

ЛЕКЦИЯ 10

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ И РОСТ МИКРООРГАНИЗМОВ

~~Д/З 4~~

«Основные типы питательных сред»

«Методы выделения чистых культур микроорганизмов»

[7] Глава 3 стр. 54-61

I. ТРЕБОВАНИЯ, ПРЕДЪЯВЛЯЕМЫЕ К СРЕДАМ

Среды должны:

- быть питательными,
- иметь оптимальную концентрацию водородных ионов – рН,
- обладать буферностью, т.е. содержать вещества, нейтрализующие продукты обмена,
- быть изотоничными для микробной клетки, т.е. осмотическое давление в среде должно быть таким же, как и внутри клетки,
- быть стерильными,
- плотные среды должны быть влажными и иметь оптимальную для микроорганизмов консистенцию,
- обладать определенным окислительно-восстановительным потенциалом,
- быть унифицированными, т.е. содержать постоянные количества отдельных ингредиентов,
- быть прозрачными.

Д/З 4 II. ОСНОВНЫЕ ТИПЫ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД

1. По исходным компонентам различают:

- ***Натуральные среды*** готовят из продуктов животного и растительного происхождения (например, МПБ, неохмеленное пивное сусло, дрожжевая и картофельные среды, почвенный экстракт). Имеют сложный, неопределенный химический состав.
- ***Синтетические среды*** готовят из определенных химически чистых органических и неорганических соединений, взятых в точно указанных концентрациях и растворенных в дважды дистиллированной воде. Наиболее удобны для исследования обмена веществ организмов.
- ***Полусинтетические среды*** относятся к средам неопределенного состава. Их главными составными частями являются углеводы, соли аммония, нитраты, фосфаты и т.д., а компонент неопределенного состава (кукурузный экстракт, дрожжевой автолизат, гидролизат казеина и др.) содержится в относительно низких концентрациях.

2. По консистенции среды бывают:

- **Жидкие** Основой является вода (отвары, экстракты (натуральные среды) или растворы химических веществ и др. компонентов (синтетические и полусинтетические)). При развитии микроорганизмы образуют суспензии, осадок или пленку.
 - **Плотные среды** готовят из жидких, к которым для получения среды нужной консистенции прибавляют обычно агар-агар или желатин. При развитии микроорганизмы образуют колонии. Они используются для:
 - ✓ изучения характера роста и классификации микроорганизмов,
 - ✓ количественного учета микроорганизмов,
 - ✓ выделения чистых культур микроорганизмов при микробиологическом анализе воздуха, воды, почвы и т.д.
 - ✓ пересылки культур микроорганизмов на расстояние,
 - ✓ длительного хранения культур.
- В качестве плотных сред применяют свернутую сыворотку крови, свернутые яйца, картофель, среды с силикагелем.
- **Сыпучие среды** (отруби) применяют для культивирования микроорганизмов в производстве биологически активных веществ

3. По составу среды делят на:

- *Простые.* К ним относят мясопептонный бульон (МПБ), мясопептонный агар (МПА), бульон и агар Хоттингера, питательный желатин и пептонную воду.
- *Сложные.* Среда готовят, прибавляя к простым средам кровь, сыворотку, углеводы и другие вещества, необходимые для размножения того или иного микроорганизма.

4. По назначению:

а) основные среды (общеупотребительные)

служат для культивирования большинства патогенных микробов

б) специальные среды

служат для выделения и выращивания микроорганизмов, не растущих на простых средах

в) элективные (избирательные) среды

предназначены для выделения чистых культур микроорганизмов из среды их естественного обитания (воды, почвы, пищевых продуктов и т.п.). Они задерживают или подавляют рост сопутствующих микроорганизмов. Жидкие среды называют средами накопления.

г) дифференциально-диагностические среды

позволяют быстро отличить (дифференцировать) один вид микробов от другого по ферментативной. Широко применяются в санитарной и медицинской микробиологии.

д) консервирующие среды

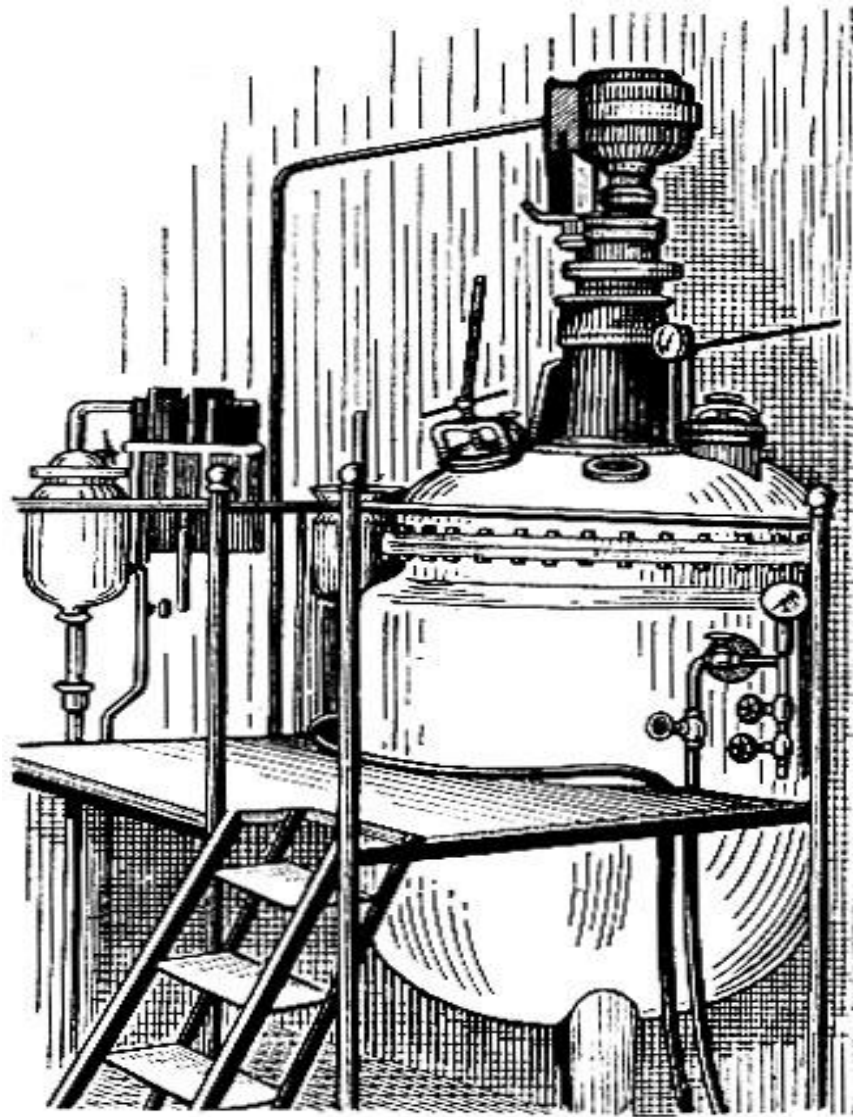
предназначены для первичного посева и транспортировки исследуемого материала. В них предотвращается отмирание патогенных микроорганизмов и подавляется развитие сапрофитов.

III. Приготовление сред

Требования к посуде:

- посуда не должна содержать посторонних веществ (например щелочей, выделяемых некоторыми сортами стекла, или окислов железа, которые могут попасть в среду при варке ее в ржавых кастрюлях).
- лучше всего пользоваться стеклянной, эмалированной или алюминиевой посудой.
- перед употреблением посуду необходимо тщательно вымыть, прополоскать и высушить.
- новую стеклянную посуду предварительно кипятят 30 мин в 1-2% растворе хлороводородной кислоты или погружают в этот раствор на ночь, после чего в течение часа прополаскивают в проточной воде.
- большие количества среды (десятки и сотни литров) готовят в специальных варочных котлах или реакторах.

Общий вид реактора



IV. Этапы приготовления сред:

1) *Варка*

На открытом огне, водяной бане, в автоклаве или варочных котлах, подогреваемых паром.

2) *Установление оптимальной величины рН*

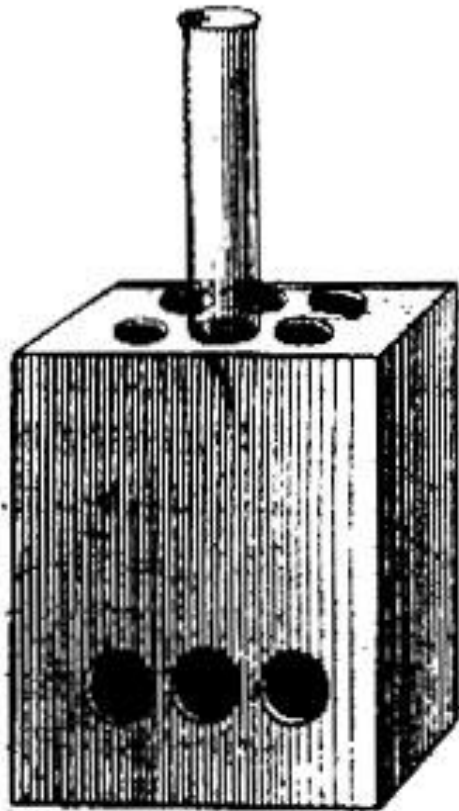
Ориентировочно производят с помощью индикаторных бумажек.

Для точного определения рН пользуются потенциометром, применяя стеклянные электроды в соответствии с инструкцией или **компаратором** (аппарат **Михаэлиса**), состоящим из штатива с гнездами для пробирок и набора стандартов определенного рН.

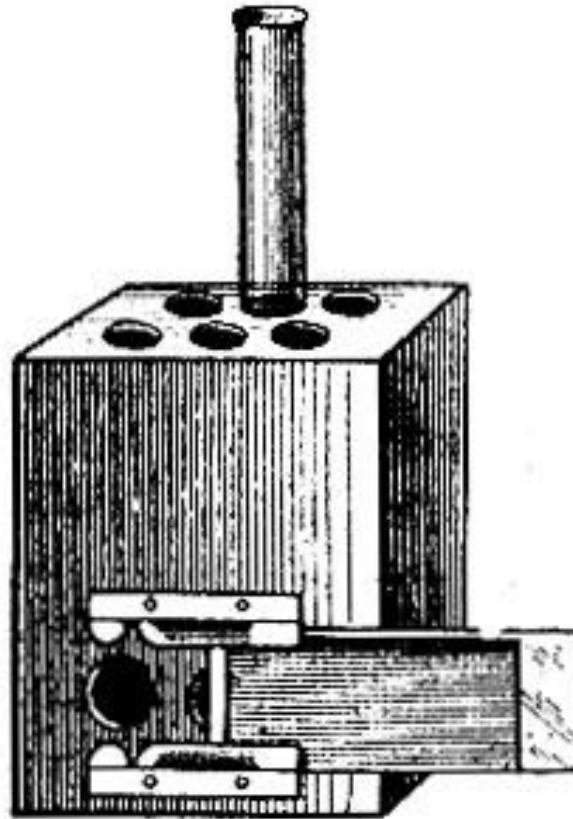
Компаратор (аппарат макро-Михаэлиса).

1 - вид спереди; 2 - вид сзади;

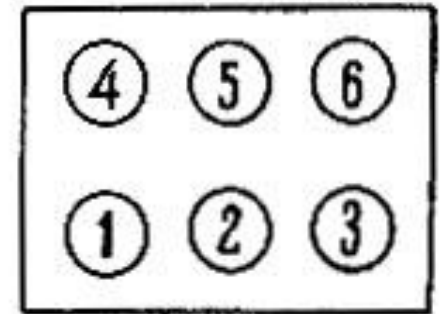
3 - схема расположения пробирок в штативе



1



2



3

3) осветление сред

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

4) Фильтрация сред

Жидкие и расплавленные желатиновые среды фильтруют через влажный бумажный или матерчатые фильтры. Агаровые среды фильтруют через ватно-марлевый фильтр. Можно пользоваться бумажными или матерчатыми фильтрами, если проводить фильтрацию в горячем автоклаве или в воронках с подогревом. Фильтрацию агаровых сред можно заменить отстаиванием.

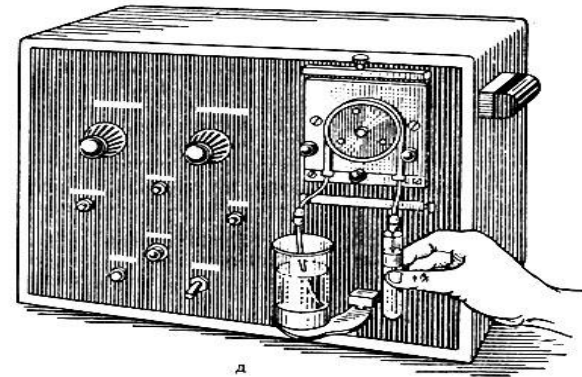
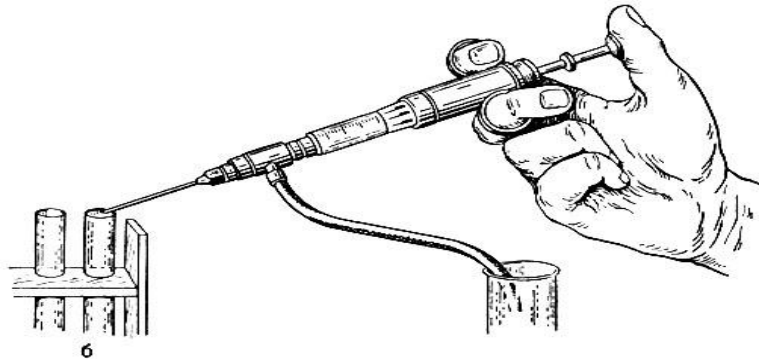
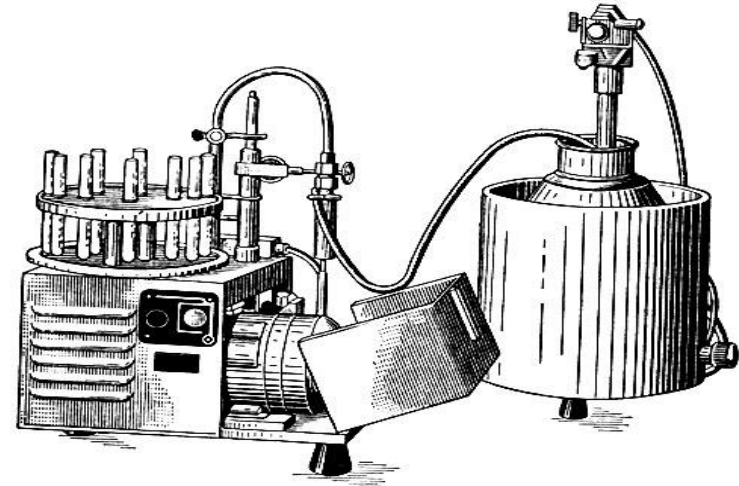
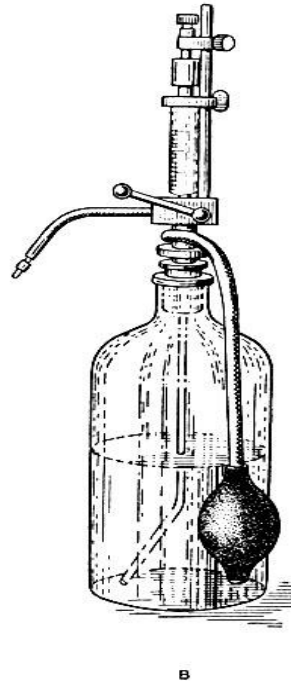
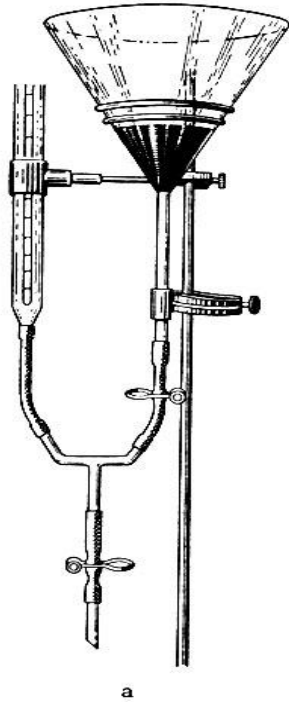
5) Разлив среды

Производится в пробирки (по 3-5 мл или по 10 мл), флаконы, колбы, матрацы и бутылки не более чем на $\frac{2}{3}$ емкости.

Среды, которые стерилизуют при температуре выше 100° С, разливают в чистую сухую посуду.

Среды, стерилизуемые при более низкой температуре, обязательно разливают в стерильную посуду.

Приспособления для мерного разлива сред. а - лабораторный монтаж; б - автоматический шприц-пипетка; в - дозатор; г - полуавтомат; д - автоматический дозатор



6) Стерилизация

¹ (Жидкие среды с углеводами, белками или витаминами лучше стерилизовать с помощью бактериальных фильтров.)

Среды	Режим стерилизации		
	аппарат	температура, давление	время
Простые	Автоклав	120 °С (1 атм)	20 мин
Сложные: 1) с углеводами ¹ , молоком, желатином	Автоклав с не- закрытой крыш- кой или аппарат Коха	100 °С (теку- чий пар)	30—60 мин 3 дня подряд (дробная стерилизация)
2) белковые (сы- вороточные или яичные) с уплотнением	Свертыватель Коха (возмож- ны два режима)	80—85 °С	1 ч 3 дня подряд
		95 °С	1 ч однократ- но
3) белковые ¹ жидкие	Водяная баня или инактиватор	58 °С	1 ч 3—4 дня подряд

7) Контроль готовых сред:

а) для контроля стерильности

- среды ставят в термостат на 2 сут, после чего просматривают.

б) химический контроль:

- окончательно устанавливают рН,
- содержание общего и аминного азота, пептона, хлоридов (их количество должно соответствовать указанному в рецепте).
Производят в химической лаборатории.

в) биологический контроль:

- несколько образцов среды засевают подобранными культурами микроорганизмов, и по их росту судят о питательных свойствах среды.

К готовой среде прилагают этикетку и паспорт, в котором указывают название и состав среды, результаты контроля и др.

Хранят среды при комнатной температуре в шкафах. Некоторые среды в холодильнике.

ЧИСТЫЕ КУЛЬТУРЫ МИКРООРГАНИЗМОВ И ИХ ПОЛУЧЕНИЕ

- **Культивирование** – выращивание микроорганизмов на питательных средах. Вырастают *культуры микроорганизмов*.
- **Чистая культура** – культура микроорганизмов одного вида, представленная потомством одной клетки. Для выделения чистой культуры используют плотные питательные среды, на которых каждая клетка вырастает в виде *изолированной колонии*.
- **Изолированная колония** – потомство микроорганизмов, образовавшееся из одной клетки.
- **Рост культуры** – физиологический процесс, в результате которого увеличивается *биомасса*

ЧИСТЫЕ КУЛЬТУРЫ МИКРООРГАНИЗМОВ И ИХ ПОЛУЧЕНИЕ

- **Биомасса** — масса клеточного вещества данного микроорганизма.
- **Накопительные культуры** состоят преимущественно из клеток микроорганизмов одного вида.
- **Посев** - внесение части исследуемого материала в стерильную питательную среду.
- **Пересев** — перенос части выросшей на питательной среде культуры микроорганизмов на другую свежую питательную среду.
- **Элективные условия** — это условия, которые способствуют развитию одной выделяемой культуры и ограничивают развитие сопутствующих микроорганизмов.

Для изучения морфологических и физиологических свойств определенного вида микроорганизма необходимо выделить микроорганизмы в чистую культуру (изолировать от других видов).

Включает три этапа:

- 1. получение накопительной культуры в элективных условиях**
- 2. выделение чистой культуры**
- 3. определение чистоты выделенной культуры**

1. получение накопительной культуры в элективных условиях.

Элективными условиями могут быть:

- использование элективных сред,
- повышенная температура для термоустойчивых форм,
- повышенная кислотность для кислотоустойчивых и т.д.

В этих условиях происходит преимущественное накопление выделяемой культуры, а сопутствующие микроорганизмы не будут развиваться.

2. выделение чистой культуры

3. определение чистоты выделенной культуры:

- визуальный метод
- микроскопирование
- посев на ряд питательных сред

СПОСОБЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Культивирование можно проводить:

1. **поверхностным или глубинным,**
2. **периодическим или непрерывным методами,**
3. **в аэробных или анаэробных условиях.**

Способ культивирования зависит от конечной цели культивирования:

- ✓ накопление биомассы,
- ✓ получение определенного продукта жизнедеятельности микроорганизма (метаболита).

СПОСОБЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Поверхностный метод – выращивание аэробных микроорганизмов на поверхности жидких и сыпучих питательных сред.

При поверхностном культивировании стараются увеличить площадь соприкосновения среды с воздухом.

- На жидких средах микроорганизмы растут в виде пленок (например, в производстве лимонной кислоты).
- На сыпучих питательных средах поверхностным методом получают ферментные препараты.

СПОСОБЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Глубинный метод – осуществляется на жидких средах, в которых микроорганизмы развиваются во всей толще. Сочетание питательной среды и растущих в ней микроорганизмов называют *культуральной жидкостью*.

Так как микроорганизмы могут утилизировать только растворенный в воде кислород, а растворимость кислорода в воде невелика, то для обеспечения роста аэробных микроорганизмов их необходимо постоянно снабжать кислородом. Процесс подвода кислорода вглубь жидкой среды называется *аэрированием*. Аэрирование осуществляется путем продувания стерильного воздуха через культуральную жидкость.

СПОСОБЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Глубинный метод широко используется для:

- ✓ получения биомассы микроорганизмов (прессованные хлебопекарные дрожжи, кормовые дрожжи)
- ✓ Получения различных продуктов жизнедеятельности микроорганизмов (органических кислот, ферментов, антибиотиков, аминокислот).

Глубинное культивирование продуцентов этих веществ в производстве осуществляют в специальных аппаратах В ферментаторах (объем может достигать 100 м^3 (100 000 л)).

Преимущества глубинного культивирования:

- ✓ способ не требует больших площадей и громоздкого оборудования, объем ферментаторов можно увеличить за счет увеличения высоты;
- ✓ простота обслуживания;
- ✓ возможность автоматизации;
- ✓ удобство выделения целевого продукта из культуральной жидкости.

СПОСОБЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Глубинное культивирование микроорганизмов может быть **периодическим и непрерывным**:

□ Периодический метод культивирования

Весь объем питательной среды засевают чистой культурой и выращивание ведут в оптимальных условиях определенный период времени до накопления нужного количества целевого продукта.

Поскольку культивирование ведется на невозобновляемой питательной среде (в стационарных условиях), клетки все время находятся в меняющихся условиях:

- ✓ Сначала они имеют в избытке все питательные вещества,
- ✓ затем постепенно наступает недостаток питания и отравление вредными продуктами обмена. В связи с этим культура в своем развитии проходит четыре фазы роста и размножения. В течение этих фаз изменяются размеры клеток, скорость размножения, морфологические и физиологические свойства.

Периодический метод культивирования

I - лаг-фаза (фаза задержки роста).

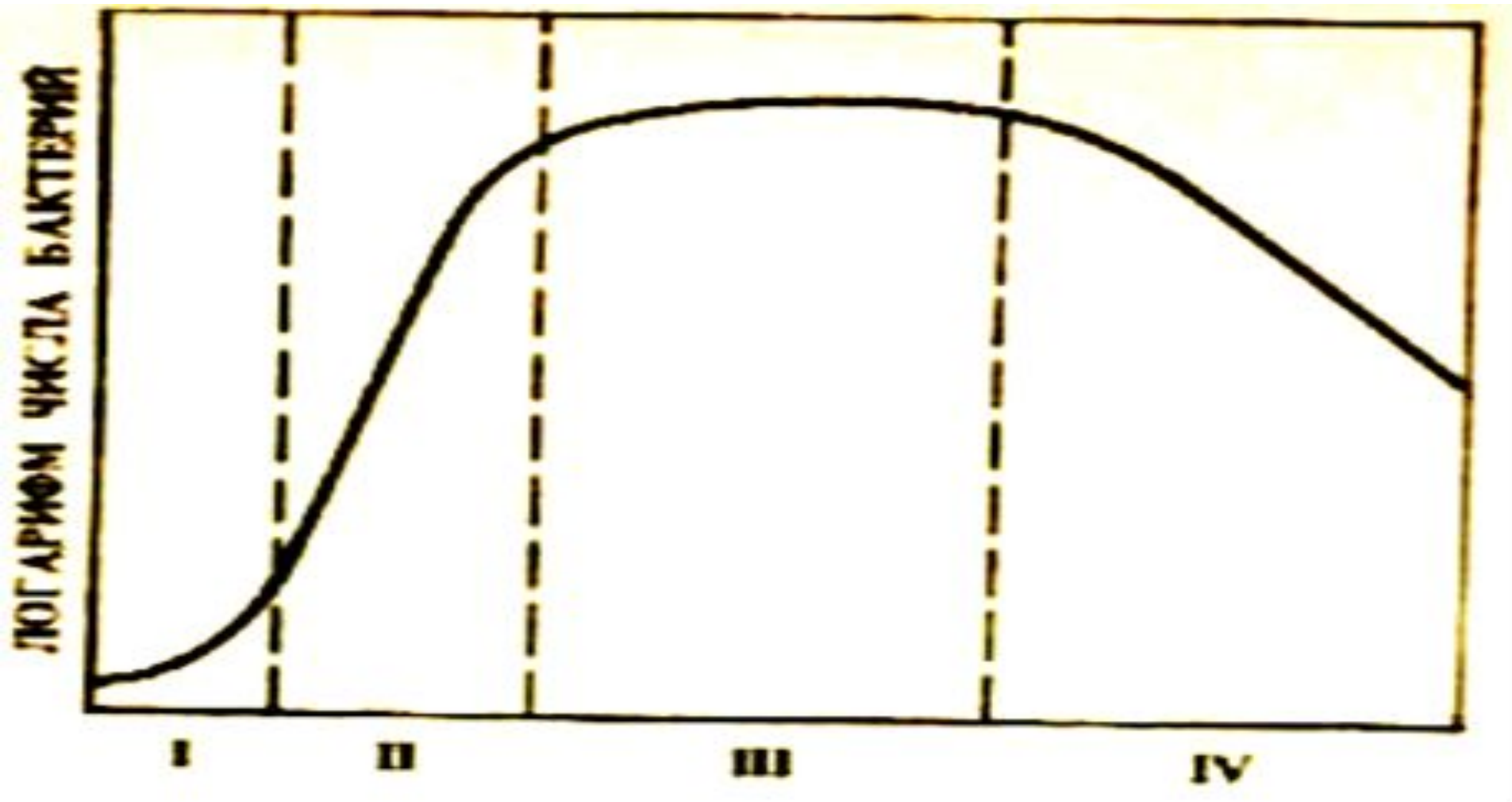
Эта фаза следует непосредственно за внесением посевного материала в питательную среду. Микроорганизмы не размножаются. Они приспосабливаются к среде, происходит повышение содержания нуклеиновых кислот, увеличение размера.

Эта стадия является подготовкой к дальнейшему интенсивному синтезу белка клеткой, т. е. ее росту и размножению.

II - фаза логарифмического роста.

Характеризуется высокой скоростью размножения клеток, так как в среде много питательных веществ и мало вредных продуктов обмена. Время, необходимое для удвоения числа клеток, называется *продолжительностью генерации*. В благоприятных условиях клетки бактерий делятся каждые 20-30 мин., их число увеличивается в геометрической прогрессии (1, 2, 4, 8, 16 и т. д.).

Периодический метод культивирования



Кривая роста бактериальной культуры:

I — лаг-фаза; II — логарифмическая фаза; III — стационарная фаза; IV — фаза отмирания

Периодический метод культивирования

III – стационарная фаза (фаза зрелости).

Размножение микроорганизмов замедляется. Скорости размножения и отмирания уравниваются. В результате - число клеток остается постоянным.

IV - фаза отмирания.

Начинается гибель клеток и их количество снижается за счет отмирания и автолиза (самопереваривания).

Периодический метод культивирования

Осуществляется во многих производствах, основанных на жизнедеятельности микроорганизмов.

Недостаток периодического культивирования :

✓ нерациональные затраты времени на прохождение всех четырех стадий развития культуры, причем период самой активной жизнедеятельности - фаза логарифмического роста - занимает небольшую часть производственного цикла.

СПОСОБЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Метод непрерывного культивирования микроорганизмов:

Культура находится в специальном аппарате. В него постоянно притекает свежая питательная среда и с такой же скоростью отводится *культуральная жидкость*. Посевной материал выращивается до стадии логарифмического роста и вносится в питательную среду. Длительность периода логарифмического роста зависит от:

- ✓ количества питательных веществ в среде,
- ✓ количества вредных продуктов обмена, выделяемых клеткой.

При большой скорости притока среда быстро обновляется, питательные вещества не успевают исчерпаться, продукты обмена не успевают накопиться и культура поддерживается долго в активном состоянии, не достигая стадии отмирания.

Метод непрерывного культивирования имеет ряд преимуществ по сравнению с периодическим способом.

Метод непрерывного культивирования

- ✓ широко используется в пищевой и микробиологической промышленности,
- ✓ создает возможность автоматического поддержания заданных оптимальных условий. Благодаря этому обеспечивается стандартность готового продукта при наименьших затратах.

Метод непрерывного культивирования

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

1. если цель культивирования - *получение биомассы продуцента*, то 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 хемотрата (турбидостата).

2. Если целью культивирования является *получение метаболита* (например, этилового спирта) - применяется способ непрерывного выращивания в двух или нескольких последовательно соединенных аппаратах (позволяет расчленить процесс на несколько стадий).

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ АЭРОБНЫХ И АНАЭРОБНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Микроорганизмы по-разному относятся к молекулярному кислороду. Это определяет различия в способах их культивирования.

1. Культивирование аэробных микроорганизмов:

- проводят на поверхности плотных сред или в тонком слое жидких сред, когда микроорганизмы получают кислород непосредственно из воздуха;
- в жидких средах (глубинное культивирование). В этом случае микроорганизмы используют растворенный в среде кислород (требуется постоянное аэрирование).

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ АЭРОБНЫХ И АНАЭРОБНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

2. Культивирование анаэробных микроорганизмов более сложно, чем выращивание аэробов (должен быть минимальным контакт микроорганизмов с молекулярным кислородом).

Микроорганизмы культивируют в замкнутом пространстве и используют *физические, химические и биологические методы* создания анаэробных условий:

- **К физическим методам** относится культивирование в микроанаэроостате. Это вакуумный аппарат для выращивания микроорганизмов, в котором воздух замещен газовой смесью (часто это такой состав: азот с 5% CO₂ и 10% H₂).
- **К химическим методам относится:**
 - 1) использование химических веществ, поглощающих молекулярный кислород (щелочной раствор пиригалиола, дитионит натрия (Na₂S₂O₄), металлическое железо и др.).
 - 2) использование восстанавливающих агентов, которые добавляют в большинство сред для снижения окислительно-восстановительного потенциала среды: тиогликолат натрия, цистеин, аскорбиновая кислота.

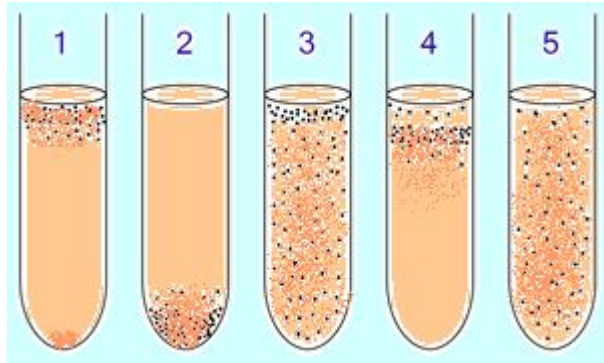
КУЛЬТИВИРОВАНИЕ АЭРОБНЫХ И АНАЭРОБНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

- **К биологическим методам** создания анаэробных условий **относится:**
 - ✓ выращивание совместно с аэробными или факультативно анаэробными бактериями. Например, питательную среду в чашке Петри разделяют желобком на две половины, на одну половину засевают какой-либо аэробный микроорганизм, на другой - анаэроб. Края чашки заливают парафином. Рост анаэробного микроорганизма начнется только после полного использования кислорода аэробом.
 - ✓ выращивание в высоком слое среды;
 - ✓ выращивание в толще плотной среды;
 - ✓ культивирование в вязких средах, в которых диффузия молекулярного кислорода в жидкость уменьшается с увеличением ее плотности;
 - ✓ заливка среды с посевом высоким слоем стерильного вазелинового масла или парафина.

Спасибо за внимание!

Аэробные и анаэробные бактерии предварительно идентифицируются в жидкой питательной среде по градиенту концентрации O_2 :

1. Облигатные аэробные бактерии в основном собираются в верхней части пробирки, чтобы поглощать максимальное количество кислорода. (Исключение: микобактерии - рост пленкой на



поверхности из-за восколипидной мембраны.

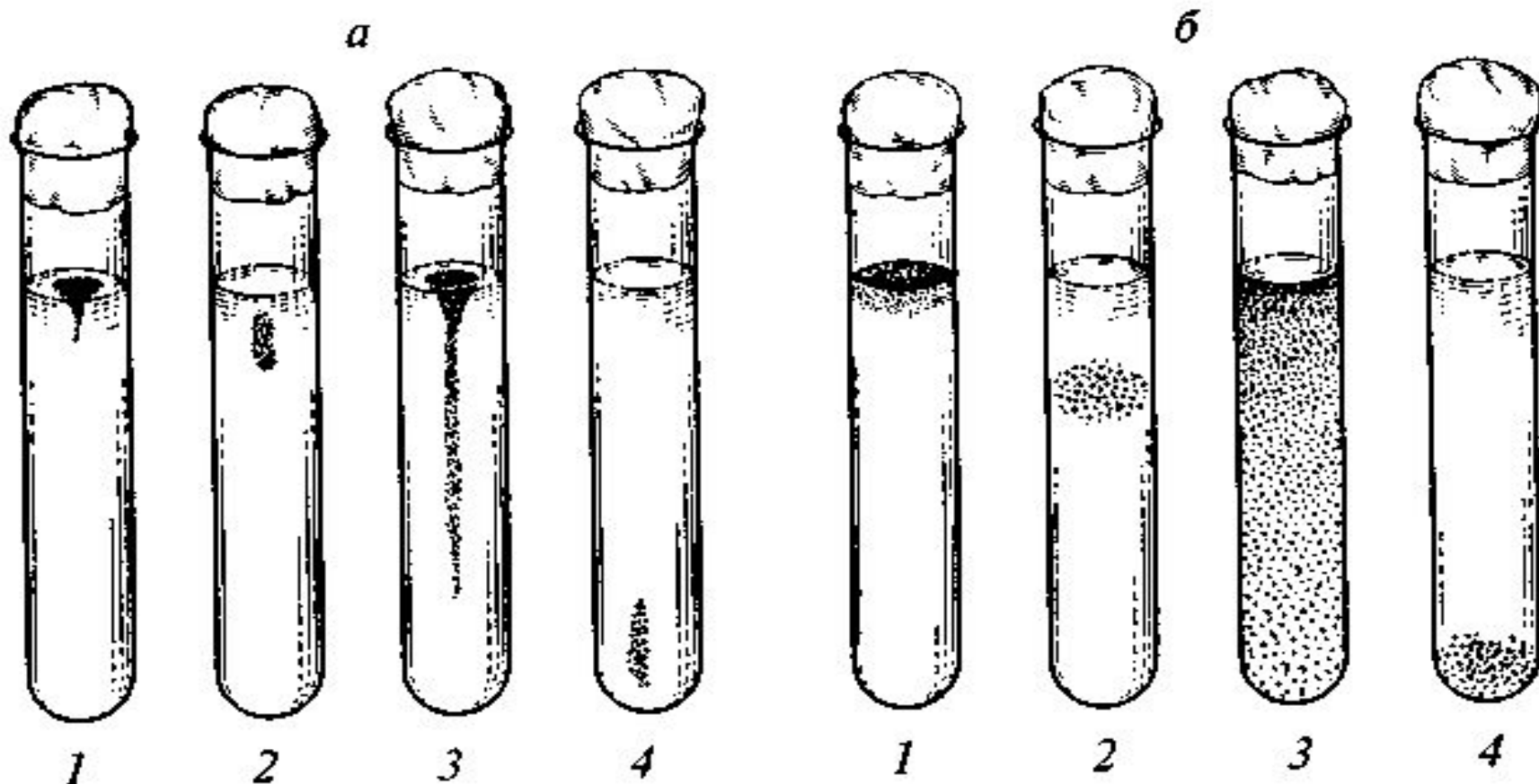
2. Облигатные анаэробные бактерии собираются в нижней части, чтобы избежать кислорода (либо не дают роста).

3. Факультативные бактерии собираются в основном в верхнем, однако они могут быть найдены на всем протяжении среды, так как от O_2 не зависят.

4. Микроаэрофилы собираются в верхней части пробирки, но их оптимум - малая концентрация кислорода.

5. Аэротолерантные анаэробы не реагируют на концентрации кислорода и равномерно распределяются по пробирке

Отношение к молекулярному кислороду



Рост микроорганизмов при посеве уколом (а). Рост микроорганизмов при посеве в расплавленную плотную среду (б)

1 – аэробы; 2 – микроаэрофилы; 3 – факультативные анаэробы; 4 – анаэробы

Строгие аэробы растут на поверхности среды и в верхнем слое, *микроаэрофилы* – на некотором расстоянии от поверхности. *Факультативные анаэробы* обычно развиваются по всей толще среды. *Строгие анаэробы* растут только в глубине среды, у самого дна пробирки.

ТЕХНИКА И МЕТОДЫ ПОСЕВА МИКРООРГАНИЗМОВ

Для посевов применяют микробиологические петли, реже - иглы и шпатели.

Чаще всего для культивирования используются пробирка и чашка Петри.

Универсальным инструментом для засева культуры является бактериальная петля. Помимо неё, для посева уколом применяют специальную бактериальную иглу, а для посевов на чашках Петри — металлические или стеклянные шпатели.

Для посевов жидких материалов наряду с петлёй используются градуированная и пастеровская пипетки.

ТЕХНИКА И МЕТОДЫ ПОСЕВА МИКРООРГАНИЗМОВ

1. Посев в жидкую питательную среду.
2. Посев на поверхность плотной питательной среды (поверхностный посев):
 - а) сплошной посев;
 - б) посев штрихом петлей;
 - в) посев штрихом на скошенную поверхность питательной среды петлей или иглой.
3. Посев уколом в столбик питательной среды
4. Глубинный метод посева в плотные среды.

МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР

1. Метод разведений

Из исследуемого посевного материала делают ряд последовательных разведений в жидкой питательной среде: 1 мл посевного материала вносят в пробирку с РПБ, из нее 1 мл переносят в следующую пробирку и так до 8-10 пробирок.

2. Чашечный метод

В стерильную чашку Петри стерильной пипеткой вносят 1 или 0,1 мл исследуемого материала, заливают расплавленным и охлажденным до температуры 45-50 С РПА.

3. Метод Дригальского (метод фракционированного посева)

Основан на механическом разобщении микробных клеток на поверхности плотной питательной среды.

4. Метод фильтрации

Основан на пропускании исследуемого материала через специальные фильтры с порами определенного диаметра и разделении содержащихся в нем микроорганизмов разной величины. Применяют для отделения вирусов от бактерий.

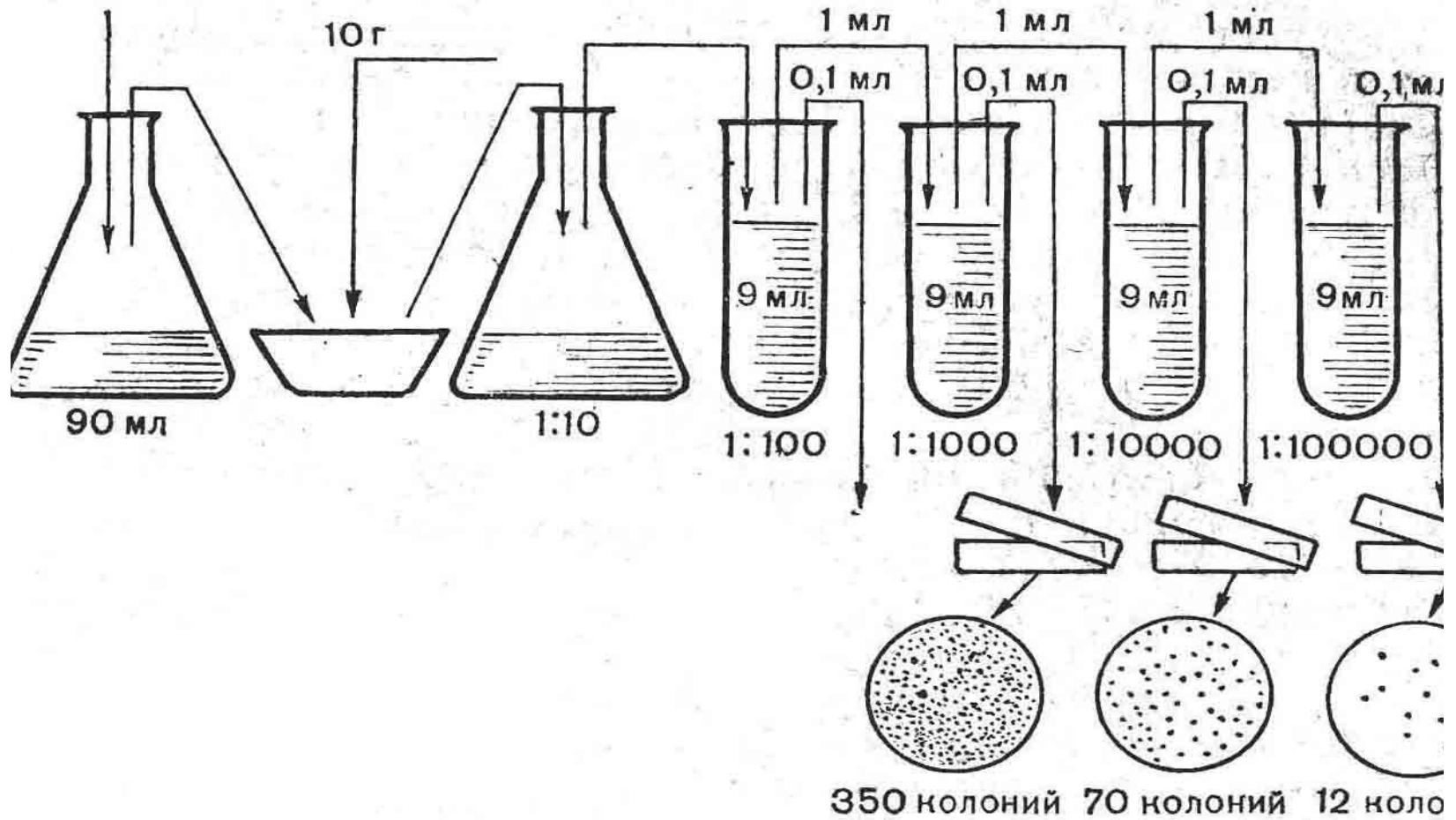
5. С помощью нагревания

Применяется для выделения чистых культур, споровых форм бактерий (гнилостные, масляно-кислые бактерии). Перед посевом исследуемый материал прогревают на водяной бане при 80 С в течение 20-30 мин. При этом вегетативные клетки погибают, их споры остаются живыми и при последующих высевах на плотную среду прорастают в колонии.

6. С помощью микроманипулятора –

Это прибор, который позволяет с помощью микропипетки или микропетли извлекать одну клетку из суспензии. Эту операцию контролируют под микроскопом.

1. МЕТОД РАЗВЕДЕНИЙ



2. ЧАШЕЧНЫЙ МЕТОД



3. МЕТОД ДРИГАЛЬСКОГО

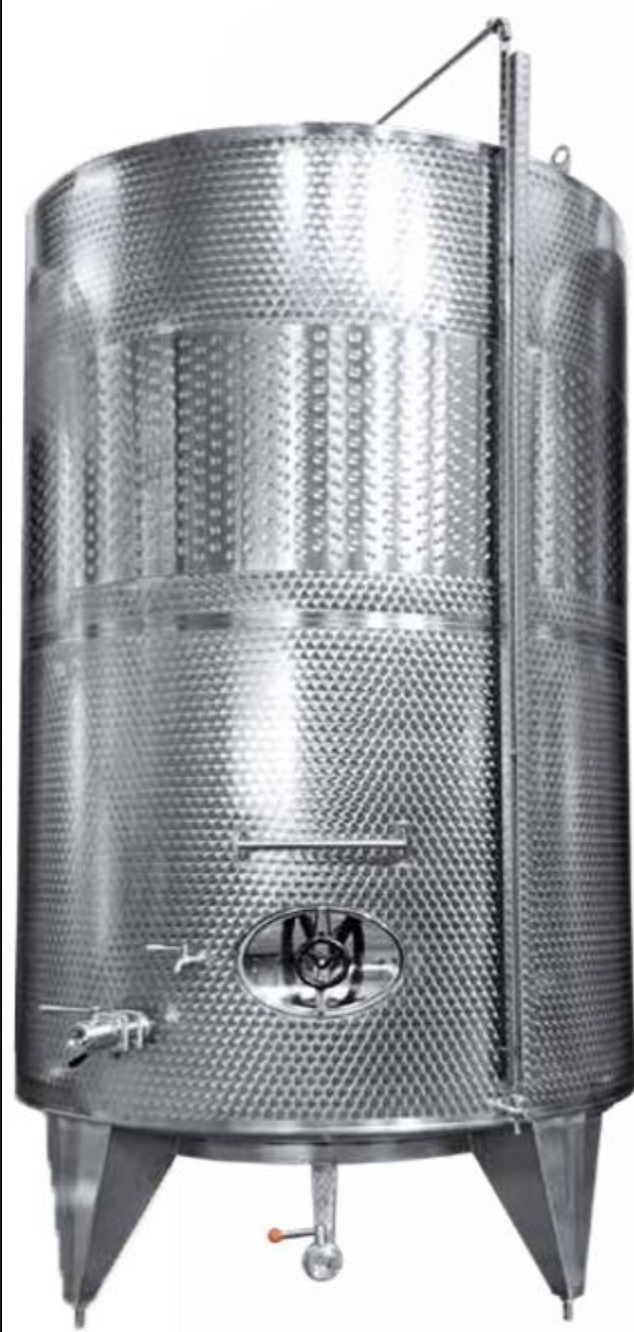
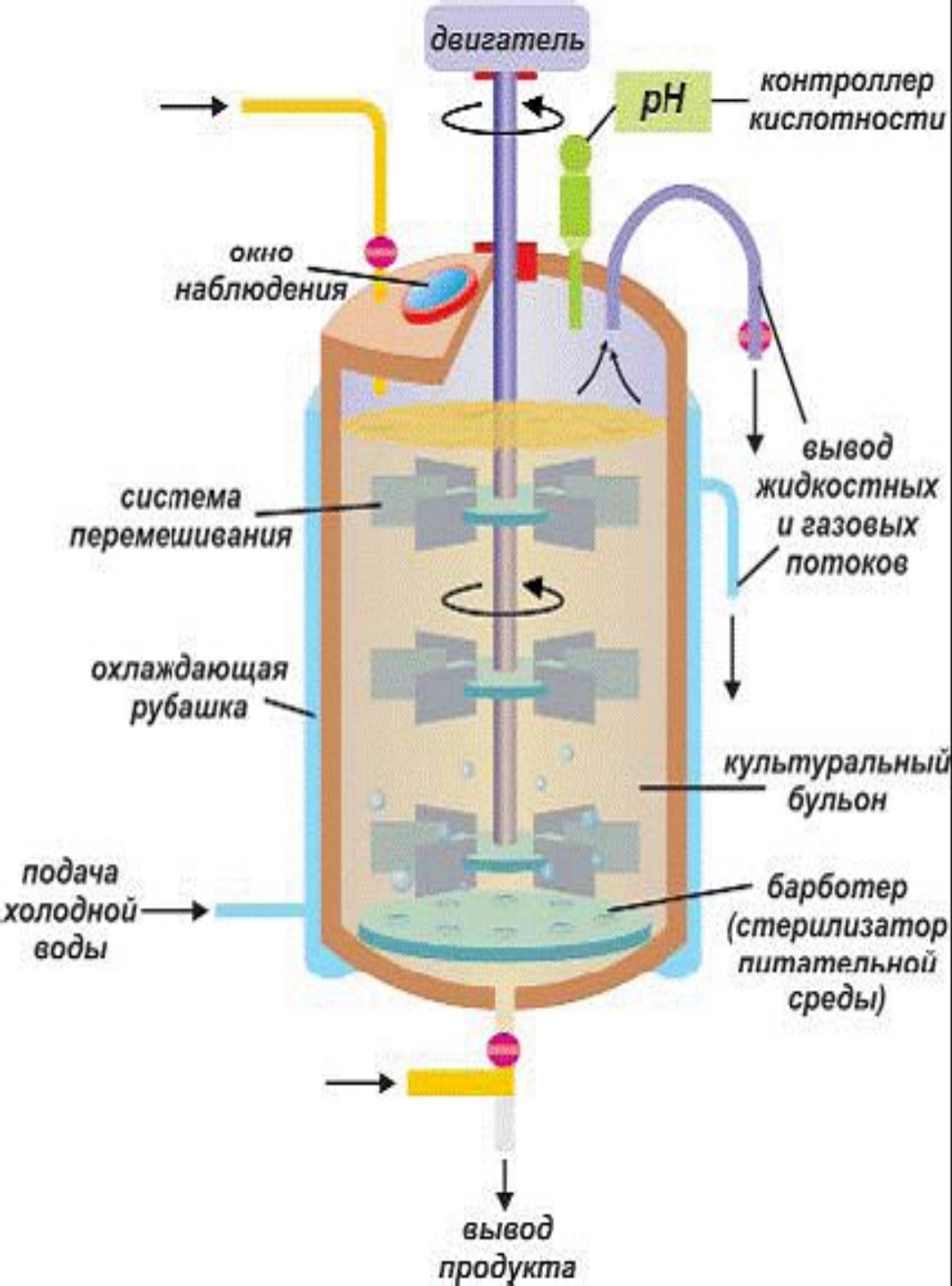


4. Метод фильтрации

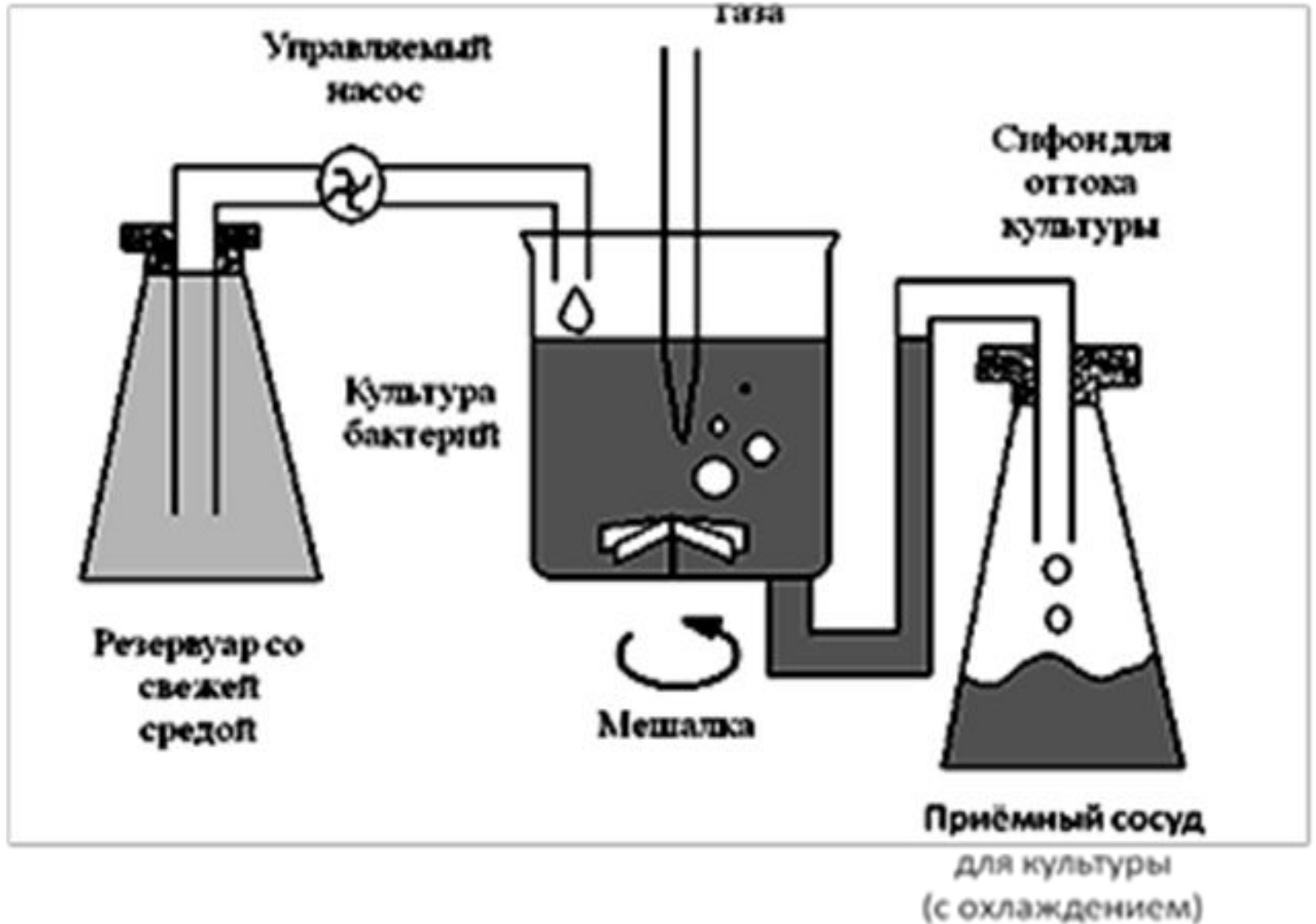


6. Микроманипулятор





ХеMOSTат



Микроанаэростат

