

# КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ

## ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

В лабораторных условиях микроорганизмы культивируются на питательных средах, поэтому питательная среда должна содержать все вещества, необходимые для их роста. Конструктивные и энергетические процессы у микроорганизмов разнообразны, поэтому разнообразны и их потребности в питательных веществах. Из этого следует, что универсальных сред, одинаково пригодных для роста всех микроорганизмов, не существует.

Основными компонентами любой питательной среды для культивирования микроорганизмов являются соединения углерода и азота, именно эти соединения определяют специфичность большинства питательных сред. Помимо источников углерода и азота многие микроорганизмы требуют наличия в среде так называемых факторов роста, к которым относятся витамины, аминокислоты и азотистые основания. Примерами смесей, содержащих различные факторы роста, могут служить дрожжевой автолизат, дрожжевой и кукурузный экстракты. Для построения веществ клетки микроорганизмам необходимы также сера, фосфор, калий, натрий, железо и другие элементы. Потребности микроорганизмов в этих элементах удовлетворяются обычно за счет минеральных солей. Таким образом, "минеральный фон" сред для культивирования многих микроорганизмов может быть близким по составу. Питательные среды должны быть сбалансированы по составу, изотоничными по концентрации растворенных веществ, иметь оптимальные влажность, вязкость, реакцию среды (рН), окислительно-восстановительный потенциал.

Питательные среды для культивирования микроорганизмов принято классифицировать по ряду признаков.

**По составу** среды делят на две группы: натуральные (естественные) неопределенного состава и синтетические.

*Натуральными* называются среды, состоящие из продуктов растительного и животного происхождения: овощные, фруктовые соки, молоко, животные ткани, разведенная кровь, экстракты, полученные из природных субстратов. На натуральных средах хорошо развиваются многие микроорганизмы, так как в этих средах имеются, как правило, все компоненты, необходимые для их роста и развития. Однако данные среды мало пригодны для изучения физиологии обмена веществ микроорганизмов, поскольку они имеют сложный и непостоянный химический состав. Примерами натуральных сред неопределенного состава, которые широко применяются в лабораторной практике, служат мясопептонный бульон (МПБ), неохмеленное пивное сусло, дрожжевая и картофельная среды, почвенная вытяжка, кукурузный экстракт.

*Синтетическими* называют среды, в состав которых входят только определенные химически чистые соединения, взятые в точно указанных концентрациях. Эти среды наиболее удобны для исследования обмена веществ микроорганизмов. В настоящее время микробиологи располагают синтетическими средами, не уступающими по своему составу натуральным.

**По назначению** различают *элективные*, *дифференциально-диагностические* (индикаторные) среды и *универсальные* (основные или стандартные). К *универсальным* средам относят среды, благоприятные для выращивания многих видов микроорганизмов: мясопептонный бульон, неохмеленное пивное сусло и другие. *Элективные* среды обеспечивают преимущественное развитие одного вида или группы микроорганизмов и менее пригодны или даже совсем не пригодны для развития других. Эти среды применяют для выделения микроорганизмов из мест их естественного обитания или для получения накопительных культур. *Индикаторные* среды позволяют достаточно быстро отличить один вид микроорганизмов от других. Эти среды применяются в клинической бактериологии, при генетических исследованиях, а также для идентификации микроорганизмов.

**По консистенции** различают жидкие, плотные и сыпучие среды. Жидкие применяются для выяснения физиолого-биохимических особенностей микроорганизмов, для накопления биомассы или продуктов обмена; плотные - для выделения чистых культур (получения изолированных колоний), для хранения культур, количественного учета микроорганизмов и т.д.; сыпучие (разваренное пшено, отруби, кварцевый песок, пропитанный питательным раствором) - в микробиологической промышленности.

Для уплотнения сред употребляют агар-агар, желатину, кремнекислый гель (селикагель).

*Агар-агар* используют особенно часто. Это сложный полисахарид, получаемый из некоторых морских водорослей. Большинство микроорганизмов не используют его в качестве питательного субстрата. В воде агар-агар образует гели, плавящиеся при 100 °С, а затвердевающие при 40 °С. Чаще всего агар-агар добавляют к средам в количестве 2%. Среду с внесенным в нее агаром нагревают на кипящей водяной бане до полного расплавления агара.

Если микроорганизмы необходимо выращивать на скошенной агаризованной среде в пробирках, то расплавленную агаризованную среду разливают в пробирки (до 1/3 ее высоты), стерилизуют, затем "скашивают". Для этого пробирки с расплавленной средой устанавливают в наклонном положении и дают среде застыть. Расстояние от среды до ватной пробки должно составлять 5-6 см.

Среду, предназначенную для выращивания микроорганизмов в чашках Петри, стерилизуют, а затем стерильно разливают в стерильные чашки по 20-30 мл.

*Желатина* - это белок, получаемый при вываривании костей и хрящей животных. Желатиновый гель плавится при температуре 23-26 °С (эта температура ниже температуры культивирования многих микроорганизмов: 30-37 °С). Кроме того, желатина разжижается протеолитическими ферментами, выделяемыми некоторыми микроорганизмами в среду. Эти свойства желатины ограничивают ее применение в качестве уплотнителя сред.

Желатину добавляют к жидким питательным средам в количестве 10-15 %. Ее используют главным образом для выявления протеолитической активности микроорганизмов.

*Кремнекислый гель (силикагель)* применяют как твердую основу для синтетических сред. Приготавливают его путем смешения равных объемов соляной кислоты (удельная масса 1,1) и жидкого стекла ( $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  или  $\text{K}_2\text{SO}_3$ ) с последующей разливкой по 25—30 мл в чашки Петри и выдержкой в течение 1—2 ч. Образовавшийся гель отмывают сначала проточной, затем горячей дистиллированной водой для удаления хлоридов.

### **Приготовление питательных сред**

Для приготовления питательных сред применяют чистую посуду, не содержащую посторонних веществ. Лучше пользоваться стеклянной посудой (колбы, флаконы, стаканы, матрацы, пробирки и другие). Новую стеклянную посуду моют и погружают на 8—10 ч в 1—2 %-ный раствор соляной или серной кислоты или кипятят в подкисленной воде, затем тщательно прополаскивают дистиллированной водой и сушат. Бывшую в работе посуду моют ершами или щетками в теплой воде, применяя кальцинированную соду, мыльный раствор, полужидкое мыло или синтетические моющие средства, прополаскивают сначала проточной водопроводной, затем дистиллированной водой. Очень загрязненную посуду со следами жира обрабатывают хромовой смесью и тщательно промывают водой. Сушат посуду при комнатной температуре или в сушильном шкафу, закрывают ватными пробками с бумажными колпачками и хранят в защищенном от пыли месте.

Жидкие питательные среды фильтруют через бумажный или полотняный фильтр и разливают в пробирки при помощи воронок с короткой резиновой трубкой, зажимом Мора и стеклянным наконечником. Для уплотнения жидких сред в них вносят необходимое количество агара и нагревают на кипящей водяной бане до полного растворения. Расплавленные агаризованные среды

фильтруют через ватно-марлевые фильтры и разливают через металлические двустенные воронки для горячего фильтрования. Для получения скошенного агара пробирки заполняют на 1/2 их высоты, для залива чашек — на 2/3 (лучше использовать пробирки большего объема), после чего стерилизуют. Можно, не разливая по пробиркам, стерилизовать среду в колбах. Пробирки и колбы перед стерилизацией закрывают ватными пробками. После стерилизации пробирки для скошенного агара устанавливают в наклонном положении и оставляют для застывания. Среда не должна доходить до ватной пробки на 5-6 см.

Добавляемую в жидкие питательные среды желатину оставляют для набухания на 10-15 мин, после чего нагревают на водяной бане до полного растворения.

Стерилизуют среды с желатиной при 0,05 МПа в течение 15 мин, избегая повторных стерилизаций, особенно при рН среды ниже 6,0 или выше 7,3.

Хранят стерильные питательные среды в прохладном, умеренно сухом помещении, в плотно закрытых шкафах, защищающих от действия света и высыхания. В сырых помещениях ватные пробки впитывают влагу, что приводит к развитию мицелиальных грибов, которые впоследствии могут попасть внутрь колб и пробирок. Каждую колбу со средой снабжают этикеткой с обозначением ее состава (или названия) и датой приготовления.

#### **МЕТОДЫ СТЕРИЛИЗАЦИИ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД, ПОСУДЫ И ИНСТРУМЕНТОВ**

Стерилизация - один из важнейших приемов в микробиологической практике. Под стерилизацией понимают уничтожение всех микроорганизмов. Микробиологи стерилизуют питательные среды, посуду, инструменты с целью не допустить развития посторонних микроорганизмов в исследуемых культурах.

**Стерилизацией** (*sterilis* — бесплодный) называют полное уничтожение вегетативных клеток микроорганизмов и их спор в каком-либо материале (питательной среде, посуде, приборе, инструменте, перевязочном материале и т. д.). Выбор способа стерилизации зависит от свойств стерилизуемого объекта. От стерилизации следует отличать **частичное обеспложивание (пастеризацию)** при которой погибают в основном вегетативные клетки микроорганизмов.

**Асептика** — система мероприятий, предупреждающих внесение (попадание) посторонних микроорганизмов из окружающей среды в материал для исследования, в питательные среды и культуры микроорганизмов при лабораторных исследованиях. Асептика предусматривает стерилизацию инструментов и материалов, соблюдение особых санитарно-гигиенических правил и приемов работы.

**Антисептика** – комплекс мероприятий, направленных на уничтожение микроорганизмов, способных вызвать инфекционный процесс. В качестве антисептиков используются различные химические соединения, оказывающие антимикробное действие: 70 %-ный этиловый спирт, 5 %-ный спиртовой раствор йода, 0,5-2 %-ный раствор хлорамина, различные детергенты.

**Дезинфекция** – обеззараживание объектов окружающей среды: уничтожение патогенных для человека и животных микроорганизмов с помощью химических веществ, обладающих антимикробным свойством. К наиболее распространенным дезинфицирующим веществам относятся хлорная известь (0,1-10 %-ный раствор), хлорамин (0,5-5 %-ный раствор), фенол или карболовая кислота (3-5 %-ный раствор).

Существует много способов стерилизации, целесообразность применения каждого из них определяется особенностями материала, подлежащего стерилизации, его физическими свойствами, химическим составом, целью исследования.

Полная или частичная стерилизация осуществляется с помощью влажного жара, сухого жара, фильтрации, облучения или различных химических агентов.

### **Стерилизация питательных сред**

*Автоклавирование* - наиболее надежный способ стерилизации питательных сред. Он основан на нагревании материала насыщенным водяным паром при давлении выше атмосферного. Создание избыточного давления возможно только при высокой температуре.

Совместное действие высокой температуры и давление пара обеспечивает высокую эффективность данного способа (погибают вегетативные клетки и споры микроорганизмов).

*Таблица - Температура насыщенного пара при различных давлениях*

Давление	Т °С	Давление	Т °С
0,00	100	0,15	128
0,05	112	0,20	134
0,10	121	0,30	144

Стерилизацию паром под давлением осуществляют в специальных герметически закрывающихся толстостенных аппаратах - автоклавах, представляющих собой металлический двустенный резервуар (рис.1).

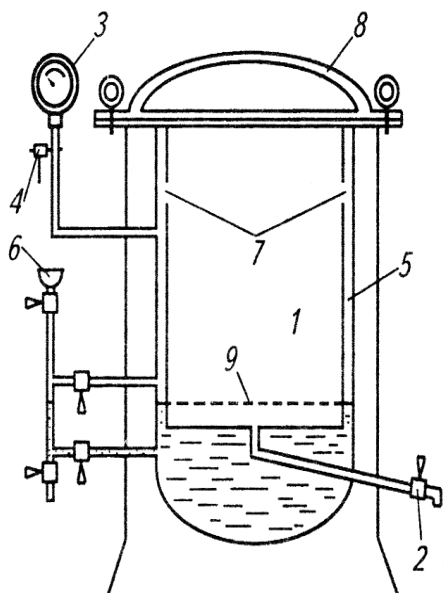


Рис.1 – Схема автоклава: 1 – стерилизационная камера; 2 – кран для выхода воздуха; 3 – манометр; 4 – предохранительный клапан; 5 – водопаровая камера; 6 – воронка для заполнения автоклава водой; 7 – отверстия для поступления пара в стерилизационную камеру; 8 – крышка автоклава; 9 – подставка для размещения стерилизуемых материалов.

Автоклав работает при высоких давлениях и температурах, и к его обслуживанию допускают только специально подготовленных лиц. При работе с автоклавом строго соблюдают правила, указанные в прилагаемой к аппарату инструкции. Подготовку автоклава к работе и процесс стерилизации осуществляют следующим образом. Тщательно проверяют исправность аппарата. В водопаровую камеру через воронку заливают дистиллированную воду до тех пор, пока ее уровень не дойдет до верхней метки водомерного стекла. После этого кран перекрывают. Питательные среды в пробирках или колбах, закрытых ватными пробками с бумажными колпачками, завернутую в бумагу посуду и другой стерилизуемый материал помещают на решетчатую подставку и накрывают бумагой. Автоклав закрывают крышкой, равномерно завинчивают зажимы, не допуская перекосов и неплотностей. Открывают спускной кран пароотводной трубы, включают автоклав в электрическую сеть и начинают прогрев. Образующийся пар должен вытеснить из автоклава весь воздух, так как температура чистого насыщенного пара выше температуры смеси пара с воздухом. После полного удаления воздуха и влажного пара непрерывную струю свистящего сухого пара выпускают еще 10—15 мин и перекрывают спускной кран. Пар выпускают через резиновый шланг, надетый на пароотводную трубу и опущенный в сосуд с водой. За повышением рабочего давления в автоклаве следят по манометру. Время стерилизации отсчитывают с момента установления необходимого давления.

По истечении времени стерилизации автоклав выключают из электрической сети, нагревание прекращают и ждут момента, когда давление по манометру упадет до нуля. Только после этого можно открыть спускной кран, осторожно выпустить из автоклава остаток пара, затем отвинтить и откинуть крышку. Если спускной кран открыть раньше, чем стрелка займет нулевое

положение, может произойти бурное вскипание жидких сред и смачивание ватных пробок. Резкое снижение давления может привести к выталкиванию пробок и даже выплескиванию жидкости из сосудов. Нельзя преждевременно отвинчивать и открывать крышку, так как вырывающиеся струи пара могут вызвать ожоги обслуживающего персонала и окружающих. Автоклав дают несколько остыть и вынимают простерилизованный материал. Оставлять автоклав закрытым до полного охлаждения не рекомендуется, так как пар конденсируется, и влага пропитывает ватные пробки. В нерабочем состоянии автоклав держат открытым и свободным от воды. Для проверки стерильности питательные среды помещают на 2—3 суток в термостат при 30 °С, и если обнаруживают рост микроорганизмов, среды готовят заново.

Для контроля соответствия показаний манометра температуре внутри автоклава пользуются веществами, имеющими определенную точку плавления. Например, бензолафтол плавится при 110 °С, антипирин — при 113 °С, резорцин и сера — при 119 °С, бензойная кислота — при 120 °С. В стеклянную ампулу или пипетку Пастера длиной 5—6 см, запаивную с одного конца, насыпают одно из указанных веществ, и прибавляют несколько кристаллов сухого анилинового красителя (фуксина, сафранина или метиленового синего). Трубочку запаивают и помещают в автоклав между стерилизуемыми предметами. Если температура соответствует давлению, контрольное вещество расплавится и окрасится в цвет взятого красителя.

Температура и продолжительность автоклавирования определяются составом питательных сред и их рН. Субстраты, легко разрушающиеся при нагревании до 120 °С, стерилизуют при 0,05 МПа. При кислой реакции некоторые вещества, входящие в состав питательной среды, в процессе автоклавирования гидролизуются. Во избежание этих явлений, растворы некоторых компонентов (сахара, многоатомные спирты, витамины, аминокислоты) стерилизуют отдельно при значениях рН, обеспечивающих их устойчивость, и добавляют после стерилизации. Такой способ обеспложивания называется раздельной стерилизацией.

*Стерилизация текущим паром (дробная стерилизация).* Данный способ применяют для стерилизации питательных сред, изменяющих свой состав и свойства под действием температур выше 100°С. Сущность дробной стерилизации состоит в том, что нагревание среды (или ее компонентов) проводят при 100 °С три раза по 30 мин трое суток подряд. Кратковременное прогревание среды кипячением уничтожает в основном термолабильные вегетативные клетки микроорганизмов. Поэтому между нагреваниями питательные среды выдерживают при комнатной температуре (или в термостате

при 30 °С) и дают возможность прорасти оставшимся жизнеспособным спорам. Образовавшиеся из термоустойчивых спор вегетативные клетки погибают при повторном кипячении. Продолжительность нагревания может быть увеличена до 45—60 мин, что зависит от объема жидкости.

Дробную стерилизацию питательных сред проводят в аппарате Коха или в автоклаве с закрытой, но незавинченной крышкой. Так как нагревание ведут в парах кипящей воды, способ называют стерилизацией текучим паром. Дробной стерилизации подвергают среды, в состав которых входят сахара, многоатомные спирты, желатина.

*Стерилизация путем прерывистого нагрева* была предложена английским физиком Джоном Тиндалем и получила название *тиндализации*. Среда, необратимо изменяющиеся при кипячении, осторожно прогревают при более низкой температуре: при 60—80 °С в течение 5 суток подряд по 30—60 мин или при 56—58 °С на протяжении 6—7 суток, в первые сутки — 2 ч, в последующие — по 1 ч. Температурную обработку сред ведут на водяной бане или в ультратермостате, где температура автоматически поддерживается на определенном уровне с помощью специального устройства. В промежутках между нагревами среды выдерживают в обычном термостате при 30 °С.

*Пастеризация.* Пастеризация, или неполная стерилизация, предложена Луи Пастером. Она предназначена для уничтожения в основном аспорогенных микроорганизмов однократным прогреванием при температуре 60—75 °С и выдержке 15—30 мин или при 80 °С в течение 10—15 мин. Пастеризации подвергают продукты и среды, которые при воздействии более высоких температур претерпевают глубокие изменения, теряют качество и питательную ценность. Пастеризацию широко применяют в пищевой промышленности.

*Стерилизация фильтрованием.* Стерилизацию жидких питательных сред, не выдерживающих даже незначительного нагревания, производят фильтрованием через специальные мелкопористые бактериальные фильтры. На бактериальных фильтрах задерживаются механические взвешенные примеси, в том числе и клетки микроорганизмов. Исключение составляют вирусы и фаги. Фильтрованию подвергают среды с белками, антибиотиками, витаминами, летучими веществами, а также культуральные жидкости с целью освобождения от клеток и сохранения всех продуктов метаболизма в неизменном виде. Фильтры изготовляют из положительно заряженных материалов. Поэтому на стенках пор фильтров возникает соответствующий электроположительный заряд. Вследствие того, что большинство микроорганизмов в водных растворах



несет на своей поверхности электроотрицательный заряд, при фильтрации имеет место не только механическая задержка клеток, но и их адсорбция.

Бактериальные фильтры изготовляют различной формы, из разного материала и с разным диаметром пор, что указывается на упаковке. Для стерилизации фильтрованием используют асбестовые фильтры Зейтца, мембранные нитроцеллюлозные фильтры и керамические свечи (рис.2). Свечи Шамберлана изготовляют из каолина с примесью кварцевого песка, отечественные фильтры ГИКИ — из каолина, свечи Берке-Фельда — из инфузорной земли и асбеста. Свечи прокаливают в специальных печах при определенном давлении и температуре.

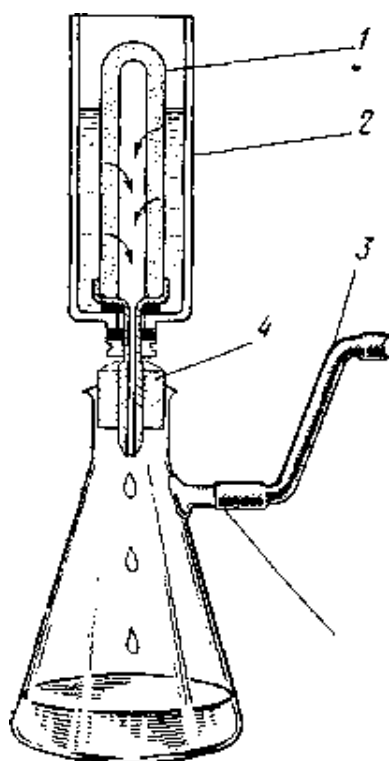


Рис.2 – Фильтрование через керамические свечи: 1 – свеча; 2 – стеклянный сосуд; 3- трубка из толстой резины; 4 – резиновая пробка; 5 – ватная пробка

Мембранные и асбестовые фильтры используют однократно. Свечи после окончания фильтрования промывают дистиллированной водой, просасывая ее в обратном направлении, заливают на ночь концентрированной серной кислотой с небольшим количеством нитрата натрия и хлорнокислого калия. На следующий день свечи вновь многократно промывают дистиллированной водой и кипятят для удаления растворенного воздуха. Для очистки от посторонних органических примесей свечи можно прокаливать в муфельной печи.

*Облучение.* Для полной или частичной стерилизации применяют ультрафиолетовые, рентгеновские и гамма-лучи. В лабораторных условиях наибольшее значение имеют ультрафиолетовые лучи. УФ-облучение также применяют для стерилизации помещений. Ионизирующее излучение применяют для стерилизации пищевых продуктов и других компактных материалов.

## Стерилизация стеклянной посуды и инструментов

Стеклянную посуду стерилизуют сухим жаром в сушильном шкафу при температуре 165—170 °С в течение 1,5—2 ч или путем автоклавирования. Посуду перед стерилизацией тщательно моют и высушивают. Пробирки и колбы закрывают ватными пробками. Пробирки завертывают по 10—20—40 шт. в бумагу. На колбы надевают бумажные колпачки, предохраняющие горлышко от пыли. В концы пипеток, которые берут в рот, вставляют ватные тампоны. Пипетки заворачивают в длинные полоски бумаги шириной 4—5 см и помещают в специальные металлические или картонные пеналы с крышкой. При работе пипетки вынимают из пакета только за верхний конец, где вставлен тампон. Чашки Петри завертывают в бумагу каждую отдельно или вместе по 2—3 шт. Подготовленную посуду размещают на решетчатых полках в сушильном шкафу или загружают в автоклав, но не слишком плотно, чтобы обеспечить циркуляцию горячего воздуха или сухого насыщенного пара и равномерный нагрев посуды. Сушильный шкаф должен быть плотно закрыт. Если шкаф не снабжен терморегулятором, необходимо все время следить за температурой. Повышать температуру более 175 °С не следует, так как бумага и пробки начинают разрушаться. Чтобы предохранить посуду от растрескивания, по окончании стерилизации сушильный шкаф охлаждают до 100—70 °С, после чего посуду можно вынимать. Для сохранения стерильности посуду разворачивают непосредственно перед работой.

Существует несколько видов стерилизации посуды и инструментов. *Стерилизация кипячением* - наиболее простой и доступный способ. Режим такой стерилизации – 100 °С, 40 минут.

*Стерилизация путем прокаливания (фломбирование)* осуществляется путем выдерживания металлических инструментов в пламени горелки.

*Стерилизация текучим паром* производится в текучепаровом аппарате Коха, представляющем собой металлический полый цилиндр с двойным дном (это пространство заполнено водой) и крышкой конической формы. Стерилизуемый материал загружают в камеру аппарата неплотно, чтобы обеспечить возможность наибольшего контакта его с паром. Стерилизацию текучим паром производят несколько раз, поскольку одно - кратное подогревание до температуры 100° не обеспечивает полной стерильности. Такая стерилизация называется дробной. Она применяется для сред, разрушающихся при температуре выше 100°. Отработку стерилизуемого материала текучим паром производят в течение 3 дней по 30 минут ежедневно.

*Стерилизация горячим воздухом (сухим паром)* является основным способом стерилизации стеклянной посуды. Она осуществляется в сушильных

шкафах при температуре 160-165 °С в течение двух часов. При этом погибают и вегетативные клетки, и споры микроорганизмов. Сушильные шкафы изготавливаются из термостойких материалов (обычно из металла и асбеста). В шкафу имеется отверстие, в котором укреплен термометр. Поддержание необходимой температуры обеспечивается терморегулятором.

Мелкие металлические инструменты (петли, иглы, пинцеты, ножницы) стерилизуют прокаливанием в пламени непосредственно перед использованием. Изделия из резины (резиновые пробки, перчатки, шланги) стерилизуют автоклавированием. Предметы, изготовленные из термостабильных пластмасс, например, центрифужные пробирки, стерилизуют УФ-лучами, окисью этилена.

*Облучение.* Для полной и частичной стерилизации применяют ультрафиолетовые, рентгеновские и гамма-лучи. В лабораторных условиях наибольшее значение имеют ультрафиолетовые лучи.

*Химические методы.* В основном они применяются при дезинфекции. Ряд химических агентов замедляет или полностью тормозит рост микроорганизмов. Гибель микроорганизмов при дезинфекции происходит в основном в результате гидролиза компонентов клетки, коагуляции белков, инактивации клеточных ферментов.

К группе антисептиков относят органические и неорганические вещества. Из неорганических антисептиков широко используются неорганические кислоты, щелочи и соли, хлорная известь, йод; из органических – этиловый и бутиловый спирты, альдегиды, органические кислоты и растворители.

В лабораторной практике методы дезинфекции применяют для обезвреживания рабочего стола, рук, камер для посева (боксов).

### **Контрольные вопросы**

1. Требования, предъявляемые к составу питательных сред.
2. основные компоненты питательных сред и их назначение.
3. Классификация питательных сред по составу.
4. Классификация питательных сред по назначению.
5. Классификация питательных сред по консистенции.
6. Вещества, используемые для уплотнения питательных сред и их области применения.
7. Основные этапы приготовления питательных сред.
8. Основные понятия: стерилизация, асептика, антисептика, дезинфекция.
9. Устройство автоклава, правила работы с ним.
10. Методы термической стерилизации питательных сред.
11. Физико-химические методы стерилизации питательных сред.

12. Подготовка различных видов посуды к стерилизации.
13. Термические способы стерилизации стеклянной посуды и инструментов.
14. Физико-химические способы стерилизации стеклянной посуды и инструментов.

### **МЕТОДЫ И УСЛОВИЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ**

Выращивание микроорганизмов на питательных средах называется культивированием (*cultur* по латыни - выращивание). Культивирование можно проводить поверхностным или глубинным, периодическим или непрерывным методами, в аэробных или анаэробных условиях. Способ культивирования существенно влияет на применяемые лабораторные модели и приемы. Большое значение имеет конечная цель культивирования: накопление биомассы или получение определенного метаболита (спирта, кислоты, антибиотика, фермента, аминокислоты и т. д.).

### **Условия культивирования микроорганизмов**

Одной из особенностей микроорганизмов является зависимость их роста от условий окружающей среды. Из-за малых размеров клеток микроорганизмы имеют тесный контакт со средой, поэтому они активно реагируют на изменение условий среды. Для жизнедеятельности микроорганизмов существенное значение имеют не только состав питательной среды, но и такие факторы, как аэрация, температура, кислотность среды, влажность, свет. Развитие микроорганизмов возможно лишь в определенных пределах каждого фактора, причём для различных групп микроорганизмов эти пределы часто неодинаковы.

### ***Влияние аэрации на рост микроорганизмов***

Большое влияние на развитие микроорганизмов оказывает аэрация среды. Микроорганизмы, которые развиваются только при условии постоянного притока молекулярного кислорода, называют облигатными (обязательными) аэробами. Энергетическим процессом у них является аэробное дыхание. Микроорганизмы, развивающиеся только в отсутствие кислорода, называют облигатными анаэробами; получение энергии у них не связано с использованием молекулярного кислорода. Кроме облигатных аэробов и анаэробов существуют еще микроаэрофилы, которые нуждаются в кислороде, но лучше растут при парциальном давлении, меньшем, чем в воздухе и

факультативные анаэробы, которые достаточно хорошо растут как в аэробных, так и в анаэробных условиях.

Неодинаковые потребности микроорганизмов в свободном кислороде определяют различия в способах их культивирования.

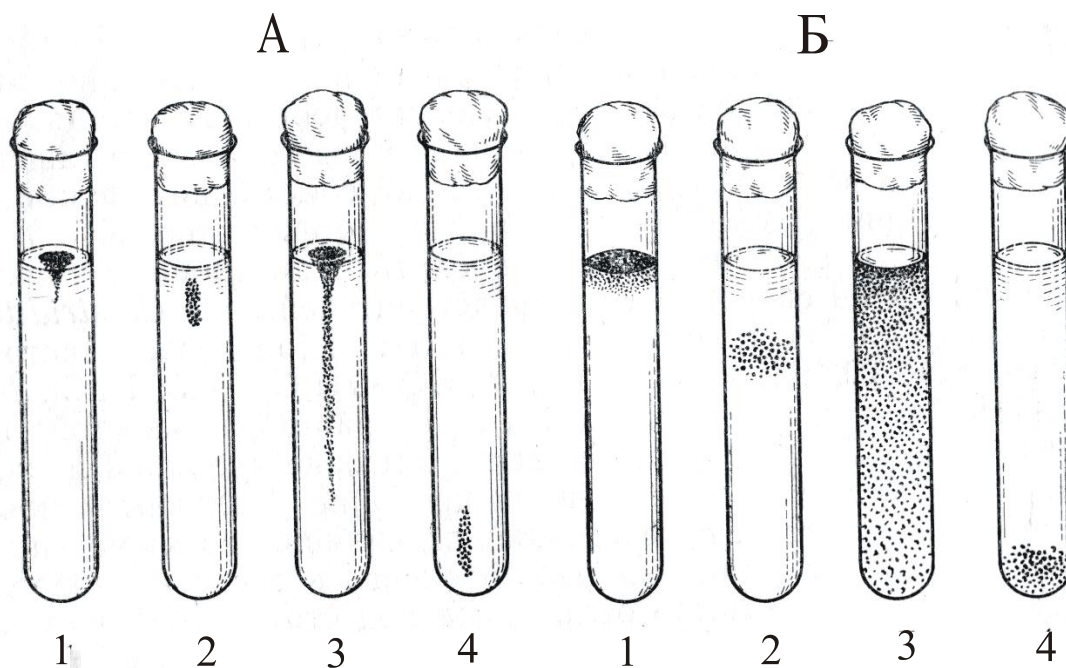


Рис. 3 – Рост микроорганизмов при посеве уколом (А) и при посеве в расплавленную плотную среду (Б): 1 – аэробы; 2 – микроаэрофилы; 3 – факультативные анаэробы; 4 – облигатные анаэробы

### ***Влияние активной кислотности среды на рост микроорганизмов***

Одним из важных условий для проявления жизнедеятельности микроорганизмов является активная кислотность среды, которую выражают величиной рН - отрицательным логарифмом концентрации водородных ионов. Значение рН от 0 до 14 характеризует степень кислотности или щелочности раствора. Большинство бактерий лучше всего растет при рН, близком к 7,0, микроскопические грибы предпочитают слабокислые среда. Поэтому в приготовленных средах всегда следует определять значение рН, Автоклавирование питательных сред часто приводит к значительным сдвигам рН, поэтому после стерилизации его следует проверить и довести, если это требуется, до нужного значения стерильными растворами кислоты или щелочи. Измеряют рН электрометрическим методом на потенциометре. В тех случаях, когда нет необходимости в высокой точности измерений, значение рН можно определить с помощью раствора индикаторного красителя или индикаторной бумаги. Активная кислотность питательной среды, благоприятная для

начального роста, часто меняется в процессе культивирования микроорганизмов в результате образования продуктов метаболизма или неравномерного потребления компонентов среды. Даже небольшие изменения активной кислотности среды заметно влияют на рост и обмен веществ микроорганизмов. Чтобы не допустить чрезмерного изменения рН и удержать его на необходимом уровне, используют различные приемы. Грубо рН культуры поддерживают с помощью добавления к среде буферов. При культивировании микроорганизмов, рост которых сопровождается образованием большого количества кислот, в среды вводят избыточные количества мела, который нейтрализует образующиеся кислоты.

Тонкий контроль значений рН достигается благодаря автоматической подаче в среду культивирования кислоты или щелочи; при этом необходимо постоянно контролировать значение рН среды. В современных ферментерах для этой цели предусмотрены специальные автоматические устройства.

### ***Влияние температуры на рост микроорганизмов***

Температура культивирования значительно влияет на интенсивность роста бактерий, так как она воздействует на скорость всех клеточных реакций. По отношению к температуре микроорганизмы разделяют на три группы: для термофилов температурный оптимум лежит в интервале от 45°C до 60-70°C, для мезофилов - от 25°C до 37°C, для психрофилов – от 5°C до 10°C. Микроорганизмы выращивают в термостатах или специальных термостатированных комнатах, где с помощью терморегуляторов поддерживается соответствующая оптимальная температура.

### **Способы культивирования аэробных микроорганизмов**

**Метод поверхностных культур.** Поверхностное культивирование аэробов проводят на плотной или сыпучей среде, а также в тонком слое жидкой среды в стеклянной посуде с широким дном: чашках Петри, колбах Виноградского, матрацах, кюветах. Засеянные сосуды выращивают при постоянной температуре в термостатах или термостатных комнатах (термокамерах). Микроорганизмы развиваются на поверхности среды и используют кислород непосредственно из воздуха. На жидких средах облигатные аэробы растут в виде обильных пленок. Факультативные аэробы (анаэробы) развиваются как в толще *жилкой* среды, образуя суспензии, хлопья, осадок, так и на поверхности в виде тонкой пленки. На плотных средах микроорганизмы растут в виде отдельных колоний или сплошным газоном. Поверхностное культивирование в лабораторных условиях широко применяют

для получения накопительных и чистых культур, их хранения, изучения морфологических, культуральных и биохимических признаков микроорганизмов. В промышленности метод выращивания поверхностных культур на жидких средах используют для получения лимонной кислоты, а на сыпучих — для производства ферментных препаратов.

**Глубинное культивирование.** Глубинное культивирование микроорганизмов может быть периодическим и непрерывным. При периодическом процессе весь объем питательной среды засевают посевным материалом, и выращивание ведут в оптимальных условиях определенный промежуток времени, пока не накопится нужное количество биомассы или целевого продукта. Для обеспечения роста аэробных культур в глубоких слоях жидкости необходимо поступление кислорода. Для аэрации жидких культур пользуются обычным стерильным воздухом либо смесью кислорода, азота и диоксида углерода. Принудительную аэрацию часто комбинируют с механическим перемешиванием.

Простым и доступным способом периодического глубинного культивирования является выращивание аэробных культур в суспендированном состоянии в жидкой среде, разлитой в небольших объемах в пробирки или колбы различной вместимости, которые после засева помещают на качалки в термокамеры. Качалки обеспечивают непрерывное встряхивание или вращение сосудов частотой 100—300 об/мин. Степень аэрации культуральной жидкости регулируют изменением частоты вращения (встряхивания) качалки, объемом среды в сосудах и применением специальных колб с 4—8 вдавленными внутрь отростками-отбойниками для разбрызгивания жидкости. Выращивание культур в колбах применяют в лабораторной практике для изучения физиологических свойств, установления закономерностей их роста в зависимости от состава компонентов среды, выяснения влияния факторов внешней среды на жизнедеятельность клеток, определения продуктов метаболизма.

Непрерывное глубинное культивирование ведут в лабораторных ферментерах (рис.4). Это стеклянные аппараты емкостью от 1 до 10 л, в которых обеспечивается непрерывная подача стерильной питательной среды, аэрация культуральной жидкости стерильным воздухом, автоматическое регулирование температуры, рН, пеногашения и других условий роста. Из аппарата непрерывно вытекает готовая культуральная жидкость. Процесс непрерывного выращивания в ферментаторе осуществляется по типу *хемостата* или *турбидостата*, которые различаются способом поддержания культуры в состоянии динамического равновесия.

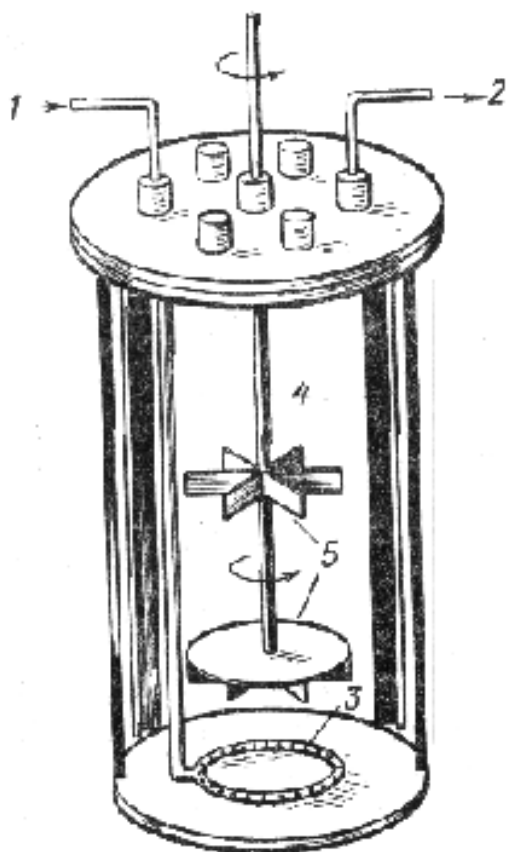


Рис. 4 – Схема ферментера для глубинного культивирования аэробных микроорганизмов:

1 – вход воздуха;

2 – выход воздуха;

3 – барбатер;

4 – отбойники;

В режиме *хемотата* рост культуры регулируют концентрацией лимитирующего фактора, в качестве которого могут быть использованы источники углерода, азота, фосфора, ростовых веществ, кислород, pH, температура. В режиме *турбидостата* поддерживают постоянную концентрацию биомассы, но фотометрический контроль плотности клеток требует применения прозрачных сред, что выполнимо только в лабораторных условиях.

Процесс глубинного культивирования может быть гомо- или гетерогенно-непрерывным. При гомогенно-непрерывном процессе в ферментаторе, где идет интенсивное перемешивание, все параметры (концентрация питательных веществ, клеточный титр и др.) постоянны во времени. При гетерогенно-непрерывном процессе применяют несколько ферментаторов, последовательно соединенных между собой. Питательная среда поступает в первый ферментатор, готовая культуральная жидкость вытекает из последнего. В этом случае имеет место непрерывный поток питательной среды, но клетки не обеспечены постоянными условиями роста (сколько аппаратов, столько и условий культивирования). В нашей стране выпускают лабораторные установки АНКУМ-2, АНКУМ-2М, АК-3 и АК-Ю, ФС-5 и ФУ-6. Лабораторные установки ФУ и ФС предназначены для непрерывного культивирования микроорганизмов по гомо- или гетерогенной схеме. В случае необходимости можно проводить и периодическое выращивание. Такие стенды применяют в научно-



исследовательских и заводских лабораториях, где изучают процессы размножения микроорганизмов с целью получения биомассы или биосинтеза метаболитов.

### Способы культивирования анаэробных микроорганизмов

Выращивание анаэробов ведут на питательных средах в обычных или специальных пробирках, трубках, чашках Петри в отсутствие кислорода. Активному росту анаэробов способствует внесение в питательную среду большого количества посевной культуры и наличие в окружающей атмосфере некоторого количества диоксида углерода.

Создать анаэробные условия можно физическими, химическими, биологическими и комбинированными методами.

**Физические методы.** Удаление кислорода из жидкой или плотной питательной среды непосредственно перед засевом культуры достигается кипячением или прогреванием пробирок на кипящей водяной бане в течение 15—20 мин и быстрым охлаждением под струей холодной воды. После засева поверхность среды, разлитой высоким слоем, заливают слоем стерильной смеси вазелинового масла и парафина. Культивирование анаэробов можно вести в специальных пробирках (рис.5), из которых после засева откачивают воздух с помощью вакуум-насоса. Пробирки с культурами анаэробных микроорганизмов, предназначенные для хранения, запаивают в узком месте.

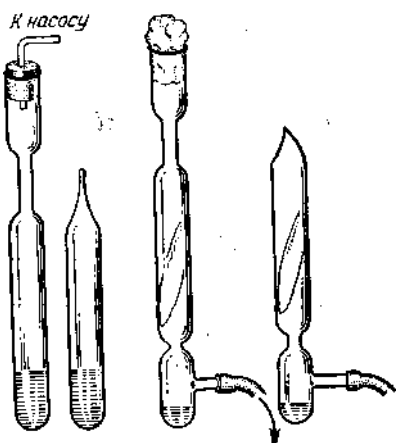


Рис. 5 – Пробирки для культивирования анаэробов

Выращивание анаэробов на питательном агаре в чашках Петри или в пробирках ведут в анаэростатах. Анаэростаты — это вакуумные металлические или стеклянные эксикаторы, хорошо сохраняющие высокое разрежение в течение продолжительного времени. Стеклянные вакуумные эксикаторы снабжены хорошо пришлифованной крышкой с краном на шлифах для откачки воздуха (рис.6). Пришлифованные поверхности во избежание проникновения воздуха покрывают специальной вакуумной смазкой. На дно эксикатора для

поглощения избытка влаги помещают 20—30 г хлорида натрия и 5—6 г хлорида кальция.

Создать анаэробные условия в анаэростатах или эксикаторах можно путем замены воздуха индифферентным газом (аргоном, гелием, водородом, диоксидом углерода, азотом), пропущенным для стерилизации через фильтры.

**Химические методы.** Связывание свободного кислорода, содержащегося в среде или в сосуде для выращивания анаэробов, производят с помощью

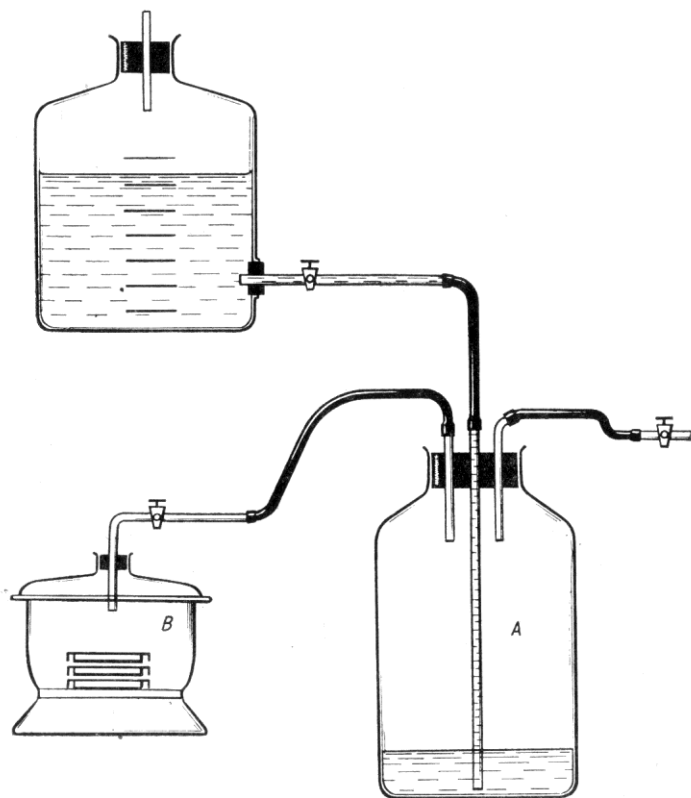


Рис. 6 - Газометр (А)  
и анаэростат (В)

химических веществ. Некоторые из них помещают вне среды, другие вводят в качестве восстановителей непосредственно в питательные среды. Химическими поглотителями кислорода являются растворы пирогаллола с  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , щелочной раствор гидросульфита натрия (дитионита), металлическое железо и другие реактивы. Слегка увлажненные химические поглотители насыпают на дно больших пробирок, в которые на специальных подставках помещают засеянные анаэробной культурой обычные пробирки (рис.7). Открытые чашки Петри со слегка увлажненным пирогаллолом с содой или гидросульфитом натрия с содой ставят на дно эксикатора.

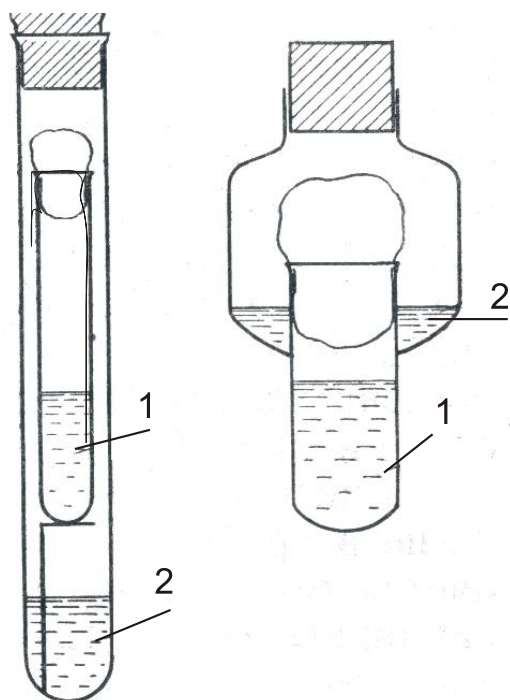


Рис. 7 – Сосуды для выращивания анаэробов: 1 - бактериальная культура; 2 - химический поглотитель молекулярного кислорода

В качестве восстановителей, добавляемых в питательные среды для культивирования анаэробов, используют органические и неорганические соединения: редуцирующие сахара (глюкозу), вещества с сульфгидрильной группой (цистеин, глутатион), аскорбиновую кислоту, пирокатехин, муравьинокислый натрий, сульфиды, сероводород, гидросульфит натрия, цитрат титана, а также некоторые сложные компоненты — пептон, кусочки печени, мышц, картофеля, яичного белка.

**Биологические методы.** Некоторые анаэробные микроорганизмы можно выращивать при доступе кислорода совместно с аэробами. В герметически закрытый сосуд помещают 10—15 пробирок с посевами аэробных культур и одну пробирку с анаэробами. Аэробные микроорганизмы энергично поглощают кислород, выделяют  $\text{CO}_2$  и создают условия для роста анаэробов. Совместное выращивание симбиотических видов аэробов и анаэробов ведут на поверхности плотной среды по методу Фортнера. В чашки Петри толстым слоем наливают кровяной агар. После застывания среды стерильным пинцетом по диаметру чашки вырезают бороздку шириной 4—6 мм. Одну половинку агаровой пластинки засевают культурой аэробов (*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*), другую — культурой анаэробов. Чтобы прекратить доступ кислорода в чашку, щель между дном и крышкой замазывают парафином, воском или пластилином. Чашки помещают в термостат. Вначале развивается аэробный микроорганизм. Когда растущие клетки поглотят из чашки весь кислород, начинается рост анаэроба.

**Комбинированные методы.** Комбинированные методы представляют собой сочетание вышеуказанных способов удаления кислорода.

### **Контрольные вопросы**

1. Отношение микроорганизмов к кислороду.
2. Влияние активной кислотности на рост микроорганизмов. Способы измерения, поддержания и коррекции pH питательной среды.
3. Влияние температуры на микробный рост. Способы поддержания заданной температуры.
4. Характер роста микробных культур на поверхности питательных сред.
5. Особенности периодического глубинного культивирования.
6. Гомо- и гетерогенные процессы глубинного культивирования микроорганизмов.
7. Физические методы создания анаэробных условий культивирования микроорганизмов.
8. Особенности физических и биологических способов выращивания микробных культур.