азота и необходимые ростовые факторы. Состав этих добавок, естественно, зависит от потребностей выращиваемого организма. Среда, в которую входят только определенные органические соединения, называется *синтетической*. Если же среда содержит и такие ингредиенты, химический состав которых известен лишь частично, то её называют *сложной*.

Сложные среды пригодны для культивирования самых разнообразных видов, в том числе таких, потребность которых в факторах роста не изучена полностью. Даже если потребность микроорганизма в этих факторах роста точно известна, часто бывает удобнее выращивать его на сложной среде, особенно если он нуждается сразу во многих факторах роста. Например, в среду вводят дрожжевой экстракт, содержащий сразу несколько факторов роста.

Развитие микроорганизмов на составленных питательных средах будет происходить в том случае, если будет соблюден также ряд дополнительных условий: необходимая температура инкубации и благоприятные осмотические условия, концентрация водородных ионов (рН). Чтобы привести осмотические условия и рН среды в соответствие с потребностями микроорганизмов, для которых среда вполне пригодна по составу питательных веществ, иногда приходится вводить в нее химические добавки. Даже если какая-то среда благоприятна для начального этапа роста, не исключено, что в результате

химических изменений, вызванных метаболизмом самих клеток микроорганизмов, дальнейшее развитие популяции в этой среде прекратится. Например, в средах, содержащих глюкозу, в результате брожения могут накапливаться органические кислоты, которые будут подавлять рост популяции.

В ряде других случаев утилизация или распад анионных компонентов среды в результате деятельности микробов может привести к подщелачиванию среды. Например, окисление сукцината натрия ведет к образованию двух молекул карбоната натрия – соли с выраженными щелочными свойствами. Известно также, что при расщеплении белков и аминокислот может происходить подщелачивание среды в результате образования аммиака.

Чтобы не допустить чрезмерных изменений концентрации водородных ионов, в среду часто добавляют буферы или нерастворимые карбонаты. Чаще всего используют фосфатные буферы, состоящие из смеси однозамещенного и двухзамещенного фосфатов ( $K_2HPO_4$  и  $KH_2PO_4$ ). Первая из этих солей слабокислая, а вторая слабоосновная, так что если в растворе они будут содержаться в эквимолярных количествах, то такой раствор будет приблизительно нейтральным (рН 6,8). Если к раствору будет добавлено небольшое количество сильной кислоты, то часть слабоосновной соли превратится в слабокислую, если же будет добавлено сильное основание, то произойдет обратный процесс. Используя кислый и основной фосфаты в разных соотношениях, можно достигнуть в среде любой величины рН в пределах примерно от 6,4 до 7,6.

Фосфаты широко используются при приготовлении сред, так как это единственные неорганические соединения, обладающие буферным действием в физиологически важном диапазоне около нейтрального значения рН. Кроме того, они мало токсичны для микроорганизмов и служат источником фосфора – одного из элементов, необходимых для синтеза нуклеиновых кислот и других важных соединений. В высоких концентрациях фосфаты начинают подавлять рост культуры; поэтому толерантность данного микроорганизма ставит предел количеству фосфатного буфера, которое можно использовать в среде. Как правило, бактерии и грибы могут выдержать до 5 г фосфатов калия на 1 л среды.

Если культура интенсивно продуцирует кислоту, то тех ограниченных количеств фосфатного буфера, которые можно добавлять в среду, оказывается недостаточно для поддержания нужного рН. В таких случаях в среду в качестве «резервной» щелочи для нейтрализации кислот по мере их образования можно добавлять карбонаты. В присутствии ионов водорода карбонат превращается в бикарбонат, а бикарбонат – в угольную кислоту, которая спонтанно распадается на  $CO_2$  и воду. Поскольку  $H_2CO_3$  – кислота чрезвычайно слабая и так как образующаяся при её распаде  $CO_2$  уходит в атмосферу, добавление в среду карбонатов предотвращает накопление в ней ионов, а значит и свободных кислот. Такие растворимые карбонаты, как  $Na_2CO_3$ , будучи сильноосновными, не подходят для культуральных сред. Наоборот, нерастворимые карбонаты используются в основном для приготовления многих сред. Чаще всего

добавляют тонко измельченный мел ( $\text{CaCO}_3$ ). Так как углекислый кальций нерастворим, он не вызывает сильного подщелачивания среды, особенно в сочетании с другими буферами. Когда pH раствора падает ниже 7,0, этот карбонат распадается с образованием  $\text{CO}_2$ . Таким образом он нейтрализует любые кислоты, которые могут появиться в культуре, переводя их в кальциевые соли.

Добавление  $\text{CaCO}_3$  к агаризированным средам, используемым для выделения и выращивания микроорганизмов, продуцирующих кислоты, помогает поддерживать нейтральную реакцию среды. Кроме того, выделяющие кислоту колонии растворяют частицы мела и образуют вокруг себя прозрачные зоны, что делает их легко видимыми на непрозрачном фоне.

В некоторых случаях для поддержания относительно постоянного pH в культуральной среде нельзя использовать ни буферы, ни растворимые карбонаты. Особая трудность возникает, например, если в среде в очень больших количествах образуются кислоты, а добавлять углекислый кальций нельзя. Еще большие затруднения встречаются, когда нужно поддерживать pH в слабощелочных средах, в которых рост бактерий приводит к образованию веществ с основными свойствами. В области pH от 7,2 до 8,5 фосфатные буферы неэффективны, а других подходящих буферов для этого диапазона pH не существует. Поэтому иногда приходится периодически или непрерывно доводить pH в культуральной жидкости до нужной величины, стерильно добавляя в среду сильную щелочь или кислоту. В некоторых лабораториях и производствах для этой цели используют сложные автоматизированные методы, с помощью которых можно непрерывно производить титрование среды и поддерживать постоянное значение pH. Многие микроорганизмы лучше развиваются в нейтральных или слабокислых условиях, которые создают с помощью подходящих буферов.

При подготовке и стерилизации питательных сред нередко выпадает осадок, особенно часто это происходит, если среда содержит относительно высокие концентрации фосфатов. Осадок формируется из-за того, что образуются нерастворимые комплексы фосфатов с некоторыми катионами (кальцием и железом). Обычно это не сказывается на ценности питательной среды, но осадок может затруднить наблюдение за развитием популяции микроорганизмов и количественную оценку параметров роста. Образование осадка можно избежать, если отдельно стерилизовать концентрированные растворы солей кальция и железа, а затем добавлять их к уже простерилизованной и охлажденной среде. Это можно также предотвратить, добавив в среду небольшое количество вещества, которое образует с этими металлами растворимый комплекс (хелат) и предотвратит тем самым образование ими нерастворимого комплекса с фосфатами. Чаще всего для этого используют этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТА) в концентрации 0,01 %.

При культивировании фотоавтотрофов и хемолитоавтотрофов часто нужно бывает обеспечить клетки достаточным количеством углекислоты. Культура может расти за счет  $\text{CO}_2$ , поступающей в среду из воздуха путем

диффузии; однако концентрация  $\text{CO}_2$  в атмосфере крайне низка (0,03 % на открытом воздухе и лишь несколько выше в закрытых помещениях). Поэтому для автотрофов углекислота нередко является фактором, лимитирующим рост. Чтобы создать лучшие условия, культуру насыщают воздухом, искусственно обогащенным  $\text{CO}_2$  (до концентрации 1–5 %). При культивировании автотрофов, способных расти в анаэробных условиях в закрытых сосудах (например, пурпурных и зеленых серобактерий), потребность в  $\text{CO}_2$  можно удовлетворить, добавив в среду  $\text{NaHCO}_3$ . Растворимые карбонаты нельзя использовать в средах, находящихся в контакте с воздухом, так как быстрый выход  $\text{CO}_2$  в атмосферу ведет к сильному подщелачиванию среды.

Освещение играет большую роль для культивирования ряда фототрофных микроорганизмов. Обеспечить одновременно и достаточное освещение, и нужную температуру – задача довольно трудная. При культивировании нефотосинтезирующих микроорганизмов для поддержания надлежащей температуры используют *термостаты*. Однако большинство термостатов не снабжено системой внутреннего освещения, и их нельзя использовать для выращивания фототрофных микроорганизмов.

Выставляя культуру на дневной свет, можно получить довольно плохо контролируемое и непостоянное освещение. При этом следует избегать прямого солнечного света, так как его интенсивность может оказаться чрезмерной, и культура может настолько сильно нагреться, что её рост окажется невозможным. Многие фототрофные микроорганизмы толерантны к постоянному освещению; в этих условиях они растут гораздо быстрее, поэтому выгоднее использовать искусственное освещение. При этом большое значение имеет спектральный состав света. В некоторых отношениях более удобны флуоресцентные лампы, так как они дают относительно мало тепла, что облегчает поддержание нужной температуры. Однако в длинноволновой области видимой части спектра и в ближней инфракрасной области излучение таких ламп слабее по сравнению с солнечным светом. Эти лампы можно применять при культивировании цианобактерий, осуществляющих фотосинтез при длинах волн менее 700 нм, но они совсем не растут или очень плохо растут с длинами волн от 750 до 1000 нм, которые необходимы для роста пурпурных и зеленых бактерий.

Для этих групп фотосинтезирующих бактерий в качестве источников искусственного света приемлемы только лампы накаливания, так что если нужна высокая интенсивность освещения, то возникают трудности с отводом тепла. Проще всего в этом случае помещать сосуды с культурой в освещаемую сбоку стеклянную или пластмассовую водяную баню, температуру которой можно стабилизировать, создавая циркуляцию воды. Можно также помещать культуры вместе с лампами накаливания в бокс и поддерживать в нем надлежащую температуру с помощью вентиляции или холодильного устройства.

*Селективные среды.* Известно, что ввиду чрезвычайно большого разнообразия метаболизма не существует такой среды или таких условий, в которых могли бы расти все разнообразные типы микроорганизмов,

встречающиеся в природе. Поэтому любая среда, подходящая для роста какого-то определенного вида, будет для него, в некоторой степени, *селективной*. В любой засеянной разными микроорганизмами среде размножаться будут лишь те из них, которые способны там расти, а развитие других видов будет подавлено. Если все потребности организма известны, то можно подобрать условия, специфически благоприятные для развития именно этого организма, что позволит выделить его даже из такой смешанной популяции, в которой он составляет лишь небольшую примесь. Либо путем прямого выделения, либо путем обогащения можно избирательно получать те или иные виды из природных местообитаний (например, из почвы или воды).

С помощью прямого высева на чашки с селективной агаровой средой можно выделить виды, способные расти в данных условиях. В жидкой же селективной питательной среде различные виды микроорганизмов будут конкурировать друг с другом за питательные вещества. Поэтому в жидкой питательной среде из всех популяций, способных расти в данных условиях, постепенно отбираются те, которые растут с наибольшей скоростью.

Селективность накопительной культуры определяется не только химическим составом среды. Получаемый в данной среде результат обогащения может существенно изменяться в зависимости от таких факторов, как температура, рН, ионная сила, освещенность, аэрация или источник инокулята. Селекцию с помощью температуры можно весьма успешно использовать для выделения, например, цианобактерий, которые по типу питания и метаболизму сходны со многими водорослями. И водоросли, и цианобактерии могут расти в простой минеральной среде на свету при 25 °С. Однако развитие водорослей можно почти полностью исключить, если проводить инкубацию при 35 °С, так как температурный оптимум для водорослей ниже, чем для цианобактерий.

Если вначале питательная среда не обладает высокой селективностью, то селективность ее для одного из микроорганизмов может резко возрасти в результате тех химических изменений, которые вызывает этот организм при своем росте. Например, бактерии и дрожжи, осуществляющие брожение, обычно менее чувствительны к образующим ими из углеводов органическим конечным продуктам, чем другие организмы. Поэтому их развитие в богатой углеводами питательной среде будет подавлять рост конкурирующих организмов. При выделении спорообразующих бактерий (из родов *Bacillus*, *Clostridium* и др.) можно полностью исключить конкуренции со стороны видов, не образующих спор, если предварительно обработать надлежащим способом инокулят. Пастеризация инокулята: кратковременный прогрев (2–5 мин) при высокой температуре (80 °С) – уничтожит все вегетативные клетки, но не уничтожит гораздо более устойчивые споры.

Использование несбраживаемых субстратов приводит обычно к накоплению облигатных аэробов, чаще всего представителей рода *Pseudomonas*. Например, включая в качестве единственного источника углерода бензоат натрия (1 г/л), можно получить окисляющие бензоат штаммы *Pseudomonas putida*. В синтетических средах для накопления аэробов в качестве

источника азота обычно используют соли аммония. Если не добавлять соединений азота, то можно выделить культуры азотфиксирующих аэробных бактерий рода *Azotobacter*.

Накопительные культуры некоторых бактерий, обладающих крайне сложными потребностями в питательных веществах, получить в среде определенного состава невозможно. Тем не менее, иногда такие организмы можно выделить из природных источников, используя специально разработанные среды. Примером могут служить молочнокислые бактерии. Для них характерна высокая устойчивость к молочной кислоте, которую они сами образуют при сбраживании сахара. Достаточно сложной и селективной является среда для пропионовокислых бактерий. Эти бактерии при брожении образуют пропионовую кислоту и  $\text{CO}_2$ . Хотя они легко сбраживают глюкозу, они не могут конкурировать в содержащей глюкозу среде с молочнокислыми бактериями и бактериями кишечной группы, так как растут сравнительно медленно и не выносят кислых условий. Однако пропионовокислые бактерии могут также сбраживать молочную кислоту, которая не является подходящим субстратом для большинства других организмов, осуществляющих различные брожения. Эту способность и используют для их накопления.

Сложные среды можно с успехом использовать для селективного выделения уксуснокислых бактерий. Эти бактерии хорошо приспособлены к среде с высокими концентрациями спирта. Кроме того, они менее других бактерий чувствительны к уксусной кислоте, которую они образуют из спирта в процессе дыхания.

### **Контрольные вопросы**

1. Какие культуры называются чистыми и накопительными?
2. Дайте понятие «штамм», «клон», «слайд-культура».
3. Назовите основные правила работы с культурами микроорганизмов.
4. Основные потребности микроорганизмов в химических элементах.
5. Перечислите группы микроорганизмов по отношению к источнику питания и энергии.
6. Назовите этапы выделения чистой культуры.
7. Что такое факторы роста культур микроорганизмов?
8. Основные принципы составления питательных сред для выделения культур микроорганизмов.
9. Дайте понятие «селективность» условий и питательных сред.
10. Какие группы микроорганизмов существуют по отношению к кислороду?

## 2 МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ НАКОПИТЕЛЬНЫХ И ЧИСТЫХ КУЛЬТУР

Бактерии – большая группа прокариотных микроорганизмов, которые относят к царству *Prokaryotae*. В XX в. проблема систематики бактерий стала настоящей в связи со стремительно увеличивавшимся как вширь (описание новых видов), так и вглубь (более детальное разностороннее изучение уже описанных видов) объемом знаний об этих организмах. Наиболее полно задача быстрой идентификации прокариотных организмов решается с помощью Определителя бактерий Берги, выпускаемого периодически Обществом американских бактериологов с привлечением крупных специалистов в области изучения тех или иных групп бактерий. Первое издание определителя было выпущено в 1923 г. группой американских бактериологов под руководством Д. Х. Берги (D. H. Bergey, 1860 — 1937); девятое издание в 4 томах вышло в 1984 — 1989 гг.

В девятом издании Определителя бактерий Берги все обнаруженные организмы, отнесенные в царство *Prokaryotae*, разделены на 33 группы. Признаки, по которым осуществляется разделение на группы, как правило, относятся к категории легко определяемых и вынесены в названия групп, например: грамотрицательные аэробные палочки и кокки (группа 4), анаэробные грамотрицательные кокки (группа 8), грамположительные палочки и кокки, образующие эндоспоры (группа 13), скользящие бактерии, образующие плодовые тела (группа 24).

Основная идея классификации "по Берги" — легкость идентификации бактерий. Для осуществления этого используют совокупность признаков: морфологических (форма тела; наличие или отсутствие жгутиков; капсулы; способность к спорообразованию; особенности внутриклеточного строения; окрашивание по Граму), культуральных (признаки, выявляемые при культивировании в лаборатории чистой культуры), физиолого-биохимических (способы получения энергии; потребности в питательных веществах; отношение к факторам внешней среды; нуклеотидный состав и последовательность нуклеотидов в молекуле ДНК; наличие и характер минорных оснований в ДНК; нуклеотидный состав рибосомальной РНК; последовательность аминокислот в ферментных белках с аналогичными функциями).

### 2.1 Биохимические методы получения накопительных и чистых культур бактерий

Биохимические методы получения накопительных и чистых культур бактерий основаны на их способности усваивать определенный вид субстрата или особенностях физиологии потребления химических соединений.

#### **Азот как субстрат для бактерий рода *Azotobacter***

Азот, имеющийся в атмосфере, способны использовать только прокариоты. Самостоятельно или в симбиозе с высшими растениями они могут

переводить инертный азот в органические соединения и включать его (непосредственно или через растения) в белок, который в конечном счете переходит в почву. Способность микроорганизмов усваивать молекулярный азот и строить из него азотсодержащие соединения клетки называется азотфиксацией. К числу наиболее активных свободноживущих азотфиксаторов относятся виды *Azotobacter*.

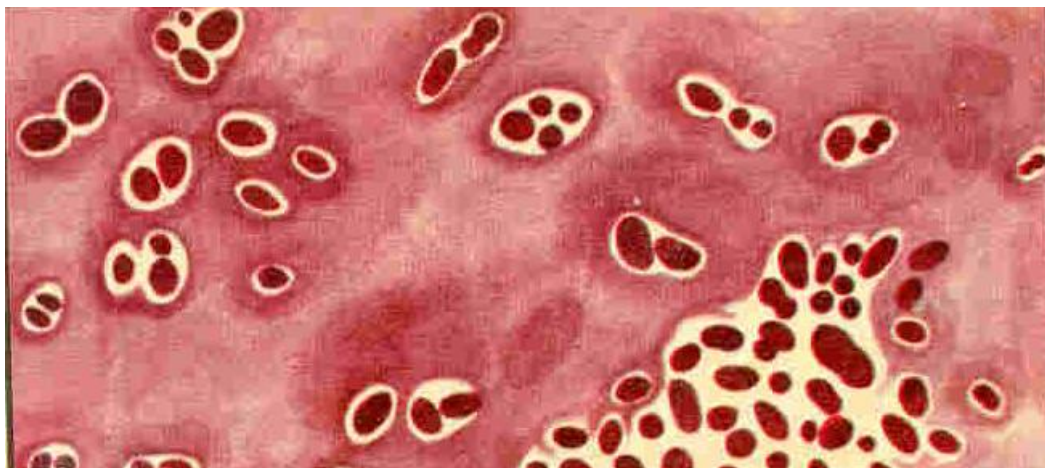
Для выделения *A. chroococcum* приготовят среду состава (г/л):

вода дистиллированная, 1000			
маннит	- 2,0;	$K_2HPO_4$	- 0,5;
$MgSO_4 \times 7H_2O$	- 0,2;	$FeSO_4 \times 7H_2O$	- 0,1.

рН среды доводят до 7,3-7,6 и стерилизуют 15 мин при температуре 121 °С. Среду разливают по 100 мл в колбы на 1 л.

В качестве посевного материала лучше всего брать огородную или садовую почву. Почву в количестве 0,1 г вносят в колбу со 100 мл среды. Инкубируют, перемешивая при 30 °С. Для очистки культуры *Azotobacter* необходимо приготовить среду такого же состава с добавлением 1,5 – 2,0 % агара.

Через несколько дней на поверхности жидкости образуется жирная пленка, сначала серовато-белая, а затем постепенно буреющая. При микроскопическом исследовании этого препарата в пленке обнаруживается присутствие большого количества характерных крупных клеток *Azotobacter* с крупными слизистыми капсулами (рисунок 2).



**Рисунок 2 - Образование капсул и цист у бактерий *Azotobacter chroococcum***

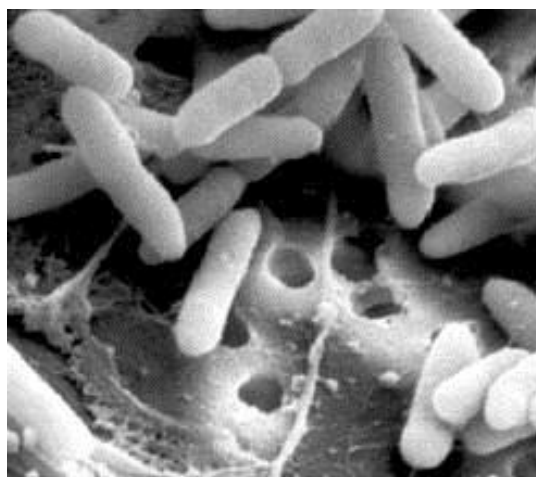
Дальнейшие пересевы в такую же среду проводят, перенося частицу пленки в стерильную жидкость. Во второй или в третьей генерации при исследовании пленки обнаруживается достаточное обогащение ее клетками *Azotobacter*; можно провести посев на плотную среду. Из молодой культуры, в которой еще не образовалась плотная пленка, а лишь заметна легкая муть, следует взять петлей часть материала и тщательно взболтать в небольшом количестве стерильной воды. Для чего готовят три разведения и каждое

рассеивают с использованием шпателя, посевы инкубируют при 25–30 °С. Через несколько дней на поверхности среды появляются выпуклые матовые колонии, напоминающие капли крахмального клейстера. Наряду с ними обыкновенно встречаются тоже выпуклые, но стекловидные и прозрачные колонии *Radiobacter* – мелкой палочки, названной так Бейеринком по ее свойству образовывать радиальные сочетания клеток в виде звезд.

Изолированные колонии, отобранные для отсева чистой культуры, подробно исследуют, используя бинокулярную лупу. Из колонии готовят препарат, который должен состоять только из клеток *Azotobacter*. Чистые культуры отсеивают в пробирки на агаризованную среду Эшби.

### **Органические кислоты как субстрат для бактерий рода *Pseudomonas***

Некоторые виды рода *Pseudomonas*, относящиеся к аэробам, можно получить в виде накопительных и чистых культур, используя их способность расти на среде с нитратом как источником азота, а также с солями различных органических кислот в качестве источников углерода и энергии. Бактерии рода *Pseudomonas* – правильные мелкие грамотрицательные палочки, подвижные (рисунок 3).



**Рисунок 3 – Морфология клеток бактерий *Pseudomonas aeruginosa***

Для выделения бактерий рода *Pseudomonas* используют *сукцинат-солевую среду* следующего состава (г/л):

сукцинат натрия	– 4,0;	KNO <sub>3</sub>	– 0,5;
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	– 0,5;	MgSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O	– 0,2;
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	– 2,6;	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	– 2,9;
CaCl <sub>2</sub> × 2H <sub>2</sub> O	– 0,1;	FeSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O	– 0,2.

Доводят рН до 7,0 и стерилизуют при 121 °С 15 мин. Предварительно разливают среду в пробирки по 3 мл. К 3 мл стерильной среды добавляют 0.1 г почвы или ила. Для получения накопительных культур псевдомонад, способных к флуоресценции, таких как *P.putida*, *P.fluorescens*, *P.aeruginosa*,

посевы инкубируют при 30 °С (2 пробирки). Для выделения *P.aeruginosa* инкубацию проводят при 41 °С. Чистые культуры следует выделять на агаризованной сукцинат-солевой среде методом Коха.

#### *Триптофан как субстрат для псевдомонад.*

Для получения накопительной культуры псевдомонад, способных использовать триптофан как единственный источник углерода и азота, в колбу Эрленмейера на 250 мл с 40 мл триптофановой среды вносят 0,1 г почвы. Состав среды с триптофаном (г/л):

MgSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O	– 0,2;	CaCl <sub>2</sub>	– 0,02;
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	– 1,0;	NaMoO <sub>4</sub> × 2H <sub>2</sub> O	– 0,001;
MnCl <sub>2</sub> × 4H <sub>2</sub> O	– 0,002;	триптофан	– 1,0;
FeSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O	– 0,05;	дистиллированная вода	

Смесь инкубируют на качалке в течение 5-7 дней при 25 °С. Далее 0.1 мл культуры переносят в другую колбу со средой и инкубируют 2-3 дня. После следующего серийного пересева полученную чистую культуру рассеивают штрихом на триптофановую среду с агаром (15 г/л). После трех дней инкубации делают посев из отдельных колоний на скошенную в пробирка агаризованную питательную среду.

#### **Получение накопительной культуры молочнокислых бактерий**

Общим признаком молочнокислых бактерий является способность осуществлять сбраживание углеводов (моно- и дисахаров) с образованием молочной кислоты (молочнокислое брожение). Инокулятом для получения накопительных культур молочнокислых бактерий могут служить молочнокислые продукты.

В качестве питательной среды используют стерильное молоко. В пробирку со стерильным молоком вносят 1 мл кислого молока или другого молочнокислого продукта. Пробирку с посевом и контрольную (со стерильным молоком) ставят в термостат при 30–32 °С. Через 24 ч отмечают свертывание молока, характер роста микроорганизмов (образование сгустка – плотного, рыхлого, слизистого), газообразование. Далее проводят микроскопирование препарата фиксированных клеток, приготовленного из культуральной жидкости. Отмечают морфологические особенности бактериальных клеток: форму, спорообразование, подвижность и т.д.

Учитывая особенность субстрата (молока), препарат фиксированных клеток готовят следующим образом: на предметное стекло из пробирки наносят каплю культуральной жидкости, которую равномерно размазывают покровным стеклом. Мазок высушивают на воздухе, фиксируют и одновременно обезжиривают смесью спирта и эфира (1:1) в течение 10 мин, которую наносят непосредственно на мазок. После испарения смесь наливают повторно. Высушенный мазок окрашивают синькой Леффлера.

Для выделения молочнокислых бактерий используют ряд селективных питательных сред.

*Среда Бликфельда.* В 950 см<sup>3</sup> дистиллированной воды растворяют 10 г лактозы, 10 г глюкозы, 5 г пептона, кипятят и фильтруют через бумажный фильтр. К фильтрату добавляют 20 см<sup>3</sup> дрожжевого экстракта, 32 см<sup>3</sup> раствора бромкрезолового пурпурного. Устанавливают рН на уровне (7,3±0,1), разливают в стерильные пробирки и стерилизуют 20 мин при (117±1) °С.

*Среда Бригса в модификации Шарпа.* В 875 см<sup>3</sup> дистиллированной воды вносят 15 г пептона, 20 г глюкозы, 25 см<sup>3</sup> дрожжевого экстракта, 5 г натрия ацетата, 5 г калия фосфата однозамещенного, 2 г аммония цитрата, 100 см<sup>3</sup> томатного сока (в расчете, что в нем содержится не менее 4,5 % растворимых сухих веществ; если в соке количество сухих веществ другое, то делают пересчет на содержание сухих веществ 4,5 %), 1 см<sup>3</sup> твина-80, 5 см<sup>3</sup> раствора солей (MgSO<sub>4</sub> × 7H<sub>2</sub>O – 11,5 г; MnSO<sub>4</sub> × 4H<sub>2</sub>O – 2,86; FeSO<sub>4</sub> × 7H<sub>2</sub>O – 0,68 г, дистиллированная вода – до 100 см<sup>3</sup>), 15 г агара. Смесь кипятят на слабом огне до полного растворения агара. рН устанавливают таким образом, чтобы после стерилизации он составлял (6,5±0,1) при 25 °С. Среду стерилизуют 15 мин при (115±1) °С.

*Среда дрожжевая.* К 100 см<sup>3</sup> дрожжевого экстракта добавляют 900 см<sup>3</sup> дистиллированной воды, 10 г простерилизованного кальция карбоната и 100 г сахарозы. Смесь нагревают до растворения сахарозы, устанавливают рН таким образом, чтобы после стерилизации он составлял (7,1±0,1) при 25 °С. Разливают в пробирки по 10 см<sup>3</sup> и стерилизуют при (121±1) °С в течение 15 мин.

*Капустный агар.* К 1 дм<sup>3</sup> водопроводной воды добавляют 200 г размельченной свежей капусты, смесь доводят до кипения, кипятят в течение 10–14 мин. Фильтруют через ватно-марлевый фильтр. Полученный фильтрат разводят водой в 2 раза. Затем добавляют 20 г глюкозы, 10 г пептона, 10 г карбоната кальция и 15–20 агара, который расплавляют в фильтрате при нагревании. Устанавливают рН среды 7,0–7,4, разливают в стерильные колбы и стерилизуют 20 мин при температуре (121±1) °С.

*Среда из томатного сока.* К 700 см<sup>3</sup> воды добавляют 300 см<sup>3</sup> томатного сока, 2 г дрожжевого экстракта (или 10 см<sup>3</sup> его раствора) и 10 г глюкозы. Доводят рН до 5,5–5,6, после чего раствор фильтруют, разливают по 100 см<sup>3</sup> в стерильные колбы и стерилизуют в автоклаве 20 мин при (121±1) °С. Перед посевом в асептических условиях смешивают 100 см<sup>3</sup> жидкой среды со 100 см<sup>3</sup> расплавленного агара. Агаризованную среду вносят в чашки, содержащие 0,25 г стерильного кальция карбоната.

*Среда МРС.*

*Жидкая среда МРС.* В мерную колбу вместимостью 1 дм<sup>3</sup> помещают 10 г пептона, 2 см<sup>3</sup> дрожжевого экстракта, 20 г глюкозы, 1 см<sup>3</sup> твина-80, 2 г калия фосфата двузамещенного, 5 г натрия ацетата, 2 г триаммония цитрата, 0,2 г магния сульфата, 0,05 г марганца сульфата (MnSO<sub>4</sub> × 4H<sub>2</sub>O), доливают до метки мясной водой. Растворяют компоненты нагреванием на водяной бане и устанавливают рН таким образом, чтобы после стерилизации он составлял

( $6,5 \pm 0,1$ ) при  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Среду разливают по  $10\text{ см}^3$  в стерильные пробирки и стерилизуют в автоклаве при ( $121 \pm 1$ )  $^{\circ}\text{C}$  в течение 15 мин. Пробирки с питательной средой хранят при температуре ( $4 \pm 1$ )  $^{\circ}\text{C}$  не более 30 суток.

*Агаризированная среда МРС.* К  $1\text{ дм}^3$  жидкой среды МРС добавляют 15–18 г агара. После растворения компонентов среду разливают в стерильные колбы и автоклавируют 15 мин при ( $121 \pm 1$ )  $^{\circ}\text{C}$ . Готовую среду хранят при температуре ( $4 \pm 1$ )  $^{\circ}\text{C}$  не более 30 суток.

Для повышения селективности этой среды после стерилизации к  $1\text{ дм}^3$  добавляют  $1\text{ см}^3$  щелочного раствора сорбиновой кислоты. Раствор сорбиновой кислоты готовят предварительно. Для этого 1 г препарата переносят, смывая раствором натрия гидроксида концентрацией  $1\text{ М/дм}^3$ , в мерную посуду вместимостью  $100\text{ см}^3$  и затем доводят объем до метки.

*Мясопептонный бульон.*

Среда с рН 9,6. К мясопептонному бульону добавляют растворы щелочи таким образом, чтобы после стерилизации рН составлял 9,6 при  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Среду стерилизуют при ( $121 \pm 1$ )  $^{\circ}\text{C}$  в течение 20 мин.

Среда с рН 7,4 (с 6,5 % натрия хлорида). При приготовлении мясопептонного бульона на  $1\text{ дм}^3$  мясной воды добавляют 65 г натрия хлорида и 10 г сухого пептона. Кипятят 30 мин, фильтруют через ватно-марлевый фильтр. Доводят рН до 7,4, бульон разливают в колбы и стерилизуют 20 мин при ( $121 \pm 1$ )  $^{\circ}\text{C}$ .

*Питательный агар с сахарозой.* 100 г сахарозы и 15 г агара добавляют в  $1\text{ дм}^3$  мясопептонного бульона. Периодически перемешивая, смесь нагревают до кипения и полного растворения компонентов. Затем охлаждают до  $45 - 55\text{ }^{\circ}\text{C}$  и устанавливают рН таким образом, чтобы после стерилизации он составлял  $7,1 \pm 0,1$  при  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Среду разливают в колбы и стерилизуют 15 мин при температуре ( $121 \pm 1$ )  $^{\circ}\text{C}$ . После стерилизации и проверки рН среду тщательно перемешивают и разливают в чашки Петри. Хранят среду при температуре ( $4 \pm 1$ )  $^{\circ}\text{C}$  не более 14 суток.

*Среда Редди.* Берут 2 колбы с  $500\text{ см}^3$  дистиллированной воды. В одну добавляют 15 г агара и нагревают до его растворения. В другую вносят 10 г калия цитрата, 15 г карбоксиметилцеллюлозы и растворяют при нагревании. Содержимое обеих колб смешивают и добавляют 3 г пептона,  $25\text{ см}^3$  дрожжевого экстракта, 1,25 г калия фосфата двухзамещенного, 5 г L-аргинина гидрохлорида. Нагревают на водяной бане до полного растворения компонентов, охлаждают до  $45 - 55\text{ }^{\circ}\text{C}$  и устанавливают рН таким образом, чтобы после стерилизации он составлял ( $6,3 \pm 0,2$ ) при  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Основу среды стерилизуют при  $121 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  в течение 15 мин и хранят при температуре ( $4 \pm 1$ )  $^{\circ}\text{C}$  не более 30 суток.

Для приготовления питательной среды к  $1\text{ дм}^3$  расплавленной и охлажденной до  $45 - 55\text{ }^{\circ}\text{C}$  основы добавляют  $5\text{ см}^3$  стерильного обезжиренного молока,  $100\text{ см}^3$  суспензии кальция карбоната массовой концентрацией  $30\text{ г/дм}^3$  и  $2\text{ см}^3$  раствора бромкрезолового пурпурного массовой концентрацией  $1\text{ г/дм}^3$ .

*Среда Рогоза жидкая.* В мерную колбу вместимостью 1 дм<sup>3</sup> помещают 10 г пептона, 25 см<sup>3</sup> дрожжевого экстракта, 20 г глюкозы, 1 см<sup>3</sup> твина-80, 6 г калия фосфата однозамещенного, 2 г аммония цитрата, 25 г натрия ацетата, 1,32 см<sup>3</sup> ледяной уксусной кислоты, 0,575 г магния сульфата, 0,12 г марганца сульфата (MnSO<sub>4</sub> × 2H<sub>2</sub>O) и 0,034 г железа сульфата. Доливают до метки дистиллированной водой и растворяют компоненты нагреванием на водяной бане. После этого устанавливают рН таким образом, чтобы после стерилизации он составлял (5,4±0,1) при 25 °С. Среду разливают по 10 см<sup>3</sup> в стерильные пробирки и стерилизуют в автоклаве при (121±1) °С в течение 15 мин. Пробирки с питательной средой хранят при температуре (4±1) °С не более 30 суток.

*Среда Рогоза агаризованная.* Готовят с добавлением 20 г агара. После растворения компонентов среду разливают в стерильные колбы и автоклавируют 15 мин при (121±1) °С. Готовую среду хранят при температуре (4±1) °С не более 30 суток.

*Среда Ли.* Вначале готовят основу среды. Для этого в мерную колбу вместимостью 1 дм<sup>3</sup> вносят 10 г пептона, 50 см<sup>3</sup> дрожжевого экстракта, 5 г лактозы, 3 г карбоната кальция (простерилизованного), 0,5 г Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> и 18 г агара. Доливают дистиллированной водой до метки, растворяют компоненты нагреванием на водяной бане. Устанавливают рН таким образом, чтобы после стерилизации он составлял (7,0±0,1) при 25 °С. Среду стерилизуют в автоклаве при (121±1) °С в течение 20 мин и хранят при температуре (4±1) °С не более 30 суток.

Для приготовления питательной среды к 1 дм<sup>3</sup> основы добавляют 20 см<sup>3</sup> стерильного раствора бромкрезолового пурпурного массовой концентрацией 1 г/дм<sup>3</sup>, перемешивают и разливают в чашки Петри. Среду хранят при температуре (4±1) °С не более 7 суток.

### **Лактат как субстрат для получения накопительной культуры пропионовокислых бактерий**

Для получения накопительной культуры бактерий семейства *Propionibacteriaceae*, вызывающих пропионовокислое брожение, используют элективные анаэробные условия и состав субстрата. В отличие от многих бактерий, пропионовокислые бактерии хорошо утилизируют лактаты, поэтому зрелые сыры («Швейцарский», «Алтайский») успешно используют для выделения пропионовокислых бактерий. Селективными условиями являются минеральная среда, содержащая 4 % лактата Na и 1000 мкг/мл сульфаниламида. Пропионовокислые бактерии хорошо используют лактат в присутствии дрожжевого экстракта (2–5 %) или бесклеточного экстракта молочнокислых бактерий. В качестве источников углерода для культивирования пропионовокислых бактерий используют среды, содержащие глюкозу, лактозу, пируват, глицерин. Пропионовокислое брожение сопровождается образованием нелетучих дикарбоновых кислот (яблочной, фумаровой, янтарной), кетокислот (щавелевоуксусной, пировиноградной) как промежуточных продуктов и монокарбоновых летучих кислот (пропионовой, уксусной, следов

муравьиной) как конечных продуктов. Накопление и соотношение органических кислот зависит от видовой принадлежности штамма, состава среды, аэрации и других факторов.

Пропионовокислые бактерии (например, *Propionibacterium shermanii*), культивируют в среде следующего состава (г/л): глюкоза – 20,0; кукурузный экстракт – 20,0;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – 3,0;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 2,0;  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  – 0,002; вода водопроводная 1000 мл; pH среды 6,08 – 7,0 устанавливают по бромтимолблау с помощью 10 %-го раствора  $\text{NaHCO}_3$  и 10 %-го раствора  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .

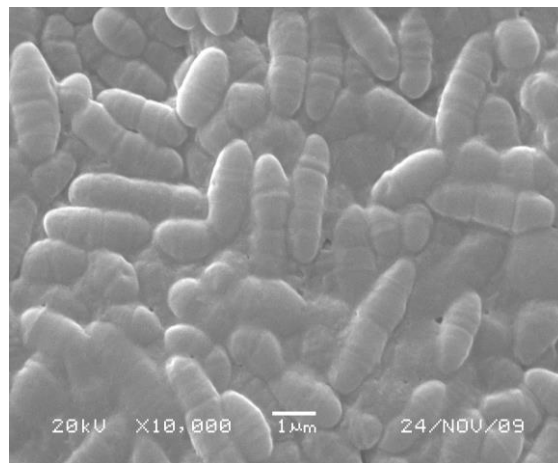
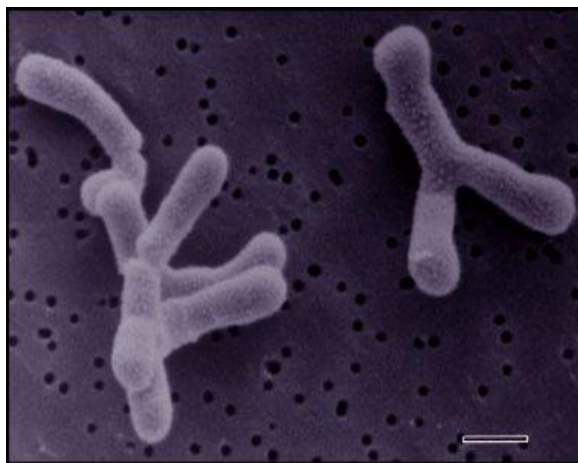
Среду разливают по 150 мл в 4 одинаковые колбы (объемом на 250 мл) и стерилизуют при 152 кПа, 50 мл 10 %-го раствора  $\text{NaHCO}_3$  и 10 мл 10 %-го раствора  $\text{H}_2\text{SO}_4$  стерилизуют при 202,6 кПа. Перед внесением инокулята (0,1 г сыра или творожной массы) pH стерильной среды проверяют по бромтимолблау и в случае необходимости доводят до первоначального значения с помощью стерильных растворов  $\text{NaHCO}_3$  и  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .

Чистоту культуры проверяют на среде следующего состава (г/л): глюкоза – 10,0;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – 3,0; мел – 10,0; пептон – 10,0; агар-агар – 15,0; вода водопроводная 1000 мл; pH среды 6,8 – 7,0.

В качестве посевного материала используют 48 – часовую культуру пропионовокислых бактерий, выращенных в вышеуказанной среде. Количество посевного материала – 10 % (объемных). Инокулируют среду в 3 колбах. Среду в одной колбе оставляют стерильной и используют в качестве контроля. Культивирование проводят в стационарных условиях при температуре 30 °С в течение 72 часов. Через каждые 24 часа кислоты, образуемые бактериями, нейтрализуют стерильным раствором 10 %-ного  $\text{NaHCO}_3$ .

### **Выделение культур бифидобактерий**

Бифидобактерии – грамположительные микроорганизмы, имеют неправильную форму клеток, изменяющуюся при старении культуры (рисунок 4). Они требовательны к источникам питания и факторам роста. В.Ф. Семенихина показала, что выделение бифидобактерий удобно производить на на следующих средах.



**Рисунок 4 – Морфология клеток бифидобактерий**

*Печеночно-цистиновая среда по Блауроку*: 500 г мелко нарезанной печени кипятят в литре дистиллированной воды в течение двух часов, содержимое отфильтровывают через складчатый бумажный фильтр. Фильтрат доливают до 1 литра водой и добавляют следующие ингредиенты: пептон – 10,0 г; цистин – 1 мл раствора концентрации 1:10000; NaCl – 5,0 г; агар – 20,0 г; лактоза – 10,0 г; рН среды – 7,0-7,2.

*Среда по Хенелю* (без сорбиновой кислоты): томатный сок – 400 мл мясной гидролизат по Хоттингеру – 10 мл; панкреатический – 100 мл; агар – 20 г; перевар казеина и дрожжевой автолизат – 100 мл; дистиллированная вода – 370 мл; рН среды 7,0. При необходимости добавляют 0,04 % сорбиновой кислоты. Бактерии можно изолировать и на агаризированной среде с дрожжевым автолизатом и лактозой (1 %).

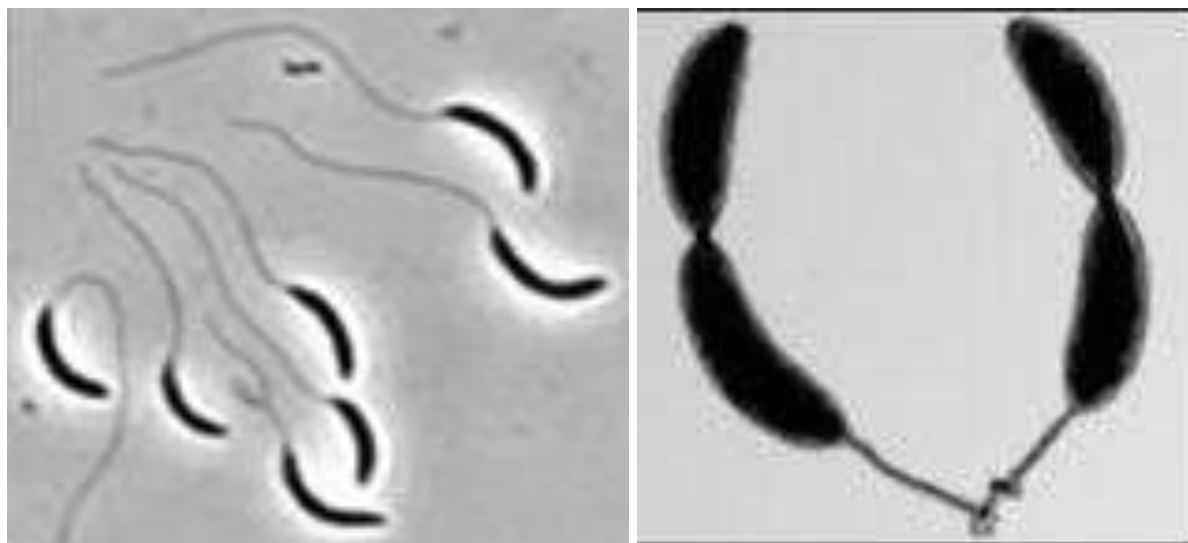
В.Ф. Семенихина рекомендует для выделения *Bifidoobacterium bifidum* использовать девятое и десятое разведение фекалий. При этом наиболее крупные колонии бифидобактерий (1,5– 4 мм) вырастают на среде по Хенелю, а мелкие – на печеночно-цистиновом агаре (0,5–2 мм). На нем обнаруживается наибольшее число ветвящихся клеток, а среда по Хенелю способствует образованию булавовидных и веретенообразных форм. Указанные среды пригодны и для хранения *Bifidoobacterium bifidum* (при 2–5 °С).

Пересевы культур следует проводить через каждые 7–10 суток. Хорошо сохранять их в лиофилизированном состоянии. Для этого суспензию *Bifidoobacterium bifidum* высушивают (до содержания остаточной влаги 1,3 %) в среде, имеющей 8 % сахарозы, 1,5 % желатина, 5 % обезжиренного молока и хранят в ампулах под вакуумом. Г.И. Гончарова (1968) для выделения и культивирования *Bifidoobacterium bifidum* рекомендует модифицированную среду Блаурока. Для чего к 1 л печеночного бульона добавляют 750 мл агара и 1 мл твина 80, рН среды доводят до 7,2–7,4.

### **Разбавленная среда для получения культур каулобактеров**

Для выделения бактерий этого рода используют пробы воды из прудов, озер или даже водопроводной с добавлением пептона используют в качестве элективных сред. Для получения накопительной культуры в колбы вносят воду из аквариума и добавляют 0,01 % пептона. Колбы закрывают неплотно бумагой или алюминиевой фольгой и инкубируют при 20–25 °С. После появления стебельковых бактерий (обычно на 4-й день) – 1 клетка на 10–20 других – делают посев из поверхностной пленки в чашки с агаровой средой, приготовленной на водопроводной воде с 0,05 % пептона, а затем инкубируют посевы при 30 °С. В условиях низкого содержания пептона обеспечивается рост мелких колоний каулобактера, но ингибируется рост других бактерий. Примерно через 4 дня (или более) кусочки среды с микроколониями каулобактера переносят в чашки со средой, содержащей 0,2 % – пептона, 0,1 % – дрожжевого экстракта, 0,02 % – MgSO<sub>4</sub> × 7H<sub>2</sub>O; 1,0 % – агара. Через 2 дня готовят витальные препараты и отдельные колонии пересеять с агара в чашки со свежей средой.

Каулобактеры представляют собой стебельковые бактерии, способные расти на средах с малым содержанием питательных веществ, которые не обеспечивают рост большинства других микроорганизмов (рисунок 5).



**Рисунок 5 – Морфология клеток стебельковых бактерий рода *Caulobacter***

*Приготовление дрожжевого экстракта.* Водную взвесь (10%-ю) из сухих дрожжей или 30 %-ю из прессованных хлебных кипятят 1 ч, оставляют в течение суток на холоде, жидкий слой декантируют, фильтруют через бумагу и нагревают при 120 °С 30 мин, после чего неоднократно фильтруют до получения совершенно прозрачного фильтрата, который затем стерилизуют при 0,5 атм. 30 мин.

#### **Этиловый спирт как субстрат для уксуснокислых бактерий**

В настоящее время в семейство *Acetobacteriaceae* объединены 14 родов: *Acetobacter*, *Acidiphilium*, *Acidisphaera*, *Acidocella*, *Acidomonas*, *Craurococcus*, *Asaia*, *Gluconoacetobacter*, *Gluconobacter*, *Paracraurococcus*, *Rhodopila*, *Roseomonas*, *Stella*, и *Kozakia*. Виды различаются по способности развития на средах с высокими концентрациями ацетата и глюкозы. Бактерии хорошо растут на D-маннитолу. Названия родов *Acetobacter* и *Gluconobacter* в этом семействе были известны еще, начиная с 1898 и далее до 1935 гг., но таксоны остальных родов выделены и опубликованы только после 1989 года.

У всех уксуснокислых бактерий метаболизм дыхательного типа, никогда бродильного нет. Каталазоположительные и оксидазоотрицательные. Желатину не разжижают, индол и H<sub>2</sub>S не образуют. Окисляют этанол до уксусной кислоты. Окисляют ацетат до CO<sub>2</sub> и H<sub>2</sub>O в зависимости от его концентрации в среде. Большинство представителей родов семейства *Acetobacteriaceae* (кроме *Asaia*) окисляет одно- и многоатомные спирты. Этиловый спирт окисляют в уксусную кислоту. После полного окисления спирта бактерии рода *Acetobacter*,

*Gluconacetobacter* и *Acidomonas* окисляют уксусную кислоту дальше до CO<sub>2</sub> и H<sub>2</sub>O, вследствие чего, их называют «переокислителями».

Среди уксуснокислых бактерий имеются представители, способные синтезировать внеклеточный полимер бактериальную целлюлозу. Так, например, виды *Gluconacetobacter xylinus*, *Gluconacetobacter hansenii*. До 1998 года целлюлозосинтезирующие бактерии *Acetobacter xylinum* в научной литературе рассматривали как отдельный вид. В 1998 этот вид был снова переклассифицирован как *Gluconacetobacter xylinus*. Вид *Acetobacter hansenii* был реклассифицирован как *Gluconacetobacter hansenii* в 1998 г. автором Yamada.

Выделение рода *Gluconacetobacter* основано на детальном анализе последовательности 16S рРНК и хемотаксономических сравнений систем убихинонов. Классификация видов семейства *Acetobacteraceae* на основе анализа последовательности рибосомальной 16S рРНК.

Получение накопительной культуры уксуснокислых бактерий основано на их высокой, по сравнению с другими микроорганизмами, устойчивости в отношении уксусной кислоты и способности к окислению спиртов. Культуру уксуснокислых бактерий можно получить на пиве, пользуясь различным отношением к реакции питательной среды и температуре этих бактерий. При малой начальной кислотности на пиве быстрее развиваются пленчатые дрожжи. При достаточной кислотности вырастают уксуснокислые бактерии. Чем ниже температура среды, тем выше должна быть кислотность, чтобы развитие пленчатых дрожжей было подавлено.

Для получения определенных видов уксуснокислых бактерий установлены следующие соотношения между температурой и кислотностью среды.

Температура культивирования, °С	40	35	30	25	20	15
Количество 1 n СН <sub>3</sub> СООН, добавляемое в среду, %	0	5	10	15	20	25

Свежее пиво разливают в колбы слоем в 2 см и подкисляют уксусной кислотой (винным уксусом). К содержимому каждой колбы прибавляют по 0,5 мл этилового спирта для обогащения среды энергетическим материалом. Колбы закрывают ватными пробками и ставят в термостат. Через пять суток на поверхности пива появляется беловато-серая пленка, состоящая из уксуснокислых бактерий. Пленку микроскопируют и определяют вид развившихся уксусных бактерий. Клетки уксуснокислых бактерий имеют форму коротких правильных палочек (рисунок 6).



**Рисунок 6 – Морфология клеток уксуснокислых бактерий рода *Acetobacter***

Развившихся бактерий можно различать до некоторой степени по внешнему виду образуемой ими пленки. У бактерий *Acetobacter aceti* пленка гладкая слизистая, не поднимается вверх по стенкам колбы. В культурах *Acetobacter pasteurianum* пленка морщинистая и сухая. *Acetobacter xylinum* в отличие от других дает чрезвычайно плотную, кожистую, толстую слизистую пленку. *Acetobacter kuttingianum* дает такую же пленку, как *A. aceti*, но ее края поднимаются по стенкам колбы.

Для микроскопического исследования уксуснокислых бактерий пользуются окрашиванием препарата йодом. У клеток *A. pasteurianum* и *A. kuttingianum* оболочка клеток синее. Подсинение пленки можно наблюдать без микроскопирования, если в фарфоровую чашку с кусочком пленки налить раствор йода. *A. aceti* и *A. rancens* подсинения не дают и окрашиваются йодом в желтый цвет.

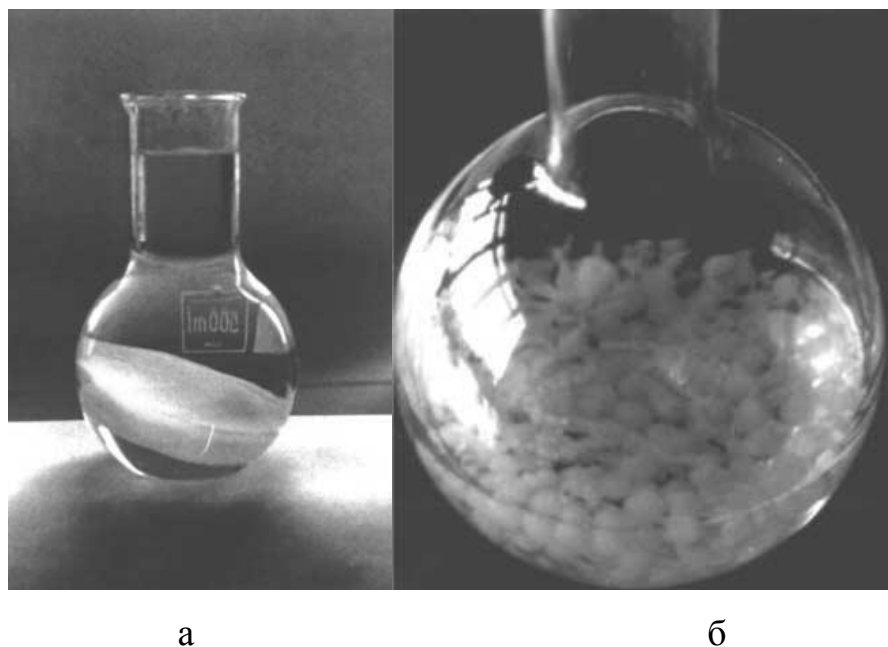
Выделение уксуснокислых бактерий в чистую культуру производят на мясопептонном сахарном (2 %-м) агаре или на сусло-агаре с прибавлением к нему после стерилизации 3 % этилового спирта. Рассев проводят шпателем. На третьи сутки при 35 °С на чашках вырастают колонии, из которых проводят отсев в свежую среду. Рекомендуются среды:

- |    |   |           |
|----|---|-----------|
| 1. | Дистиллированная вода                           | – 1000 мл |
|    | Виноградный сахар                               | – 30 г    |
|    | Пептон  | – 10 г    |
|    | Мясной экстракт                                 | – 10 г    |
|    | Этиловый спирт                                  | – 40 мл   |
| 2. | Дистиллированная вода                           | – 1000 мл |
|    | Глюкоза   | – 20 г    |
|    | (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | – 3 г     |
|    | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                 | – 2 г     |
|    | MgSO <sub>4</sub> × H <sub>2</sub> O            | – 2 г     |
|    | Этиловый спирт                                  | – 20 мл   |

3. 6 °Б сусло пивное с прибавлением 5%-го этилового спирта.

В колбу емкостью 250 мл наливают 50 мл среды и после стерилизации засевают бактериями. Для обнаружения уксусной кислоты в культуре в горлышке колбы пробкой закрепляют полоску синей лакмусовой бумажки, которая при выделении уксусной кислоты краснеет. Препараты уксуснокислых бактерий окрашивают синькой Леффлера. Вид уксуснокислых бактерий устанавливают на основании характера роста и реакции с йодом.

Выделение целлюлозосинтезирующих представителей *Gluconacetobacter xylinus* и *Gluconacetobacter hansenii* необходимо проводить только на жидких или полужидких питательных средах, так как на плотных питательных средах они не культивируются. Культивирование продуцентов бактериальной целлюлозы. При культивировании в различных условиях продуценты могут формировать внеклеточную целлюлозу в виде пленки, а в перемешиваемых условиях в виде глобул (7).



**Рисунок 7 – Характер образования бактериальной целлюлозы: плёнка в статической культуре (а) и глобулы в перемешиваемой культуре (б)**

В целом, факторами, влияющими на синтез целлюлозы, главным образом, являются состав питательной среды, условия культивирования и образование побочных продуктов. Питательными веществами, необходимыми для роста микроорганизмов, являются источники углерода, азота, фосфора, серы, солей калия и магния.

Выделение уксуснокислых бактерий, синтезирующих бактериальную целлюлозу, представляет сложную задачу, поэтому исследования проводят поэтапно, используя принцип селективности – создание специфических условий для развития только уксуснокислых целлюлозосинтезирующих бактерий.

### Питательные сред для выделения *Glucanacetobacter spp.*

По данным литературы стандартная питательная среда для обогащения и выделения уксуснокислых бактерий, кроме *Glucanacetobacter europaeus* и *Glucanacetobacter entanii*, содержит (г/л): дрожжевой экстракт - 5,0 г/л, пептон - 3,0 г/л, D-глюкоза - 0,5 г/л, этанол (99,8 %) - 15 мл, циклогексимида - 0,1г, агар - 12 г. Однако, виды *Glucanacetobacter xylinus* и *Glucanacetobacter hansenii*, у которых высокая продуктивность синтеза бактериальной целлюлозы, очень плохо развиваются на плотной среде и им необходима высокая концентрация сахаров для развития.

Для выделения штаммов *Glucanacetobacter spp.* в работе используют также ряд рекомендованных питательных сред для уксуснокислых бактерий.

1. Среда Хоугера Фратера (HP) (%): Глюкоза - 2,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  - 0,3,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  - 0,2,  $\text{MgSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$  - 0,2,  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$  (96 %) - 2 мл, пивное сусло - 0,5.

2. Среда S. Hestrin, M. Schramm (HS) (%): глюкоза - 2, пептон - 0,5, дрожжевой экстракт (на сухое вещество) - 0,5,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  - 0,27, моногидрат лимонной кислоты - 0,115.

3. Среда US, рекомендованная авторами патента US 4655758 (US) [i], (%): глюкоза - 2,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  - 0,5, дрожжевой экстракт - 0,5, моногидрат лимонной кислоты - 0,115,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  - 0,27.

4. Среда MYP [**Ошибка! Закладка не определена.**] (%): D-маннитол - 25, пептон - 3, дрожжевой экстракт - 5, агар - 12.

5. Среда GY [**Ошибка! Закладка не определена.**] (г/л): глюкоза - 100, дрожжевой экстракт - 10, агар - 12.

6. Среда GYC (г/л): глюкоза - 100,  $\text{CaCO}_3$  - 20, дрожжевой экстракт - 10, агар - 20.

7. Среда H1-1 (%): глюкоза - 2,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  - 0,3,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  - 0,2, дрожжевой экстракт - 0,5,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  - 0,27, моногидрат лимонной кислоты - 0,115, уксусная кислота - 2.

8. Среда H2-1 (%): глюкоза - 2,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  - 0,3,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  - 0,2,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  - 0,27, дрожжевой экстракт - 0,5, моногидрат лимонной кислоты - 0,115, Уксусная кислота 9% 54 мл (pH = 3,5 - 4).

9. Среда H3-1 (питательная среда, разработанная нами) (%): глюкоза - 2,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  - 0,3,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  - 0,2,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  - 0,27, моногидрат лимонной кислоты - 0,115, дрожжевой экстракт - 0,5.

10. Среда P1(%): нестандартное сырье плодово-ягодных производств (на сухое вещество) 0,1-7,0, пептон 0,01-1,5, дрожжевой экстракт 0,01-0,1, этанол 0,1-7,0, пивное сусло (на сухое вещество) 0,1-1,0.

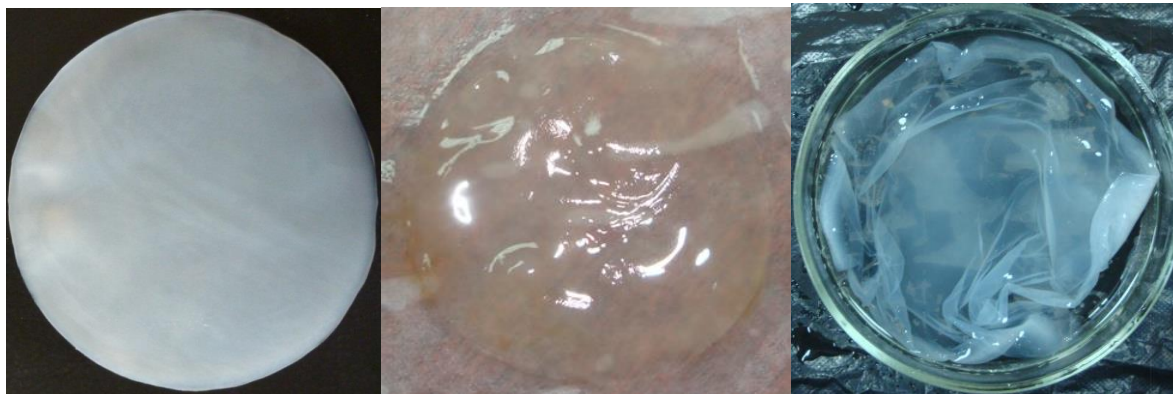
11. Чайная среда T1 (%): сахароза - 10, чайный экстракт - 0,2, уксусная кислота 9% - 54 мл.

12. Среда H4-1 (%): глюкоза - 2,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  - 0,3,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  - 0,2,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  - 0,27, моногидрат лимонной кислоты - 0,115, дрожжевой экстракт - 0,5, кокосовое молоко - 10, агар - 12.

Для выделения продуцентов питательные среды разливают в колбы по 100 мл, добавляют 5мл образца культуры «чайного кваса» и разливают в

чашки Петри по 20 мл. После 3-х суток инкубируют при температуре  $29\pm 1$  °С полученные культуры вносят в чашки по 0,1мл, в которые вносят жидкие питательные среды в объеме 10 мл и культуру снова инкубируют в термостате типа ТС-80 при температуре  $29\pm 1$  °С.

Такую процедуру повторяют многократно до получения пленки бактериальной целлюлозы. Образуемый бактериями полимер может представлять прозрачные и непрозрачные пленки (рисунок 8).



**Рисунок 8 – Структура прозрачной (А) и непрозрачной (Б) полимера бактериальной целлюлозы, синтезируемой штаммом *G. hansenii***

## **2.2 Биофизические методы получения чистых и накопительных культур бактерий**

### **Использование подвижности клеток для получения накопительной культуры *Proteus vulgaris***

Для получения бактерий из группы *Proteus* используют сырое мясо, которое оставляют в стакане с водой на ночь при комнатной температуре; утром из замутившейся воды делают посева на 5–7 %-й МПЖ и, когда вырастут колонии, отмечают те, которые отличаются фигурным ростом (колонии-рои). Биомассу на бактериологической петле культуры этих колоний переносят в конденсационную воду в пробирки со скошенным МПА и инкубируют при 37 °С. Через несколько дней беловатый налет *Proteus* начинает постепенно подниматься снизу вверх по поверхности агара вследствие исключительной подвижности этого вида. Бактерии рода *Proteus* имеют клетки различной морфологии (рисунок 9).

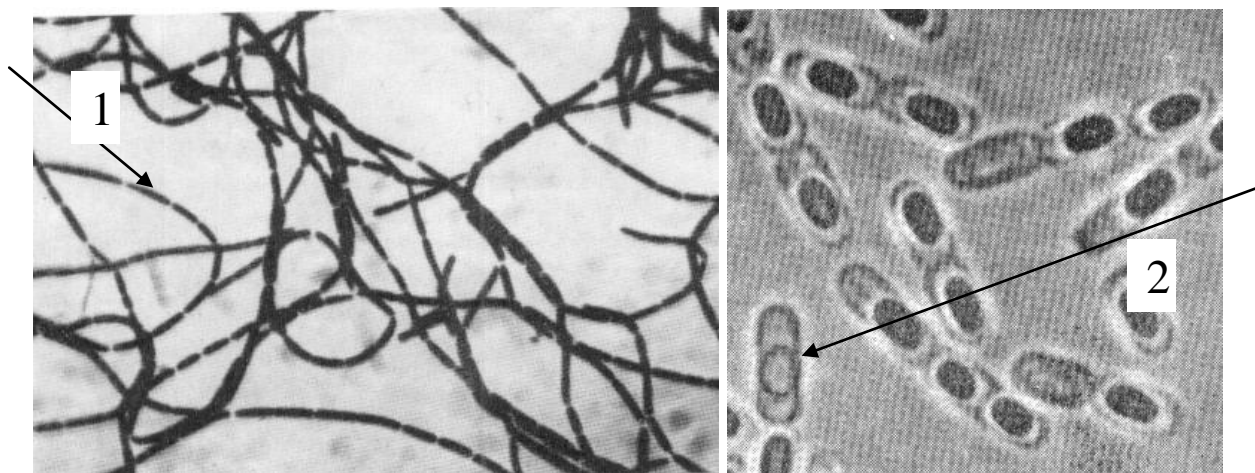
Частицу налета пересевают в новую пробирку с конденсационной водой. Эту процедуру повторяют пока не изолируется чистая культура.



**Рисунок 9 – Морфология клеток бактерий рода *Proteus***

**Использование терморезистентности для получения мезофильных бактерий *Bacillus subtilis* и *Bacillus mesentericus***

Для получения накопительной культуры *Bacillus subtilis* 10 г сена измельчают, заливают водой (100 г) и кипятят в течение 10 мин. Затем культивируют в термостате при 20–30 °С в течение 2–3 дней. На поверхности суспензии вырастает серо-белая пленка из палочек *B.subtilis* (рисунок 10).



**Рисунок 10 – Морфология клеток и споровых бактерий рода *Bacillus*  
1- цепочка клеток; 2 – спора в клетке**

Через 1, 2, 3 суток, наблюдают различные стадии развития сенной палочки: стадию молодых подвижных клеток; стадию зооглеи; спорообразование (спороносные клетки и зрелые высыпавшиеся споры).

*Bacillus mesentericus* – картофельная палочка. Для получения накопительной культуры истертый в кашичу картофель помещают в пробирку или колбу, прогревают на водяной бане при 100 °С в течение 30 мин и оставляют стоять. На картофеле образуется плотная морщинистая пленка, состоящая из палочек *B.mesentericus*.

## 2.3 Биологические методы получения накопительных культур бактерий

Биологические методы выделения культур микроорганизмов основаны на использовании специфических хозяев для выделяемого микроорганизма, а также культуры тканей (клеток) хозяев. Ряд биологических методов основан на преимуществе патогенных свойств выделяемых микроорганизмов (например, его инвазивность), которыми не обладают другие представители смешанной популяции.

### Бактериальный паразитизм

Типичным представителем паразитов бактерий является аэробный вибрион *Bdellovibrio bacteriovorus*. Клетки этих паразитов относительно малы и очень подвижны благодаря толстому (50 нм) жгутику, они способны, натываясь на бактерию-хозяина, прикрепляться к ее клеточной стенке противоположным месту расположения жгутика концом. Иногда паразит вращается вокруг продольной оси, проникая через клеточную стенку бактерий. Пораженная клетка округляется, превращаясь в подобие сферопласта. Размножение *Bdellovibrio bacteriovorus* происходит в периплазматическом пространстве. Там клетка паразита растет в длину до тех пор, пока не будут израсходованы питательные вещества, извлекаемые из уменьшающегося протопласта хозяина. Затем происходит множественное поперечное деление, при котором образуется несколько клеток равной величины. Клетка хозяина растворяется, а потомство бактерии-паразита освобождается в активном состоянии (рисунок 11).

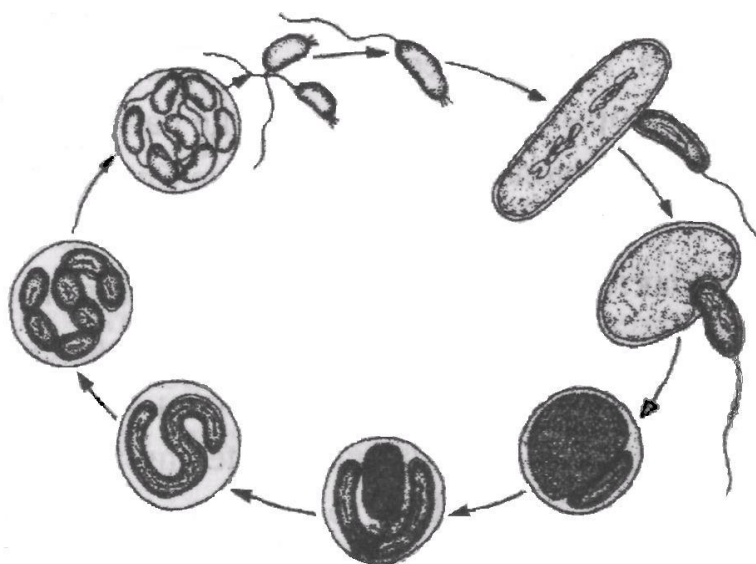


Рисунок 11 – Цикл развития *Bdellovibrio bacteriovorus* в бактерии-хозяине

Метод выделения бделловибрионов во многих отношениях сходен с методом, используемым для бактериофагов. По мере размножения и распространения паразитов лизис бактерий становится макроскопически заметным: на бактериальном газоне появляются зоны лизиса, или "дырки", а в суспензиях уменьшается светорассеяние. В отличие от бактериофагов, которые размножаются только в растущих клетках, *Bdellovibrio* поражает и лизирует также и нерастущие клетки. Штаммы *Bdellovibrio*, выделенные из различных почв, различаются кругом своих хозяев. Они лизируют в основном грамотрицательных бактерий, предпочитая псевдомонад и энтеробактерий.

Для более надежного выделения бделловибрионов целесообразно использовать бактерии родов *Enterobacter* и *Pseudomonas*. 500 г почвы суспендируют в 500 мл водопроводной воды и энергично встряхивают в течение 1 ч. Суспензию центрифугируют в течение 5 мин при 500 g для осаждения больших частиц. Надосадочную жидкость пропускают через мембранные ультрафильтры, постепенно уменьшая размер пор в порядке: 3; 1,2; 0,8; 0,65 и 0,45 мкм. К объему 0,5 мл полученного фильтрата добавляют 0,5 мл суспензии (около  $5 \times 10^{10}$  клеток в 1 мл) бактерий хозяев. Эту смесь добавляют к 4 мл расплавленной полужидкой среды УР следующего состава: дрожжевой экстракт – 3 г; пептон – 0,6 г; дистиллированная вода – 1000 мл.

Доводят рН до 7,2 и стерилизуют 15 мин при 121 °С. Для полужидкой среды УР, используемой как покрытие, добавляют 6 г агара на 1 л; для получения твердой среды добавляют 19 г агара на 1 л. Кипятят до растворения агара и стерилизуют автоклавированием.

Фильтрат и питательную среду УР перемешивают и наливают на поверхность твердой УР среды в чашки. После инкубирования в течение суток проверяют появление на среде бляшек (областей лизиса). Если они образуются в течение 24 ч, то это более характерно для бактериофагов, чем для бделловибрионов, которые обнаруживаются не раньше, чем через двое суток. Бляшки, в которых предполагают присутствие бделловибрионов, срезают и суспендируют в УР среде. Затем готовят серию разведений для наслаивания на газоны бактерий-хозяев для получения изолированных бляшек. Одну бляшку исследуют фазовоконтрастной микроскопией с целью найти подвижные крошечные вибрионы. Определяют их размеры. Материал, используемый из бляшек, суспендируют в УР бульоне, суспензию пропускают через ультрафильтр с диаметром пор 0,45 мкм, фильтрат разводят и наносят на газоны бактерий хозяев. После трех последовательных выделений из бляшек можно считать, что полученные штаммы бделловибриона вырастают из одной клетки.

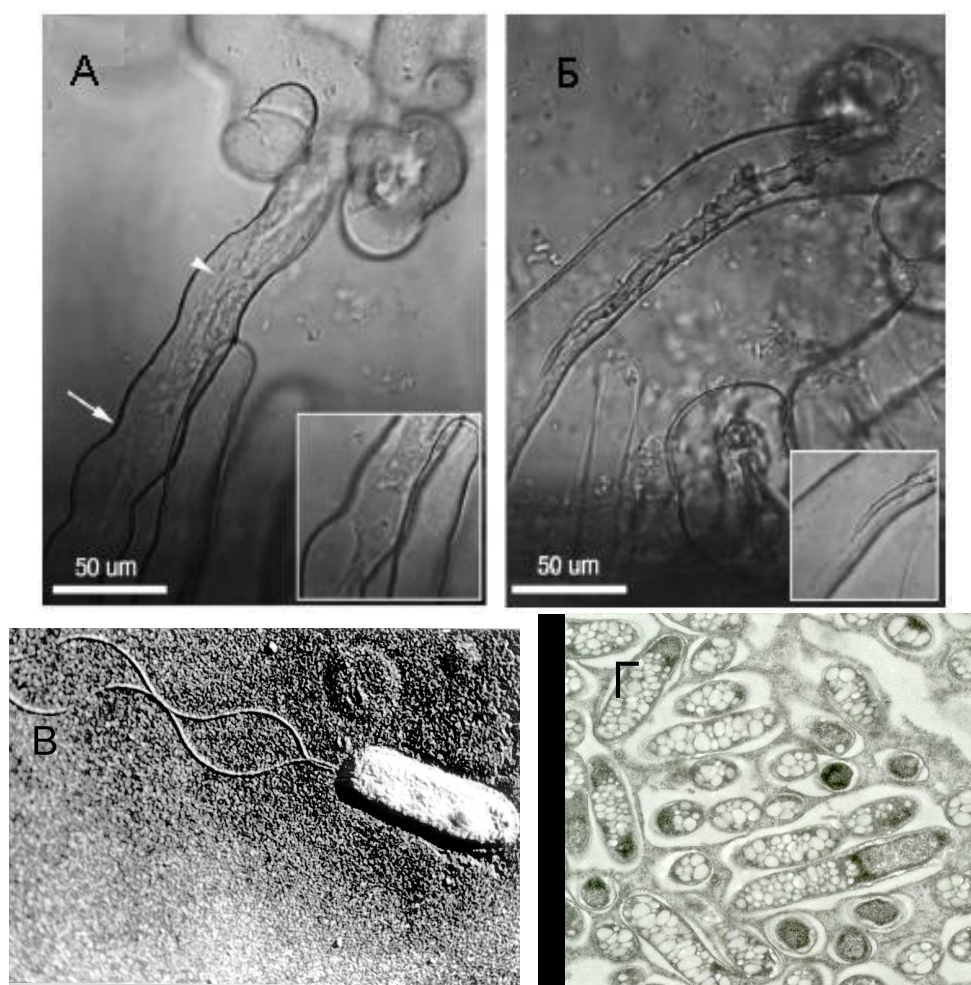
### **Симбиоз бактерий рода *Rhizobium* с растениями**

Симбиоз различных видов клубеньковых бактерий с клетками бобовых растений в корневых клубеньках относится к наиболее дифференцированным симбиотическим взаимоотношениям. Клубеньки на корнях растений представляют собой природную накопительную систему симбиотических

азотфиксирующих бактерий рода *Rhizobium*. Клубеньки часто окрашены в розовый цвет за счет присутствия в покровной ткани леггемоглобина.

Бактерии легко выделяются из клубеньков бобовых растений, собранных в период их вегетативной активности. При взаимодействии с растениями они образуют инфекционные структуры, которые проникают в ткань корня, вызывают ее разрастание и образуют инволюционные формы клеток – бактериоиды (рисунок 12).

Корни бобового растения, содержащего клубеньки, отмывают от земли. Отделяют клубеньки от корня так, чтобы небольшая часть корня оставалась с клубеньком. С помощью волосяной щетки промывают клубеньки водопроводной водой, удаляя остатки земли, и погружают их в раствор  $\text{HgCl}_2$  (1:1000) на 3–6 мин, время от времени переворачивая стерильным пинцетом. Переносят в 75 %-й этанол и несколько минут встряхивают.



**Рисунок 12 – Инфекционные структуры и морфология бактерий рода *Rhizobium* (A и B – проникновение инфекционной нити в ткань растения; C – морфология вегетативной клетки; D – бактериоиды в ткани корня)**

Затем корни помещают в стерильную воду и взбалтывают смесь еще несколько минут. Наливают по 1 мл стерильной воды в шесть стерильных

чашек Петри. В первую чашку кладут клубенок, раздавливают его стерильным пинцетом и добавляют к нему стерильную воду. Переносят 1–2 петли полученной суспензии во вторую чашку Петри со стерильной водой и перемешивают. Полученную суспензию таким же образом вносят в оставшиеся чашки.

К каждому разведению добавляют расплавленный и остуженный до 45 °С агар с дрожжевым экстрактом и маннитом:

маннит	– 10 г,	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	– 0,5 г;
MgSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O	– 0,2 г;	NaCl	– 0,1 г;
CaCO <sub>3</sub>	– 3,0 г;	дрожжевой экстракт	– 0,2 г;
агар	– 15,0 г;	дистиллированная вода	– 1000 мл.

Среду кипятят до растворения агара и стерилизуют 15 мин при 121 °С. Посевы инкубируют при комнатной температуре (20–22 °С) и получают затем субкультуры из отдельных колоний.

### **Получение чистых культур *Staphylococcus pneumoniae* методом заражения лабораторных животных**

Патогенный микроорганизм можно выделить, инокулируя животное-хозяина смешанной культурой, в которой он находится. В инфицированном животном патогенный микроб преобладает и часто обнаруживается в виде чистой культуры в крови и тканях. При этом в результате действия защитных механизмов животного рост непатогенных сопутствующих микроорганизмов ингибируется или они гибнут.

Чистую культуру пневмококков можно получить через 4–6 ч после внутрибрюшного введения мыши 1 мл эмульгированной мокроты, содержащей *Staphylococcus pneumoniae* и другие бактерии. Пробы перитонеальной жидкости берут из брюшной полости животного с помощью стерильной остроконечной капиллярной пипетки.

## **2.4 Выделение чистой культуры анаэробных бактерий**

В лабораторной практике часто придется работать с анаэробными микроорганизмами. Они более прихотливы к питательным средам, чем аэробы, чаще нуждаются в специальных ростовых добавках, требуют прекращения доступа кислорода при их культивировании, длительность роста их длиннее. Потому работа с ними более сложна, требует значительного внимания бактериологов и лаборантов.

Для культивирования анаэробных бактерий используют специальные питательные среды, которые не должны содержать кислорода и имеют низкий окислительно-восстановительный потенциал (-20 -150 мВ), к их составу вводят индикаторы – резазурин, метиленовый синий и тому подобное, которые реагируют на смену этого потенциала. При его росте возобновлены бесцветные формы индикаторов изменяют свой цвет: резазурин окрашивает среду в розовый цвет, а метиленовый синий – в голубой. Такие изменения свидетельствуют о невозможности использования сред для культивирования анаэробных микробов.

Способствует снижению окислительно восстановительного потенциала введения в среду не меньше 0,05 % агара, который, увеличивая его вязкость, способствует уменьшению поступления кислорода. Это, в свою очередь, достигается еще и использованием свежих (не позже двух часов после изготовления) и редуцируемых питательных сред.

Следует учесть, что через особенности бродильного типа метаболизма анаэробных бактерий они требуют более богатых на питательные компоненты и витамины сред. Чаще всего используют сердечно мозговой и печеночный настои, соевые и дрожжевые экстракты, гидролитичный перевар казеина, пептон, триптон. Обязательным является добавление факторов роста, таких как твин-80, гемин, менадион, цельная или гемолизированная кровь.

### **Методы создания анаэробных условий**

Учитывая, что свободный молекулярный кислород является токсичным для облигатно-анаэробных бактерий, обязательным условием культивирования таких микроорганизмов является ограничение его доступа. Существует ряд методов (механических, физических, биологических), которые позволяют это обеспечить.

#### ***Физические методы.***

1.. Перед посевом бактерий на питательную среду его обязательно регенерируют для удаления избытка растворенного кислорода. С этой целью среду кипятят в течение 15-20 мин на водяной бане, а затем быстро охлаждают к необходимой температуре.

2. Для предупреждения проникновения кислорода в среду его заливают слоем стерильного вазелинового масла или парафином.

3. Столбик питательной среды в пробирках должен быть достаточно высоким (10-12 см). Кислород, как правило, диффундирует в толщу столбика на глубину до 2 см, потому ниже создаются благоприятные условия для культивирования анаэробных микробов.

4. Эвакуационно-заместительный метод заключается в использовании анаэроостатов. Они представляют собой герметические металлические или пластмассовые банки, из которых можно выкачать кислород и заменить его инертным газом (гелий, азот, аргон). Допускается использование трехкомпонентной газовой смеси, которая состоит из 80 % азота, 10 % диоксида углерода и 10 % водорода. Допустимым считается использование природного газа. Для поглощения кислорода, который остается в анаэроостате, используют палладиевые катализаторы. С целью поглощения водяного пара используют хлорид кальция, силикагель и т. п., которые помещают на дно анаэроостата.

***Химические методы.*** 1. Использование веществ, способных поглощать кислород. С этой целью допустимым является применение щелочного раствора связывания кислорода в 1 л воздуха используют смесь, которая состоит из 100 мл свежего 20 % раствору  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  и 16 мл 50 % гидроксида калия.

2. Применение веществ-редуцентов. Учитывая, что рост облигатно-анаэробных бактерий происходит в средах с низким уровнем окислительно

восстановительного потенциала, к ним добавляются специальные восстановители: цистеин (0,03-0,05 %), тиогликолевую кислоту или тиогликолат пирогаллола. При этом учитывают поглощающую активность вещества: на 100 мл емкости герметического сосуда, в котором находятся чашки Петри, используют 1 г пирогаллола и 10 мл 2,5 N раствора гидроксида натрия.

Кислородосвязывающий эффект имеет также гидросульфит натрия ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ). Для натрия (0,01-0,02 %), сульфид натрия, аскорбиновую кислоту (0,1 %), разнообразные сахара.

Функции обновителей могут выполнять кусочки паренхиматозных органов животных (печенка, почки, сердце) или даже растений (картофель, другие корнеплоды). Степень поглощения кислорода или степень возобновления среды измеряют или электрометрически или с помощью индикаторов (резазурин, нейтральный красный, феносафранин).

3. Использование специальных газогенерирующих систем, которые позволяют создать бескислородные условия в микроанаеростатах, транспортных пластиковых пакетах и тому подобное. Одной из самых распространенных есть система "Gas Generating Vох". В ее состав входят химические генераторы водорода (борогидрит натрия) и углекислого газа (таблетки бикарбоната натрия и лимонной кислоты), а также палладиевый катализатор, который поглощает кислород.

Чашки с посевами помещаются в микроанаеростат, на дне которого находится слой палладиевого катализатора. Кончик пакета "Gas Generating Vох" надрезают ножницами, и у него наливают 10-15 мл воды. Пакет располагают в микроанаеростат. Через 15-20 мин в нем создаются анаэробные условия. Водород, который выделяется, взаимодействует с кислородом, образуя воду, а углекислота продуцируется при взаимодействии бикарбоната натрия с лимонной кислотой.

**Биологические методы.** 1. Метод Фортнера. Метод заключается в совместном культивировании на одной среде аэробных и анаэробных микроорганизмов. Сначала по диаметру чашки вырезают полоску агару шириной до 0,5-1,0 см. С одной стороны засевают исследуемый материал, который содержит анаэробные возбудители, а из другого – микробы, которые являются индикатором анаэробных условий (*Serratia marcescens* или "чудесная палочка"). Края чашки парафинируют или закрывают пластилином. Через некоторое время на поверхности среды вырастают колонии как аэробных, так и анаэробных микробов. При поглощении кислорода *Serratia marcescens* дает рост бледно-розовых или бесцветных колоний, а при нарушениях герметичности – ярко-красные. На другой половине чашки вырастают колонии анаэробных микробов.

2. Метод Хеннеля ("часовых стекол"). Он является своеобразной модификацией предыдущего. Материал, который содержит анаэробные возбудители, засеивается на поверхность питательной среды диаметром 2-2,5 см. Сверху он покрывается "часовым стеклом", заполненным слоем МПА и засеянным *Serratia marcescens*. Аэробные микроорганизмы, поглощая

кислород, создают условия для благоприятного роста анаэробных возбудителей. В высоко специализированных лабораториях пользуются специальной анаэробной техникой, которая включает использование питательных сред без кислорода с обновителями, выполнение посевов и пересевов в атмосфере инертных газов, углекислоты и тому подобное.

За последние годы созданы стационарные анаэробные боксы, которые содержат все необходимое для создания анаэробных условий культивирования, включая термостаты. Как правило, такие камеры заполняются трикомпонентную газовой смесью. Бактериолог работает в камере, находясь внешне, применяя резиновые перчатки, смонтированные в неё. Такое оборудование имеет неоспоримые преимущества, которые заключаются в том, что полностью исключается контакт кислорода с исследуемым материалом.

### **Среды для культивирования анаэробных микроорганизмов**

**Среду Китта-Тароци** готовят на основе бульона Хоттингера, к которому добавляют кусочки бычьей печени или мяса. Стерилизуют его при 1 атмосфере в течение 30 мин. Активная реакция среды – 7,4-7,6. После посева материала среду заливают сверху слоем вазелинового масла толщиной до 1 см.

**Анаэробный кровяной агар** готовят на основе эритрит-агара. В его состав входят также специальные добавки: среда 199 (10 %), гемин (10 мкг/мл), твин-80 (0,1 %), метадон (10 мкг/мл), цитратная кровь (до 5 %) и тому подобное. После стерилизации его разливают в чашки Петри. Используют не позже, как через 2 год после изготовления.

**Желтковый агар.** В расплавленную и охлажденную до 56-60 °С среду на основе эритрит-агара добавляют суспензию куриного желтка (20 %), глюкозу (0,2 %), гемин (10 мкг/мл) и разливают в чашки Петри. Среду используют для определения лецитиназной активности возбудителей, в частности *S. perfringens*. При наличии лецитиназы вокруг колоний образуются зоны помутнения.

**Коммерческая среда для контроля стерильности.** Её можно использовать в качестве транспортное. Для улучшения роста анаэробных бактерий к его составу можно вводить специальные добавки, такие как среда 199, гемин, твин-80, метадон, цитратная кровь и тому подобное.

**Среда Вильсон-Блера.** Её готовят на основе расплавленного и охлажденного до 60 °С 1 % сахарного (глюкоза) МПА с рН 7,4 и с добавлением на 100 мл 10 мл стерильного 20 % раствора сульфата натрия и 1 мл 8 % раствора хлорида железа. Готовую среду не стерилизуют. Её используют для ускоренной диагностики газовой анаэробной инфекции, вызванной *Clostridium perfringens*. Уже через 1-2 год наблюдают изменение среды: она чернеет в результате восстановления сульфата натрия в сульфат, который взаимодействует с хлоридом железа, образуя сульфид железа. Появляются также разрывы агара в результате интенсивного газообразования.

**Лакмусовое молоко.** Готовят среду из свежего молока. Предварительно его кипятят и оставляют в прохладном месте на одни сутки. Снимают верхний слой

жира и процедуру повторяют. Молоко фильтруют, и 10 % раствором бикарбоната натрия доводят рН до 7,2. Перед стерилизацией к молоку добавляют 5-10 % лакмусовой настойки и идентичное количество 10 % раствора бикарбоната натрия, чтобы пена молока приобрела сине-фиолетовый оттенок. При подщелачивании молока оно становится сине-фиолетовым, при подкислении – розовым, вплоть до красного.

## 2.4 Выделение культур актиномицетов

Актиномицеты – ветвящиеся мицелиальные прокариоты, которые на уровне организации клетки осуществляют сложные циклы развития, сходные с таковыми у грибов. Это свободноживущие гетеротрофные микроорганизмы, распространенные повсеместно. Природными субстратами, из которых актиномицеты выделяются в наибольшем числе и разнообразии, являются почвы.

В зависимости от типа почвы и экологических условий содержание актиномицетов колеблется от 5 до 70 %, составляя около 30 % общей численности микроорганизмов в почве. В значительном количестве обнаруживаются актиномицеты в пресных и морских водоемах, а также в их донных отложениях. В воздухе они присутствуют чаще всего в виде спор.

подавляющее большинство актиномицетов аэробы, встречаются микроаэрофильные и анаэробные формы. В основном это мезофильные микроорганизмы, оптимум размножения которых 23-30 °С. Термофилы встречаются редко.

Актиномицеты очень различны в своих требованиях к субстрату. Одни растут на сложных органических средах, другие – на простых соединениях. Наилучшими источниками азота для актиномицетов являются протеины, пептоны и аминокислоты. Из неорганических источников азота лучше всего они усваивают азот нитратов, но могут использовать аммонийные соли, а некоторые виды – нитриты. Аммоний сульфатов более подходящий источник азота, чем хлористый аммоний. Актиномицеты разлагают белки, мочевины и более простые соединения. Лучшим источником углеродного питания являются глюкоза, мальтоза, крахмал, глицерин, маннит. Из органических кислот хорошо усваиваются уксусная, лимонная, яблочная, плохо – щавелевая, муравьиная, из спиртов – этанол, эритрин и дульцит.

Большинство известных актиномицетов являются нейтрофилами (оптимальные для роста значения рН среды – 6,8–7,5). Но некоторые обнаруживают слабый рост при рН среды 11,5. Оптимальные значения рН для роста алкалофильных форм – 9,7–10,5. В сравнении с другими бактериями почвенные актиномицеты более устойчивы к высушиванию и могут хорошо развиваться при низкой влажности питательного субстрата (8–10 %). За исключением термофилов, актиномицеты характеризуются сравнительно небольшой скоростью роста даже в условиях лабораторных культур и достаточного снабжения легкоусвояемыми питательными веществами.

К настоящему времени все известные актиномицеты относятся более чем к 60 родам. Они разделены на 9 групп без выделения семейств:

1. Актинобактерии (13 родов и несколько видов, родовая принадлежность которых не установлена) – гетерогенная группа, включающая роды, объединявшиеся ранее в семейство *Actinomycetaceae*, группу коринеподобных бактерий, роды *Oerskovia*, *Promicromonospora*.
2. Актинопланы. В группу объединены актиномицеты, образующие спорангии (ранее семейство *Actinoplanaceae*) и моноспоровый род *Micromonospora*.
3. Актиномицеты с многоклеточными спорангиями (*Dermatophilus*, *Frankia*, *Geodermatophilus*) – сборная группа, выделенная из-за сходства морфологии (деление гиф во взаимно перпендикулярных направлениях с образованием спорангиеподобных структур, распадающихся на фрагменты).
4. Нокардиоподобные актиномицеты (нокардиоформы) – роды, содержащие миколовые кислоты.
5. Стрептомицеты (*Intrasporangium*, *Kineosporia*, *Nocardioides*, *Sporichthya*, *Streptomyces* и близкие *Actinopycnidium*, *Actinosporangium*, *Chainia*, *Elytrosporangium*, *Kitasatoa*, *Microellobosporia*, *Streptoverticillium*) – в группе объединены разнообразные по морфологии актиномицеты.
6. Мадуромицеты (*Actinomadura*, *Excellospora*, *Microbispora*, *Microtetraspora*, *Planobispora*, *Planomonospora*, *Spirillospora*, *Streptosporangium*) – актиномицеты, ранее включавшиеся в различные семейства.
7. Термомоноспоры (*Actinosynnema*, *Nocardiosis*, *Streptoalleloteichus*, *Termomonospora*) – гетерогенная группа родов.
8. Микрополиспоры (*Actinopolyspora*, *Faenia*, *Pseudonocardia*, *Saccharomonospora*, *Saccharopolyspora* и виды нокардий, не содержащих миколовых кислот) – группа близких по морфологии и хемотаксономическим признакам родов.
9. Термоактиномицеты с единственным родом *Thermoactinomyces*, хотя и не родственными актиномицетам, но из соображений удобства идентификации культур в силу традиции помещены в систему Берги их классификации.

Согласно определителю Берги (1997), родовой состав групп несколько изменяется. Например, группа микрополиспор входит в группу нокардиоподобных актиномицетов.

Выделение актиномицетов осуществляют методом посева водной суспензии исследуемого субстрата на поверхность агаровой пластинки. Навеску в 10 г помещают в колбу с 90 мл стерильной воды. Содержимое колбы встряхивают в течение 5 мин, а затем из водной суспензии делают ряд последовательных разведений, которые высевают на соответствующие среды.

Сред для культивирования актиномицетов предложено очень много. Наиболее распространенными средами для количественного определения актиномицетов в почве являются следующие.

1. Крахмало-аммиачная среда (г/л):  
 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – 2,0;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NaCl}$  – 1,0;

CaCO<sub>3</sub> – 3,0; крахмал растворимый – 10,0;  
агар – 20,0.

2. Среда Чапека (г/л):

глюкоза или сахароза – 20,0; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 1,0;  
MgSO<sub>4</sub>, KCl – 0,5; FeSO<sub>4</sub> – 0,1;  
CaCO<sub>3</sub> – 3,0; агар – 20,0.

На этих средах хорошо растут и многие бактерии.

Для выделения разнообразия почвенных актиномицетов рекомендуют следующие среды (г/л).

Среда 1. Крахмал – 20,0; MgSO<sub>4</sub> × 7H<sub>2</sub>O – 0,5;  
NaCl – 0,5; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 0,5;  
KNO<sub>3</sub> – 1,0; FeSO<sub>4</sub> × 7H<sub>2</sub>O – 0,01;  
агар – 30,0; pH=7.2÷7.4.

Среда 2. Пептон – 1,0; MgSO<sub>4</sub> × 7H<sub>2</sub>O – 0,4;  
глюкоза – 5,0; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 0,4;  
агар – 30,0; pH=7,2÷7.4.

Процеженный отвар картофеля - 100 мл.

Картофель варят в 200 мл воды и доводят водой объем до 1 л.

Среда 3. Гороховая мука – 10,0; NaCl – 5,0;  
CaCO<sub>3</sub> – 1,0; агар – 30,0;  
глюкоза – 10,0; pH = 7,2÷7,4.

Среда 4. Мясной экстракт – 50,0; пептон – 4,0;  
дрожжевой экстракт – 5,0; NaCl – 2,5;  
глюкоза – 10,0; агар – 30,0;  
pH = 7,2÷7,4.

Среда 5. Крахмал – 10,0; дрожжевой экстракт – 10,0;  
NaCl – 2,0; кукурузный экстракт – 10,0;  
агар – 30,0; pH = 7,2÷7,4.

Наибольшее разнообразие актиномицетов выявляется при использовании метода центрифугирования почвенной суспензии, предложенного Ржгачеком (1959 г.). Метод основан на различии скорости оседания отдельных видов микроорганизмов в центробежном поле. При 3000 об/мин в течение 20 мин частицы, соответствующие по размерам спорам плесеней или клеткам бацилл, осаждаются на дно пробирки. Частицы же, соответствующие по размерам спорам актиномицетов, оказываются при данной скорости центрифугирования в поверхностном слое жидкости. Высевая надосадочную жидкость, удается в большинстве случаев (до 92 %) получить на пластинках питательного агара колонии актиномицетов.

**Выделение стрептомицетов**

Для преимущественного выделения стрептомицетов рекомендуют обогащение почвы CaCO<sub>3</sub>, для чего 1 г воздушно-сухой почвы смешивают с 0,1 г CaCO<sub>3</sub> и инкубируют при температуре 26 °С в течение 7–9 дней во влажной атмосфере (60 % от общей влагоемкости). Можно перед посевом прогревать почву в течение 8 ч при 45 °С или обработать раствором фенола: 0,1 мл

почвенной суспензии добавляют к 10 мл 1,4 %-го раствора фенола. Через 10 мин суспензию разводят до нужного разведения и высевают на среды.

Для ограничения роста бактерий и грибов добавляют антибиотики. Часто в качестве селективных источников углерода и азота в среды добавляют крахмал, глицерин, казеин и нитраты.

Крахмало-казеиновая среда (г/л):

крахмал (или глицерин) – 10,0;	казеин – 0,3;	KNO <sub>3</sub> – 2,0;
MgSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O – 0,05;	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> – 2,0;	CaCO <sub>3</sub> – 0,02;
FeSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O – 0,01;	NaCl – 2,0;	агар – 20,0;

Глицерин-аргининовый агар (г/л):

глицерин – 12,5;	MgSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O – 0,05;
аргинин – 1,0;	FeSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O – 0,01;
NaCl – 1,0;	CuSO <sub>4</sub> × 5H <sub>2</sub> O – 0,001;
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> – 1,0;	ZnSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O – 0,001;
агар – 20;	MnSO <sub>4</sub> × H <sub>2</sub> O – 0,001.

Принадлежность актиномицетов к роду определяется в соответствии с морфологическими, культуральными и химическими признаками. Морфологические признаки исследуют микроскопически в культурах, выросших на плотных питательных средах. Характеризуют способ ветвления, образование и расположение спор, присутствие и отсутствие спорангиев, наличие подвижных элементов, образование склероциев, эндоспор и т.п.

Из стрептомицетов чаще всего на средах вырастают представители родов *Streptomyces*, *Streptoverticillium*, *Chainia* (отождествляется с родом *Streptomyces*), относящиеся к группе стрептомицетов и родственных им организмов. Для них характерен разветвленный несегментированный субстратный и воздушный мицелий.

Воздушный мицелий образует спороносящие гифы, на которых в виде цепочек образуются споры. Споры неподвижные. На поверхности колоний могут образовываться склероции. Один из основных диагностических признаков – строение спороносцев. Обычно на синтетических средах строение их выражено более отчетливо. Для изучения репродуктивных органов рекомендуют следующие среды (г/л).

Среда с минеральным источником азота:

KNO <sub>3</sub> – 1,0;	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> – 0,5;	MgSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O – 0,5;
NaCl – 0,5;	FeSO <sub>4</sub> – 0,01;	крахмал – 30,0;
агар – 30,0.		

Овсяной агар:

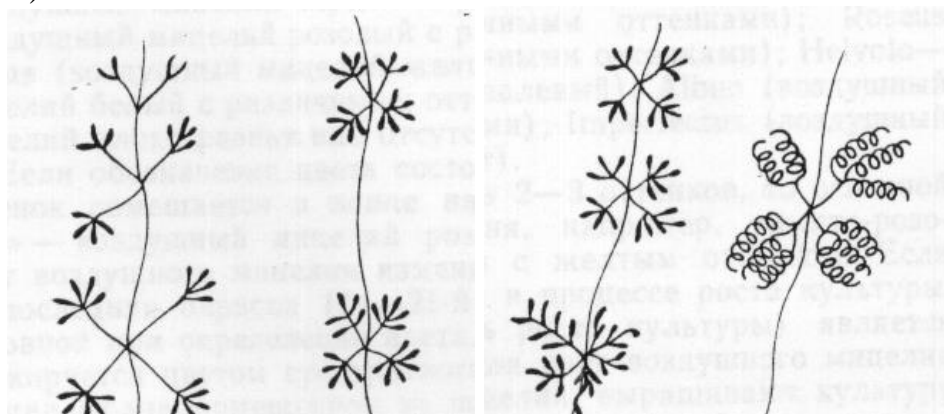
овсяная мука (или геркулес) – 20-65,  
агар – 20, рН 7,2.

Среда с органическим источником азота:

бульон Хоттингера (700 мг-% аминного азота) - 30 мл,  
пептон – 5,0; NaCl – 5,0; глюкоза – 10,0; агар – 30,0.

Тип спорообразования цепочек определяют у зрелых культур на 7–14 день роста, иногда в более поздние сроки. Органы плодоношения актиномицетов можно рассмотреть с помощью фиксированного препарата, изготовленного методом отпечатка, или помещая на предметное стекло кусочек агара с мицелием, предварительно срезав бритвой лишний агар.

При рассмотрении в световом микроскопе ( $\times 150$ ,  $\times 200$ ) отчетливо видны формы цепочек спор. Различают цепочки спор прямые, извитые, с примитивными спиралями, с хорошо сформированными спиралями. Между типами нет резких границ, чаще всего у одной культуры можно наблюдать несколько типов распределения спор вместе. Например, цепочки прямые и в виде примитивных спиралей или цепочки спиральные и в форме крючков. Если культура образует преимущественно прямые цепочки спор и изредка спиральные, она рассматривается как культура со спиральными цепочками спор. Виды *Streptovercillium* имеют мутовчатое расположение цепочек спор, сами цепочки могут быть прямыми или в виде крючков, петель, спиралей (рисунок 13).

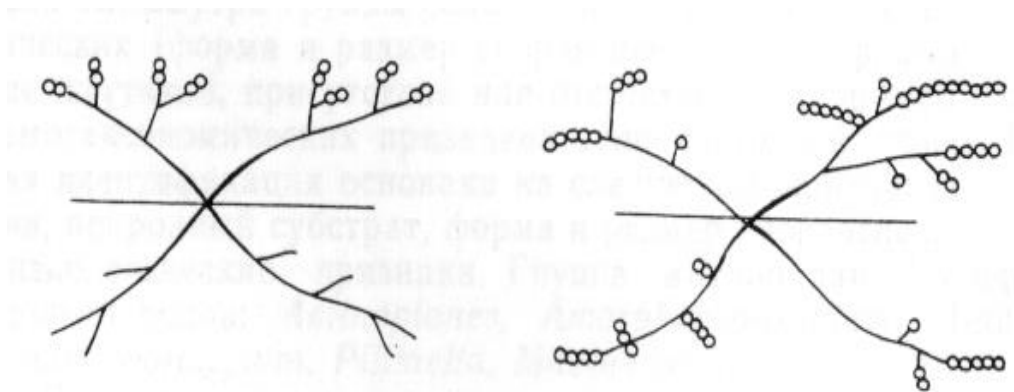


**Рисунок 13 – Органы спороношения у *Streptovercillium***

### **Выделение актиномицетов порядка *Actinomycetales***

Из почв и сопряженных с ней субстратов выделяются представители групп: мадурамицеты, актинопланы, термомоноспоры, нокардии, представители группы с многоклеточными спорангиями и актиномицеты-эндофиты.

Мадурамицеты – многочисленная группа актиномицетов, ранее относящихся к различным семействам. Они образуют нефрагментированный мицелий. На воздушном мицелии у культур рода *Microbispora* присутствуют пары спор, у *Microtetraspora* цепочки из четырех спор (рисунок 14), у *Faenia* – короткие цепочки спор.



**Рисунок 14 – Органы спороношения у *Microbispora* и *Microtetraspora***

Для выделения *Microbispora* и *Microtetraspora* используют глюкозо-аспарагиновую среду (г/л):

глюкоза	– 2,0;	$K_2HPO_4$	– 0,5;
L-аспарагин	– 1,0;	$MgSO_4$	– 0,5;
солевой раствор	– 1,0;мл	агар	– 20,0.

Состав солевого раствора (мг/мл):  $FeSO_4 \times 7H_2O$  – 10,0;  $MnSO_4 \times H_2O$ ,  $CuSO_4 \times 5H_2O$ ,  $ZnSO_4 \times 7H_2O$  – 1,0; pH = 8,0.

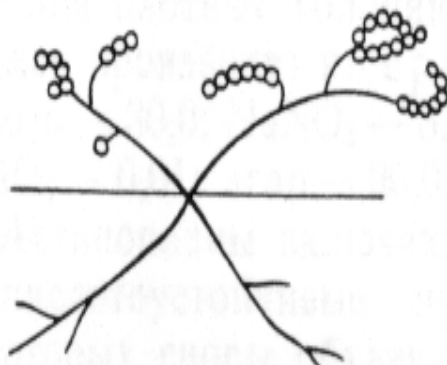
К среде добавляют почвенный экстракт в количестве 1 мл/л (10 г почвы на 1 л воды, автоклавируют 30 мин, фильтруют) и витаминный раствор (параминобензойная кислота, биотин – 0,25 мг на 1 л среды). В среду добавляют антигрибные и антибактериальные антибиотики: нистатин и актидион (по 50 мкг/мл), пенициллин (0,8 мкг/мл), полимиксин В (4 мкг/мл). Почвенные образцы предварительно в течение часа выдерживают при 100–121 °С.

Для выделения мезофильных культур посеvy инкубируют 1–1,5 месяца при 30–32 °С, термофилов – 20 дней при 50 °С.

Актиномицеты рода *Actinomadura* выделяют из образцов, прогретых в течение 1 ч при 100 °С на средах с рубомицином (5 мкг/мл), добавляемым для ограничения роста стрептомицетов. Чаще всего применяют среду Гаузе -2 (г/л): пептон – 5,0; NaCl – 5,0; глюкоза – 10,0; агар – 20,0; бульон Хоттингера - 30 мл.

Инкубирование посевов ведут несколько недель при 28–30 °С.

*Actinomadura* имеют стерильный субстратный мицелий, короткие цепочки спор на воздушном мицелии (рисунок 15).



**Рисунок 15 – Органы спороношения у *Actinomadura***

Актиномицеты группы актинопланы можно выделить из почвы:

- 1) методом "выманивания", 2) методом селективного выделения, основанным на аэротаксисе и аттракции спор к хлорид-ионам.

В первом случае используется хитиновый агар: 2,5 г очищенного хитина растворяют в 70 мл 50%-й серной кислоты. Отфильтровывают нерастворившуюся фракцию, к раствору приливают 105 мл дистиллированной воды. Хитин выпадает в осадок. Осадок центрифугируют, кислотный супернатант отделяют. Осадок несколько раз промывают, центрифугируя в воде, до pH 4. Суспензию хитина переносят в флакон на 1 л, добавляют следующие соли (г):

CaCO<sub>3</sub> – 0,02; FeSO<sub>4</sub> × 7 H<sub>2</sub>O – 0,01; KCl – 1,71; MgSO<sub>4</sub> × 7 H<sub>2</sub>O – 0,05; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> × 12 H<sub>2</sub>O – 4,11; pH доводят серной кислотой, добавляют 20 г агара и автоклавируют. Для ограничения роста грибов в среду добавляют актидион (50 мкг/мл).

К 8–10 г почвы в стерильной чашке добавляют стерильную воду и различные природные субстраты (пыльцу растений, листья, змеиную кожу, волосы) так, чтобы они плавали на поверхности воды. Через неделю на поверхности воды при малом увеличении микроскопа обнаруживаются белые сверкающие спорангии актиномицета. Кусочки субстрата переносят на питательную среду.

При втором методе из двух стеклянных пластинок делают изоляционную камеру. Одна пластинка толщиной 9 мм имеет две ячейки по 24 мм в диаметре. Ячейки соединены каналом шириной 2 мм и глубиной 3 мм. Вторая пластинка толщиной 3 мм служит дном для ячеек первой пластинки. Камеру стерилизуют УФ-светом и помещают в чашку Петри.

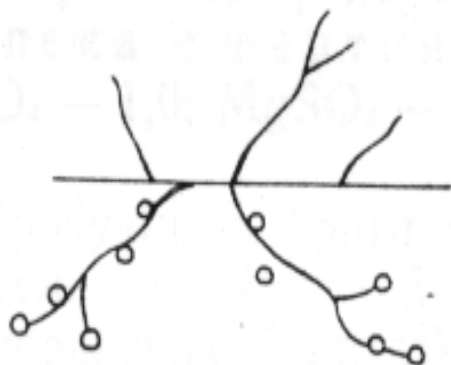
В каждую ячейку кладут по 0,5 г почвы, добавляют стерильную воду на 2/3 канала, соединяющего ячейки, и инкубируют почву в воде при 25–30 °С в течение 1 ч. В это время споры освобождаются из спорангиев. Затем в канал пинцетом помещают стерильный капилляр, заполненный 1 мкл 0,01 М фосфатного буфера pH 7, содержащего 0,01 М KCl. Капилляр выдерживают в канале при 28–30 °С в течение 1 ч, после чего его удаляют и помещают в 1 мл стерильной воды или буфера. Часть полученной суспензии высевают в чашки Петри с крахмало-казеиновой средой состава (г/л):

крахмал растворимый – 10,0; казеин – 10,0; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>–0,5;  
безводный MgSO<sub>4</sub> – 0,05; агар – 20,0.

Выросшие колонии актинопланов тестообразные или плотные, белые или яркоокрашенные. Культивируют их на среде Чапека с пептоном (г/л):

сахароза – 30,0; NaNO<sub>3</sub> – 3,0; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 1,0;  
MgSO<sub>4</sub> – 0,5; FeSO<sub>4</sub> – 0,01; агар – 20,0.

Актинопланы – образующие мицелий культуры, у которых споры подвижные и находятся в спорангиях (рисунок 16). Форма и размер спорангиев, число и форма спор, наличие жгутиков, присутствие или отсутствие воздушного мицелия – признаки, на основе которых определяется принадлежность актинопланов к родам.



**Рисунок 16 – Органы спороношения у актинопланов**

Для выделения микромоноспор суспензию почвы до посева выдерживают при 70 °С на водяной бане 10 мин и высевают на одну из сред.

Среда 1. Коллоидно-хитиновый агар (г/л):

коллоидный	– 4,0;	$K_2HPO_4$	– 0,7;	$KH_2PO_4$	– 0,7;
хитин					
$MgSO_4 \times 7 H_2O$	– 0,5;	$ZnSO_4$	– 0,001;	$MnCl_2$	– 0,001;
$FeSO_4 \times 7 H_2O$	– 0,01;	агар	– 20,0,	pH = 7,0	

Среда 2 (г/л):

$K_2HPO_4$	– 0,466;	$Na_2HPO_4$	– 0,732;	$KNO_3$	– 0,1;
$MgSO_4 \times 7 H_2O$	– 0,1;	NaCl	– 0,29;	$CaCO_3$	– 0,02;
пропионат Na	– 0,2;	агар	– 20,0;	pH = 7,0;	
$FeSO_4 \times 7 H_2O$	– 200 мкг,	$ZnSO_4 \times 7 H_2O$	– 180 мкг,		
$MnSO_4 \times 4 H_2O$	– 20 мкг,	актидион	– 50 мкг/мл,	тиамин	– 4.0 мкг.

Раствор, содержащий актидион и тиамин, стерилизуют фильтрованием через мембранный фильтр и смешивают со стерильной средой.

Среда 3. Среда Кадота (г/л):

$NaNO_3$	– 0,5;	$MgSO_4 \times 7 H_2O$	– 0,5;
$K_2HPO_4$	– 1,0;	$FeSO_4 \times 7 H_2O$	– 0,01;
		$C_6H_5COONa$ (бензонат Na)	
	– 20,0;	агар	– 20,0;
		pH	7,2.

1 мл почвенной суспензии смешивают с 0,67 г порошка целлюлозы, который обычно используют для тонкослойной хроматографии, и с 2 мл жидкой среды Кадота. Эту смесь распределяют на поверхности агаризованной среды Кадота в чашках Петри и инкубируют во влажной камере при 28 °С 25–30 дней.

Колонии микромоноспор окрашенные, по мере образования спор цвета меняются от желто-коричневых, красных, оранжевых в начале до темно-коричневых и черных. Воздушный мицелий образуют только некоторые штаммы при длительном культивировании. Многие на среде с целлюлозой образуют зоны просветления. Наблюдать субстратный мицелий со спорами можно, выращивая актиномицет на овсяной агаризованной среде методом желобка.

В агаровой пластинке в чашке Петри вырезают стерильным скальпелем желобок шириной в 1 см на всю глубину агара. Края желоба засевают культурой актиномицета. На засеянные участки желобка помещают стерильное предметное стекло. Чашки инкубируют в термостате при температуре роста актиномицета. Стекла снимают с агара, фиксируют жидкостью Карнуа, окрашивают метиленовым синим (водный 1 %-й раствор) и рассматривают под микроскопом.

Представители *Micromonospora* имеют одиночные или в парах споры, сидящие на коротких или длинных спороносцах на субстратном мицелии. Воздушный мицелий отсутствует или слабо развит.

Группа термомоноспор представлена мезофильными и термофильными видами. Мезофильные выделяются из почвы, термофильные – из самонагревающихся субстратов, богатых растительными остатками (почва, навоз, компост). Образцы почвы помещают на кусочки влажной фильтровальной бумаги, разложенной в чашки Петри на поверхность питательной среды состава (г/л):

дрожжевой экстракт – 0,1;  $K_2HPO_4$  – 0,2;  $MgSO_4 \times 7 H_2O$  – 0,3;  
казаминовые кислоты – 0,1;  $CaCO_3$  – 0,2;  $FeSO_4 \times 7 H_2O$  – 0,005;  
мочевина или  $(NH_4)_3PO_4$  – 0,5; агар – 20,0.

Чашки Петри инкубируют в трехлитровых банках с плотными крышками при 50 °С в течение 5 дней. В банки опускают мензурки со щелочным пирогаллолом для удаления кислорода. На кусочках фильтровальной бумаги появляются споры, из которых можно выделить культуру термомоноспоры, пересевая ее на питательную среду того же состава.

При выделении мезофильных видов почвенные образцы прогревают при 100 °С для уменьшения численности бактериальных клеток, мешающих выделению термомоноспор. Оптимальная температура для роста термофилов лежит в пределах 40–50 °С, мезофилов – 35–40 °С.

Колонии термомоноспор палевого или желто-коричневого цвета с голубоватым или сероватым воздушным мицелием. Спороносцы короткие, формируются на воздушном мицелии и несут единичные споры.

Род *Actinosynnema*. Представителей выделяют из травы на картофеле-морковном или овсяном агаре. Образует желтоватые колонии со скудно развитым мицелием. В колониях различают колонообразующие гифы (*synnemata*). Споры подвижны.

Представители рода *Thermoactinomyces* составляют отдельную группу. Выделяют их из почвы, сена, навоза и других саморазогревающихся субстратов на агаризованной среде Чапека, в которую добавляют антибиотики для ограничения роста бактерий (новобиоцин 25 мкг/мл) и грибов (циклогексимид 50 мкг/мл), а также дрожжевой экстракт – 2 г/л и казаминовые кислоты – 6 г/л; рН среды 7,2. Инкубируют посева при 50 °С 48 ч. Воздушный мицелий хорошо заметен уже через 24 ч. Воздушные и субстратные гифы ветвятся моноподиально и не распадаются на фрагменты. Непосредственно на гифах или на коротких спороносцах образуются эндоспоры.

Метод выделения нокардий из почвы основан на способности актиномицетов использовать в качестве единственного источника углерода п-парафина. 1 г почвы помещают в 10 мл стерильного раствора Рингера (5 %) и перемешивают на качалке в течение 10 мин. Суспензии дают отстояться и пипеткой отбирают по 1 мл супернатанта в каждую из двух пробирок с 5 мл среды без источника углерода (г/л):

NaNO <sub>3</sub> – 2,0;	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (безв.) – 0,8;
FeCl <sub>3</sub> – 0,01;	MnCl <sub>2</sub> × 4 H <sub>2</sub> O – 0,0008;
MgSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O – 0,5;	ZnSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O – 0,0002;     рН = 7,2.

В среду помещают капельки парафина, простерилизованного при 121 °С 15 мин. Пробирки инкубируют при 37 °С. Через 3 недели капельки парафина переносят на поверхность агаризованной среды с дрожжевым экстрактом (г/л):

дрожжевой экстракт – 1,0;	глюкоза – 10,0;
мясной экстракт – 1,0;	биотин – 20,0;
смесь аминокислот (мг/л): dl-треонин – 200, dl-метионин – 200,	
dl-изолейцин – 200;     рН среды 7,2.	

Парафин дробят и равномерно распределяют по поверхности среды, инкубируют 2 недели при 37 °С.

Другой метод выделения нокардий предусматривает получение накопительной культуры на среде Мюнца (г/л):

KNO <sub>3</sub> – 1,0;	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> – 0,14;	MgSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O – 0,1;
NaCl – 1,0;	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> – 0,6;	2 % парафина.

В колбы на 0,5 л с 50 мл среды Мюнца вносят 0,1 г почвы и посеы культивируют на качалке при 28–30 °С в течение 3–5 сут. Из накопительной культуры затем производят высев на агаризованную среду Мюнца.

Нокардии образуют субстратный и воздушный мицелий, который с возрастом фрагментируется на палочковидные и кокковидные клетки. На гифах воздушного или воздушного и субстратного мицелия могут образовываться цепочки спор. Колонии нокардий окрашены и покрыты белым воздушным мицелием.

Группа актиномицетов с многоклеточными спорангиями чаще всего представлена культурами рода *Geodermatophilus*, выделение которых проводят на среде состава (г/л):

дрожжевой экстракт – 5,0;	растворимый крахмал – 10,0;
солодовый экстракт – 15,0;	сахароза – 10,0;
CaCO <sub>3</sub> – 2,0;	агар – 20,0.

Посевы культивируют в течение месяца при 28–34 °С. Вырастающие колонии темно-коричневого или черного цвета, рудиментарный мицелий фрагментируется; образуют подвижные споры.

Актиномицеты-эндофиты рода *Frankia* выделяют из клубеньков небобовых растений методом Лалонде. После стерилизации терминальных долек клубеньков раствором OsO<sub>4</sub> их разрезают, соблюдая стерильность, в

фосфатносолевом буфере с поливинилпирролидином; отдельные кусочки клубеньков помещают на дно пробирок с жидкой средой состава (г/л):

пептон – 5,0;	дрожжевой экстракт – 0,5;
$K_2HPO_4$ – 0,3;	$MgSO_4 \times 7 H_2O$ – 0,2;
$NaH_2PO_4$ – 0,2;	KCl – 0,2;
$CaCO_3$ – 0,1;	$FeC_6H_5O_7 \times n H_2O$ – 0,01;
$H_2BO_3$ – 0,0015;	глюкоза – 10,0;
лецитин – 0,005 (или твин-80 – 1 мл),	$CoSO_4$ – 1,0 мкг.
$MnSO_4 \times 7 H_2O$ – 0,8 мг,	$ZnSO_4 \times 7H_2O$ – 0,6 мг,
$CuSO_4 \times 5H_2O$ – 0,1 мг,	$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \times 4 H_2O$ – 0,2 мг.

Через 8–10 дней отбирают пробирки, в которых дольки клубеньков покрыты актиномицетным мицелием. Эти дольки рассеивают на среду вышеприведенного состава с добавлением 0,8 % агара, чашки заклеивают лейкопластырем и инкубируют 4 недели при 28 °С. Обычно из клубеньков, обильно обрастающих мицелием, в основном выделяют стрептомицеты. Из клубеньков, покрытых слабым мицелием, вырастают небольшие колонии диаметром 1–2 мм с несегментированным хорошо развитым мицелием со спорангиями различной формы (10–30 мкм в диаметре), сильно опушенными на одном конце, и везикулами (5–7 мкм в диаметре). Эти колонии отсеивают на чашки с полутвердой средой и в пробирки с жидкой средой того же состава. При субкультивировании культуры растут медленно, видимый рост проявляется через 4 недели инкубации. Культуры развиваются внутри полутвердой среды, реже – на поверхности среды.

## 2.5 Выделение накопительных и чистых культур грибов

Грибы – большая группа эукариотных гетеротрофных организмов с абсорбционным (осмотрофным) способом питания, включающая, по данным различных авторов, от 100 до 250 тыс. видов. Основное отличие грибов от растений заключается в том, что зеленые растения – это автотрофные первичные продуценты, а грибы – гетеротрофные редуценты. Хитиновые оболочки клеток большинства грибов, некоторые черты углеводного и азотного обмена, в результате которых образуются гликоген, серотонин и мочевины – метоболиты, характерные для животной клетки. Особый синтез лизина, состав стеролов – всё это также существенно отличает грибы от растений.

Клетка грибов как гетеротрофных организмов столь же существенно отличается от животной клетки. Основные отличия клеток грибов от простейших – абсорбционный способ питания (всей поверхностью тела), а не голозойный (путем заглатывания пищи). Царство настоящих грибов *Fungi* или *Mycota* включает четыре отдела: *Chytridiomycota*, *Zygomycota*, *Ascomycota*, *Basidiomycota*. Изменения в системах грибов отражают кардинальные перемены во взглядах на происхождение, эволюцию и филогенетические связи между таксономическими группами.

Тело (таллом) грибов может представлять голый комок цитоплазмы (плазмодий), содержащий много ядер и погруженный в субстрат, у некоторых форм с ризомицелием; хорошо развитый мицелий, часто разветвленный, без перегородок или с перегородками. Грибам присуще явление, получившее название диморфизма. Есть грибы, у которых отмечается дрожжеподобный рост (одиночные или в коротких цепочках округлые клетки, не имеющие полярности и размножающиеся почкованием – выпячиванием оболочки). Существуют также грибы, имеющие мицелий (цилиндрические клетки в разветвленных нитях с отчетливой полярностью – ростом верхушкой). Многие виды грибов в зависимости от условий могут находиться в мицелиальном или дрожжевом состоянии.

Мицелиально-дрожжевой диморфизм обусловлен кардинальной перестройкой морфологии, физиологии, метаболизма грибов. При переходе от мицелиального к дрожжеподобному росту изменяется физиология важнейших энергетических процессов (дыхание – на брожение), образ жизни (паразитический – на сапротрофный).

В биотехнологии для получения метаболитов, белка, ферментов, медицинских препаратов и других полезных соединений грибы используют с древних времен. Получение накопительных и чистых культур грибов основано на особенностях их метаболизма, строения и биологических свойств. Источниками для выделения грибов могут быть почва, растения, животные, пищевые продукты и т.д.

В зависимости от цели исследования выбирают тот или иной метод отбора образцов, позволяющий обнаружить или количественно учесть мицелиальные или дрожжевые грибы в анализируемом субстрате.

### **Метод смыва**

Этот метод в основном используют для выделения микромицетов и дрожжевых грибов. Смыв производят стерильной водой непосредственно с объекта, помещая его в сосуд или же при больших размерах объекта пользуясь ватными и марлевыми тампонами, которые затем опускают в суспензионную жидкость, встряхивают и делают высев. Недостатком этого метода является невозможность его стандартизировать (разные люди прикладывают разные усилия при смыве), кроме того, вата активно сорбирует клетки микроорганизмов и суспензия получается обедненной.

При изучении эпифитной микрофлоры зеленых растений используют непосредственный смыв без тампонов путем перенесения целых листьев или их частей в колбы со стерильной водой. При сравнительных исследованиях из листа вырезают пластинки стандартной площади, чтобы можно было сделать пересчет числа микроорганизмов на  $1 \text{ см}^2$ . Листья или вырезанные из них пластинки встряхивают в колбе с водой 10 мин на качалке, а затем делают посев. Растирание материала, которое иногда рекомендуют, не всегда желательно, так как при этом освобождаются токсические вещества, фитонциды, которые могут оказать губительное действие на микробные клетки. Метод смыва с поверхности применяют и при исследовании таких образцов, как плоды и овощи, зерно и семена, мясо и шкуры и т.д.

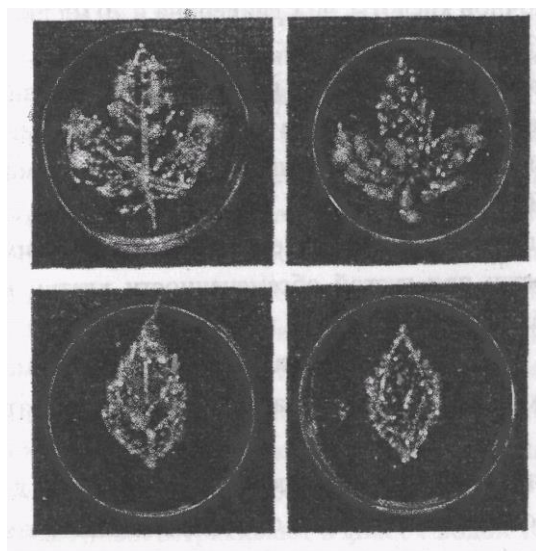
### **Метод соскоба**

Соскоб производят стерильным скальпелем непосредственно в сосуд со стерильной водой. Суспензию перед посевом либо встряхивают 10 мин, либо обрабатывают на микроизмельчителе.

### **Метод отпечатков**

Отпечатки готовят прямыми или опосредованными методами. Прямые методы основаны на снятии дрожжевых клеток с исследуемой поверхности различными прозрачными адгезивными материалами: коллоидной пленкой, бесцветным лаком, липкой целлофановой лентой, полиэтиленовой пленкой, смазанной клеящим веществом. Полученные отпечатки просматривают под микроскопом, опуская пленки в каплю лактофенола на предметном стекле. Лактофенол получают следующим образом: кристаллы фенола расплавляют на водяной бане и взвешивают 20 г. Добавляют 20 г молочной кислоты, 40 г глицерина и 20 мл дистиллированной воды. Липкой лентой можно снимать и предварительно нанесенную на поверхность объекта тонкую агаровую пленку. Полоску ленты с агаром и прикрепившимися к нему дрожжевыми клетками рассматривают затем под микроскопом без проращивания.

Метод получения отпечатков имеет некоторые общие недостатки: далеко не все клетки снимаются с исследуемой поверхности; при густой обсемененности клетки могут располагаться слишком близко друг от друга, и их трудно учитывать. При получении отпечатка с последующим проращиванием объект прижимают к поверхности плотной питательной среды, после чего удаляют; чашки со средой ставят в термостат. Таким образом хорошо наблюдать плотность заселения и характер распределения дрожжей на поверхности листовой пластинки. (рисунок 17).



**Рисунок 17 – Выделение дрожжевых грибов методом отпечатков**

Если объект большого размера, то поступают наоборот: к нему прижимают приготовленную среду, пользуясь способом агаровой колбаски. Колбаски делают из разных питательных агаров, запечатывая их стерильно в пергаментную обертку. Перед использованием верхнюю часть колбаски

срезают острым стерильным ножом и плотно прижимают свежую поверхность среза к исследуемому объекту. Срезая последовательно круглые ломтики, их по 4 размещают в стерильные чашки Петри и проращивают во влажной камере.

Отпечатки можно получить с помощью мягких пластинчатых материалов, таких как бархат, замша, вельвет, из которых делают круглые подушечки - репликаторы. Лучший для этих целей материал - бархат, велюр, белый или бледно-желтый (другие краски могут быть токсичными). Бархат первоначально кипятят, затем вырезают из него круглые куски и приклеивают их к алюминиевым дискам такого размера, чтобы они помещались в чашку Петри. Стерилизуют их завернутыми в бумагу сухим жаром при температуре 160 °С в течение 1 ч. Перед использованием поверхность бархата смачивают жидкой питательной средой и прикладывают его к исследуемому объекту на несколько секунд. Затем (не сдвигая!) осторожно переносят в чашку Петри. Отпечатки делают на серии чашек с одной или разными средами. После употребления репликаторы стерилизуют в сосудах с водой автоклавированием 20 мин при 120 °С, подсушивают и расправляют бархат шпателем.

### **Выделение из воздуха**

Методы анализа воздуха основаны либо на осаждении аэрозолей, либо на фильтрации его через жидкости или твердые фильтры. Метод Коха основан на свободном оседании микробных аэрозолей на поверхность питательной среды под влиянием гравитационных сил. Чашки со средой оставляют открытыми на 15 мин, а затем закрывают и помещают в термостат. Этот метод используют для обнаружения дрожжей в воздухе закрытых помещений при кратковременной экспозиции чашек. В открытых местах его использованию мешают горизонтальные токи воздуха.

Для выявления дрожжей в воздухе рекомендуют проводить количественный учет щелевым методом на сусло-агаре и метабисульфитном агаре (МПА + 0,2 % метабисульфита Na) с добавлением биомицина в количестве 100000 ед/л. Инкубируют посева 48 ч при 37 °С. Для фильтрации воздуха через жидкости используют прибор Кикженко, основанный на осаждении микробных клеток в улавливающей жидкости, которую затем переносят по 0,1- 0,3 мл на плотную питательную среду и проращивают.

### **Методы получения чистых культур грибов**

Существуют прямые и непрямые методы получения чистых культур грибов. Первые основаны на выделении одной клетки или споры под непосредственным контролем через микроскоп. Во втором случае используют косвенные приемы для разделения клеток.

#### **Прямые методы.**

*Капельный метод Линднера.* Суспензию дрожжей или спор разбавляют жидким суслон до концентрации 100 клеток в 1 мл и стерильным чертежным пером наносят мельчайшие капельки на необезжиренное покровное стекло, простерилизованное фламбированием в пламени газовой горелки или спиртовки. Капельки располагают в определенном порядке, обычно по 5 капель в 2 ряда, т.е. всего 10 капель на стекле. Затем быстро опрокидывают стекло над

влажной камерой, которую запечатывают минеральной смазкой. Все камеры немедленно рассматривают под микроскопом и отмечают те из них, которые содержат по одной клетке. Если все капли содержат по несколько клеток, то увеличивают разбавление суспензии и процедуру повторяют. После трех-четырехдневного инкубирования, когда отмеченные единичные клетки образуют микроколонии, последние переносят стерильной иглой или полоской стерильной фильтровальной бумаги в жидкую среду и размножают.

*Метод Линднера в видоизменении Надсона.* Чистое покровное стекло проводят трижды через пламя горелки и края его обводят мастикой (смесь равных частей парафина и вазелинового масла). На центральную часть стекла наносят плоскую каплю прозрачной среды с 10 %-го желатина или 0,5% агара. В теплую и еще не застывшую среду вносят иглой суспензию дрожжей такого разведения, чтобы в каплю попало всего несколько клеток. Стекло помещают во влажную камеру и рассматривают препарат при малом увеличении микроскопа.

Находят ориентиры, которыми могут быть частички взвеси, пузырьки воздуха или дефекты стекла, и вычерчивают карту с расположенными по отношению к ориентирам одиночными клетками дрожжей. Через каждые 10-20 ч препарат повторно исследуют, зарисовывая все изменения. Когда отмеченные клетки разрастаются в микроколонии, покровное стекло перевертывают на предметное и под визуальным контролем глаза при малом увеличении микроскопа переносят иглой материал в пробирки.

*Метод Линднера, упрощенный Вучковичем.* Упрощение метода сводится к тому, что капельки суспензии, содержащие 3–4 клетки дрожжей или спор, снимают петлей, которой предварительно захватывают стерильную среду, и переносят штрихом на поверхность среды. Через некоторое время появляются микроколонии, число которых на одном штрихе должно соответствовать количеству исходных клеток в отмеченной капельке. Из этих колоний пересевом выделяют чистые культуры. Таким способом можно получить сразу несколько одноклеточных культур за короткое время.

*Выделение спор дрожжей при помощи манипулятора.* К использованию микроманипулятора прибегают главным образом при необходимости изолировать споры из асков, так как вегетативные клетки легко повреждаются при микроманипулировании.

Аски разрывают либо механическим прикосновением иглы микроманипулятора, либо заранее обрабатывая суспензию препаратом ферментов, лизирующих клеточную стенку дрожжей. Для работы с микроманипулятором требуются специальные стеклянные микроиглы и влажные камеры.

- *Метод Клинкгаммера.* Суспензию дрожжей разбавляют и наносят на стерильное предметное стекло так, чтобы в поле зрения микроскопа при увеличении в 450 раз было видно лишь несколько клеток. Среди этих клеток выбирают одну, которую всасывают капилляром и переносят в стерильную питательную среду.

*Выделение клеток дрожжей при помощи отделителя Годюруа.* Этот метод основан на тонком распылении микросуспензии в виде аэрозоли при помощи прибора, сконструированного Годюруа. При этом образуются настолько мелкие капельки, что они не могут содержать более одной клетки. Это было доказано экспериментально.

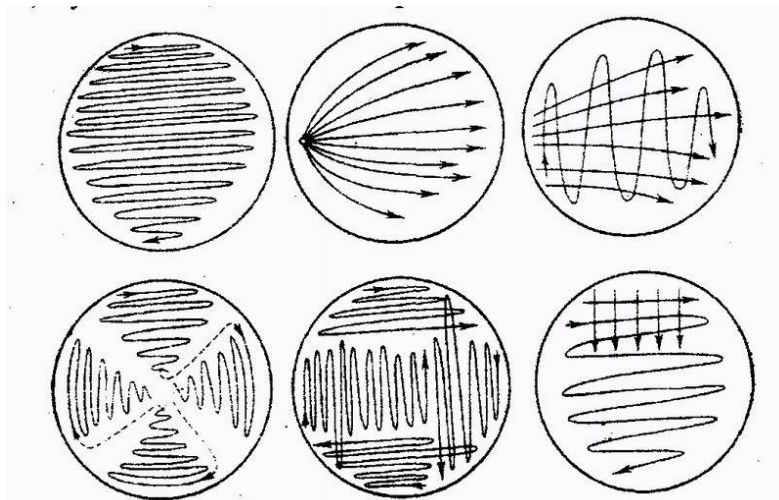
Выделенную любым способом чистую культуру хранят при температуре +5°C. Пересевы делают через 6 мес на виноградное сусло или 10%-ный раствор сахарозы.

•

### **Непрямые методы.**

Методы, основанные на разделении клеток в питательных средах и использовании специфических биологических особенностей отдельных видов для создания преимущественных условий для их роста.

*Метод поверхностного посева на агаровые среды.* Посевы производят либо из суспензии пипеткой, либо петлей по принципу “истощающего штриха”. Каплю суспензии, содержащей дрожжевые клетки, наносят на поверхность застывшей подсохшей среды в чашке Петри. Стерильным стеклянным шпателем равномерно распределяют ее по поверхности. Этим же шпателем можно еще засеять 2–3 чашки на случай, если в первой будет очень густой рост колоний. Процессы выделения чистой культуры заканчиваются пересевом из отдельно выросшей изолированной колонии в пробирку. Контролем чистоты выделенной культуры служит однородность клеток под микроскопом и однотипность колоний на чашке при последующем рассеве. Посев “истощающим штрихом” производят петлей: либо нанося очень густые штрихи, либо прожигая петлю после каждого штриха (рисунок 18).



**Рисунок 18 – Способы посева "истощающим штрихом" для получения отдельных колоний**

Метод посева на поверхности агаровых сред можно применять как в работе с уже имеющимися культурами при проверке их чистоты, так и при первичном выделении дрожжей из любого субстрата. С целью повышения возможностей избирательного выделения культур дрожжей определенного вида

для посева используют элективные среды, а при культивировании создают особые температурные условия, например психрофилы выделяют при 0 °С, а условно патогенные – при 37 °С.

Для выделения дрожжей родов *Brettanomyces* и *Lipomyces* используют их устойчивость к антибиотику актидиону (циклогексимиду), добавление которого в среду в концентрации 100-200 мг/л подавляет рост большинства видов других дрожжей.

*Выделение чистых культур баллистовых дрожжей.* Баллистоспоровые дрожжи легко получить в чистой культуре, используя их способность отбрасывать споры на значительное расстояние. На дно чашки Петри наливают агар без посева, посев культуры дрожжей делают на поверхность застывшей агаровой среды в крышке чашки Петри. Инкубируют посева в перевернутом положении, через некоторое время на нижней пластинке появятся колонии в результате отстрелявшихся баллистоспор.

### **Выделение чистых культур базидиомицетов**

Базидиомицеты – высшие грибы с многоклеточным мицелием. К ним относятся около 30 тысяч видов, среди которых и микроскопические грибы, и грибы с крупными плодовыми телами. Они осваивают экологические ниши, включающие самые разнообразные органические субстраты. По способу питания их разделяют на: паразиты растений (например, широко распространенные и очень опасные для сельскохозяйственных растений головневые и ржавчинные грибы), многочисленные почвенные сапрофиты – хорошо всем известные шляпочные грибы (например, шампиньоны, навозники). К базидиомицетам относятся и микоризообразующие шляпочные грибы, которые успешно развиваются только в тесном контакте с корнями древесных растений (например, белый, подберезовик, подосиновик и многие другие лесные грибы).

Особое место среди грибов занимают ксилотрофные базидиомицеты – паразиты и сапрофиты, способные расти на древесине. Это многочисленные трутовики, основная функция которых – деструкция или биологическое разрушение лигноцеллюлозных субстратов. Большая часть представителей развивается на древесине, находящейся на различной стадии разложения – от свежего отпада до почти гумифицированных остатков. Относительно небольшое число видов растет на живых стволах и вызывает стволые и корневые гнили деревьев преимущественно зрелого возраста.

Виды ксилотрофных базидиомицетов, поселяющиеся на живых деревьях или свежем отпаде, со временем изменяют химический состав древесины настолько, что не могут продолжать свое развитие. Происходит сукцессия видов-деструкторов: первичные разрушители уступают место более конкурентоспособным в изменившихся условиях. Ферментативный комплекс грибов-деструкторов древесины определяет продолжительность использования ими одного субстрата, а также и возможность перехода на другие (Бабицкая, 1993; Горленко и др., 1985; Крапивина и др., 2006) (рисунок 19).



А



Б

**Рисунок 19 – Плодовые тела ксилотрофных базидиомицетов:**

А – *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill; Б – *Fomitopsis officinalis* (Vill.: Fr.) Bond. et Sing.

Для выделения чистых культур ксилотрофных базидиомицетов в качестве исходного материала используют свежесобранные (не позднее 48 часов после сбора материала) и подсушенные (после сбора материала прошло от 3-х суток до 1-го месяца) плодовые тела. Для идентификации выделенных из природных источников видов используют ряд определителей (Бондарцева, 1998; Сафонов, 2000; Ainsworth and Bisby's dictionary of the fungi, 2001).

Выделение штаммов грибов в культуру проводят двумя методами.

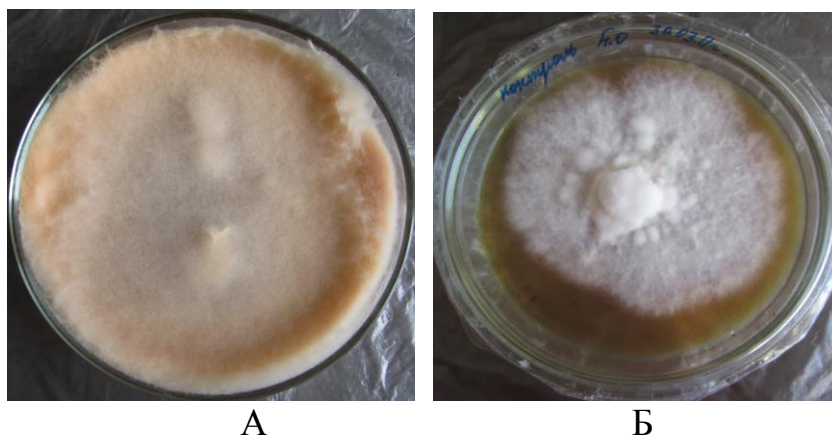
**Споровый метод.** Собранные плодовые тела протирают стерильным тампоном и помещают на стерильную бумагу или в чашки Петри до высыпания спор из плодовых тел. Споры суспендируют в стерильной воде и высевают в чашки Петри на сусло-агар. После 3-5 суток культивирования с помощью микроскопа при увеличении 10 x 40 отмечают проросшие споры и формирование микроколоний. Через 5-7 суток отдельные грибные колонии образовавшиеся, как правило, из нескольких проросших спор, отсевают в пробирки со скошенным сусло-агаром.

**Тканевый метод.** С помощью стерильного скальпеля или бактериологической петли отделяют кусочек гименофора, мякоть из толщи плодового тела или мицелиальные тяжи с древесины и затем помещают их в центр чашки Петри на поверхность агаризованной среды. Через 3-7 суток наблюдают рост мицелия, который отсевают в пробирки со скошенным агаром.

Для предупреждения контаминации грибных культур сопутствующей бактериальной микрофлорой проводят посевы выделенной мицелиальной культуры на агаризованные питательные среды с добавлением 4 %-ной молочной кислоты. После чего грибные культуры проверяют на чистоту от бактериальной контаминации путем посева исследуемой грибной культуры на сусло-агар. После 3-5 суток инкубирования при температуре 28 °С и 37 °С проводят микрокопирование.

Для доказательства систематической принадлежности исследуемых культур используют следующие критерии: цвет мицелия, наличие пряжек на

мицелии, получение в искусственных условиях плодовых тел, что может служить прямым доказательством того, что выделенные мицелиальные культуры относятся к соответствующим видам. Морфология роста штаммов представлена на рисунке 20, микроморфология мицелия на рисунке 21.



**Рисунок 20 – Морфология роста мицелия ксилотрофных базидиомицетов:**  
А – *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill; Б – *Fomitopsis officinalis* (Vill.: Fr.) Bond. et Sing.



**Рисунок 21 – Микроморфология мицелия культур *Fomitopsis officinalis* (Vill.: Fr.) Bond. et Sing. (А) и *Trametes versicolor* (L.:Fr.) Pilat (стрелками указаны пряжки в мицелии)**

## 2.6. Питательные среды для выделения грибов

Для выделения грибов из почвы обычно используют твердые (агаризованные) питательные среды с легкодоступными источниками углерода – сахарозой, глюкозой, декстрозой.

Поскольку в ассоциациях почвенных грибов встречаются представители различных систематических и экологических групп, для выделения их

применяют различные питательные среды. Так, для изоляции быстрорастущих и обильноспороносящих грибов (виды родов *Penicillium*, *Aspergillus*) используют сусло-агар, среду Чапека, картофельно-декстрозный агар. Для выделения грибов, разрушающих целлюлозу, используют питательные среды, содержащие целлюлозу. Для выделения из почв грибов, разлагающих хитин, применяют приманки, имеющие хитин, а для выделения кератофильных грибов – приманки, содержащие роговые вещества. Грибы, растущие в условиях дефицита органических веществ, изолируют с помощью голодного агара. Грибы, разлагающие гумус, выделяют на почвенном агаре.

Питательные среды, которыми пользуются в микологии, можно разделить на природные, искусственные (получаемые обработкой природных субстратов) и среды определенного состава. Ниже приводятся способы приготовления наиболее употребляемых питательных сред.

### **Среды природные**

Овощи (картофель, морковь, свекла и др.) предварительно моют, нарезают цилиндриками, затем помещают в пробирки и стерилизуют без добавления воды текучим паром в течение часа или в автоклаве при 0,5 атм. (112 °С) в течение 30 мин 2 дня подряд.

Зерна (ячмень, овес, пшеница, рис и др.) помещают в пробирки и заливают водой 1:1, для риса 1:2. Стерилизацию проводят 3 дня подряд при 1 атм. (121 °С) в течение 20 мин.

Листья, стебли и корни растений очищают, моют, нарезают кусочками, помещают в пробирки и заливают водой так, чтобы покрылась нижняя часть кусочков растений. Стерилизуют текучим паром в течение часа 2 дня подряд.

### **Среды искусственные, полученные путем обработки природных субстратов**

*Сусло-агар:*            пивное сусло – 1 л,  
                                 агар-агар     – 15–20 г.

Пивное сусло отфильтровывают от осадка и разбавляют водой (1:1). Затем к 1 л пивного сусла добавляют агар, хорошо перемешивают и кипятят 15–20 мин. Полученный раствор быстро, пока не остыл, фильтруют, разливают в стерильную посуду и стерилизуют в автоклаве при 0,5 атм. в течение 30 мин

*Картофельный агар:*            картофель – 200 г,  
                                 агар-агар – 15–20 г,  
                                 вода – 1 л.

Картофель моют, очищают, заливают водой и варят 30 мин. После этого фильтруют через несколько слоев марли или вату, добавляют воду до прежнего объема, смешивают с агаром, кипятят 15-20 мин разливают в стерильную посуду и стерилизуют при 0,5 атм. в течение 30 мин.

*Картофельно-декстрозный агар:*            картофель – 200 г,  
                                 декстроза – 20 г,  
                                 агар-агар – 15–20 г,  
                                 вода – 1 л.

Декстрозу можно заменить глюкозой, такая среда будет картофельно-глюкозной.

Водный (голодный) агар: агар-агар – 15–20 г, вода – 1 л.

Стерилизуют при 1 атм 20 мин.

Вытяжка из почвы с агаром: почва – 500 г, агар-агар – 15–20 г, вода – 1 л.

Измельченную почву заливают водой, настаивают сутки, периодически взбалтывая, затем кипятят 30 мин и фильтруют через 1–2 слоя фильтровальной бумаги, жидкость доводят до 1 л, добавляют агар, кипятят 15–20 мин, разливают в посуду и стерилизуют при 0,5 атм. 30 мин.

Иногда для лучшего роста грибов к этим средам добавляют экстракт или автолизат дрожжей из расчета 5 мл на 100 мл среды.

Дрожжевой экстракт готовят следующим образом: 100 г прессованных дрожжей размельчают, добавляют 1 л воды и кипятят 5 мин при постоянном помешивании, затем фильтруют через 1–2 слоя фильтровальной бумаги и стерилизуют в автоклаве при 0,1 атм. (102,5 °С) в течение 10 мин.

Для приготовления дрожжевого автолизата берут 500 г прессованных дрожжей, смешивают с 500 мл воды и в банке с притертой пробкой настаивают 2–3 суток в термостате при 45 °С или 1 сутки при 55–58 °С. После этого фильтруют, остаток из фильтра промывают 1 л воды, добавляют воды до 2 л и стерилизуют 10 мин при 0,4 атм. (110 °С).

#### **Среды определенного состава**

*Среда Чапека (г/л):*

сахароза – 30,0;

NaNO<sub>3</sub> – 2,0; MgSO<sub>4</sub> – 0,5; KCl – 0,5;

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 1,0; FeSO<sub>4</sub> – 0,01; агар – 15–20.

*Среда Чапека-Докса (г/л):*

сахароза – 30,0;

NaNO<sub>3</sub> – 3,0; MgSO<sub>4</sub> – 0,5; KCl – 0,5;

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 1,0; FeSO<sub>4</sub> – 0,01; агар – 15–20.

*Глюкозо-пептонный агар Сабуро (г/л):*

глюкоза – 40, пептон – 10, агар – 15–20.

В почвах грибы находятся в ассоциации с другими организмами. Поэтому для подавления роста некоторой сопутствующей микрофлоры (бактерий, актиномицетов) питательные среды следует подкислять либо добавлять к ним антибиотики. Для этой цели используют соляную, серную, молочную, лимонную, фосфорную кислоты. Подкисление ведут до pH со значением 4,2 – 4,5. Более высокая кислотность может оказывать угнетающее действие на рост многих грибов. Среды обычно подкисляют перед добавлением агара.

Из антибиотиков в качестве ингибиторов могут использоваться пенициллин, стрептомицин и другие; 1000 000 ед пенициллина растворяют в 10 мл стерильной дистиллированной воды и к каждому литру питательной среды добавляют по 2 мл полученного раствора; 1000 ед стрептомицина растворяют в 90 мл стерильной дистиллированной воды, после чего 4 мл раствора прибавляют к 1 л питательной среды. Антибиотики добавляют к питательным средам после автоклавирования.

На основании проведенных исследований макроколоний, микроскопического изучения мицелия и репродуктивных органов ведут

идентификацию гриба. Сначала определяют принадлежность к классу, затем порядку, семейству, роду, виду.

*Глюкозо-аммонийная* среда содержит следующие вещества (в г/л водопроводной воды):

глюкоза	– 20,0;	MgSO <sub>4</sub>	– 0,5;
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	– 5,0;	NaCl	– 0,1;
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	– 0,85;	CaCl <sub>2</sub>	– 0,1;
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	– 0,15;	агар	– 20,0.

Для обогащения факторами роста к этим средам добавляют иногда дрожжевой (0,2 %) и мясной (0,3 %) экстракты и виноградный сок (3 %).

### **Дифференциальные среды**

Их используют при выделении дрожжевых грибов из субстратов, сильно загрязненных микроорганизмами. Для подавления роста сопутствующих микроорганизмов к указанным выше питательным средам добавляют различные ингибиторы. Рост большинства бактерий и актиномицетов подавляется при низком значении рН среды, поэтому чаще всего среды для выделения дрожжей подкисляют до рН 4,5 путем добавления к ним минеральных или органических кислот. Для синтетических сред более применима соляная кислота, для суловых – молочная, лимонная или винная. Для подкисления заводского солодового сула (6–8 % СВ) обычно требуется 3 – 4 мг/л концентрированной молочной кислоты. Кислоты добавляют в жидкую или расплавленную агаровую среду сразу после стерилизации, непосредственно перед засевом или перед разливкой в чашки Петри. Все дрожжи, кроме *Schizosaccharomyces pombe* (рН 5,45), растут при рН до 2,5. Если брать 3 % агара, то среда застывает при рН 4,8.

Вместо кислот используют также антибиотики широкого спектра действия: стрептомицин (80 г/л или 100 ед/мл); пенициллин (20-100 ед/мл); левомицетин (50 мг/л) и др. Их можно добавлять в среду порознь и в комплексе. Например, против кислотоустойчивых бактерий применяют следующие смеси антибиотиков:

- актиномицин 2 мг/л + ауреомицин 50 мг/л;
- пенициллин 60 ед/мл + стрептомицин 100 ед/мл;
- левомицетин 20 мг/л + стрептомицинсульфат 20 мг/л + хлортетрациклин солянокислый 100 мг/л.

Для отделения сахаромицетов от других дрожжей добавляют 2,5 % этилацетата и доводят рН до 4,0 уксусной кислотой. Затем чашки герметизируют. При этих условиях колонии сахаромицетов проявляются первыми.

Росту дрожжевых грибов на питательных средах при высеве из исходного материала зачастую препятствуют грибы с широко распространяющимися на поверхности субстрата мицелиальными колониями. Они имеют общие с дрожжами потребности в источниках питания, устойчивы к низким значениям рН среды и нечувствительны к воздействию противобактериальных антибиотиков. Для ограничения роста микромицетов в среду добавляют специфические вещества: дифенил (0,005-0,01 %), бычью желчь (0,25–0,5 %),

теллурат калия (0,05–0,15 %), пропионат натрия (0,15–0,25 %), или некоторые красители: бромкрезоловый пурпурный (0,0025 %), бенгальский розовый (0,003 %), кристаллический фиолетовый (0,001 %). Для получения дифенила исходного раствора 100 мг дифенила растворяют в 1 мл этилового спирта в водяной бане при 40–50 °С.

### Элективные среды

Эти среды применяют для дрожжей из специфических местообитаний. Осмофильные дрожжи обитают в гнездах диких пчел (в меде), обнаруживаются при производстве сахара, при порче меда или других продуктов с большим содержанием сахара. Их выделяют на средах с высоким осмотическим давлением: на медовом и осмофильном агарах. Ниже представлен состав сред для осмофильных дрожжей.

*Медовый агар*: 70 % меда в водопроводной воде и 2 % агара;

*Синтетический "медовый" агар*: 60 г глюкозы, 0,5 г дрожжевого экстракта, 2,5 г агара, 100 мл воды;

*Осмофильный агар*: в сироп, содержащий 35 массовых частей сахарозы и 10 частей глюкозы, добавляют агар и стерилизуют 20 мин при 112 °С. Повторное расплавление не рекомендуется.

При выделении осмофильных дрожжей посевы делают на указанные среды и для сравнения - на обычные. Сахар, мед или сиропы растворяют в воде и фильтруют через мембранные фильтры, которые затем помещают для проращивания на агаровые среды.

Почвенные олигонитрофильные дрожжи *Lipomyces* выделяют на безазотистых средах. Примером такой среды может служить модифицированный агар Эшби (в г/л дистиллированной воды):

Сахароза	– 20,0;	NaCl	– 0,2;
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	– 0,2;	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	– 0,1;
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	– 0,1;	агар	– 20,0.
MgSO <sub>4</sub>	– 0,2;		
×7 H <sub>2</sub> O			

Для подавления роста бактерий к этой среде добавляют 80 мг/л стрептомицина. Посев производят комочками почвы: навеску в 100 мг распределяют на 2 чашки Петри по 50 комочков на каждую. Для равномерного распределения используют трафарет, который подкладывают под чашку. Учет обрастаний производят через 25–30 сут инкубирования при комнатной температуре. Результат выражают в процентах обрастания комочков почвы молочно-белыми слизистыми колониями липомицетов.

Для выделения и культивирования базидиальных грибов предложенные питательные среды можно объединить в три группы: 1) естественные органические субстраты (сусло, пептон, гидролизат казеина, картофель, зерно, древесные опилки и т.п.); 2) полусинтетические среды, которые помимо природных продуктов, содержат определенные химические соединения; 3) синтетические среды, которые состоят только из соединений, химический состав которых точно известен.

Среды из естественных органических субстратов имеют ряд преимуществ перед другими средами: они дешевы, несложны в приготовлении и, как правило, все грибы на них хорошо культивируются. К недостаткам этих сред можно отнести непостоянство состава некоторых органических субстратов, как, например, колебания в содержании крахмала в картофеле в зависимости от сроков и условий его хранения или различное соотношение аминокислот в кукурузном экстракте различного происхождения и т.п.

Органические субстраты, которые входят в состав полусинтетических сред, используются не только как источники питания, но и в качестве стимуляторов роста или веществ, индуцирующих образование определенных ферментов и некоторых биологически активных веществ.

### **Контрольные вопросы**

1. На каком принципе основаны биохимические методы получения накопительных и чистых культур бактерий?
2. На каком принципе основаны биофизические методы получения накопительных и чистых культур бактерий?
3. На каком принципе основаны биофизические методы получения накопительных и чистых культур бактерий?
4. Перечислите методы получения чистых культур дрожжевых и мицелиальных грибов.
5. Основные принципы составления питательных сред для выделения грибов.
6. Основные принципы составления питательных сред для выделения актиномицетов.
7. Дайте характеристику признаков грибов: общие признаки с животными и растениями.
8. Дайте определение «мицелиально-дрожжевой диморфизм».
9. Перечислите методы выделения накопительных культур дрожжевых и мицелиальных грибов.
10. Приведите основные принципы селективности питательных сред для выделения бактерий и грибов.

### **3 ХРАНЕНИЕ КУЛЬТУР МИКРООРГАНИЗМОВ**

Для поддержания культур микроорганизмов в жизнеспособном состоянии, а также поддержания таксономически важных признаков и свойств разработаны специальные методы, включающие создание специальных питательных сред и условий хранения. Основная проблема длительного хранения сводится к созданию условий анабиоз – торможения процессов обмена веществ. Культуры микроорганизмов сохраняют в специальных коллекциях типовых культур.

В крупных коллекциях имеются банки бактерий, мицелиальных и дрожжевых грибов, вирусов, культур тканей растений и животных. В настоящее время в различных странах насчитывается свыше 500 коллекций. Жизнеспособность микроорганизмов поддерживается следующими методами: 1) периодическими пересевами на свежие питательные среды; 2) хранением в условиях низких и ультранизких температур; 3) лиофилизацией; 4) высушиванием; 5) хранением под минеральным маслом.

#### **3.1 Периодические пересевы (субкультивирование)**

Периодические пересевы – наиболее традиционный, исторически сложившийся метод поддержания культур микроорганизмов. Со времен Л. Пастера и Р. Коха и до настоящего времени этот метод широко используется в различных лабораториях и является главным для микроорганизмов, не выдерживающих замораживания или высушивания.

Пересевы аспорогенных культур микроорганизмов проводят на свежие питательные среды с интервалом один-два раза в месяц (иногда еженедельно, если это необходимо), культуры спорообразующих бактерий, дрожжей, мицелиальных грибов пересевают через два-три месяца. Время инкубирования до начала хранения не должно превышать периода экспоненциального роста культуры. Как правило, культуры, находящиеся в начале стационарной фазы роста, лучше переносят условия хранения. Частые пересевы, особенно на жидкие питательные среды, вызывают изменения свойств, способствуют возникновению спонтанных мутантов, которые могут при более высокой скорости роста вытеснять исходную популяцию. Кроме того, при изменении свойств у мутантов они могут снижать активность продукции биологически активных соединений в сравнении с исходной культурой. Поэтому для хранения следует использовать генетически однородную популяцию на плотной питательной среде (если они на ней растут). Для предотвращения возможных изменений в популяции лучше приготовить серию субкультур, полученных из одной родительской культуры. Микроорганизмы между пересевами хранят в темноте при температуре от плюс 5 до плюс 20 °С.

Преимуществом метода периодических пересевов являются простота и удобный визуальный контроль чистоты культуры, а также возможной визуальной морфологической изменчивости колоний (образование R и S вариантов, атипичных, секторных и других колоний). Недостатками метода

считаются: возможность заражения, краткосрочность хранения, трудоемкость работы и расход в больших количествах компонентов питательных сред.

В качестве примера можно привести молочнокислые бактерии, характеризующиеся высокими требованиями к условиям культивирования. Во время периодических пересевов они часто утрачивают свои ценные производственные свойства. Известно, что актиномицеты и мицелиальные грибы при частых пересевах на богатые питательные среды также могут изменять свойства, снижать или утрачивать способность к образованию антибиотических веществ, спор. Некоторые пигментообразующие бактерии (виды рода *Azotobacter* и др.) при пересевах утрачивают способность образования пигментов. Методом периодических пересевов в коллекциях обычно поддерживают ряд бактерий, дрожжи, мицелиальные грибы, простейшие.

### **3.2 Хранение микроорганизмов при низких и ультранизких температурах**

Для длительного хранения бактерий, вирусов (включая бактериофагов), мицелиальных грибов, дрожжевых грибов, водорослей и простейших используют низкие и ультранизкие температуры. Изучением возможности хранения того или иного вида микроорганизмов при низких и ультранизких температурах занимается наука «криобиология».

Обычно культуру микроорганизмов готовят в виде густой суспензии с титром  $10^8$ – $10^{12}$  клеток/мл в криозащитной среде, предохраняющей клетки от повреждений, а затем помещают в стеклянные или пластиковые ампулы или пробирки с завинчивающимися пробками. Известно, что густая суспензия при различных стрессах повреждается в меньшей степени, чем популяция низкой плотности. В качестве криогенов используют смесь льда или снега (3 г) с NaCl (1 г), имеющую температуру минус 21 °С или смесь льда (2 г) с CaCl<sub>2</sub> (1 г), имеющую температуру минус 56 °С. Используют также твердую углекислоту, имеющую температуру минус 78 °С. Замораживание клеток проводят в сосудах Дюара.

Микроорганизмы замораживают в рефрижираторах при температуре от минус 12 до минус 80 °С. В последние годы для хранения микроорганизмов в крупных коллекциях используют рефрижираторы с азотом: газовой-фазовый (минус 130–170 °С) и жидко-фазовый (минус 196 °С) рефрижираторы емкостью от 10 до 35 л. В жидком азоте хранятся микроорганизмы, не выдерживающие лиофилизации (автотрофы, спирохеты, микоплазмы), а также вирусы. Лучше всего сохраняют стабильность в жидком азоте закваски молочнокислых бактерий, а также тест-культуры бактерий и дрожжей, используемые для определения витаминов и оценке антибиотической активности.

Сохранение жизнеспособности микроорганизмов при замораживании и оттаивании зависит от природы микроорганизма, возраста и плотности популяции, условий культивирования, криопротекторов, скорости замораживания–оттаивания и других факторов.

Установлено, что даже штаммы одного вида могут отличаться чувствительностью к низким температурам. Грамположительные бактерии обычно более устойчивы к замораживанию, чем грамотрицательные. Для любого вида хранения микроорганизмы выращивают при оптимальных условиях до начала стационарной фазы. При периодическом культивировании микроорганизмы обычно более чувствительны к холоду в экспоненциальной фазе роста. Споры более устойчивы к замораживанию, чем вегетативные клетки.

Микроорганизмы, выращенные на синтетической среде, обычно более чувствительны к действию различных стрессов, чем клетки, полученные на богатой питательной среде, содержащей сложные компоненты. Изменяя состав среды, можно подобрать условия, способствующие синтезу в клетках таких соединений, как гликогенподобные резервные вещества, липиды, пептиды, которые защищают их от повреждений при замораживании–оттаивании.

При замораживании микроорганизмов в солевом растворе или бульоне они быстро погибают, в воде – умеренно, а в глицерине или молоке сохраняют свою способность длительный период времени. Было выявлено хорошее криопротекторное действие ряда веществ. В настоящее время в качестве криопротекторов применяют как низкомолекулярные соединения (10–20%-ный глицерин, 7–10%-ный диметилсульфоксид, 10–20%-ная сахароза), так и высокомолекулярные (белки, 10 %-ный поливинилпирролидон). Их условно подразделяют на две группы: 1) вещества, проникающие в клетки (глицерин, диметилсульфоксид); 2) вещества, не проникающие в клетки (поливинилпирролидон).

Механизм криозащитного действия этих веществ окончательно не выяснен. Предполагается, что криопротекторы уменьшают концентрацию электролитов, противодействуют осмотическому давлению, изменяют структуру воды вне клеток, действуют на поверхность и проницаемость клеток.

Относительно объяснения повреждений клеток при замораживании предложено много теорий. Согласно ранней теории образование кристаллов льда внутри клеток вызывает механическое повреждение мембран и последующую гибель клеток. Другая популярная теория объясняет повреждение клеток как следствие увеличивающейся концентрации в них солей при быстром удалении воды в процессе образования льда вне- и внутриклеточно. Концентрация внутриклеточных растворов вызывает изменение рН и увеличение скорости реакций между компонентами даже при очень низкой температуре, что приводит к денатурации таких макромолекул, как белки, ДНК и РНК, и к нарушению клеточных мембран.

В настоящее время признается, что повреждения клеток могут возникать в зависимости от скорости охлаждения. При медленной скорости охлаждения, когда внутриклеточная вода не замерзает, происходит дегидратация клеток и увеличивается концентрация солевых растворов, которые ответственны за их повреждения. При средней скорости охлаждения (до минус 20 °С или ниже) около 90 % внутриклеточной воды замерзает, остальные 10 % составляет «связанная» вода. При высоких скоростях охлаждения образуются

внутриклеточные кристаллы льда, вызывающие повреждения и гибель клеток. Видимо, существует связь между величиной кристаллов льда и выживаемостью микроорганизмов.

Полагают, что при быстром охлаждении в мембранах образуются гидрофильные каналы, через которые происходит утечка из клеток веществ. При медленном охлаждении липидные цепочки перестраиваются и препятствуют образованию таких каналов. Оптимальной скоростью охлаждения считается та, при которой клетки подвергаются наименьшим повреждениям.

В последние годы большое внимание исследователи уделяют влиянию скорости замораживания и оттаивания на жизнеспособность клеток. Различают скорость охлаждения до точки замерзания суспензии и скорость охлаждения от точки замерзания суспензии. Лучшие результаты выживаемости получены при двухэтапном режиме охлаждения: сначала с медленной скоростью охлаждения ( $1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ ) до минус  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  и затем охлаждением со скоростью  $15\text{--}30\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{мин}$  до минус  $150\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Ампулы хранят в жидком азоте при минус  $190\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Следует подчеркнуть, что необходимо измерять скорость охлаждения образца, а не охлаждающей бани. Скорость оттаивания образца должна быть быстрой. Особенно это имеет значение в случае быстрого и ультрабыстрого охлаждения для предупреждения повреждений, вызываемых рекристаллизацией льда. Обычно образец оттаивают в водяной бане при плюс  $30\text{--}45\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Преимущества метода криогенного хранения культур состоит в следующем: малая вероятность заражения культуры, сохранения стабильности свойств микроорганизмов, затрате небольшого времени и небольшого количества материалов при подготовке культуры к хранению. Клетки можно легко извлечь из рефрижиратора и использовать в качестве прямого инокулята. Трудности метода: требует специального оборудованного рефрижиратора и регулярного контроля его работы, мер предосторожности при проверке герметичности стеклянных ампул для предупреждения взрыва.

### **3.3 Лиофилизация**

Большое значение как наиболее перспективный приобрел метод лиофилизации (freeze-drying), заключающийся в высушивании клеток из замороженного состояния под вакуумом, минуя жидкую фазу (по типу сублимации).

Впервые этот метод был применен для гистологических исследований в 1890 году. В настоящее время лиофилизация широко используется для хранения культур длительный период (более 30 лет) в крупных коллекциях. Этим методом можно сохранять грамположительных и грамотрицательных бактерий, актиномицетов, микоплазм, микромицетов, дрожжей. В процессе лиофилизации микроорганизмы подвергаются действию различных стрессов: замораживание, высушивание, дегидратации и др. Важным аспектом является установление причин, вызывающих повреждение клеток при лиофилизации, а

также подбор условий, обеспечивающих сохранение жизнеспособности и стабильности признаков.

Выживаемость лиофилизированных микроорганизмов зависит от специфической чувствительности вида и штамма, стадии роста культур, концентрации клеток, состава защитных сред, режима лиофилизации, условий хранения (температура, газовая атмосфера, свет), условий реактивации (состав и показатель активности воды -  $a_w$  среды, продолжительность хранения).

Особо важное значение имеет состав защитных или суспензионных сред, в которых лиофилизируют клетки. В первых работах бактерии лиофилизировали в бульоне или молоке, фактически используя их в качестве защитных сред. Микроорганизмы, лиофилизированные в дистиллированной воде или физиологическом растворе, имели низкую выживаемость и плохо сохранялись. Защитные среды для различных видов микроорганизмов подбирали эмпирически.

Установлено, что протекторными свойствами обладают сложные вещества: сыворотка крови, белки сыворотки, желатина, молоко, мясной бульон, декстрин, крахмал, полиэтиленгликоль, поливинилпирролидон, пептон. Защитный эффект на микроорганизмы оказывают и простые вещества: глюкоза, сахароза, галактоза, глутамат натрия, аспарагинат натрия и некоторые другие. Наиболее часто применяются сложные среды: 1 % желатина + 10 % сахарозы; обезжиренное молоко + 7 % глюкозы; 75 % лошадиной сыворотки + 25 % бульона + 7,5 % глюкозы; 2 % декстрина + 0,5 % аскорбиновой кислоты; телячья сыворотка + 5 % мезо-инозита; 10 % сухого молочного порошка + 1 % глутамата натрия. Лучший результат получается при использовании одновременно двух-трех защитных сред.

Существуют различные гипотезы о механизме действия защитных сред. Первая: защитная среда должна содержать вещество, способное сохранять остаточную влажность до определенного уровня; минимальное количество электролитов; вещество, формирующее механический каркас (матрицу), на котором высушиваются микроорганизмы. Вторая: механизм защиты клеток часто связывают с физико-химическими факторами. Низкомолекулярные соединения (сахара), проникая в клетку, создают большое осмотическое давление, растворяют метаболиты и препятствуют разрыву клеточной оболочки во время высушивания. Высокомолекулярные белки и другие полимеры не проникают внутрь клетки и заставляют клеточную оболочку плотнее прилегать к цитоплазме при регидратации клеток. 3. Протекторные свойства отдельных соединений тесно связаны с их химической структурой: с наличием трех или более водородных связей и ионизирующих групп в подходящей конформации, у глутаминовой кислоты и аргинина – с  $\text{NH}_2$ -группой, а у сахаров и полиспиртов – присутствием более пяти  $\text{OH}$ -групп. Предполагается, что протекторные растворы стабилизируют клеточные структуры вблизи клеточной мембраны.

Для лиофилизации используют различные аппараты и режимы. Например, лиофилизация в центробежно-сублимационном аппарате с дальнейшим досушиванием в сублимационном аппарате. Для чего

концентрированную суспензию микроорганизмов ( $10^9$ – $10^{10}$  клеток/мл) в защитной среде (снятое молоко + 5 % лактозы + 5 % сахарозы) разливают по 0,2 мл в ампулы из нейтрального стекла. Ампулы охлаждают до минус 20–24 °С с одновременным высушиванием при температуре сублиматора 20, 26 °С, рефрижиратора – минус 45, минус 60 °С при вакууме  $1 \cdot 10^{-3}$  (0,11–0,07 мм рт.ст.). Длительность замораживания–высушивания составляет 5–6 ч, досушивания – 2 ч. Ампулы запаивают под вакуумом и хранят при 4 °С в темноте.

Лиофилизированные клетки лучше сохраняются под вакуумом или в атмосфере инертного газа (аргон, неон, гелий, криптон), чем на воздухе. Кислород оказывает токсическое действие; его эффект коррелирует с образованием свободных радикалов и (или) с повреждением клеточной мембраны. Лиофилизированные культуры лучше хранить при температуре 4–6 °С. Многими работами показано, что с увеличением температуры хранения от 18 до 37 °С число жизнеспособных клеток уменьшается.

На жизнеспособность клеток и скорость их отмирания при хранении оказывает влияние количество воды, оставшейся непосредственно после лиофилизации. Оптимум остаточной влажности (2–6 %) варьирует в зависимости от состава среды, в которой микроорганизмы высушивали, атмосферы хранения, а также от вида и физиологического состояния микроорганизмов. Сверхвысушивание (ниже 0,5–1,5 % влажности) является губительным. Лиофилизированные клетки, как правило, необходимо хранить в темноте; при хранении на свету выживаемость их резко падает.

Большое значение придается процессу реактивации – выведению лиофилизированных клеток из состояния анабиоза. Условия, снижающие возникающий при вскрытии ампул осмотический шок и стресс, увеличивают процент выживаемых клеток. Хорошие результаты получены при медленном добавлении дистиллированной или водопроводной воды (0,2–1,0 мл) к сухим клеткам. В качестве регидратантов применяют мясной бульон, пептон, растворы органических кислот и питательные среды. В некоторых коллекциях лиофилизированные бактерии регидратируют в питательном бульоне в течение 10 мин, а грибы – в водопроводной воде в течение 15–20 мин.

Микроорганизмы, поврежденные в процессе замораживания-высушивания, хранения и регидратации, отличаются повышенной чувствительностью к среде реактивации и лучше всего восстанавливают свои свойства при культивировании на богатых естественных средах после нескольких пассажей.

Наиболее часто при лиофилизации повреждаются клеточные стенки, клеточные мембраны и РНК. После регидратации поврежденные клетки сначала восстанавливают свою измененную проницаемость, а затем начинают синтезировать РНК и белки. Эти репарационные процессы заканчиваются в период начала репликации ДНК. Лиофилизированные клетки имеют удлиненную лаг-фазу роста, но она сокращается после внесения в среду культивирования растворов пептида и аминокислот.

Результаты многочисленных исследований показывают, что лиофилизация является надежным способом сохранения жизнеспособности у большого числа видов микроорганизмов и стабильности важных признаков у тех видов, которые выдерживают этот процесс на протяжении многих лет хранения. Однако известны факты изменения структуры и физиолого-биохимических свойств микроорганизмов в результате замораживания–высушивания. Отмечается уменьшение величины и изменение морфологии лиофилизированных клеток, у отдельных штаммов микроорганизмов происходит задержка скорости роста и пигментообразования, снижение антибиотической активности. Но некоторые штаммы после регидратации отличаются повышением биохимической активности (азотфиксации, скорости поглощения кислорода).

### **3.4 Хранение микроорганизмов в высушенном состоянии**

Процесс высушивания – простейший метод хранения микроорганизмов. Многие микроорганизмы хорошо переносят длительное воздушное высушивание в природе (в почве, песке, глине и т.д.) и в различных пищевых продуктах, на растительных и животных остатках. В процессе высушивания происходит обезвоживание микробных клеток. В живых клетках вода составляет 80–90 % микробной массы. Во время высушивания клетки теряют свободную воду и рост микроорганизмов прекращается при остаточной влажности 10–12 %. При снижении остаточной влажности до 2–5 % сохраняется прочно связанная с клеточными структурами вода, которая строго локализована. В высушенных таким образом клетках биохимические реакции приостанавливаются или отдельные реакции протекают очень медленно.

Резистентность микроорганизмов к высушиванию зависит от многих факторов: свойств микроорганизмов, среды и условий культивирования, методов высушивания, остаточной влажности, условий хранения и реактивации. Процесс высушивания лучше всего переносят спорообразующие виды. Эндоспоры, цисты, конидии, артроспоры, вероятно, возникли у микроорганизмов в процессе эволюции для перенесения неблагоприятных условий окружающей среды. Эндоспоры бактерий отличаются наибольшей устойчивостью к высушиванию: от 60 до 300 лет и это, вероятно, не предел. Механизм резистентности спор к высушиванию до конца остается необъясненным. Большинство исследователей придерживаются точки зрения, что резистентность является результатом низкого содержания воды в цитоплазме спор.

Как правило, аспорогенные микроорганизмы, особенно морские и пресноводные, быстро погибают при высушивании. Однако патогенные стрептококки и стафилококки отличаются высокой устойчивостью к высушиванию. Это имеет большое биологическое значение в связи с переносом инфекционных заболеваний. Хорошо переносят длительное пребывание в высушенной почве клубеньковые бактерии, также не образующие спор.

Высушивание культур микроорганизмов проводят на различных сорбентах: в стерильной почве, песке, глине, силикагеле, на пшене, фильтровальной бумаге, вате, стеклянных и фарфоровых бусах, тканях, пластмассах, нерастворимом фосфате, углекислом кальции, крахмале, кристаллах сахарозы и т.д. Причины лучшего сохранения микроорганизмов на сорбентах пока неясны. По-видимому, сорбенты защищают микроорганизмы от сильного высыхания и поддерживают определенный уровень влажности.

Ряд микроорганизмов, не выдерживающих лиофилизации, переносят высушивание под вакуумом на сухих таблетках пептона, крахмала, декстрана, а также на бумажных, целлофановых или желатиновых дисках. В производственной практике широко применяют методы контактной (с адсорбентом) и конвективной (в сухом воздухе) сушки для хранения хлебопекарных и кормовых дрожжей, заквасок молочнокислых бактерий, бактериальных удобрений, энтомопатогенных препаратов.

Процесс реактивации микроорганизмов из высушенного состояния включает: увлажнение клеток (регидратация), ликвидация поврежденных клеточных структур (репарация) и восстановление численности популяции путем размножения жизнеспособных клеток. Высушивание приводит к удлинению лаг-фазы роста и поэтому для восстановления скорости размножения требуется определенное время. Процесс реактивации обычно лучше происходит в полноценной питательной среде.

Существует зависимость между температурой хранения высушенных клеток, рН и  $a_w$  среды. Величина  $a_w$  имеет большое значение в связи с вопросами выживаемости и размножения микроорганизмов при термической обработке пищевых продуктов. Методы высушивания благодаря своей простоте нашли широкое применение в лабораториях и в практике. Высушенные культуры микроорганизмов легко хранить и транспортировать.

### **3.5 Хранение культур под минеральным маслом**

Метод хранения под минеральным маслом применяется для сохранения крупных коллекций и в условиях лабораторий. Он отличается простотой, не требует специальной аппаратуры и обеспечивает относительно длительное сохранение жизнеспособных клеток и стабильности признаков. Впервые для сохранения культур гонококков применили вазелиновое масло в 1914 году. Принцип метода заключается в следующем: культуру микроорганизмов выращивают на благоприятной питательной среде и заливают стерильным вазелиновым маслом (слоем 0,5–1,0 см). В таких условиях в клетках замедляется скорость обменных процессов и предотвращается поверхность среды от высыхания.

Аэробные микроорганизмы выращивают в пробирках на поверхности коротко скошенной среды (под углом 45°). Микроорганизмы, растущие в анаэробных условиях, сеют уколом в столбик агаризованной питательной среды. Молочнокислые и некоторые светящиеся бактерии культивируют в

полужидкой питательной среде с 0,25–0,40 % агара. При определении срока заливки культур маслом следует учитывать способность их к образованию покоящихся форм (эндоспор, цист). Аспорогенные микроорганизмы лучше заливать маслом в начале стационарной фазы роста, спорообразующие – в стадии формирования спор, актиномицеты и мицелиальные грибы в возрасте 7–14, а дрожжевые – 12–14 суток.

Для хранения применяют высокоочищенное медицинское вазелиновое масло (плотность 0,8–0,9), которое предварительно стерилизуют в автоклаве (давление  $1 \cdot 10^4$  Па), а затем прогревают для удаления воды в сушильном шкафу при температуре не выше 150 °С или выдерживают при комнатной температуре 2–3 суток. Масло наливают не выше 1 см над верхним краем среды. Более тонкий слой масла не предохраняет среды от высыхания. Культуры микроорганизмов хранят при 5 °С или при комнатной температуре в темноте.

При пересеве избыток масла удаляют прикосновением петли к внутренней стенке пробирки. Капли масла на поверхности питательной среды снижают скорость роста культур в первом пассировании. Для определения числа жизнеспособных клеток масло оттягивают пипеткой, содержимое пробирки переносят в колбу со 100 мл стерильной водопроводной воды и делают посев на плотную агаровую среду из серии разведений.

Во время длительного хранения идет процесс отмирания клеток, поэтому чувствительные микроорганизмы, как правило, пересевают из-под масла один-два раза в год. Большинство видов дрожжевых и мицелиальных грибов пересевают один раз в год, а мицелиальные грибы – каждые два-три года.

Признаки микроорганизмов после относительно длительного хранения под маслом остаются большей частью стабильными. Но иногда хранение под маслом вызывает задержку роста микроорганизмов и снижает скорость использования ими питательных субстратов. Через два-три пассажа на питательной среде того же состава, на которой хранится культура, скорость роста и ферментативная активность восстанавливаются. У некоторых мицелиальных грибов после хранения под маслом обнаружены признаки утраты спороношения, уменьшения скорости роста, образования секторных колоний.

Хранение под маслом имеет следующие преимущества: обеспечивает длительное сохранение стабильности свойств большинства микроорганизмов; сокращает время, необходимое для приготовления сред и пересевов; из одной пробирки можно отбирать инокулят несколько раз.

К недостаткам метода следует отнести возможность инфицирования лаборатории и работающего персонала из-за разбрызгивания масла при обжигании петли. Поэтому во время работы следует соблюдать необходимые меры предосторожности. Требуется также время для очистки от масла использованной посуды.

Итак, для хранения культур микроорганизмов могут быть использованы различные методы. Некоторые микроорганизмы целесообразно хранить только в одних условиях, тогда как другие при возможности выбора нескольких

предпочтительно сохранять в условиях, обеспечивающих максимальную выживаемость. Для гарантии длительного поддержания стабильной культуры рекомендуется одновременно хранить микроорганизмы различными методами.

Для определения сохранности живых микроорганизмов различными методами общепринято использовать в качестве критерия подсчет их колоний, выросших после предварительных разведений на богатых питательных средах или только констатировать факт роста на соответствующей жидкой или плотной питательной среде. Процент выживаемости микроорганизмов определяют по отношению числа сохранившихся клеток к первоначальному числу жизнеспособных клеток (до начала хранения), принятому за 100%. Процент поврежденных клеток вычисляют по разнице между общим числом клеток на богатой питательной среде и числом клеток, выросших на синтетической («минимальной») среде определенного химического состава.

### **Контрольные вопросы**

1. Дайте характеристику метода хранения культур путем субкультивирования.
2. При каких температурах обеспечивается длительное сохранение жизнеспособности культур микроорганизмов?
2. Что такое лиофилизация культур?
3. Чем различаются методы хранения микроорганизмов в высушенном состоянии и лиофилизации?
4. Какое масло используют для сохранения культур?
5. Какие вещества обладают протекторными свойствами для клеток при замораживании?
6. Какое масло используют для хранения культур микроорганизмов?
7. Какие критерии используют для оценки жизнеспособности клеток при хранении?
8. В какой фазе роста следует закладывать на хранение аспорогенные микроорганизмы?
9. Какие недостатки имеет метод хранения под минеральным маслом?

## 4 КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ

Рост организмов в любой биологической системе может быть определен как согласованное увеличение всех химических компонентов. В микробиологии понятие роста используют в двух случаях:

1. Рост клеток – процесс увеличения биомассы (размеров, объема, массы) организма или его частей в ходе индивидуального развития, обусловленный синтезом новых веществ. Характерен для всех групп микроорганизмов про- и эукариот. Способность и темпы роста определяются, с одной стороны, природой (наследственностью) самого организма, с другой – совпадением условий обитания с потребностями микроба. Рост начинается после деления материнской клетки и состоит в последовательном увеличении количества РНК → белка → ДНК, всех параметров клетки и отдельных ее структур. Клетка быстро (мин, ч) достигает зрелости и приступает к размножению или переходит в состояние покоя. Растущие клетки отличаются от покоящихся большей базофилией цитоплазмы, более активным обменом веществ и энергии, в том числе синтезом экстрацеллюлярных биологически активных веществ, более высокой чувствительностью к повреждающим факторам внешней среды. В старых культурах появляются *инволюционные* формы клеток. Изучение роста микроорганизмов проводят на изолированных клетках.

2. Рост популяции (культуры) – увеличение числа особей в локальной популяции, вызванное их размножением, но не притоком иммигрантов из других популяций. Закономерности роста популяций, в большей степени, зависят от того, размножаются ли они в закрытой системе типа пробирки (колбы и др.) с жидкой питательной средой или в закрытой системе, в которую подается питательная среда и из которой удаляется часть микробных клеток с продуктами их обмена. Условия роста естественных популяций, особенно паразитов, близки к таковым в открытой системе, но не равноценны ей. Следует иметь в виду, что показатели массы микро-организмов и число клеток не всегда коррелируют и зависят от физиологического состояния популяции. Число клеток чаще всего подсчитывают в счетной камере с помощью микроскопа, в агаровых пластинках методом посева из серийных разведений.

Возрастание массы, однако, не обязательно связано с ростом, поскольку клетки способны просто накапливать запасные вещества, такие как гликоген или  $\beta$ -полиоксибутират. В питательной среде, к которой бактерии уже адаптированы, они находятся в состоянии сбалансированного роста и в этот период удвоение биомассы сопровождается удвоением всех других учитываемых параметров популяции (белка, РНК, ДНК и внутриклеточной воды). Культуры, растущие *сбалансированно*, сохраняют постоянный химический состав, и скорость прироста всех компонентов популяции одна и та же. Именно поэтому для определения скорости роста достаточно измерить прирост любого компонента.

Бактериальная культура, растущая сбалансированно, имитирует автокаталитическую химическую реакцию первого порядка, т.е. скорость

прироста вещества клеток в любой данный момент пропорциональна числу или массе имеющихся в это время бактерий.

Скорость прироста клеток =  $\mu$  (число или масса клеток)

Коэффициент пропорциональности  $\mu$  является *индексом скорости* роста и называется удельной скоростью роста. Поскольку рост бактерий в этом случае рассматривают сбалансированным,  $\mu$  показывает отношение прироста любого клеточного компонента к количеству этого компонента.

Размножение микроорганизмов – процесс воспроизведения себе подобных особей, обеспечивающий продолжение существования вида. Важнейшей особенностью микроорганизмов являются исключительно высокие темпы размножения в благоприятных условиях (взрывной тип размножения) и способность их очень долгое время обходиться без размножения в неблагоприятных условиях. Способы и скорость размножения обуславливаются природой (геномом) микроба и соответствием условий обитания его генетическим потребностям (источники углерода, азота, зольных элементов, ростовых факторов; достаточная для диффузии влажность, определенные показатели pH, осмотического давления). Если отсутствует одно или несколько условий, размножение прекращается, и микроорганизм гибнет или переходит в стадию покоя.

В нормальных условиях рост и размножение строго сбалансированы и последовательны. В неблагоприятных условиях возможно разобщение этих процессов, когда рост продолжается, а размножение не наступает (несбалансированный рост). Это приводит к образованию *инволюционных* форм микроорганизмов.

Выращивание культур микроорганизмов на питательных средах называется культивированием, а культивирование при определенной температуре называется *инкубированием*.

#### **4.1 Способы культивирования микроорганизмов**

Биологические продуценты – прокариоты и эукариоты – культивируют для различных целей:

1. Нарастивания биомассы, которая и представляет собой продукт биотехнологии.
2. Биосинтеза в процессе роста ценных соединений продуктов метаболизма. В этих случаях часто сама биомасса является балластом после процесса биосинтеза. Продукты часто накапливаются вне клеток или внутри. Это могут быть первичные метаболиты или вторичные метаболиты.
3. Биотрансформации – процесса, в котором под действием микроорганизмов или ферментов (чаще) происходит изменение состава исходного химического вещества.
4. Потребления микроорганизмами из жидких сред различных

веществ. Это в основном ликвидация загрязнений, микроорганизмы используются как промежуточный агент, а после процесса также выбрасываются. Эти процессы используются при очистке сточных вод.

5. Выщелачивания с помощью микроорганизмов. Это извлечение тяжелых и благородных металлов из руд и других источников.

6. Использования жизнедеятельности микроорганизмов для образования газа и создания пористых материалов. Это приготовление хлеба, шампанского, пива и т.д.

### **Классификация процессов ферментации**

По признаку **целевого** продукта процесса ферментация может быть следующих типов:

1) Ферментация, в которой целевым продуктом является биомасса микроорганизма. Такие процессы называют *культивированием* или выращиванием.

2) Целевым продуктом является не сама биомасса, а продукты биосинтеза, такие процессы называют *биосинтезом*.

3) Цель ферментации *утилизация* определенных компонентов исходной среды (биоокисление, биометаногенез, биокомпостирование, биodeградация). Исходную среду называют *субстрат*.

Классификация **по основной фазе**, в которой протекает процесс ферментации.

1) Поверхностная (твердофазная) ферментация (культивирование) на поверхности агаровых сред, твердых субстратов (производство сыра, колбасы, биокомпостирование).

2) Глубинная (жидкофазная) ферментация, где биомасса микроорганизмов суспендирована в жидкой питательной среде, через которую при необходимости подается воздух или другие газы.

3) Газофазная ферментация, в которой процесс протекает на твердом носителе, где закрепляются микроорганизмы но сами частицы носителя взвешены в потоке газа, насыщенном аэрозолем питательной среды.

По **отношению к кислороду** различают аэробную, анаэробную и факультативно-анаэробную ферментацию.

По **отношению к свету** – световая (фототрофная) и темновая (хемотрофная) ферментация.

По **степени защищенности микроорганизмов-продуцентов** от посторонних микроорганизмов – асептическая, условно-асептическая и неасептическая ферментация.

По **числу видов микроорганизмов** различают ферментации на основе монокультуры (или чистой культуры) и смешанной, в которой культивируют две или более культуры.

По способу организации процессы ферментации могут быть

1) Периодические; период ферментации любой.

2) Непрерывные;

3) Многоциклические;

В основном напоминают периодические, но при выгрузке продукта в аппарате оставляют часть ферментационной жидкости, содержащей посевной материал.

4) Отъёмно-доливные;

В процессах ферментации в промежутках между загрузкой и разгрузкой аппарата протекает как периодическая, но после некоторого времени часть ферментационной среды отделяют и добавляют свежей питательной средой. Но отбирают меньше ферментационной жидкости, чем в моноциклическом. Эффект лучше по утилизации субстрата.

5) Периодические с подпиткой субстрата;

При такой ферментации часть среды загружается в начале ферментации, а другая добавляется непрерывно по мере протекания процесса. естественным завершением процесса является переполнение аппарата.

б) Полунепрерывные с подпиткой субстрата.

В этой ферментации происходит сочетание отъёмно-доливных и подпиточных. После достижения определенных состояний биологического агента происходит отбор части ферментационной жидкости из аппарата, а потом делают постепенное добавление нового субстрата. Эффект очень высокий.

Преимущества жидкофазного культивирования перед твердофазным культивированием: 1) является более удобной моделью для изучения пищевых потребностей за счет возможности введения в среду широкого спектра питательных веществ и варьирования их концентраций; 2) полученная биомасса чистой культуры используется в дальнейшей работе по изучению биохимического состава и биологических свойств; 3) культуральная жидкость, которая получена после поверхностного или глубинного культивирования, в которой развивался продуцент и которая содержит продукты его жизнедеятельности, может служить дополнительным источником биологически активных веществ.

Биомассу можно выращивать на жидких средах поверхностно, т.е. в стационарной культуре (в этом случае продуцент образует в поверхностном слое жидкости более или менее плотную пленку), и погруженно, т.е. в жидкости. К недостаткам стационарного культивирования относятся неблагоприятные и неодинаковые условия развития клеток или мицелия. Обычно биомасса растет при стационарном культивировании гораздо медленнее, чем при погруженном, однако, бывают исключения из этого правила. Условия погруженного культивирования более благоприятны для роста биомассы, и оно имеет ряд преимуществ перед стационарным. Так, механическое перемешивание и непрерывная аэрация способствуют доступу питательных веществ и кислорода ко всем клеткам, обеспечивая одинаково благоприятные условия для роста и накопления продуктов метаболизма. Но, в то же время, эффективность биотехнологического процесса, базирующегося на погруженном (глубинном) культивировании, определяется преимущественно технологическими характеристиками жидкой питательной среды, а также качеством и количеством источников углеродного и азотного питания, т.е. требует строго определенных условий, соответствующих физиологическим потребностям микроорганизмов.

Однако повышенная аэрация может подавлять, например, активность некоторых ферментов.

Мицелиальные грибы при росте в жидкой питательной среде в погруженных условиях не образуют пленку, и их мицелий не дифференцируется на субстратный и воздушный, а растет в виде аморфных микроколоний, иногда образует сферические микроколонии правильной и неправильной формы диаметром от 0,5 до 5,0 мм (рисунок 22).



**Рисунок 22 – Рост мицелия гриба в виде глубинных колоний**

Известно несколько вариантов культивирования мицелиальных грибов в глубинных биотехнологических системах:

1. Культивирование в колбах и сосудах, встряхиваемых на поступательных или вращательных качалках.

2. Культивирование в сосудах разной емкости с барботажем через среду воздуха без дополнительного механического перемешивания среды.

3. Культивирование с перемешиванием среды и барботажем через нее воздуха.

*Твердофазное культивирование* – биотехнологический процесс, протекающий в массе измельченного и влажного твердого субстрата. Субстрат может иметь различную форму и размеры частиц. Он должен содержать доступные питательные вещества для роста микроорганизмов: целлюлозу, крахмал, сахара в качестве источников углерода; аммиак, мочевины, белки в качестве источников азота и минеральные соли. Субстрат может полностью или частично использоваться грибом. По своим физическим свойствам субстрат может быть практически нерастворимым в воде (например, опилки), набухать в ней, принимать гелеобразное состояние или даже частично растворяться (например, крахмал) ().

Независимо от конкретного варианта твердофазного культивирования субстрат должен обладать достаточной влажностью. Влага может пропитывать частицы или образовывать пленку на их поверхности. Водные пленки могут быть различными в зависимости от свойств субстрата и потребностей используемого продуцента, и, следовательно, соотношение объемов твердой, водной и воздушной фаз может варьировать.

Преимуществами твердофазного культивирования перед жидкофазным можно считать следующие: 1) отдельные микробиологические процессы протекают в условиях твердофазной ферментации намного интенсивнее, чем в погруженной культуре; 2) твердофазные процессы менее энергоемки, трудоемки, материалоемки; 3) из-за низкого содержания воды в ферментируемой массе твердофазное культивирование более рационально использует рабочее пространство; 4) уменьшение или полное исключение капитальных производственных затрат, связанных с перемешиванием в ферментере для лучшей аэрации среды; 5) более низкая стоимость при извлечении и высушивании конечного продукта; 6) более приближенные к естественным условиям для роста лигнинразрушающих грибов.

К недостаткам твердофазного культивирования следует отнести следующие: 1) большая часть микробиологических процессов в условиях твердофазного культивирования протекает медленнее; 2) контроль основных параметров ферментации (рН, концентрация биомассы и других параметров) сложнее или вообще невозможен из-за отсутствия водной фазы и гетерогенности среды.

В настоящее время мировой практике известны несколько технологических вариантов твердофазной ферментации, направленных на промышленное получение, синтезируемых микроорганизмами ферментов, биологически активных веществ, антибиотиков и обогащенных белком кормовых препаратов. Существуют следующие технологические варианты твердофазной ферментации: 1) твердофазная ферментация в перемешиваемом слое; 2) твердофазная ферментация в аэрируемом слое; 3) перемешиваемая глубинная твердофазная ферментация; 4) псевдожидкая культура; 5) поверхностная твердофазная ферментация (Стахеев и др., 1991).

Последний вариант твердофазной ферментации самый простой. Он исключает специальную принудительную аэрацию массы субстрата или его перемешивание. В качестве микроорганизмов продуцентов в поверхностной твердофазной ферментации, как правило, используются грибы. Их развитие происходит в тонком (3-5 см) поверхностном слое субстрата. Этот метод ферментации применяется в развивающихся странах для биосинтеза различных ферментов, которые затем экстрагируются из твердой фазы.

*Комбинированный способ культивирования* состоит из двух этапов: наращивают биомассу глубинным способом, затем культуральную жидкость (с выросшей биомассой) разливают в стерильные кюветы (чашки Петри) и продолжают культивирование в поверхностных условиях. В этих условиях у мицелиальных грибов образуются воздушный мицелий и органы бесполого размножения – конидии.

## 4.2 Оптимизация процессов культивирования по плану полного факторного эксперимента

Для управления биотехнологическими процессами в целях получения биомассы или метаболитов из продуцентов необходимо создание оптимальных условий их культивирования. Для чего необходимо использовать элементы теории планирования эксперимента.

Математическая теория эксперимента определяет условия оптимального проведения исследования, в том числе и при неполном знании физической сущности явления. Для этого используются математические методы при подготовке и проведении опытов, что позволяет исследовать или оптимизировать процессы, обеспечивать высокую эффективность эксперимента и точность определения исследуемых факторов. Обеспечивается также эффективное управление экспериментом при неполном знании механизмов явления.

Эксперименты обычно ставятся небольшими сериями по заранее согласованному алгоритму. После каждой небольшой серии опытов производится обработка результатов наблюдений и принимается строго обоснованное решение о том, что делать дальше. При использовании методов математического планирования эксперимента возможно: решать различные вопросы, связанные с изучением сложных процессов и явлений; проводить эксперимент с целью адаптации технологического процесса к изменяющимся оптимальным условиям его протекания и обеспечивать, таким образом, высокую эффективность его осуществления.

Теория математического эксперимента содержит ряд концепций рандомизации, последовательности эксперимента, математического моделирования, оптимального использования факторного пространства и ряд других.

Принцип рандомизации заключается в том, что в план эксперимента вводят элемент случайности. Для этого план эксперимента составляется таким образом, чтобы те систематические факторы, которые трудно поддаются контролю, учитывались статистически и затем исключались в исследованиях как систематические ошибки.

При последовательном проведении эксперимент выполняется не одновременно, а поэтапно, с тем, чтобы результаты каждого этапа анализировать и принимать решение о целесообразности проведения дальнейших исследований. В результате эксперимента получают уравнение регрессии, которое называют моделью процесса. Для конкретных случаев математическая модель создается исходя из целевой направленности процесса и задач исследования, с учетом требуемой точности решения достоверности исходных данных, что обычно производится по критерию Фишера. Так как степень полинома, адекватно описывающего процесс, предсказать невозможно, то сначала пытаются описать явление линейной моделью, а затем, если она неадекватна, повышают степень полинома, т.е. проводят эксперимент поэтапно.

Важное место в теории планирования эксперимента занимают вопросы оптимизации исследуемых процессов, свойств многокомпонентных систем или

других объектов. Как правило, нельзя найти такое сочетание значений влияющих факторов, при котором одновременно достигается экстремум всех функций отклика. Поэтому в большинстве случаев за критерий оптимальности выбирают лишь одну из переменных состояния – функцию отклика, характеризующую процесс, а остальные принимают приемлемыми.

Оптимальные условия обеспечиваются различными факторами, такими как состав и концентрация питательных субстратов, температура, pH, аэрация и др. Параметры каждого фактора для создания оптимальных условий подбираются, с одной стороны, эмпирически, а с другой – методами планирования эксперимента. Безусловно, планирование эксперимента обеспечивает более быстрое достижение желаемого результата. Одним из методов планирования при проведении экспериментальных исследований в области биотехнологии является полный факторный эксперимент.

Сущность факторного эксперимента первого порядка состоит в одновременном варьировании всех факторов при его проведении по определенному плану, представлении математической модели (функции отклика) в виде линейного полинома и исследовании последнего методами математической статистики. Для проведения исследований и анализа полученных результатов введем несколько определений.

*Уровнем фактора* называют определенное значение фактора, которое будет фиксироваться при проведении эксперимента. Предположим, что объектом исследования является ферментер, в котором выход продукта (биомассы микроорганизма)  $Y$  зависит от температуры ( $X_1$ ) и концентрации питательных веществ ( $X_2$ ). Дополнительно известно, что изменение температуры от 20 до 40 °С и концентрации питательных веществ от 10 до 20 % изменяет выход продукта. Обозначим минимальные и максимальные значения факторов  $X_1$  и  $X_2$  символами +1 и -1. Тогда все возможные комбинации факторов варьирования на двух уровнях (минимальном и максимальном) будут определены четырьмя опытами. Такой план эксперимента принято записывать в виде матрицы планирования (таблица 3).

В первой графе таблицы приводятся порядковые номера экспериментов, включающих все варианты, в которых каждый фактор сочетается с другими в определенной последовательности.

Таблица 3 – Матрица планирования эксперимента для двух факторов на двух уровнях

Номер эксперимента	$X_0$	Планирование		Переменная состояния, $Y$
		$X_1$	$X_2$	
1	+1	+1	+1	$Y_1$
2	+1	-1	+1	$Y_2$
3	+1	+1	-1	$Y_3$
4	+1	-1	-1	$Y_4$

Во второй графе таблицы приведены значения фиктивной переменной  $X_0$  (тождественно равной +1), которая понадобится при вычислении свободного члена полинома. В первой строке таблицы спланирован первый опыт, когда факторам  $X_1$  и  $X_2$  придают максимальные значения, во второй строке – когда фактору  $X_1$  придают минимальное значение, а фактору  $X_2$  придают максимальное значение, и т.д. Подобное планирование имеет ряд достоинств и поэтому широко применяется для получения моделей. Пользуясь планом проведения эксперимента – таблица 3, можно после проведения эксперимента определить коэффициенты линейного уравнения регрессии:

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 \quad (1)$$

Уровнем факторов можно назвать и средние значения рассматриваемых интервалов для факторов: температура и концентрация питательных веществ, т.е. 30 °С и 15 %. Эти значения факторов называются нулевыми уровнями, они определяют некоторую точку факторного пространства, которая в предварительном эксперименте была оценена наилучшей по максимуму или по минимуму переменной состояния.

Обозначим нулевой уровень  $i$ -ого фактора, выраженного в натуральных единицах (в данном случае в градусах Цельсия или процентах), через  $X_{i0}$  и введём еще одно понятие – интервал варьирования. Это такое значение фактора в натуральных единицах, прибавление которого к нулевому уровню дает верхний, а вычитание – нижний уровень фактора. Обозначим его  $\Delta X_i$ .

Экстремальные значения, которые могут принимать факторы, не изменяя своих физико-химических свойств и не искажая сути исследуемого процесса, называют границами существования изучаемых факторов, а интервал ( $X_{i\max} - X_{i\min}$ ) – *областью определения факторов*. Очевидно, что интервал варьирования факторов должен составлять часть области определения факторов, если решается задача оптимизации. Это необходимо для того, чтобы осуществить движение к оптимуму в области определения факторов. В задачах аппроксимации (или интерполяции) интервал варьирования охватывает всю описываемую область таким образом, что для двухфакторной задачи верхними уровнями факторов являются  $X_{1\max}$  и  $X_{2\max}$ , а нижними уровнями –  $X_{1\min}$  и  $X_{2\min}$ . Эту область можно назвать интерполяционной, а область *определения факторов* – областью постановки экстремального эксперимента (М).

Из определений следует, что областей М может быть несколько (в общем случае конечное множество). Можно также предположить несколько областей оптимума. Область определения факторов для данной задачи одна. Обозначение верхних и нижних уровней факторов символами «+1» и «-1» фактически соответствует кодированию факторов по формуле:

$$X_i = \frac{X_i - X_{i0}}{\Delta X_i} \quad (2)$$

Кодирование факторов означает переход от системы координат в натуральных единицах к системе координат в кодированной форме. Каждая точка факторного пространства – это опыт в исследованиях.

В общем случае эксперимент, в котором реализуются все возможные сочетания уровней факторов, называется полным факторным экспериментом (ПФЭ). Если каждый фактор варьируется на двух уровнях, то получается ПФЭ типа  $2^n$ . Для двух факторов ( $n=2$ ) число опытов  $N = 2^2 = 4$ . Можно осуществлять планирование на трех уровнях (верхний, средний, нижний), тогда ПФЭ будет типа  $3^n$  и для  $n=2$  общее число опытов будет  $N = 3^2 = 9$ .

*Выбор уровней и интервалов варьирования факторов.* Этот этап по планированию экспериментов можно выделить как этап принятия решений перед составлением плана эксперимента. Действительно, построение плана эксперимента начинают с выбора определяющих его характеристик. Первой рассматривают область определения факторов, которая, как правило, фиксируется в предварительном эксперименте. Для этого используют результаты опытов и теоретические представления о процессе.

Далее из области определения факторов выбором нулевых уровней интервалов варьирования факторов выделяется часть области для планирования эксперимента. Правильный выбор нулевых уровней (центра эксперимента) и интервалов варьирования факторов имеет решающее значение для действенности математической модели.

Идеальным случаем при выборе нулевых уровней факторов является «попадание» центра эксперимента в область оптимальных значений переменной состояния. Основное требование к интервалу варьирования состоит в том, чтобы он превышал удвоенную квадратичную ошибку фактора:

$$2S_{xi} < \Delta X_i < (X_{imax} - X_{imin}), \quad (3)$$

где  $S_{xi}$  – среднеквадратическое отклонение факторов  $X_i$ ;  $\Delta X_i$  – интервал варьирования;  $(X_{imax} - X_{imin})$  – область определения фактора.

Это требование связано с тем, что интервал между двумя соседними уровнями должен значимо (неслучайно) влиять на переменную состояния. Обычно интервал варьирования выбирается на основании априорной информации (или интуитивно) и затем уточняется после получения математической модели. Определенные сведения о нулевых уровнях и интервалах варьирования удастся получить на этапе предварительного эксперимента.

*Построение матрицы планирования.* План, содержащий запись всех комбинаций факторов или их части в кодированной форме, называется матрицей планирования. В таблице 3 приводится матрица планирования для двух факторов на двух уровнях. Для построения матрицы планирования с большим числом факторов используют ряд приемов. Первый из них состоит в том, что элементарное сочетание первого фактора (+1, -1) повторяется для

каждого следующего фактора на верхнем и нижнем уровнях. Столбец  $X_0$  – это столбец значений фиктивной переменной. Доказано, что его участие в матрице планирования делает расчеты коэффициентов математической модели более общими. Иногда указанный прием построения матрицы планирования трактуется как прием чередования знаков. В первом столбце знаки не меняются, во втором – меняются поочередно, в третьем - они чередуются через два, в четвертом – через четыре и т.д. по показателям степени двойки.

Рассмотренные матрицы планирования обладают такими свойствами, которые позволяют считать, что их построение выполнялось оптимально с точки зрения получаемой по результатам реализации матрицы планирования математической модели. Если модель получаем в виде уравнения регрессии, то коэффициенты должны быть наилучшими и точность предсказания значений переменной состояния одинакова в любом направлении факторного пространства. Эти требования формулируются как условия *ортогональности* и *рототабельности*. Условие ортогональности предполагает равенство нулю суммы почленных произведений любых двух столбцов матрицы:

$$\sum_{u=1}^N X_{iu} X_{ju} = 0 \quad (4)$$

*Рототабельность* предполагает равенство и минимальность дисперсий предсказанных значений переменной состояния для всех точек факторного пространства.

*Основное преимущество факторного эксперимента* заключается в том, что в эксперименте варьируются одновременно все факторы. Это приводит к тому, что дисперсия в оценке коэффициентов регрессии оказывается в  $N$  раз меньше ошибки опыта. При классическом подходе эксперименты ставятся в определенной последовательности: все факторы фиксируются на некотором уровне, а один переводят на другой уровень. Затем это повторяют для другого фактора и в оценке каждого из коэффициентов участвует только какая-то часть опытов. К достоинствам полного факторного эксперимента следует также отнести:

- независимость дисперсии переменной состояния от вращения системы координат в центре плана;
- одинаковую и минимальную дисперсию коэффициентов регрессии;
- независимость определения коэффициентов регрессии друг от друга;
- простоту в вычислениях коэффициентов.

Организация матриц планирования при различном числе факторов от типа ПФЭ  $2^2$  до ПФЭ  $2^5$  в эксперименте приведена в таблице 4.

Таблица 4 – Организация матриц планирования типа ПФЭ от  $2^2$  до  $2^5$

№	Тип эксперимента			Факторы					
				$X_0$	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$X_4$	$X_5$
1	ПФЭ $2^5$	ПФЭ $2^3$	ПФЭ $2^2$	+1	+1	+1	+1	+1	+1
2				+1	-1	+1	+1	+1	+1
3				+1	+1	-1	+1	+1	+1
4				+1	-1	-1	+1	+1	+1
5			+1	+1	+1	-1	+1	+1	
6			+1	-1	+1	-1	+1	+1	
7			+1	+1	-1	-1	+1	+1	
8			+1	-1	-1	-1	+1	+1	
9		ПФЭ $2^4$		+1	+1	+1	+1	-1	+1
10				+1	-1	+1	+1	-1	+1
11				+1	+1	-1	+1	-1	+1
12				+1	-1	-1	+1	-1	+1
13				+1	+1	+1	-1	-1	+1
14				+1	-1	+1	-1	-1	+1
15				+1	+1	-1	-1	-1	+1
16				+1	-1	-1	-1	-1	+1
17				+1	+1	+1	+1	+1	-1
18				+1	-1	+1	+1	+1	-1
19				+1	+1	-1	+1	+1	-1
20				+1	-1	-1	+1	+1	-1
21				+1	+1	+1	-1	+1	-1
22				+1	-1	+1	-1	+1	-1
23				+1	+1	-1	-1	+1	-1
24				+1	-1	-1	-1	+1	-1
25				+1	+1	+1	+1	-1	-1
26				+1	-1	+1	+1	-1	-1
27				+1	+1	-1	+1	-1	-1
28				+1	-1	-1	+1	-1	-1
29				+1	+1	+1	-1	-1	-1
30				+1	-1	+1	-1	-1	-1
31				+1	+1	-1	-1	-1	-1
32				+1	-1	-1	-1	-1	-1

*Реализация матрицы планирования.* После построения матрицы планирования приступают непосредственно к эксперименту. Обычно матрицу планирования представляют в виде, удобном для реализации опытов – все кодированные значения факторов заменяют натуральными. Такую матрицу

планирования называют рабочей. В рабочую матрицу переменных заносят время проведения опытов, значения ограничительных переменных и некоторые временные изменения в анализируемых пробах. Поскольку на изменение выходной переменной влияют помехи, план чаще всего реализуют несколько раз, получая  $m$  параллельных значений.

Алгоритм расчета полного факторного эксперимента типа  $2^n$ . В матрицу планирования экспериментов включают параллельные опыты. Если априорные сведения предполагают невысокую воспроизводимость результатов, далее проводят расчет коэффициентов уравнения регрессии по формуле:

$$b_i = \frac{1}{N} \sum_{u=1}^N X_{iu} Y_u \quad (i = 1, 2, \dots, n), \quad (5)$$

$$Y_u = \frac{1}{m} \sum_{k=1}^m Y_{uk}, \quad (6)$$

где  $Y_u$  – среднее значение по параллельным опытам  $u$ -й строки матрицы планирования.

Объединив формулы (5) и (6), можно вычислять коэффициенты регрессии:

$$b_i = \frac{1}{Nm} \sum_{u=1}^N \sum_{k=1}^m X_{iu} Y_{uk} \quad (7)$$

Далее рассчитывают ошибку опыта (дисперсию воспроизводимости). Для этого вычисляют построчные дисперсии по формуле:

$$S_u^2 = \frac{1}{m-1} \sum_{k=1}^m (Y_{uk} - Y_u)^2, \quad (8)$$

Однородность дисперсий  $S_u^2$  проверяют по критерию Кохрена:

$$G_p = \frac{S_{u \max}^2}{N \sum_{u=1}^N S_u^2}, \quad (9)$$

где  $S_{u \max}^2$  - максимальная из рассчитанных построчных дисперсий;

$N \sum_{u=1}^N S_u^2$  - сумма всех дисперсий по  $N$  строкам.

Если выполняется условие  $G_p < G_t$ , то гипотеза об однородности дисперсий принимается.  $G_t$  находят по таблицам для чисел степеней свободы  $f_1 = m - 1$  и  $f_2 = N$  и уровня значимости  $q$ . В технических и биологических расчетах принимается 5 % уровень значимости  $q = 0,05$ .

Построчные дисперсии усредняют по формуле:

$$S^2_o = \frac{1}{N(m-1)} \sum_{u=1}^N \sum_{k=1}^m (Y_{uk} - Y_u)^2, \quad (10)$$

где  $N(m-1) = f_0$  – число степеней свободы.

Таким образом получают ошибку опыта.

*Проверка значимости коэффициентов регрессии.* Очевидно, что один фактор влияет на переменную состояния больше, а другой – меньше. Для чего проводят оценку значимости коэффициентов регрессии двумя способами. В обоих случаях сначала находят дисперсию коэффициентов регрессии по формуле:

$$S^2_{bi} = \frac{S^2_o}{N} \quad (11)$$

т.е. дисперсии всех коэффициентов равны, поскольку зависят только от ошибки опыта  $S^2_o$  и числа строк матрицы планирования  $N$ .

По первому способу оценку значимости коэффициентов осуществляют по формуле:

$$t_{ip} = \frac{|b_i|}{S_{bi}} \quad \text{и} \quad \text{условию} \quad t_{ip} > t_t, \quad (12)$$

где  $|b_i|$  – абсолютное значение  $i$ -того коэффициента регрессии;

$t_t$  – табличное значение критерия Стьюдента, которое находят по числу степеней свободы  $f_0 = N(m-1)$  и уровню значимости  $q$ ;

$S_{bi}$  – среднеквадратичное отклонение  $b_i$ .

По второму способу для проверки значимости коэффициентов регрессии используют доверительный интервал  $\Delta b_i$ , который вследствие равенства  $S^2_{bi}$  для всех коэффициентов регрессии одинаков для всех  $b_i$ . Тогда значимость коэффициентов оценивают, сравнивая абсолютные значения коэффициента и доверительного интервала:

$$|b_i| > \Delta b_i. \quad (13)$$

Если выполняются оба условия (12) и (13), то  $i$ -й коэффициент признается значимым.

*Проверка адекватности линейного уравнения регрессии.* Для оценки пригодности линейного уравнения регрессии для решения задачи поиска оптимума сравниваются две дисперсии – одна показывает рассеяние средних опытных данных переменной состояния  $Y_u$  относительно тех значений переменной состояния  $Y_u$ , которые предсказаны полученным линейным уравнением регрессии. Эта дисперсия называется дисперсией адекватности и рассчитывается по формуле:

$$S^2_{ad} = \frac{m}{N-l} \sum_{u=1}^N (Y_u - \bar{Y}_u)^2, \quad (14)$$

где  $m$  – число параллельных опытов;  
 $N$  – число строк матрицы планирования;  
 $l$  – число членов в уравнении регрессии, оставшихся после оценки значимости.

Вторая дисперсия – это ошибка опыта. Адекватность проверяют, оценивая отношение:

$$F_p = \frac{S^2_{ad}}{S^2_0} \quad (15)$$

по критерию Фишера

$$F_p < F_t \quad (16)$$

для степеней свободы  $f_{ad} = N - l$ ,  $f_0 = N(m - 1)$  и заданного уровня значимости  $q$ .

Если выполняется условие (16), то линейное уравнение регрессии признается адекватным, т.е. рассеяние экспериментальных данных переменной состояния относительно уравнения регрессии того же порядка, что и рассеяние, вызванное случайными изменениями в объекте исследования (ошибка опыта).

#### 4.3 Оптимизация процесса роста биомассы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*

Дрожжи этого вида культивируют для получения биомассы, используемой в процессах хлебопечения, получения спирта, в пивоварении. Морфология клеток продуцентов представлена на рисунке 23.



Рисунок 23 – Почкующаяся клетка *Saccharomyces cerevisiae*

Для оптимизации процесса необходимо оценить влияние температуры, концентрации сахарозы и скорости перемешивания культуры в питательной среде на численность популяции и биомассу клеток *Saccharomyces cerevisiae*. Исследования оптимизации процесса накопления биомассы *Saccharomyces cerevisiae* проводят по плану полного факторного эксперимента типа  $2^3$ .

Для культивирования дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* пользуются синтетической средой следующего состава (в объемных процентах):

сахароза .....	15,0
пептон .....	0,5
$\text{KH}_2\text{PO}_4$ .....	0,3
$\text{MgSO}_4$ .....	0,1

Среду разливают по 50 мл в плоскодонные колбы емкостью 150-200 мл. Производят посев культурой *Saccharomyces cerevisiae* из расчета  $10^4$  кое · мл<sup>-1</sup>. Посевы инкубируют на качалке в течение 48–72 часов при температуре 25–27 °С. Количество клеток *Saccharomyces cerevisiae* в суспензии определяют каждые 12 ч.

*Определение количества клеток микроорганизмов и биомассы на фотоэлектроколориметре.*

Рост микроорганизмов выражают в показаниях фотоэлектроколориметра (ФЭК). Для этого строят кривую зависимости показаний ФЭК от числа клеток или их биомассы. По этой кривой, предварительно измерив светорассеяние, определяют содержание клеток или вес сухой биомассы в единице объема среды.

Для построения калибровочной кривой измеряют величину светорассеяния суспензий различной плотности. В каждой из суспензий определяют количество клеток/мл, используя камеру Горяева, или вес сухой биомассы в г/л (г/100 мл) питательной среды.

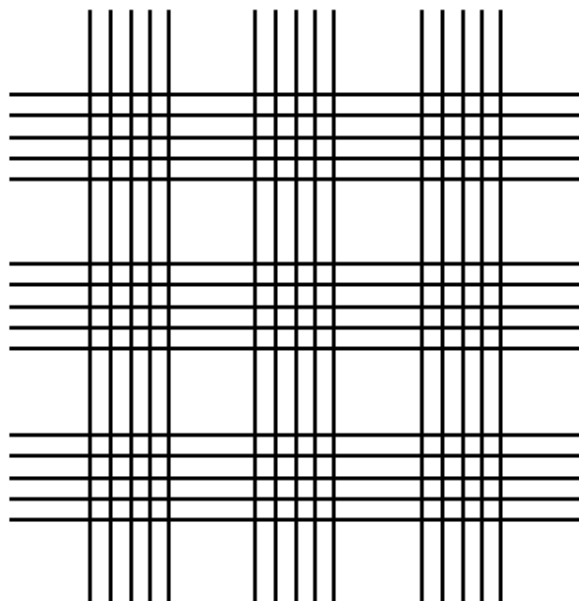
Подсчет микроорганизмов в камере Горяева возможен только для клеток с крупными размерами, позволяющими применять для микроскопирования оптические системы со сравнительно малым увеличением. Этот метод удобен для счета дрожжей, крупных бактерий и спор грибов.

Счетная камера Горяева представляет собой толстостенное предметное стекло, в центре которого находится стеклянная пластинка с выгравированной на ней сеткой. По обе стороны пластинки расположена другая пластинка на 0,1 мм выше первой (рисунок 22).

После нанесения на пластинку с сеткой капли исследуемой жидкости к боковой пластинке притирается покровное стекло. Пространство, заключенное между покровным стеклом и пластинкой с сеткой, представляет собой камеру глубиной 0,1 мм. Дном камеры является пластинка с сеткой, имеющей ряд больших квадратов площадью  $1/400$  мм<sup>2</sup>. Объем малого квадрата –  $1/400$  мм<sup>3</sup>, большого –  $16/400 = 1/250$  мм<sup>3</sup>.

Счет клеток производят следующим образом: подсчитывают все клетки, находящиеся внутри большого квадрата и на пограничных линиях. Если клетки

пересекаются пограничной линией пополам, считают только на двух смежных сторонах квадрата, например, нижней и левой.



**Рисунок 22 – Сетка камеры Горяева**

Рекомендуется клетки подсчитывать в десяти больших квадратах, в каждой капле, с пятикратной повторностью, т.е. в 50 больших квадратах. Объем 50 больших квадратов составляет  $1/5 \text{ мм}^3$ . Общее число клеток рассчитывают следующим образом. Допустим, что в 50 больших квадратах ( $1/5 \text{ мм}^3$ ) было подсчитано 530 клеток. Тогда в  $1 \text{ мм}^3$  будет равно  $530 \times 5 = 2650$  клеток, а в 1 мл –  $2650 \times 1000 = 2\,650\,000$  клеток. Слишком густые суспензии считать затруднительно, их следует разбавлять водой. Лучше пользоваться разведениями, при которых количество клеток в одном большом квадрате не превысит 16.

На основании полученных данных строят калибровочную кривую на миллиметровой бумаге, откладывая на оси ординат показания ФЭК, а на оси абсцисс – количество клеток, содержащихся в 1 мл среды, или вес сухой биомассы в 1 г/л. На графике указывают номер светофильтра, рабочее расстояние кюветы, дату построения графика и для какой культуры он составлен.

Количество клеток (или биомассу) определяют по калибровочному графику. Измерив величину светорассеяния анализируемой суспензии, находят на оси ординат точку, соответствующую данному значению. Через нее проводят линию, параллельную оси абсцисс до пересечения с калибровочной кривой, и из точки пересечения опускают на ось абсцисс перпендикуляр. По точке пересечения определяют количество клеток (или биомассу) в анализируемой пробе.

Исследования проводят по плану полного факторного эксперимента первого порядка ПФЭ  $2^3 = 8$ . В таблице 5 приведена матрица планирования ПФЭ типа  $2^3$  в кодированной форме.

Таблица 5 – Матрица планирования ПФЭ типа  $2^3$  в кодированной форме

Опыт	$X_0$	Факторы			Величина $Y$
		$X_1$	$X_2$	$X_3$	
1	+	+	+	+	
2	+	-	+	+	
3	+	+	-	+	
4	+	-	-	+	
5	+	+	+	-	
6	+	-	+	-	
7	+	+	-	-	
8	+	-	-	-	

В качестве факторов выбраны температура ( $X_1$ ), концентрация сахарозы ( $X_2$ ) и скорость перемешивания культуры ( $X_3$ ).

**Фактор  $X_1$ ,** температура. Центр плана – 27 °С. Шаг варьирования – 2 °С.

**Фактор  $X_2$ ,** концентрация сахарозы. Центр плана – 20 г/100 мл. Шаг варьирования – 5 г/мл.

**Фактор  $X_3$ ,** скорость перемешивания культуры. Центр плана – 250 об/мин. Шаг варьирования – 50 об/мин.

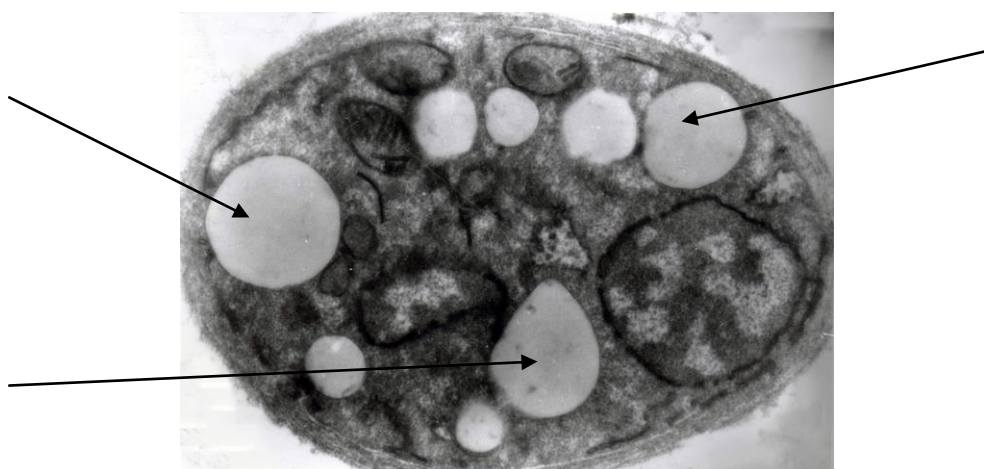
Предельные значения факторов (верхний и нижний уровни) следующие: температура – 25 и 29 °С; концентрация сахарозы – 15 и 25 объемных процента; скорость перемешивания – 200 и 300 об/мин. Эксперименты в каждом варианте ставят не менее, чем в трех повторностях. В таблице 6 приведена матрица реализации факторного эксперимента типа  $2^3$ .

Таблица 6 – Матрица реализации факторного эксперимента типа  $2^3$

Номер эксперимента	Факторы			Величина $Y$
	$X_1$	$X_2$	$X_3$	
1	29	25	300	
2	25	25	300	
3	29	15	300	
4	25	15	300	
5	29	25	200	
6	25	25	200	
7	29	15	200	
8	25	15	200	

#### 4.4 Оптимизация процесса роста и липидообразования мицелиальными грибами *Cunninghamella japonica*

Для оптимизации процесса необходимо оценить влияние температуры, культивирования, концентрации фосфатов и скорости перемешивания культуры на рост и липидообразование у мицелиальных (аскомицетов и мукоровых) грибов. Мукоровые грибы в частности гетероталличный гриб семейства *Choanephoraceae* – *Cunninghamella japonica*, рассматриваются в качестве перспективного штамма для получения липидов олеинового типа (в составе его липидов содержится более 50 % олеиновой кислоты). Морфология клеток сверхпродуцента липидов – гриба *C. japonica* представлена на рисунке 23.



**Рисунок 23 – Срез мицелия мукорового гриба *Cunninghamella japonica*: стрелками указаны липидные включения**

Для проведения эксперимента посевной материал (споры) грибов выращивают в пробирках в течение 10–12 суток на агаризованной среде Чапека. Исследования оптимизации процесса накопления биомассы гриба *Cunninghamella japonica* проводят по плану полного факторного эксперимента типа  $2^3$ .

Опыты проводят в колбах объемом 250 мл, куда помещают 50 мл жидкой среды Чапека и вносят посевной материал. Предварительно рассчитывают необходимое для эксперимента количество колб, так как для каждого измерения требуется 2–3 колбы.

Состав среды Чапека (%):

$\text{KH}_2\text{PO}_4$	.....	0,5
$\text{NaCl}$	.....	0,5
$\text{MgSO}_4$	.....	0,5
$\text{KNO}_3$	.....	1,0
$\text{CaCO}_3$	.....	1,0
$\text{FeSO}_4$	.....	0,01
Глюкоза	.....	3,0

Вода – водопроводная, рН 7,0

Культивирование гриба проводят на качалках, вращающихся с различной скоростью. Посевы инкубируют на качалках в течение 48–72 ч при температуре 25–28 °С. Биомассу гриба и содержание в ней липидов определяют через каждые 24 ч культивирования микроорганизма. Перед проведением эксперимента биомассу отделяют от культуральной жидкости, взвешивают и далее отбирают навески для определения содержания сухой биомассы и количества в ней липидов.

*Определение сухой биомассы гриба.*

Порядок выполнения работы. Навеску биомассы гриба около 0,5 г (с точностью до 0,001 г) помещают в предварительно высушенную до постоянной массы и взвешенную бюксу. Высушивание мицелия гриба производят в термошкафу при температуре 105 °С до постоянного веса. Первое взвешивание бюкса с навеской производят через 1 ч сушки, повторные – через каждые 30 мин сушки. Каждый раз перед взвешиванием бюкс охлаждают в эксикаторе в течение 15 минут. Бюксу с навеской высушивают до постоянного веса.

Сухую биомассу (А г/л) гриба определяют по формуле:

$$A = \frac{V \times M_2}{M_1}, \quad (17)$$

где А – сухая биомасса гриба;  
В – сырая биомасса гриба;  
M<sub>1</sub> – сырая навеска биомассы гриба, г;  
M<sub>2</sub> – сухая навеска биомассы гриба, г.

*Определение содержания общих липидов в биомассе гриба.*

Порядок выполнения работы. Для анализа можно использовать навеску гриба, оставшуюся после определения сухой биомассы. Навеску растирают, количественно переносят в бумажную гильзу и помещают в экстрактор, в качестве которого можно использовать аппарат Сокслета.

Для проведения испытаний в приемную колбу, высушенную до постоянного веса, наливают на 2/3 объема растворитель, присоединяют её к экстрактору и помещают в водяную баню. Пускают воду в холодильник и подогревают баню до 50–55 °С. Кипение растворителя не должно быть бурным во избежание потерь. Образующиеся пары растворителя поступают в экстрактор, затем в холодильник и по каплям стекают в экстрактор. Когда уровень эфира в экстракторе становится выше верхнего колена сифона, растворитель стекает в колбу и процесс повторяется. Навеску экстрагируют 6 ч с таким расчетом, чтобы в течение одного часа происходило 5–6 сливов растворителя. Когда процесс экстрагирования закончен, растворитель из приемной колбы отгоняют на водяной бане и оставшиеся в приемной колбе

липиды высушивают при 100–105 °С до постоянной массы. Сушат первый раз 1 ч, а затем по 30 мин.

Содержание липидов (X, %) вычисляют по следующей формуле:

$$X = \frac{(M_1 - M_2)}{M_0} \cdot 100 \quad (18)$$

где  $M_0$  – масса сухой навески, г;

$M_1$  – масса колбы с липидами, г;

$M_2$  – масса пустой колбы, г.

В качестве факторов выбраны температура ( $X_1$ ), концентрация фосфатов ( $X_2$ ) и скорость перемешивания культуры ( $X_3$ ).

**Фактор  $X_1$** , температура. Центр плана – 28 °С. Шаг варьирования – 2 °С.

**Фактор  $X_2$** , концентрация фосфатов ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ). Центр плана – 0,5 г/100 мл. Шаг варьирования – 0,1 г/мл.

**Фактор  $X_3$** , скорость перемешивания культуры. Центр плана – 160 об/мин. Шаг варьирования – 20 об/мин.

Предельные значения факторов (верхний и нижний уровень) следующие: температура – 20 и 32 °С; концентрация фосфатов – 0,1 и 1,0 объемных процента; скорость перемешивания – 100 и 240 об/мин. Эксперименты в каждом варианте ставят не менее, чем в трех повторностях. В таблице 7 приведена матрица реализации факторного эксперимента типа  $2^3$ .

Таблица 7 – Матрица реализации факторного эксперимента типа  $2^3$

Опыт	Факторы			Величина Y
	$X_1$	$X_2$	$X_3$	
1	29	25	300	
2	25	25	300	
3	29	15	300	
4	25	15	300	
5	29	25	200	
6	25	25	200	
7	29	15	200	
8	25	15	200	

## Контрольные вопросы

1. Каким методом учитывается численность клеток дрожжей в культуральной жидкости?
2. Как определить область существования и определения факторов температура ( $X_1$ ), концентрация сахарозы ( $X_2$ ) и скорость перемешивания культуры ( $X_3$ ) для показателя функции численность популяции дрожжей?
3. Как составить матрицу для реализации эксперимента?
4. Укажите минимальное количество параллельных опытов в эксперименте, которые необходимо провести для оценки дисперсии воспроизводимости.
5. Как рассчитать число экспериментов для четырех факторов на двух уровнях?
6. Дайте определение однофакторного и многофакторного эксперимента.
7. Какой эксперимент называют полным факторным экспериментом?
8. Что такое «уровень» фактора и «центр плана»?
9. Что такое интервал варьирования факторов?
10. Как рассчитать коэффициенты регрессии?
11. Как рассчитать и оценить однородность дисперсии воспроизводимости?
12. Как оценивается значимость коэффициентов регрессии?
13. Что такое область определения и область существования факторов?
14. Укажите достоинства полного факторного эксперимента.
15. Как оценивается адекватность полученного уравнения регрессии?

## БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Асонов Н.Р. Микробиология / Н.Р. Асонов. – 4-е изд., перераб. и доп. – М.: Колос, 2001. – 352 с.
2. Бабьева, И.П. Методы выделения и идентификации дрожжей / И.П. Бабьева, В.И. Голубев. – М.: Пищевая промышленность, 1979. – 120 с.
3. Бабьева, И. П. Биология дрожжей: Спецкурс для студентов биол.-почв. фак. и фак. почвоведения ун-тов / И. П. Бабьева, И. Ю. Чернов; МГУ им. М. В. Ломоносова. — М.: Изд-во МГУ, 1992. — 94, с.
4. Бабьева, И. П. Биология дрожжей: учеб. пособие / И. П. Бабьева, И. Ю. Чернов ; Моск. гос. ун-т им. М. В. Ломоносова, Фак. почвоведения, Ин-т экол. почвоведения. — М.: Товарищество науч. изд. КМК, 2004 (Тип. ООО Галлея-Принт). — 221 с.
5. Билай В.И. Методы экспериментальной микологии. / В.И. Билай. – Киев: Наук. думка, 1982. – 550 с.
6. Биотехнология. Принципы и применение: пер с англ. под ред. Хиггинса, Д. Деста и Дж. Джонса. – М.: Мир, 1994. – 480 с.
7. Бирюков В.В. Основы промышленной биотехнологии. М.: «Колос С» «Химия», 2004. — 296 с.
8. Бродский, В.Э., Таблицы планов эксперимента для факторных и полиномальных моделей. / В.Э. Бродский, Л.И. Бродский, Т.И. Голиков, Е.П. Никитина, Л.А.Панченко – М.: Металлургия, 1982. – 752 с.
9. Великая, Е.И., Лабораторный практикум по курсу общей технологии бродильных производств. / Е.П. Великая, В.Ф. Суходол. – М.: Легкая и пищевая промышленность, 1983. – 311 с.
10. Винаров А.Ю., Гордеев Л.С., Кухаренко А.А., Панфилов В.И. Ферментационные аппараты для процессов микробиологического синтеза./ под ред. В.А. Быкова. — Москва, ДеЛи Принт, 2005. — 278 с.
11. Воробьева Л.И. Пропионовокислые бактерии / Л.И. Воробьева. – М.: МГУ, 1995. – 286 с.
12. Гарибова, Л.В. Основы микологии: морфология и систематика грибов и грибоподобных организмов / Л.В. Гарибова, С.Н. Лекомцева.– М.: Товарищество научных изданий КМК, 2005. – 220 с.
13. Градова Н.Б. Лабораторный практикум по общей микробиологии. /Н.Б. Градова, Е.С. Бабусенко, И.Б. Горнова, 2004.Издательство: ДеЛи принт. – 144 [с.](#)
14. Громовых Т.И. Методы выделения, идентификации и культивирования микроорганизмов/ Т.И. Громовых, В.А. Тюльпанова, В.М. Гукасян, С.В. Прудникова, Красноярск, 2006, Изд-во КГУ. – 168 с.
15. Грюнерт, Г. Грибы / Г. Грюнерт, Р. Грюнерт. – М.: Астрель, 2001. – 288 с.
16. Гусев М.В. Микробиология / М.В. Гусев, Л.А. Минеева. – М.: МГУ, 2004. – 423 с.
17. Джеймс М. Джей. Современная пищевая микробиология. /Джей М. Джеймс, М. Дж. Лёсснер, Д.А. Гольден. М. – «БИНОМ», 2011. – 890 с.

18. Егорова, Т.А. Основы биотехнологии / Т.А. Егорова, С.М. Клунова, Е.А. Живухина. – М.: АСАДЕМА, 2003. – 208 с.
19. Еремина И.А., Кригер О.В. Лабораторный практикум по микробиологии: Учебное пособие. - / Кемеровский технологический институт пищевой промышленности. – Кемерово, 2005. - 112 с.
20. Красильников А.П. Микробиологический словарь-справочник / А.П. Красильников, Т.Р. Романовская. – Минск: Асар, 1999. – 397 с.
21. Крылов И.А., Красноштанова А.А., Гусева И.И. Комплексная переработка биомассы промышленных микроорганизмов/ Учебное пособие. — М.: РХТУ им. Д.И.Менделеева, 2001. — 84 с.
22. Лабинская А.С., Блинкова Л.П., Ещина А.С. Частная медицинская микробиология с техникой микробиологических исследований. Издательство: Медицина, 2005.- 600 с.
23. Лакин Г.Ф. Биометрия / Г.Ф. Лакин.– М.: Высш. шк., 1973. – 343 с.
24. Метаболизм микроорганизмов: учеб. пособие / под ред. Н.С. Егорова. – М. Изд-во Моск. ун-та, 1986. – 256 с.
25. Методы общей бактериологии [пер. с англ.] / Под ред. Ф. Герхарда [и др.] – М.: Мир, 1983. – Т. 1. – 536 с.
26. Методы общей бактериологии [пер. с англ.] / под ред. Ф. Герхарда [и др.]– М.: Мир, 1984. – Т. 2. – 472 с.
27. Методы общей бактериологии [пер. с англ.] / под ред. Ф. Герхарда [и др.]– М.: Мир, 1984. – Т. 3. – 264 с.
28. Методы почвенной микробиологии и биохимии / под ред. Д.Г. Звягинцева. – М.: Изд-во МГУ, 1991. – 304 с.
29. Нетрусов, А. И. Практикум по микробиологии/ А. И. Нетрусов, М.А. Егорова, Л.М. Захарчук и др, М.: Издательский центр «Академия», 2005.- 608 с.
30. Определитель бактерий Берджи в 2-х т. [пер. с англ.] / под ред. Дж. Хоулта, [и др.]. – М.: Мир, 1997. – Т. 1. – 432 с.
31. Определитель бактерий Берджи в 2-х т, [пер. с англ.] / под ред. Дж. Хоулта, [и др.] – М.: Мир, 1997.– Т. 2 – 368 с.
32. Основы научных исследований / под ред. В.И. Крутова, В.В. Попова. – М.: Высш. шк., 1989. – 399 с.
33. Прунтова, О.В. Лабораторный практикум по общей микробиоло-П85 гии / О. В. Прунтова, О. Н. Сахно ; Владим. гос. ун-т. - Владимир : Изд-во ВлГУ, 2005. - 76 с.
34. Рабинович, 2001 М.Л. Теоретические основы биотехнологии древесных композитов. Древесина и разрушающие ее грибы / М.Л. Рабинович, А.В. Болотова, В.И. Кондращенко. – М.: Наука, 2001. – 264 с.
35. Современная микробиология: Прокариоты / под ред. Й. Ленглера, Т. Древе, Г. Шлегеля. – М.: Мир, 2005. Т 1.– 643 с.; Т. 2. – 449 с.
36. Теппер, Е.З. Практикум по микробиологии / Е.З. Теппер, В.К. Шильникова, Г.И. Переверзева. – М.: Дрофа, 2004. – 256 с.
37. Чернов, И. Ю. Биология дрожжей: Текст лекций / И. Ю. Чернов; Моск. технол. ин-т пищ. промышленности. — М.: МТИПП, 1988. — 54 с.

38. Шлегель Г. Общая микробиология. / Г. Шлегель. – М.: Мир, 1987. – 566 с.
39. Barnett J.A. Yeasts: Characteristics and identification / J.A. Barnett, R.W. Payne, D. Yarrow, Cambridge University Press. London, New York, New Rochelle: 1983. – 811 p.
40. Bab'eva I.P., Chernov I.Yu. Geographical aspects of yeast ecology // Phisiol. Gen. Biol. Rev. 1995. V. 9. Pt 3. P. 1-54.
41. Hestrin S. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*: 2. Preparation of Freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose/ S. Hestrin, M. Schramann // Biochemical Journal, 1952, 58.- p.345-352.
42. Park J.K. Cellulose production by *Gluconacetobacter hansenii* in a medium containing ethanol/ J.K. Park, J.Y. Jung, Y.H. Park// Biotechnol. Lett., 2003, 25.- p.2055–2059.
43. Yamada Y. The phylogeny of acetic acid bacteria based on the partial sequences of 16S ribosomal RNA: the elevation of the subgenus *Gluconoacetobacter* to generic level/ K. Hoshino and T. Ishikawa// Biosci.Biotechnol. Biochem, 1997, 61.- p. 1244–1251.

## СОДЕРЖАНИЕ

<b>Введение</b> .....	3
<b>1 КУЛЬТУРЫ МИКРООРГАНИЗМОВ</b> .....	4
1.1 Общая характеристика.....	4
1.2 Правила работы с культурами микроорганизмов.....	5
1.3 Выделение чистых культур.....	6
1.4 Основные принципы подбора условий для выделения культур	12
1.5 Подбор состава питательных сред для выделения культур.....	20
<b>2 МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ НАКОПИТЕЛЬНЫХ И ЧИСТЫХ КУЛЬТУР</b> .....	27
2.1 Биохимические методы получения накопительных и чистых культур бактерий.....	27
2.2 Биофизические методы получения чистых и накопительных культур бактерий.....	41
2.3 Биологические методы получения накопительных культур бактерий.....	43
2.4 Выделение чистых культуры анаэробных бактерий.....	46
2.4 Выделение культур актиномицетов.....	50
2.5 Выделение накопительных и чистых культур грибов.....	60
2.6 Питательные среды для выделения грибов.....	68
<b>3 ХРАНЕНИЕ КУЛЬТУР МИКРООРГАНИЗМОВ</b> .....	74
3.1 Периодические пересевы (субкультивирование).....	74
3.2 Хранение микроорганизмов при низких и ультранизких температурах.....	75
3.3 Лиофилизация.....	77
3.4 Хранение микроорганизмов в высушенном состоянии.....	80
3.5 Хранение культур под минеральным маслом.....	81
<b>4 КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ</b> .....	84
4.1 Способы культивирования микроорганизмов.....	85
4.2 Оптимизация процессов культивирования по плану полного факторного эксперимента.....	90
4.3 Оптимизация процесса роста биомассы дрожжей <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	98
4.4 Оптимизация процесса роста и липидообразования мицелиальными грибами <i>Cunninghamella japonica</i> .....	102
<b>БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК</b> .....	106