

**Рост, размножение,
культивирование
прокариот.
Лекция № 2**



Рост и размножение клетки – это два различных процесса. Под ростом понимают увеличение массы клетки вследствие формирования всех клеточных структур. Размножение – это увеличение количества клеток в колонии. Различают бинарное деление, почкование и генетическую рекомбинацию (процесс, напоминающий половое размножение).



Термин «размножение» характеризуется временем генерации (интервал времени, за который число клеток удваивается) и таким понятием, как концентрация бактерий (число клеток в 1 мл). В отличие от митотического цикла деления у эукариот размножение большинства прокариот (бактерий) идет путем бинарного деления, а актиномицетов — почкованием. При этом все прокариоты существуют в гаплоидном состоянии, поскольку молекула ДНК представлена в клетке в единственном числе.

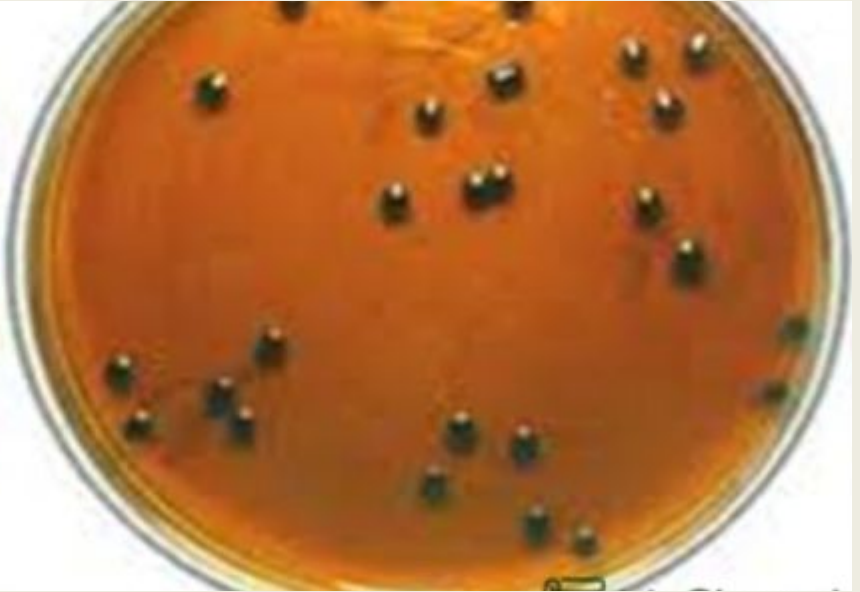


Большинство прокариотических (безъядерных) клеток, к которым принадлежат все бактерии, размножается путем деления надвое (**бинарное деление**). Таким способом размножаются, например, молочнокислые бактерии. Процесс начинается с удвоения бактериальной хромосомы (молекула ДНК, заменяющая ядро) и протекает в несколько этапов:





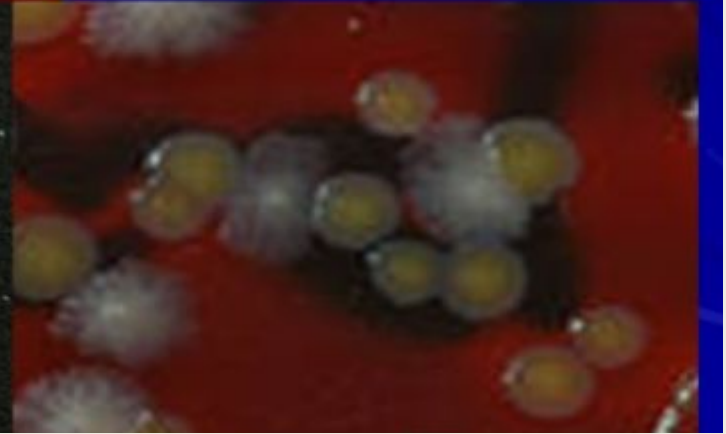
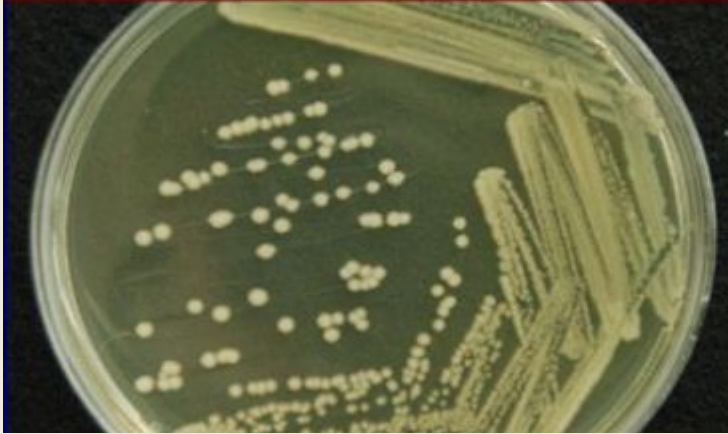
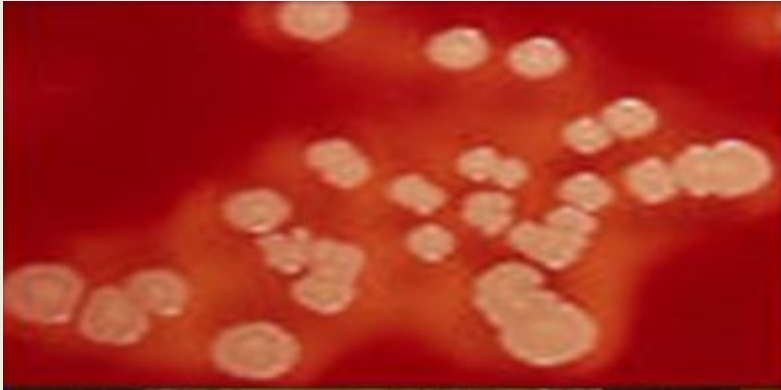
- клетка удлиняется;
- наружная оболочка «врастает» внутрь и образует поперечную перегородку (перетяжку);
- две новые (дочерние) клетки расходятся в разные стороны.
В результате получаются два идентичных организма.



Отдельные микроорганизмы делятся почкованием, но это скорее исключение из общего правила.

Процесс заключается в образовании на одном из полюсов клетки короткого выступа, в который «дрейфует» одна из половин разделившегося нуклеоида (молекулы ДНК с генетической информацией). Затем выступ разрастается и отделяется от материнской клетки.





Есть еще вариант, напоминающий половое размножение, – **генетическая рекомбинация**. В этом случае происходит обмен генетической информацией и в результате получается клетка, содержащая гены своих родителей. Существуют **три способа передачи генетической информации**:





- **конъюгация** – прямая передача (не обмен) части ДНК при контакте от одной бактерии к другой (процесс идет только в одном направлении);
- **трансдукция** – перенос фрагмента ДНК с помощью бактериофага (вируса бактерий);
- **трансформация** – поглощение генетической информации отмерших или уничтоженных клеток из окружающей среды.



При изучении процесса размножения бактерий необходимо учитывать, что бактерии всегда существуют в виде более или менее многочисленных популяций, и развитие бактериальной популяции в жидкой питательной среде в периодической культуре можно рассматривать как замкнутую систему. В этом процессе выделяют 4 фазы:

1-я — начальная, или лаг-фаза, или фаза задержки размножения, — характеризуется началом интенсивного роста клеток, но скорость их деления остается невысокой;

2-я — логарифмическая, или лог-фаза, или экспоненциальная фаза, — характеризуется постоянной максимальной скоростью деления клеток и значительным увеличением числа клеток в популяции;



3-я — стационарная фаза — наступает тогда, когда число клеток в популяции перестает увеличиваться. Это связано с тем, что наступает равновесие между числом вновь образующихся и гибнущих клеток. Число живых бактериальных клеток в популяции на единицу объема питательной среды в стационарной фазе обозначается как M -концентрация. Этот показатель является характерным признаком для каждого вида бактерий;



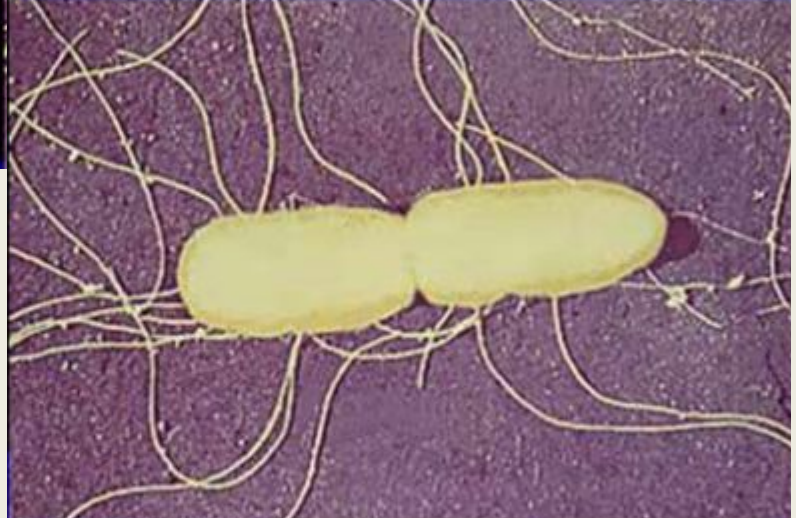
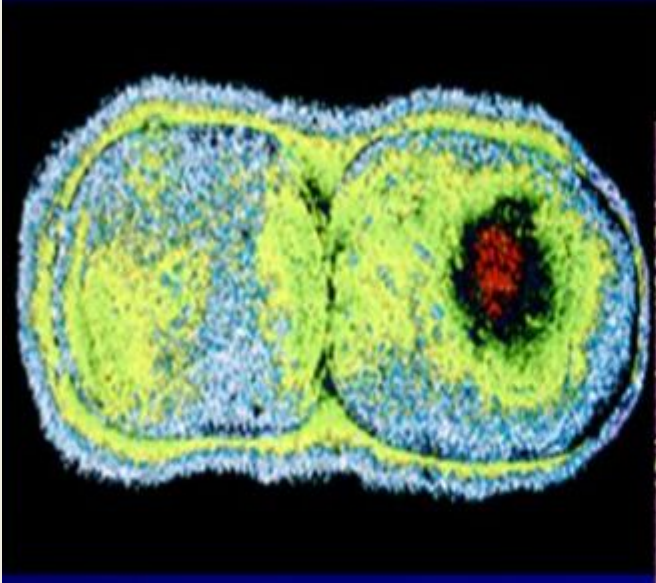
4-я — фаза отмирания (логарифмической гибели) — характеризуется преобладанием в популяции числа погибших клеток и прогрессивным снижением числа жизнеспособных клеток популяции.

Прекращение роста численности (размножения) популяции микроорганизмов наступает в связи с истощением питательной среды и/или накоплением в ней продуктов метаболизма микробных клеток.



РОСТ ПОПУЛЯЦИИ МИКРОБОВ В ЗАКРЫТОЙ СИСТЕМЕ





Удаляя продукты метаболизма и/или
заменяя питательную среду,
регулируя переход микробной
популяции из стационарной фазы в
фазу отмирания, можно создать
открытую биологическую систему,
стремящуюся к устранению
динамического равновесия на
определенном уровне развития
популяции.

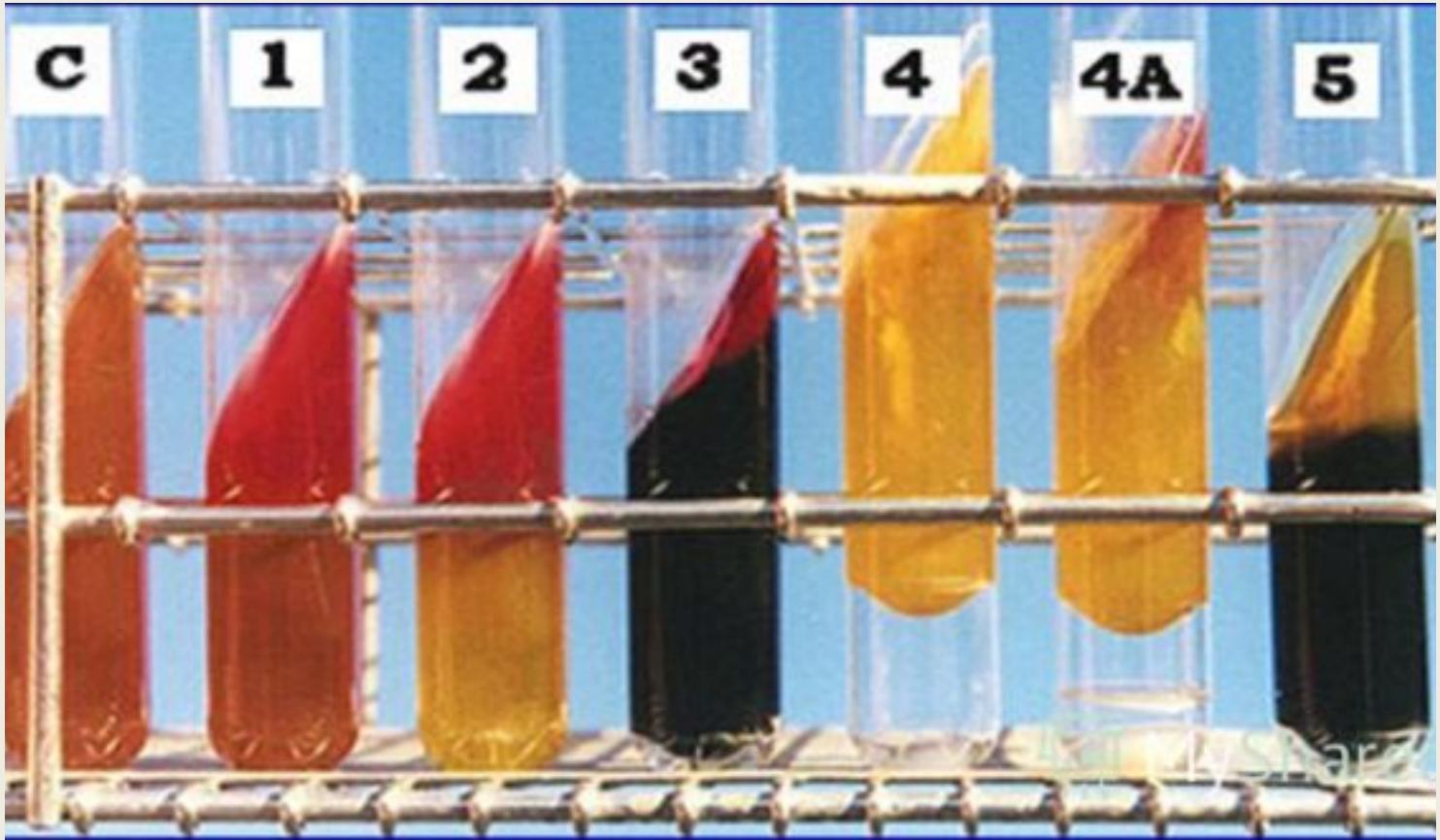






Такой процесс выращивания микроорганизмов называется **проточным культивированием** (непрерывная культура). Рост в непрерывной культуре позволяет получать большие массы бактерий при проточном культивировании в специальных устройствах (хемотратах и турбидистатах) и используется при производстве вакцин, а также в биотехнологии для получения различных биологически активных веществ, продуцируемых микроорганизмами.





Для изучения метаболических процессов на протяжении цикла клеточного деления возможно также использование **синхронных культур** — таких культур бактерий, все члены популяции которых находятся в одной фазе цикла. Это достигается с помощью специальных методов культивирования. Однако через несколько одновременных делений синхронизированная клеточная суспензия постепенно снова переходит к асинхронному делению, так что число клеток увеличивается в дальнейшем уже не ступенчато, а непрерывно.



При культивировании на плотных питательных средах бактерии образуют **КОЛОНИИ** — видимое невооруженным глазом скопление бактерий одного вида, являющееся чаще всего потомством одной клетки.

Колонии бактерий разных видов отличаются:

- формой;
- величиной;
- прозрачностью;
- цветом;
- высотой;
- характером поверхности и краев;
- консистенцией.



Характер колоний — один из таксономических признаков бактерий.

Скорость кинетического роста бактериальной колонии во многом зависит от вида бактерий, состава питательных сред, количества посеянных (внесенных в среду) клеток, возраста культуры, способа дыхания и еще ряда факторов. Например, для размножения молочнокислых бактерий важно поддержание температур в довольно узком диапазоне (25-30⁰С) и определенный уровень кислотности среды (рН).





Микробные колонии как целостные структуры стали модным предметом исследований в 90-е годы, однако нельзя забывать разработки на эту тему классиков микробиологии. Корифей отечественной микробиологии И.Д. Иерусалимский фактически предварил сегодняшние дискуссии на тему организации микробных колоний (плёнок, зооглей, флоков и др.), возражая в своей докторской диссертации против примитивного органицизма – прямолинейного уподобления микробной колонии многоклеточному организму.

И. Д. Иерусалимский говорил о микробной колонии как **надорганизменной (биосоциальной) системе**, которая, подобно социумам муравьев или даже млекопитающих, характеризуется:

- пространственной обособленностью микроколоний каждого вида ("микробных муравейников") в естественных местообитаниях;
- фенотипической гетерогенностью культуры как основой для дифференциации клеток по социальным ролям;
- целостностью культуры в процессе развития, наличием у ней интегральных свойств, отсутствующих у отдельных индивидов;
- способностью колонии влиять на характеристики окружающей среды при достаточной плотности популяции.



Известно значительное количество питательных сред, используемых для культивирования и поддержания (сохранения) микроорганизмов. **Питательной средой** в микробиологии называют среды, содержащие различные соединения сложного или простого состава, которые применяются для размножения микроорганизмов в лабораторных или промышленных условиях.



Все химические элементы, необходимые для жизнедеятельности микроорганизмов, подразделяют на макро- и микроэлементы. К макроэлементам (биогеенным) относятся десять элементов, содержащихся в основных биополимерах всех организмов: С, О, Н, N, S, Р, К, Са, Mg, Fe. Микроэлементы включают в себя Mn, Мо, Zn, Cu, Со, Ni, Ва, В, Cr, Na, Se, Si, W и другие, однако в них нуждаются не все организмы.



Из макро- и микроэлементов бактерии синтезируют все вещества, необходимые для построения клетки: белки, аминокислоты, нуклеиновые кислоты, витамины, липиды и т. д. В зависимости от использования источников углерода все микроорганизмы разделяются на автотрофы и гетеротрофы.



Автотрофы (от греч. autos – сам, trophe – пища, питание) – это микроорганизмы, способные усваивать или фиксировать углекислый газ воздуха в качестве единственного источника углерода и синтезировать из него органические вещества своих клеток.



Гетеротрофы – организмы, нуждающиеся в готовых органических веществах. Как автотрофы, так и гетеротрофы подразделяют на две группы в зависимости от того, какой источник энергии они используют: фототрофы используют энергию света и трансформируют ее в химическую, хемотрофы используют энергию, освобождаемую при реакциях окисления-восстановления.



В зависимости от того, какие питательные вещества – органические или неорганические – являются донорами электронов, все микроорганизмы также подразделяют на две группы. **Органотрофными** являются организмы, использующие в качестве доноров электронов органические соединения, к **литотрофным** относятся организмы, способные использовать в качестве доноров электронов неорганические вещества (H_2 , NH_3 , H_2S , CO , Fe^{2+} и т. д.).



Группа микроорганизмов, способная к росту на простых средах, содержащих источник углерода и энергии, а также набор основных биогенных элементов, получила название **прототрофных**. Следует учитывать и то, что в природе встречаются бактерии, которые способны размножаться в местах с низким пищевым потоком углерода до 0,1 мг/л в день. Они получили название **олиготрофных**, противоположную группу для них составляют бактерии **копиотрофные** – способные к росту на богатых пищевых субстратах.



E. coli (кишечная палочка) способна к росту на простой среде, содержащей только глюкозу и неорганические соли. Молочнокислые же бактерии растут на сложных средах, содержащих в качестве добавок ряд органических соединений (витамины, аминокислоты и др.), которые клетки не в состоянии синтезировать самостоятельно. Такие соединения называются факторами роста. Организмы, которые нуждаются в их добавлении к ростовой среде, называются **ауксотрофными** по соответствующим соединениям. Среды классифицируют: по происхождению (исходным компонентам), консистенции, назначению.



Элективныe среды обеспечивают преимущественное развитие одного или целой физиологической группы микроорганизмов. Например, для выделения стафилоккоков в среду может быть добавлен хлористый натрий в концентрации 7,5 %. При этой концентрации рост других бактерий подавляется. Элективные среды применяются на первом этапе выделения чистой культуры бактерий, т.е. при получении накопительной культуры.



Дифференциально-диагностические среды применяются для быстрой идентификации близкородственных видов микроорганизмов, для определения видовой принадлежности, в клинической бактериологии и др. Принцип построения дифференциально-диагностических сред основан на том, что разные виды бактерий различаются между собой по биохимической активности и имеют неодинаковый набор ферментов, расщепляющих субстраты, входящие в состав питательной среды.



В состав дифференциально-диагностической среды входят: а) основная питательная среда, обеспечивающая размножение бактерий; б) определенный химический субстрат, отношение к которому является диагностическим признаком для данного микроорганизма; в) цветной индикатор, изменение окраски которого свидетельствует о биохимической реакции и наличии данной ферментной системы у исследуемого микроорганизма. Например, среда Эндо позволяет отличить микроорганизмы, сбраживающие лактозу от микроорганизмов, не обладающих этим свойством. Основными компонентами этой среды являются питательный агар, углевод и основной фуксин, обесцвеченный сульфитом (реактив Шиффа).



Исходная питательная среда окрашена в розовый цвет. Микроорганизмы, не сбраживающие лактозу, образуют бесцветные колонии. При сбраживании лактозы до ацетальдегида последний реагирует с сульфитом и развивается красная окраска соответствующих колоний. По консистенции среды могут быть жидкими, полужидкими, твердыми, сыпучими. Жидкие питательные среды получают при растворении в воде определенного необходимого набора питательных веществ, макро- и микроэлементов.



Приготовление твердых питательных сред достигается добавлением к жидким средам определенных уплотнителей, в качестве которых могут выступать агар, желатин, силикагель. Наиболее важным преимуществом использования твердых сред является то, что на них можно выращивать микроорганизмы в виде колоний, образующихся из отдельных клеток популяции. Наиболее распространенным из уплотнителей является **агар** – полисахарид, выделяемый из красных морских водорослей.



Он обладает рядом полезных свойств, в частности:

- 1) способен образовывать в воде гели;
- 2) плавится при температуре 100 °С и затвердевает при 45 °С;
- 3) не расщепляется под влиянием ферментов большинства видов микроорганизмов;
- 4) термолабильные вещества и живые микроорганизмы не разрушаются при добавлении к нагретому до 45 °С расплавленному агару, если смесь сразу же охладить;
- 5) агаровые гели имеют высокую степень прозрачности;
- 6) обычно используемые концентрации 1,5 - 2,0 % являются относительно невысокими и их использование экономично.



Такие среды пригодны для изучения подвижности и хемотаксиса клеток, культивирования микроаэрофилов. Сыпучие среды представляют собой массу в той или иной степени измельченного и увлажненного сырья (чаще всего, растительного). Основное их назначение – использование в пищевой промышленности (получение соевого соуса), сельском хозяйстве (силосование кормов) и т. д.



При обилии в засеваемом материале микроорганизмов они растут в виде пленки, покрывающей всю поверхность питательной среды. Такой характер микробного роста получил название сплошного, или газонного. Посев газоном производят, когда нужно получить большие количества микробной культуры одного вида.



Из материала, подлежащего посеву в толщу плотной питательной среды, готовят взвесь в стерильной водопроводной воде или в изотоническом растворе. Набирают 0,1—1 мл взвеси в пипетку (в зависимости от степени предполагаемого микробного загрязнения) и выливают в пустую стерильную чашку Петри. Вслед за этим чашку заливают 15 – 20 мл мясопептонного агара, расплавленного и остуженного до температуры 40 – 45 °С.



Выделение чистой культуры включает три этапа:

- получение накопительной культуры,
 - выделение чистой культуры,
- определение чистоты выделенной культуры.



Накопительными называют такие культуры, в которых преобладают микроорганизмы одной группы или даже одного вида. С целью получения накопительных культур создают селективные (избирательные) условия, обеспечивающие преимущественное развитие выделяемых микроорганизмов. При создании селективных условий следует учитывать неодинаковое отношение микроорганизмов к аэрации, температуре, кислотности среды и т.д. При получении накопительных культур следует учитывать и такие особенности выделенных форм, как подвижность, спорообразование, устойчивость к антибиотикам и т.д.



Чистой культурой микроорганизмов называют популяцию микроорганизмов одного вида, полученную из изолированной микробной колонии. Под колонией подразумевается потомство бактерий, возникающее в результате размножения одной микробной клетки. Выделение чистой культуры микроорганизмов является обязательным этапом всякого бактериологического исследования.



Чистая культура необходима для изучения морфологических, культуральных, биохимических и антигенных свойств, по совокупности которых определяется видовая принадлежность исследуемого микроорганизма. Для выделения чистых культур микроорганизмов из материалов, содержащих обильную смешанную микрофлору, предложено много различных методов

