

**Накопительные культуры и
принцип элективности.
Методы выделения культур
микроорганизмов.**

- **Культура накопительная** - начальный этап получения **чистой культуры** микроорганизма из природных субстратов.
- Заключается в создании **элективных (избирательных)** условий для роста организма определенного **вида** или группы сходных видов, при которых он (они) преодолевает конкуренцию других микроорганизмов. В качестве **элективных факторов** могут выступать – кислая реакция **питательной среды**.
- **Принцип элективности** разработан С. Н. Виноградским. Заключается в подборе строго избирательных условий - питательной среды и других факторов - для выделения и культивирования определенных видов микроорганизмов с учетом их природных физиологических особенностей.

- **Чистая культура (или аксеничная культура)** — совокупность микроорганизмов одного вида, имеющие одинаковые морфологические, биохимические и культуральные свойства.
- Чистые культуры используются при:
 - изучении систематики и изменчивости микроорганизмов;
 - диагностике для идентификации возбудителей порчи пищевых продуктов;
 - диагностике инфекционных болезней;
 - в микробиологической промышленности в качестве исходного материала для получения ферментов, вакцин, антибиотиков, витаминов, стероидных гормонов и других продуктов;
 - в пищевой промышленности: в виноделии, пивоварении, производстве молочнокислых продуктов и хлеба.

- **Чистой культурой** называется популяция бактерий одного вида или одной разновидности, выращенная на питательной среде. Многие виды бактерий подразделяют по одному признаку на биологические варианты — **биовары**. Биовары, различающиеся по биохимическим свойствам, называют **хемоварами**, по антигенным свойствам — **сероварами**, по чувствительности к фагу — **фаговарами**. Культуры микроорганизмов одного и того же вида, или биовара, выделенные из различных источников или в разное время из одного и того же источника, называют **штаммами**, которые обычно обозначаются номерами или какими-либо символами. Чистые культуры бактерий в диагностических бактериологических лабораториях получают из изолированных колоний, пересевая их петлей в пробирки с твердыми или, реже, жидкими питательными средами.
- **Колония** представляет собой видимое изолированное скопление особей одного вида микроорганизмов, образующееся в результате размножения одной бактериальной клетки на плотной питательной среде (на поверхности или в глубине ее). Колонии бактерий разных видов отличаются друг от друга по своей морфологии, цвету и другим признакам.

- **Чистую культуру бактерий** получают для проведения диагностических исследований — идентификации, которая достигается путем определения морфологических, культуральных, биохимических и других признаков микроорганизма.
- **Морфологические и тинкториальные признаки** бактерий изучают при микроскопическом исследовании мазков, окрашенных разными методами, и нативных препаратов.
- **Культуральные свойства** характеризуются питательными потребностями, условиями и типом роста бактерий на плотных и жидких питательных средах. Они устанавливаются по морфологии колоний и особенностям роста культуры.
- **Биохимические признаки** бактерий определяются набором конститутивных и индуцибельных ферментов, присущих определенному роду, виду, варианту. В бактериологической практике таксономическое значение имеют чаще всего сахаролитические и протеолитические ферменты бактерий, которые определяют на дифференциально-диагностических средах.
- **При идентификации бактерий** до рода и вида обращают внимание на пигменты, окрашивающие колонии и культуральную среду в разнообразные цвета. Например, красный пигмент образуют *Serratia marcescens*, золотистый пигмент — *Staphylococcus aureus* (золотистый стафилококк), сине-зеленый пигмент — *Pseudomonas aeruginosa*.
- **Для установления биовара** (хемовара, серовара, фаготипа) проводят дополнительные исследования по выявлению соответствующего маркера — определению фермента, антигена, чувствительности к Фанам.

Методы выделения чистых культур микроорганизмов - аэробов.

- **Аэробы** – это микроорганизмы, для жизнедеятельности которых необходим O₂ воздуха.
- **МЕТОД ПАСТЕРА (МЕТОД ПРЕДЕЛЬНЫХ РАЗВЕДЕНИЙ)**. Заключается в том, что из исследуемого материала делают ряд последовательных разведений в жидкой среде (пробирки с физ. раствором по 9 мл). Посев проводят пипеткой Пастера или бак петлей.
- **МЕТОД КОХА (МЕТОД ГЛУБИННОГО ПОСЕВА)**. Основан на механическом разведении микробных клеток с использованием питательных сред (пробирки с расплавленным или охлажденным агаром по 9 мл). Посев проводят пипеткой Пастера или бак петлей.
- **МЕТОД ДРИГАЛЬСКОГО**. Основан на механическом разделении микробных клеток на поверхности плотной питательной среды в чашках Петри (несколько чашек). Посев проводят пипеткой Пастера с бак петлей или шпателем.
- **МЕТОД ИСТОЩАЮЩЕГО ШТРИХА**. Делается подобно методу Дригальского, но в целях экономии сред и посуды можно пользоваться 1 чашкой Петри (разделив ее на сектора, и последовательно засеивать их штрихом).
- **МЕТОД ЗАДЕРЖКИ РОСТА**. Основан на культивировании микроорганизмов на питательных средах, содержащих вещества (например, антибиотики), задерживающие рост одних микроорганизмов и не влияющие на рост других.

- **ТЕРМИЧЕСКИЙ МЕТОД** Заключается в нагревании исследуемого материала в течение 15-20 мин при $t=80^{\circ}\text{C}$. Это нужно для того, чтобы остались только споровые микроорганизмы, устойчивые к нагреванию.
- **ХИМИЧЕСКИЙ МЕТОД** Выделения чистых культур ведется с помощью химических веществ, к которым они устойчивы, а др микробы не устойчивы. Например, возбудитель туберкулеза устойчив к действия кислот, спиртов и щелочей, а др микробы – нет. После воздействия кислоты или щелочи клетки туберкулезной палочки остаются живыми, а все другие микроорганизмы, содержащиеся в исследуемом материале, погибают.
- **БИОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД** Заключается в заражении лабораторных животных (биопробе) и выделении чистой культуры. После вскрытия павшего животного из внутренних органов делают посевы на специальные среды, на которых вырастают чистые культуры выделяемых микробов. Метод используется для выделения только патогенных микроорганизмов.

Основные источники получения микроорганизмов, используемых для культивирования.

1. Классический путь – проводится выделение микроорганизмов *из мест, где обитание того или иного вида наиболее вероятно.*

В селективных средах путем варьирования различных факторов создаются избирательные условия для преимущественного развития определенного микроорганизма. Таким образом получают **накопительные культуры микроорганизмов.**

Следующий этап – **выделение чистых культур.** Для этого используют плотные питательные среды, на которые засевают образцы проб из накопительных культур. Отдельные клетки микроорганизмов на плотных питательных средах образуют изолированные колонии, при их последующем пересеве получают чистые культуры продуцента.

2. Другой путь подбора микроорганизмов – *из имеющихся коллекций микроорганизмов.*

Получение накопительных культур

Выделение чистой культуры данного микроорганизма будет успешным, если он присутствует в смешанной популяции в достаточно высокой концентрации, т. е. количественно преобладает. Разработанные методы накопления имеют целью добиться увеличения относительного количества данного организма благодаря созданию лучших условий для его роста и выживания по сравнению с другими или путем пространственного отделения его от других членов популяции.

К **физическим методам накопления** следует относить регуляцию роста температурой, тепловую и ультразвуковую обработку, ультрафиолетовое облучение, приводящие к гибели или подавлению роста других организмов, присутствующих в популяции, но существенно не затрагивающие выделяемые клетки.

Можно также использовать преимущества в некоторых физических свойствах изучаемого микроорганизма, таких, как его размеры и подвижность; это позволяет в значительной мере отделить данный организм от других в популяции.

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

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

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

Получение чистых культур

- Из накопительных культур микроорганизмы обычно выделяют путем их пространственного отделения от других форм на твердой среде, где они растут в виде колоний. Для микроорганизмов, не растущих на твердых средах, можно использовать метод предельного разведения, последовательно перенося клетки в отдельные пробирки с жидкой средой.
- Для выделения микроорганизмов в виде *чистых культур* известно сравнительно мало методов. Чаще всего используют способ изолирования отдельных клеток на твердой питательной среде или метод предельных разведений.
- Однако получение отдельной колонии не всегда гарантирует чистоту культуры, поскольку колонии могут вырасти не только из отдельных клеток, но из их скоплений.
- Для выделения предпочтительнее использовать неселективную среду, поскольку на ней лучше растут контаминирующие микроорганизмы и их легче обнаружить. Не следует очень быстро отбирать колонии, поскольку за данный отрезок времени могут не вырасти медленно растущие контаминирующие организмы.

Чистые культуры

- Из чистой культуры обычно вырастают одинаковые колонии, и при микроскопировании выявляются схожие клетки, в частности, по морфологии и результатам окраски по методу К. Грама. Однако возможны исключения, например, колонии, вырастающие из чистой культуры, могут быть гладкие (S) и шероховатые (R). Кроме того, в чистых культурах различных микроорганизмов могут появиться морфологически различные клетки (*полиморфизм*), цисты и споры.
- Наконец, некоторые микроорганизмы проявляют *грамвариабельность*. Тем не менее, указанные критерии широко используются при определении чистоты культур.

Определение чистоты культуры

- При определении чистоты культуры учитывают морфологию колоний, формирующихся на плотных питательных средах, оценивая следующие признаки:
- **профиль** – плоский, выпуклый, кратерообразный, конусовидный и т. д.;
- **форму** – округлая, амебовидная, неправильная, ризоидная и т.д.;
- **размер (диаметр)** – измеряют в миллиметрах; если размеры колонии не превышают 1 мм, то их называют точечными;
- **поверхность** – гладкая, шероховатая, бороздчатая, складчатая, морщинистая, с концентрическими кругами или радиально исчерченная;
- **блеск и прозрачность** – колония блестящая, матовая, тусклая, мучнистая, прозрачная;
- **цвет** – бесцветная (грязно-белые колонии относят к бесцветным) или пигментированная; особо отмечают выделение в субстрат пигмента;

- • **край** – ровный, волнистый, зубчатый, лопастной, ризоидный, бахромчатый и т.д.;
- • **структуру** – однородная, мелко- или крупнозернистая, струйчатая и т.д.;
- • **консистенцию:** колония может легко сниматься с агара, быть плотной, мягкой или врастающей в агар, маслянистой, слизистой (прилипает к петле), вязкой, пленчатой (снимается целиком), быть хрупкой (легко ломается при прикосновении петлей).
-
- Размеры и многие другие особенности колонии могут изменяться с возрастом и зависят от состава среды. Поэтому при их описании указывают возраст культуры, состав среды и температуру культивирования.

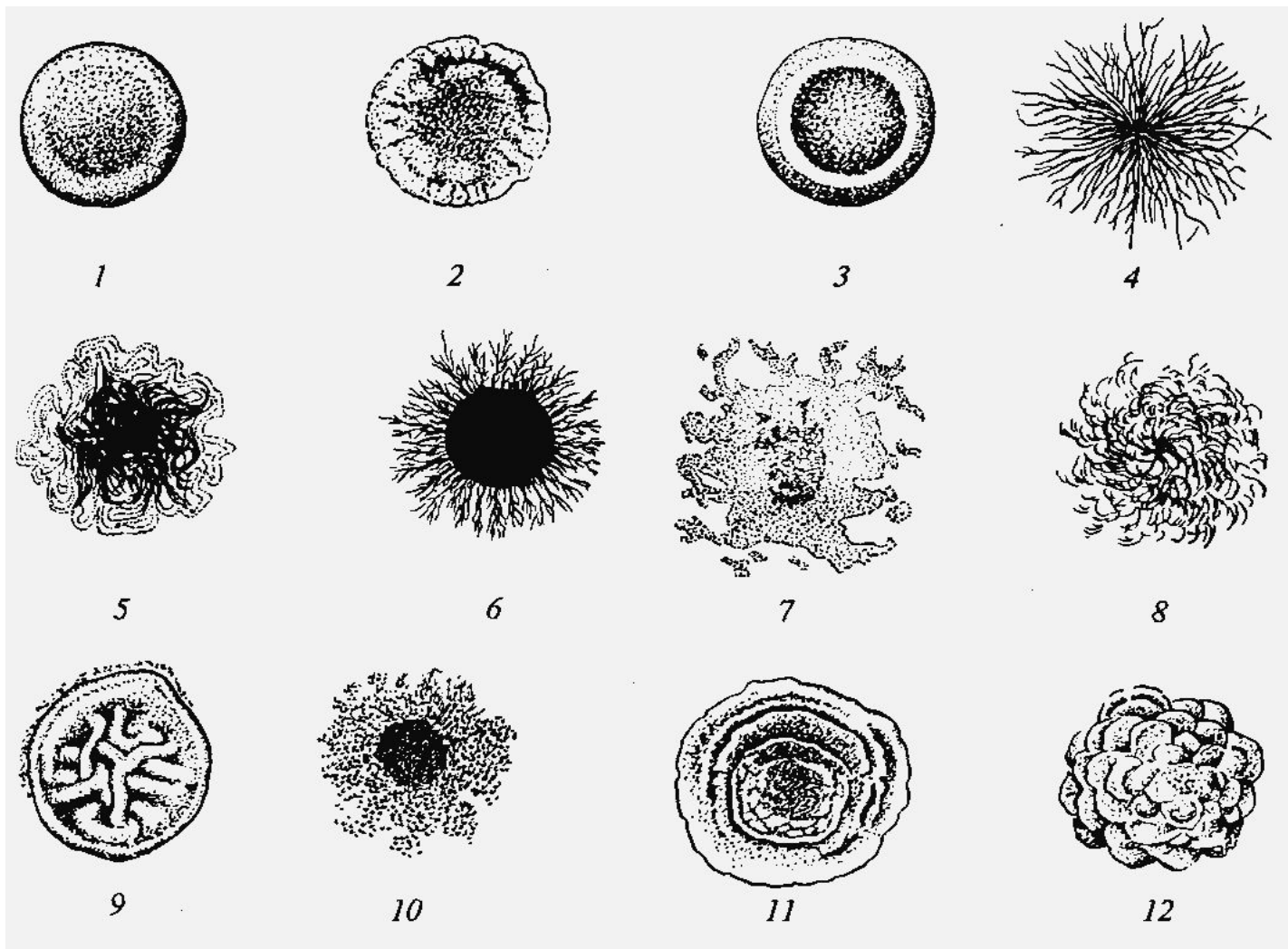


Рис. Форма колонии

1 – круглая; 2 – круглая с фестончатым краем; 3 – круглая с валиком по краю; 4, 5 – ризоидные; 6 – с ризоидным краем;
 7 – амёбовидная; 8 – нитевидная; 9 – складчатая;
 10 – неправильная; 11 – концентрическая; 12 – сложная

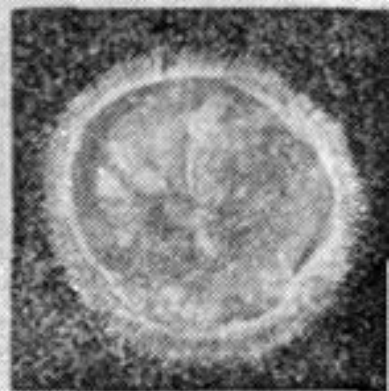
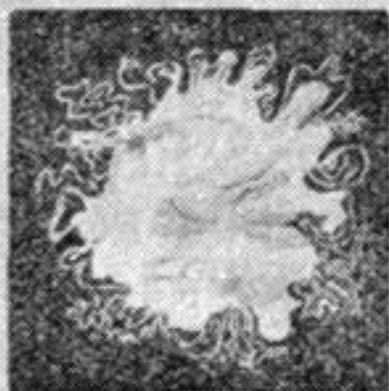
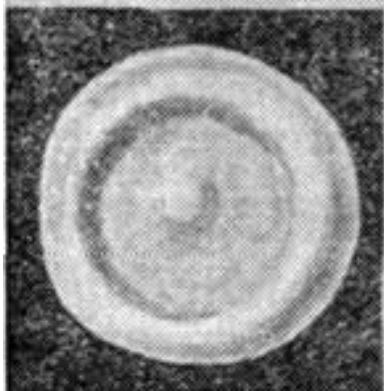
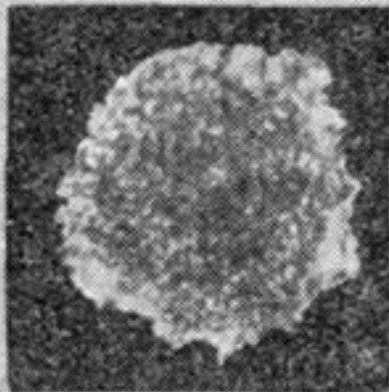
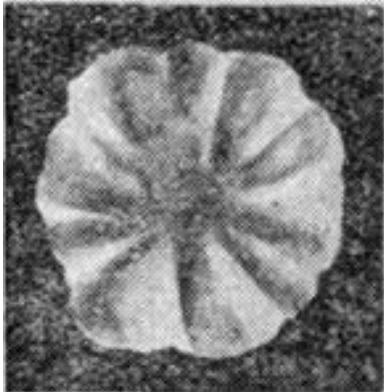
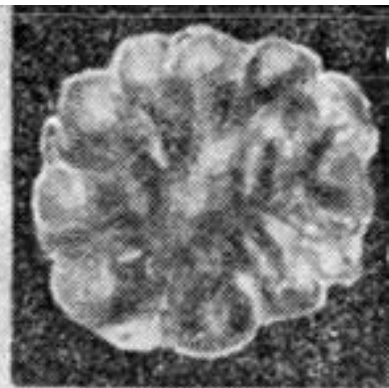
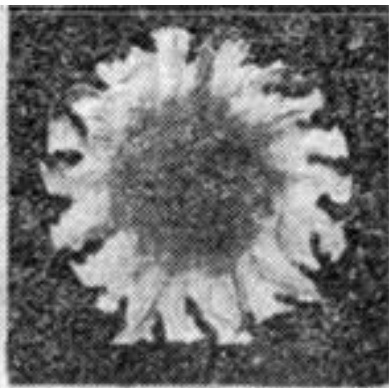
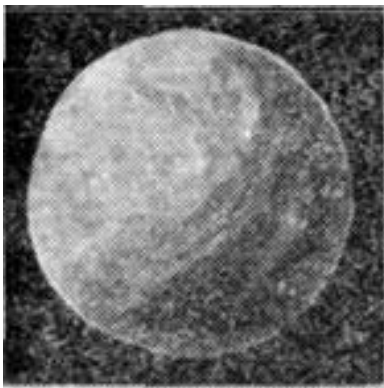


Рис. Профиль колонии

1 – изогнутый; 2 – кратерообразный; 3 – бугристый; 4 –
врастающий в субстрат; 5 – плоский; 6 – выпуклый;
7 – каплевидный; 8 – конусовидный



1



2



3



4



5



6



7



8

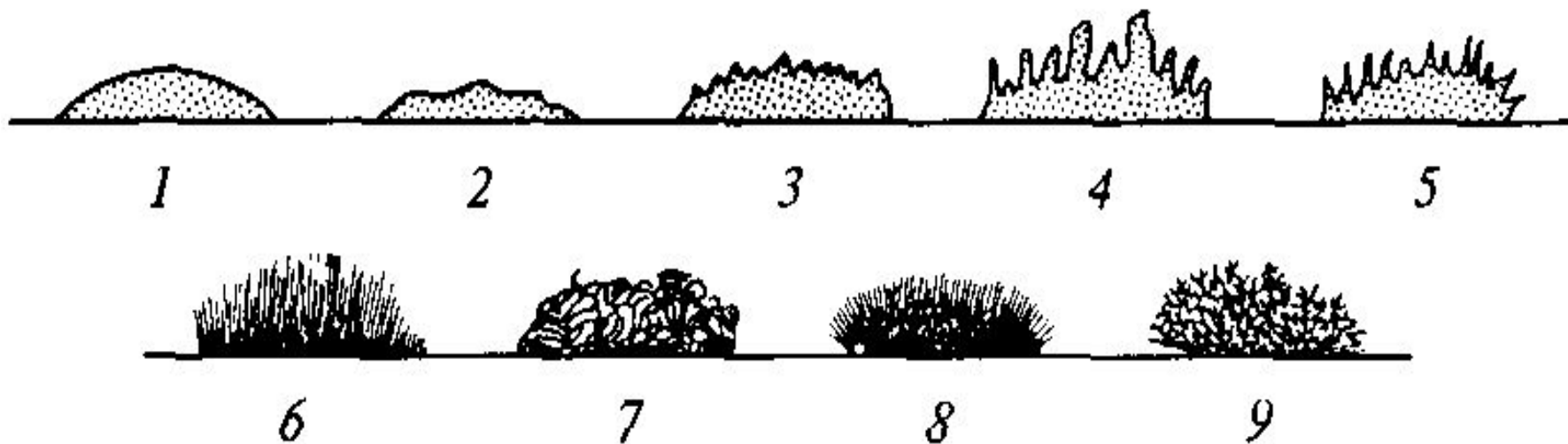


Рис. Край колонии

1 – гладкий; 2 – волнистый; 3 – зубчатый; 4 – лопастной;
5 – неправильный; 6 – реснитчатый; 7 – нитчатый;
8 – ворсинчатый; 9 – ветвистый

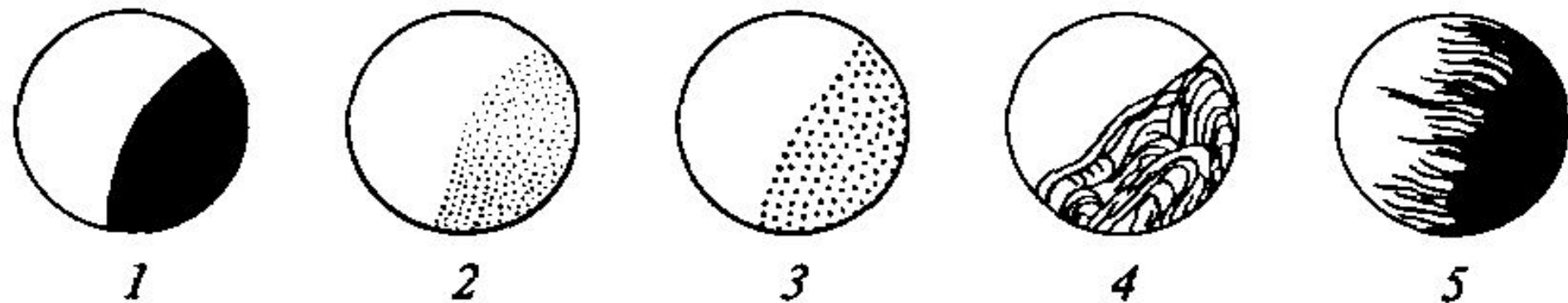


Рис. Структура колонии

1 – однородная; 2 – мелкозернистая; 3 – крупнозернистая;
4 – струйчатая; 5 – волокнистая

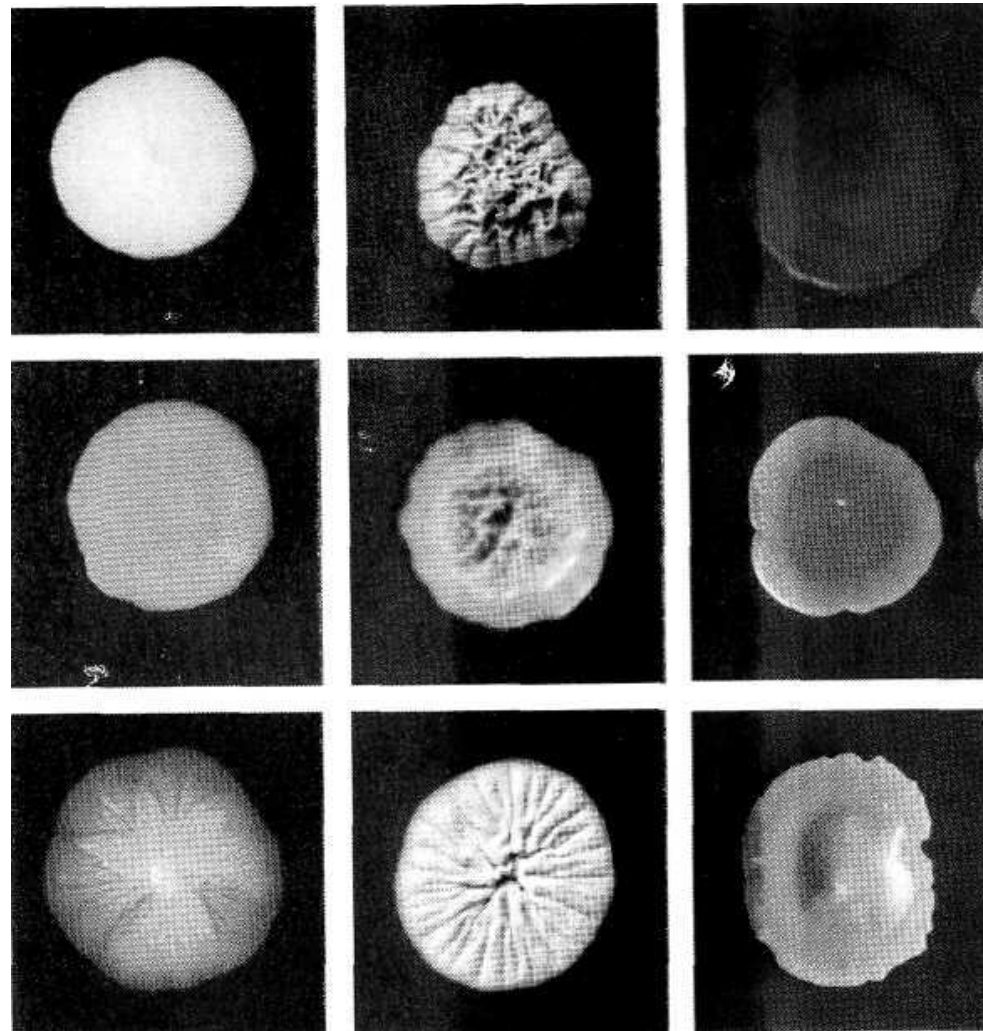


Рис. Колонии дрожжей разных видов на сусло-агаре



Haemophilus influenzae

Рис. Культура дрожжевого гриба *Candida albicans*





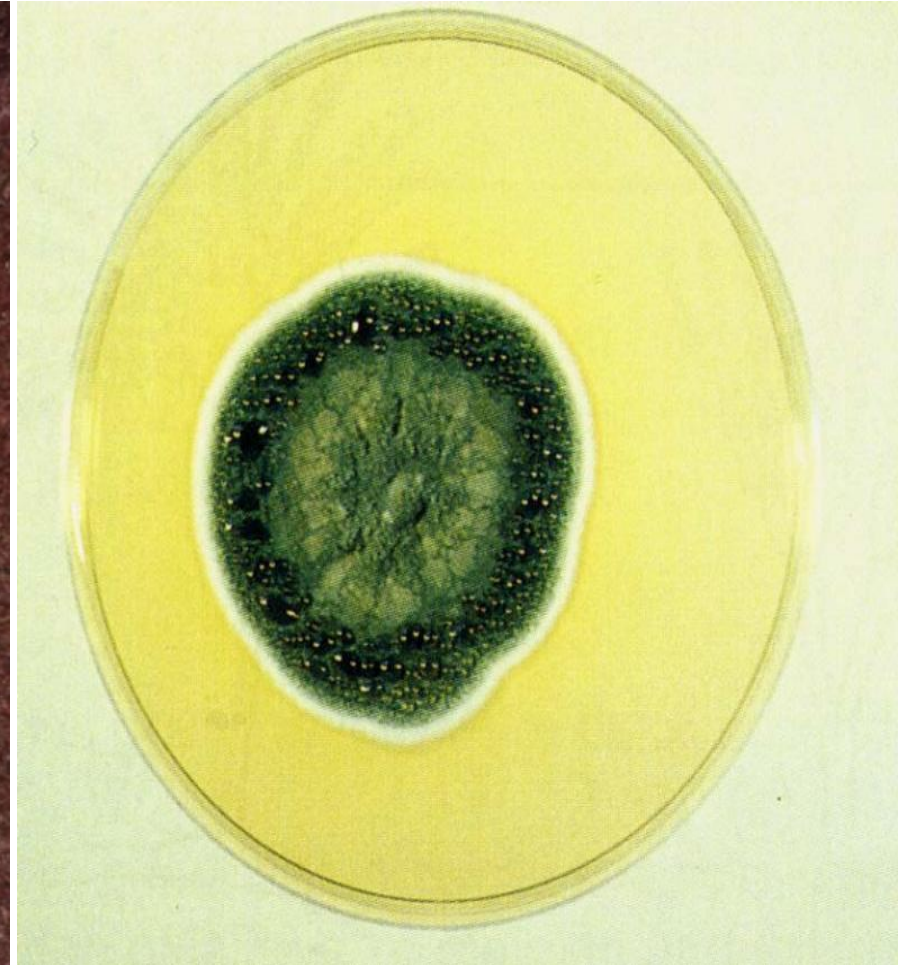


Рис. Колонии мицелиальных грибов



Классификация процессов культивирования

- Выбор процесса культивирования зависит не только от потребностей организма, но и от того, для чего будет использована культура, то есть, от конечной цели эксперимента.
- 1) по состоянию питательной среды или по основной фазе (поверхностные и глубинные);
- 2) по наличию или отсутствию перемешивания (динамические или статические);
- 3) по содержанию кислорода (на аэробные или анаэробные);
- 4) по способу действия (закрытые, чаще периодические, и открытые, чаще непрерывные);
- 5) по количеству ферментеров (одно-, дву- и многостадийные);
- 6) по способу управления (хеостатные, турбидостатные, оксистатные, рН-статные и другие);
- 7) по степени защищенности от посторонней микрофлоры;
- 8) по числу видов микроорганизмов.

ПРОЦЕССЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

ПЕРИОДИЧЕСКИЕ

НЕПРЕРЫВНО-ПРОТОЧНЫЕ

Статические

Динамические с перемешиванием при помощи:

Продленные

Полного смешения (хемостаты)

Полного вытеснения

Насадочные с иммобилизованными клетками

на плотной среде
на жидкой среде

качалки
барботажа
мешалки

диализ
подпитка

одностадийные
многостадийные
отъемно-доливные

регулирование по схеме хемостата

регулирование по схеме турбидостата рН-стата

многостадийные
одностадийные
с рециркуляцией

трубчатый ферментер

колонка с наполнителем

Рис. Основные методы культивирования микроорганизмов.

Культивирование микроорганизмов на твердой поверхности

- Культура бактерий на твердой среде имеет ряд **преимуществ**:
 - 1. В случае культур, выращенных на твердой среде, нет необходимости использовать оборудование для сбора клеток, поскольку в этих культурах клетки находятся уже в сконцентрированном состоянии.
 - 2. Твердые культуры относительно свободны от макромолекулярных компонентов и полностью свободны от частиц питательной среды, так как последние обычно находятся внутри агарового геля. Более того, твердые культуры относительно свободны от низкомолекулярных питательных веществ и продуктов метаболизма микроорганизмов.
 - 3. На твердых средах можно получать результаты, которые невозможно достичь другим путем.

Недостатки твердых культур

- 1. Твердая культура имеет ограничения при выращивании больших количеств биомассы.
- 2. Твердые культуры не обеспечивают однородность популяции клеток, т. е. культура гетерогенна в физиологическом отношении. Гетерогенна культура и в техническом смысле, так как клетки микроорганизмов и питательная среда распределены неравномерно.
- 3. Твердые культуры характеризуются небольшим числом клеток в пересчете на данное количество среды.

Твердофазное культивирование

Используется в основном для культивирования грибов. В качестве твердой фазы могут выступать различные виды растительного сырья.

1. Дешевое производство и возможность использования субстратов, которые непригодны для других способов культивирования.
2. Некоторые процессы протекают значительно интенсивнее.

Варианты твердофазного культивирования:

1. Поверхностное («тонкий слой»),
2. Глубинное в неперемешиваемом слое («высокий слой»),
3. Культивирование в перемешиваемой и аэрируемой массе.

Продленное периодическое культивирование

- Характерные черты:
- предусматривает одноразовую загрузку и разгрузку ферментера;
- продлевается как экспоненциальная фаза, так и фаза линейного роста;
- подпитка переводит периодический процесс в продленный периодический процесс;
- Для увеличения выхода продуктов или с целью повышения биомассы применяют процессы диализа

Многоциклическое культивирование

- Это такие процессы, в которых цикл выращивания культуры повторяется многократно без многократной стерилизации емкости.
- **Применяют** как для получения биомассы, так и продуктов микробного синтеза — токсинов, антибиотиков, внеклеточных ферментов, аминокислот.



Процессы суспензионного или глубинного культивирования

Простейшая классификация процессов суспензионного или
глубинного культивирования:

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

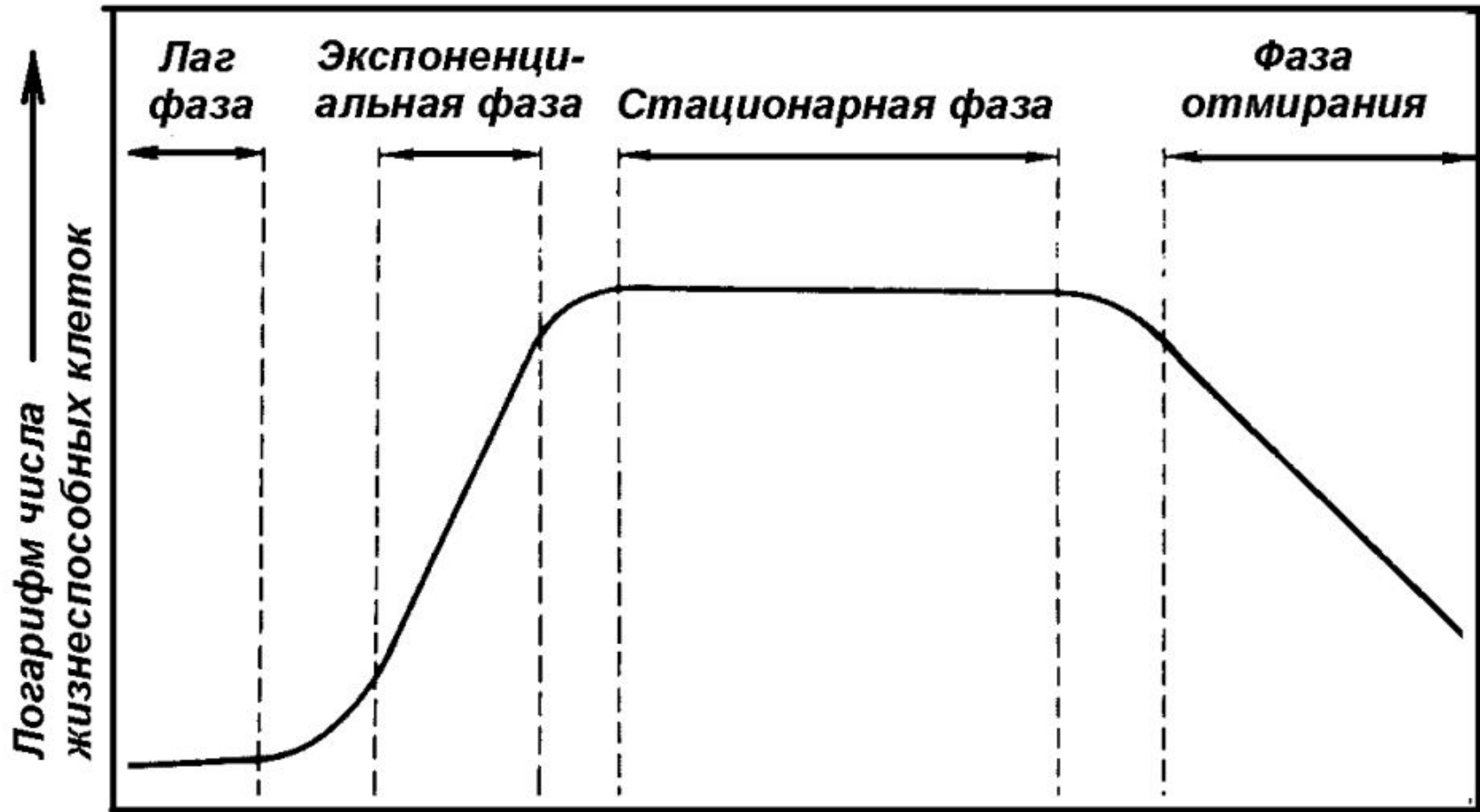
Периодическое культивирование

- Периодический метод культивирования предусматривает внесение посевного материала в питательную среду (инокуляция клетками среды) в начале процесса и получение культуры по достижении заданной фазы развития популяции.
- Концентрация микроорганизмов в периодической культуре нарастает и останавливается либо из-за лимитирования субстратом, либо из-за ингибирования токсичными продуктами жизнедеятельности.
- Практически все системы периодического культивирования являются закрытыми, поскольку микроорганизмы в них размножаются и проходят все фазы развития без притока питательной среды и оттока культуральной жидкости.

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

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

**Рис. Основные фазы кривой роста
периодической культуры микроорганизмов**



Параметры кривой роста

Под **урожаем клеток (X)** понимают разность между максимальной и исходной массой бактерий:

$$X = X_{\max} - X_0.$$

Особенно важно отношение урожая клеток к количеству потребленного субстрата (X/S). Если обе эти величины выражают в весовых единицах, то отношение X/S , называемое **экономическим коэффициентом**, обозначают через Y :

$$Y = dX/dS,$$

где dX – увеличение биомассы, соответствующее потреблению субстрата в количестве dS .

Важность экономического коэффициента состоит в том, что он выражает количественные потребности организма в пище.

Если же урожай (в граммах) относят к числу молей потребленного субстрата, то экономический коэффициент, называемый в этом случае **молярным экономическим коэффициентом**, обозначают через Y_m .

Молярный экономический коэффициент позволяет связать урожай клеток с полученным из какого-либо источника энергии (т. е. какого-либо субстрата) количеством АТФ. **Y_{ATP} - энергетический коэффициент**, выражается в граммах клеточной массы на 1 моль АТФ.

Скорость потребления субстрата культурой в данный момент времени выражается соотношением:

$$dS/dT = qX,$$

где X – биомасса, а коэффициент q известен как **метаболический коэффициент** или удельная скорость метаболизма. Метаболический коэффициент можно выразить также через экономический коэффициент и удельную скорость роста и представить еще в таком виде:

$$q = \mu/Y.$$

Если удовлетворены все необходимые требования, то в течение единицы времени dt увеличение биомассы dX должно быть пропорционально количеству биомассы X и интервалу времени, т. е.:

$$dX = \mu X \cdot dt,$$

откуда

$$dX/dt = \mu X \quad \text{или} \quad \mu = dX/dt \cdot 1/X$$

Дифференциальное отношение dX/dt выражает **скорость роста популяции клеток**. Параметр μ , обозначающий скорость роста единицы биомассы ($1/X$) (dX/dt), называется **удельной скоростью роста**.

Для того, чтобы рассчитать время генерации клеток можно использовать уравнение, учитывая геометрическую прогрессию роста:

$$N = N_0 \cdot 2^n, \text{ откуда } \lg N = \lg N_0 + n \lg 2,$$

где N число клеток.

Отсюда число клеточных делений (n) составит:

$$n = \lg N - \lg N_0 / \lg 2$$

Константа скорости деления или число клеточных делений в единицу времени $t-t_0$ можно вычислить по формуле: $v=n/t$,

а время одной генерации (g) по формуле:

$$g=t/n=1/v$$

Спасибо за внимание!