

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ И РОСТ МИКРООРГАНИЗМОВ



Понятие о чистых и накопительных культурах микроорганизмов

- Выращивание микроорганизмов на питательных средах называется культивированием, а развившиеся в таких средах микроорганизмы – культурой. При культивировании происходит рост культуры – физиологический процесс, в результате которого увеличивается *биомасса* – масса клеточного вещества данного микроорганизма.

- Чистой культурой микроорганизма называют культуру, которая представлена потомством одной клетки. Естественным путем получить чистую культуру почти невозможно, поэтому ее получают искусственно. Для выделения чистой культуры используют плотные питательные среды, на которых каждая клетка вырастает в виде *изолированной колонии* – популяции микроорганизмов одного вида.

Перед выделением чистой культуры из какого-либо пищевого продукта или природного субстрата (например: почвы, воды), в котором данный микроорганизм находится в небольших количествах, вначале получают накопительные культуры, проводя культивирование в элективных условиях.

- Накопительные культуры состоят преимущественно из клеток микроорганизмов одного вида. *Элективны́е* (накопительные) условия – условия, способствующие развитию одной культуры и ограничивающие развитие сопутствующих микроорганизмов. Создать накопительные условия можно путем использования накопительных сред. Примером элективных условий может быть повышенная температура (для выделения термоустойчивых форм бактерий), повышенная кислотность, повышенная концентрация соли и т.д.
- Инкубация – культивирование микроорганизмов при определенной температуре.

- Хранят чистые культуры обычно на плотных питательных средах в пробирках. При этом постоянно необходимо делать пересевы на свежую питательную среду.
- К другим способам хранения чистых культур относятся сохранение их на накопительной среде под слоем вазелинового масла и хранение в лиофилизированном состоянии (сушка под вакуумом замороженных клеток микроорганизмов).

- В пищевой промышленности применяют чистые культуры дрожжей, молочнокислых, уксуснокислых, пропионовокислых бактерий, обладающих ценными свойствами для производства. В последнее время находят успешное применение многокомпонентные чистые культуры, состоящие из двух и более видов микроорганизмов.

Способы культивирования микроорганизмов

- Способ культивирования зависит от конечной цели культивирования (целью является либо накопление биомассы, либо получение определенного продукта жизнедеятельности – метаболита).

- Поверхностное культивирование заключается в выращивании аэробных микроорганизмов на поверхности жидких и сыпучих питательных сред. При этом микроорганизмы получают кислород непосредственно из воздуха. При поверхностном культивировании на жидких средах микроорганизмы растут в виде пленок. Осуществляется поверхностное культивирование в специальных ваннах – *кюветах*.

- Глубинное культивирование проводится на жидких питательных средах, в которых микроорганизмы развиваются во всем объеме питательной среды. Сочетание питательной среды и растущих в ней микроорганизмов называют *культуральной жидкостью*. Осуществляется глубинное культивирование в специальных аппаратах – *ферментаторах*, снабженных мешалками и системой подвода стерильного воздуха для обеспечения роста аэробных микроорганизмов. *Аэрирование* – продувание стерильного воздуха через культуральную жидкость.

- При периодическом культивировании весь объем питательной среды засевают чистой культурой, которую выращивают в оптимальных условиях определенный период времени до накопления нужного количества целевого продукта. Следует отметить, что, так как культивирование ведется на невозобновляемой питательной среде (в стационарных условиях), то клетки все время находятся в меняющихся условиях. Таким образом, периодическую систему можно рассматривать как замкнутую систему.

- При непрерывном культивировании культура находится в специальном аппарате, куда постоянно притекает питательная среда и откуда с такой же скоростью отводится культуральная жидкость. Для микроорганизма создаются неизменные условия среды, поэтому непрерывную систему можно рассматривать как открытую систему.
- Поверхностное культивирование может быть только периодическим, в то время как глубинное культивирование может осуществляться и периодическим, и непрерывным способом.

Закономерности роста статической и непрерывной культуры

При периодическом способе культивирования популяция микроорганизмов проходит 7 стадий (фаз) роста.

1. Лагфаза. В этот период культура адаптируется к новой среде обитания. Активизируются ферментные системы, возрастает количество нуклеиновых кислот, клетка готовится к интенсивному синтезу белков и других соединений. Клетки не размножаются (скорость размножения равна нулю). Концентрация живых клеток постоянна и равна количеству внесенных клеток. Продолжительность этой фазы зависит от физиологических особенностей микроорганизма и от состава питательной среды.

2. Фаза ускорения роста. Эта фаза характеризуется началом деления клеток, увеличением общей массы и постоянным увеличением скорости роста культуры. Эта фаза обычно непродолжительна.

3. Экспоненциальная (логарифмическая) фаза роста. В этот период микроорганизмы размножаются с постоянной максимальной скоростью. При этом логарифм числа клеток линейно зависит от времени. К концу этой фазы среда истощается вследствие катаболических и анаболических процессов, в среде накапливаются продукты жизнедеятельности микроорганизмов. Возникает и пространственная ограниченность, так как клетки мешают друг другу.

4. Фаза замедления роста. В этот период снижается скорость роста, небольшая часть клеток гибнет. Скорость роста выше скорости отмирания.

5. Стационарная фаза. Количество живых клеток достигает максимума. Скорость роста равна скорости отмирания клеток, поэтому концентрация жизнеспособных клеток остается постоянной.

6. Фаза ускорения отмирания. Количество отмерших клеток (скорость отмирания) становится больше количества образовавшихся клеток.

7. Фаза отмирания. Масса живых клеток значительно уменьшается, так как в среде нет питательных веществ, а запасные вещества клетки исчерпываются

При непрерывном способе культивирования культура поддерживается в какой-то фазе роста.

Если цель культивирования – получение биомассы продуцента, процесс целесообразно вести в режиме логарифмической фазы, когда микроорганизм способен обеспечить максимальную скорость роста популяции.

Для поддержания культуры в логарифмической фазе культивирование микробной популяции проводят в условиях хемостата или турбидостата.

Рост в хемостате. Хемостат состоит из сосуда, в который вводят с постоянной скоростью питательный раствор. По мере поступления питательного раствора из него вытекает суспензия микроорганизмов с той же скоростью. При культивировании в условиях хемостата поддерживается постоянная концентрация одного из компонентов среды (например, углерода). Благодаря этому в условиях хемостата поддерживается постоянная скорость роста культуры. Культура микроорганизма находится в условиях динамического равновесия.

Рост в турбидостате. Работа турбидостата основана на поддержании постоянной концентрации живых клеток. В сосуде для культивирования все питательные вещества содержатся в избытке, а скорость роста бактерий приближается к максимальной.

Если же целью культивирования является получение метаболта (например, этилового спирта), выход которого в среду обитания не соответствует логарифмической фазе роста, применяется способ непрерывного выращивания в двух или нескольких последовательно соединенных аппаратах, что позволяет как бы расчленить процесс на несколько стадий.