

Лабораторне заняття № 9-10

ТЕМА: « Процеси аеробного і анаеробного дихання у мікроорганізмів (відновлення нітрату, сульфату, карбонату, фумарату) »

МЕТА: знати механізми аеробного і анаеробного дихання у мікроорганізмів, види і механізми анаеробного дихання; застосовувати різні методи та обладнання для вирощування певних груп мікроорганізмів; вміти вирощувати аеробні та анаеробні мікроорганізми.

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА:

Способи культивування аеробних мікроорганізмів

Для облигатних аеробних культур, які ростуть на щільних середовищах, кисню достатньо. У рідких середовищах великого обсягу при глибинному культивуванні аеробні бактерії можуть жити тільки на поверхні, так як з віддаленням від поверхні умови наближаються до анаеробних. Для нормального росту аеробів в глибоких шарах необхідна аерація.

Мікроорганізми здатні використовувати розчинений кисень, але його розчинність низька, тому використовують технологічні прийоми для підвищення його швидкості розчинення - збільшення поверхні розділу газової і рідкої фаз, збільшення тиску кисню в газовій фазі. Це здійснюють:

- Культивуванням в тонкому шарі на поверхні щільних і рідких середовищ;
- перемішування рідини встряхиванием;
- Обертанням судини, в якому відбувається вирощування;
- Пропусканням повітря крізь рідину (барботери, колби Клейвер);
- Механічне перемішування.

Найбільш простий і широко використовуваний в лабораторній практиці спосіб глибинного культивування - вирощування на гойдалках (пристосування для механічного струшування), що забезпечують струшування або обертання колб або пробірок зі швидкістю 100-200 об / хв (рис.1). Збільшити аерацію можна, застосовуючи на качалка колби з відбійниками (вдавлення всередину у вигляді 4-8 відростків 2-3 см завдовжки) (рис. 2).

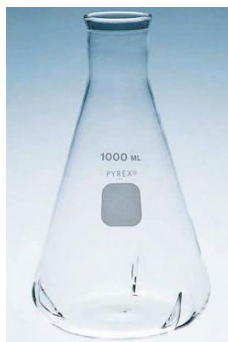


Рис. 1 – Качалка мікробіологічна з колбами

Рис. 2 – Колба з відбійниками

Крім перемішування, аерувати культуру мікроорганізмів можна продуванням товщу середовища стерильного повітря. Цей спосіб часто використовується в лабораторних дослідженнях, але особливо широке застосування він знайшов у промисловій мікробіології. У лабораторних умовах повітря стерилізується шляхом проходження через активоване деревне вугілля, скляну вату, просочену антисептиком, або спеціальні тканини з полімерів; коли обсяг і швидкість надходження повітря невеликі, використовують заздалегідь простерилізовані ватяні фільтри. Для максимально сильного розпилення повітря пропускають через дрібнопористі пластинки - барбатера; в лабораторних дослідах з цією метою застосовують скляні фільтри.

Для аерації культур мікроорганізмів, як правило, використовують звичайне повітря. Продування середовищ киснем не рекомендується, так як надмірне насичення середовища киснем (до 40 мг / л) може привести до пригнічення росту мікроорганізмів. У ферментерах (рис. 3) примусову аерацію зазвичай поєднують з механічним перемішуванням середовища мішалками, швидкість обертання яких може досягати сотень і навіть тисяч обертів на хвилину.

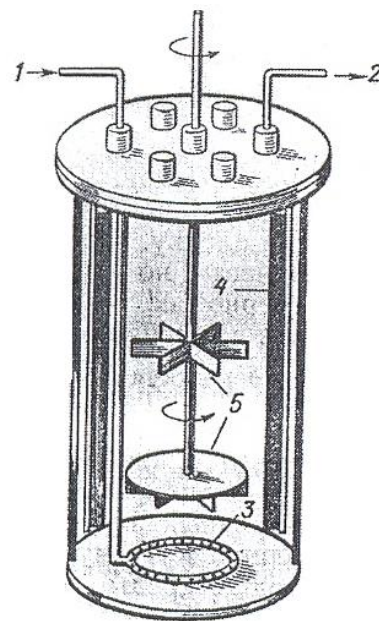


Рис. 3 – Схема ферментера для глибинного культивування аеробних мікроорганізмів:
1 - вхід для повітря, 2 - вихід повітря, 3 - барбатер, 4 - відбійники, 5 - мішалка

Способи культивування анаеробних мікроорганізмів

Вирощування анаеробних мікроорганізмів більш складно, ніж культивування аеробів, так як зіткнення культур анаеробів з киснем повітря має бути зведено до мінімуму або навіть повністю виключено. Для цього використовують різні прийоми, нерідко комбінуючи їх один з одним.

Вирощування в високому шарі середовища. Це найбільш простий спосіб обмеження доступу повітря до культури. Рідку середу наливають в судини для культивування вищим шаром. Так як не можна стерилізувати середовища, якщо вони займають більше половини висоти посудини, частина середовища стерилізують окремо і стерильно доливають нею посудина для культивування відразу ж після посіву. Безпосередньо перед посівом середу кип'ятять або прогрівають на киплячій водяній бані 30-40 хв, потім швидко охолоджують, щоб в ній не встиг розчинитися кисень повітря, і вносять на дно посівний матеріал.

Якщо розвиток мікроорганізмів не супроводжується газоутворенням, поверхня середовища можна залити шаром стерильного вазелінового масла, парафіну або їх сумішшю (співвідношення 1: 3), шаром стерильного водного агару або закрити судини для культивування стерильними пробками: скляній притертою або гумовою.

Культивування в вузьких середовищах. Дифузія кисню в рідину зменшується зі збільшенням її в'язкості. Тому в вузьких середовищах, таких як картопляна або середовища з кукурудзяної або інший борошном, добре розвиваються деякі облигатні анаероби, наприклад, збудники маслянокислого або Ацетонобутилового бродиння. В'язкість рідких середовищ легко збільшити, якщо додати до них 0,2-0,3% агару.

Вирощування в товщі щільною середовища. Цим прийомом користуються для отримання ізольованих колоній при виділенні чистих культур або визначенні чисельності анаеробних мікроорганізмів. Посівний матеріал вносять у розплавлену і охолоджені до 48-50 ° С щільних, бажано освітлену середу, ретельно перемішують і залишають в пробірках або переливають стерильною піпеткою в заздалегідь простерилізовані трубки Бурри або чашки Петрі. Поверхня середовища в пробірках заливають парафіном. Трубки Бурри - це скляні трубки, довжиною 20-25 см, діаметром 1,0 1,5 см. Трубки стерилізують, закривши оба кінця ватяними пробками. Перед посівом ватяну пробку у одного кінця замінюють стерильною гумовою, через інший кінець трубки вносять середу з посівним матеріалом і закривають цей кінець також гумовою пробкою (рис. 4).

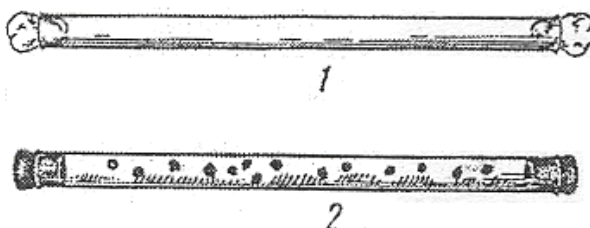


Рисунок 4 – Трубка Бурі:

1 – трубка, подготовленная к стерилизации; 2 – колонии анаэробных микроорганизмов в толще агаризованной среды

При використанні чашок Петрі для вирощування анаеробів засіяну щільну середу наливають в кришку чашки і, після того як середовище застигне, щільно притискають до її поверхні дно чашки. Зазор між стінками дна і кришки, де середовище стикається з повітрям, заливають стерильним парафіном (рис. 5).

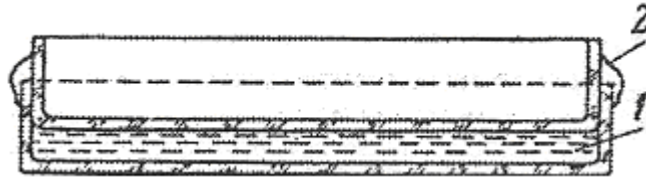


Рисунок 5 – Культивування анаеробів у чашці Петрі:

1- агаризоване середовище, 2 – парафін

Вирощування в анаеростатах. Анаеробні мікроорганізми можна вирощувати в анаеростатах - вакуумних металевих камерах, наділених манометром (рис. 6). Анаеростатах може служити звичайний вакуумний скляний ексикатор (рис. 7). З анаеростатах відкачують повітря, а потім, як правило, заповнюють його газовою сумішшю, що складається з азоту (90-80%) і вуглекислоти (10-20%) до тиску порядку $67 \cdot 10^3$ Па (500 мм рт.ст.). Надмірний тиск виключає можливість дифузії кисню повітря.



Рис. 6 – Анаеростат

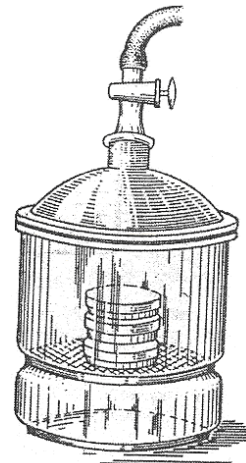


Рис. 7 – Ексикатор

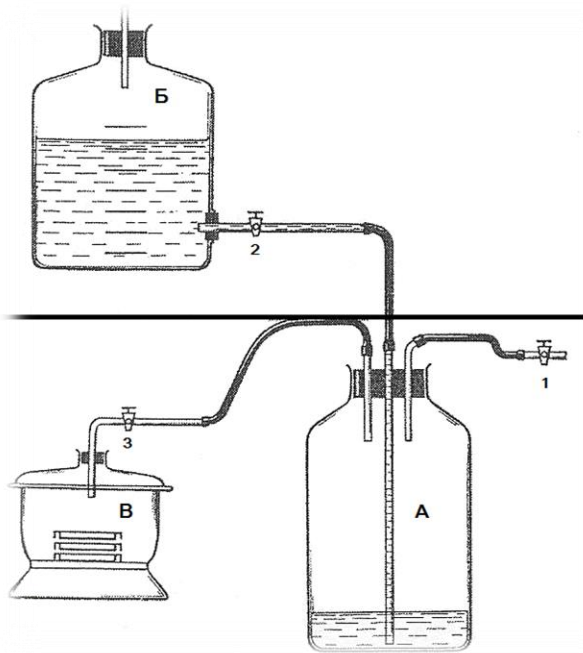


Рис. 9 – Сосуди для вирощування анаеробів: 1 – бактеріальна культура; 2 – хімічний поглинач молекулярного кисню

Для заповнення анаеростатах газовою сумішшю використовують газометри (рис. 8). Газометр (А) заповнюється окремим газом або газовою сумішшю через кран 1. Рідина, спочатку заповнює газометр, через кран 2 (кран 3 при цьому закритий) витісняється в посудину Б. Потім кран 1 закривають, обережно відкривають кран 3, і рідина з посудини Б надходить в газометр і витісняє газ в анаеростатах (В). Обсяг газу, що заповнює анаеростатах, вимірюють за обсягом рідини, що надійшла з посудини Б в газометр.

Необхідно пам'ятати, що випускаються промисловістю гази навіть високої чистоти містять, як правило, невеликі кількості кисню. Тому, щоб очистити гази від залишків кисню, їх пропускають через хімічні поглиначі, наприклад, через колонки з розпеченої відновленої металеві міддю.

Для видалення кисню з навколишнього середовища при культивуванні анаеробів іноді використовують речовини, які поглинають кисень. Ці речовини можна помістити на дно великої пробірки, що має спеціальну підставку, на яку ставлять пробірку з бактеріальною культурою.

Зручно використовувати спеціальні посудини, в зовнішню розширену частину яких вносять яка поглинає суміш, а у внутрішню - живильне середовище з мікроорганізмами. Культуральний посудину закривають ватним корком, а посудину з поглиначем - гумової, що забезпечує герметичність системи (рис. 9). Застосовують також вакуумні або звичайні ексикатори, в які на дно або в спеціальні посудини поміщають поглинають кисень речовини.

Як поглинач в лабораторній практиці використовують лужний розчин пірогаллола, Дитіоніти натрію ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$), металеве залізо і деякі інші реактиви. При цьому необхідно враховувати поглинає здатність реактивів і обсяг замкнутого простору, в якому вирощується культура. Наприклад, на кожні 100 мл ємності використовують 1 г пірогаллола і 10 мл 2,5 н. розчину гідроксиду натрію. Оскільки багато анаероби потребують углекислоте для біосинтезу речовин клітини, пірогаллол розчиняють не в лузі, а в насиченому розчині бікарбонату натрію. Повноту поглинання кисню хімічними речовинами контролюють, використовуючи розчин, що містить окислювально-відновний індикатор. Для приготування розчину змішують рівні об'єми 0,024% -ного розчину NaOH , 0,015% -ного водного розчину метиленового синього і 6% -ного розчину глюкози; як антисептик до розчину додають тимол. Перед вживанням в пробірку наливають 5 мл суміші і

нагрівають в киплячій водянній бані до знебарвлення, швидко охолоджують і поміщають в анаеростатах. В анаеробних умовах розчин залишається безбарвним. Зручний в обігу анаеростатах системи Газ Пак (Gas Pak), которого забезпечений паладієвим каталізатором, що поглинає кисень, і хімічними генераторами водню (таблетка борогідрида натрію - NaH_2) і вуглекислоти (таблетка бікарбонату натрію і лимонної кислоти). Після завантаження анаеростатах таблетки змочують водою і негайно герметично закривають його кришкою. В такому анаеростатах анаеробні умови створюються через 16-20 хв.

Культивування в середовищах з відновниками. Зростання багатьох облигатних анаеробів можливий тільки в середовищах з низьким окислювально відновним потенціалом (Eh). Тому в середовища для культивування анаеробів рекомендується додавати відновники, наприклад, цистеїн, тiogліколовую кислоту або її натрієву сіль, сульфід натрію, аскорбінову кислоту або дітіотреїтолу. Частіше за інших використовують сульфід і тiogликолат натрію. Зазвичай готують 1% -ні розчини цих відновників в 5% -ому розчині бікарбонату натрію, стерилізують в автоклаві і додають до середох сульфід Na з розрахунку 250-500 мг, а тiogликолат натрію від 250 мг до 1 г на 1 л середовища. Відновлювачі слід використовувати в концентраціях, які не впливають на ріст мікроорганізмів.

Функції восстановителів виконують і такі компоненти середовища, як глюкоза та інші відновлюють цукру, а також пептони. З метою зниження окисно-відновного потенціалу до середох для культивування анаеробів можна додавати убиті клітини дріжджів, шматочки свіжевирезаних тканин паренхіматозних органів тварин (нирки, печінку, серце) або рослинних тканин (бульби картоплі, коренеплоди). Ступінь поглинання кисню і відповідно ступінь восстановленности середовища визначається окислювально-відновним потенціалом - Eh, який вимірюють електрометричного на потенціометрі або за допомогою індикаторів таких, як резазуріна, феносафранін і нейтральний червоний, змінюють забарвлення при зміні Eh. Особливо зручний резазуріна, який додають до середох в концентрації 0,0001% і стерилізують разом з мінеральними компонентами середовища. У окисленої формі він забарвлений в слабо-рожевий колір, відновлена форма його безбарвна. Резазуріна реєструє окислювально-відновний потенціал вище - 420 В. Феносафранін реєструє більш низькі значення потенціалу - 252 В.

Успішного вирощування облигатних анаеробів сприяє внесення в середу великої кількості посівного матеріалу. Це пояснюється тим, що при розвитку анаеробів в культуральної рідини накопичуються відновники, які пов'язують частина розчиненого кисню нового середовища.

Деякі екстремальні анаероби, до яких відносяться, наприклад, метанобразующие бактерії і мікроорганізми рубця, гинуть навіть при короткочасному зіткненні з киснем повітря. Робота з такими мікроорганізмами представляє великі труднощі і вимагає спеціального обладнання. Техніка роботи з екстремальними анаеробами була розроблена

Хангейтом. Вона включає сукупність кількох прийомів, головними з яких є наступні:

- середовища перед вживанням кип'ятять для звільнення від розчиненого кисню;
- до середовищ обов'язково додають відновники - цистеїн, сульфід Na, тиогликолат Na;
- пересівання, посіви, розлив середовищ в судини для культивування здійснюють в струмі вуглекислоти або водородуглекислотной суміші;
- культури вирощують в герметично закритих судинах в атмосфері газової суміші, часто з надлишковим тиском;
- гази H₂, CO₂ або їх суміші використовують тільки після очищення від слідів кисню.

Останнім часом для культивування екстремальних анаеробів запропоновані спеціальні камери, які містять всередині все необхідне для виконання бактеріологічних робіт, включаючи термостат. Камера заповнюється газовою сумішшю, що складається з 10% H₂, 10% CO₂ і 80% N₂, звільненої від домішки кисню. Роботу в камері дослідник проводить, надягаючи рукавички, вмонтовані в камеру. Це обладнання досить складно і дорого, але воно має одну незаперечну перевагу - контакт клітин мікроорганізмів з повітрям виключається на всіх етапах роботи.

ПРАКТИЧНА ЧАСТИНА:

Завдання №1. Вивчення методів культивування анаеробів методом Фортнера.

Проведіть культивування анаеробних бактерій *Bifidobacterium bifidum* біологічним методом Фортнера.

1. Чашку Петрі з товстим шаром агару розділіть на 2 половини: на одну половину засейте газоном облигатний аероб - *Staphylococcus aureus*, на іншу половину чашки засейте досліджувану анаеробну культуру - *Bifidobacterium bifidum*.

2. Чашку залийте розтопленим парафіном, після чого поставте в термостат при температурі 37 ° C на 72 години

3. На наступному занятті зробіть облік результатів досвіду. Через 24-48 годин в чашці виростають аероби, потім, коли запас кисню вичерпується, починають розмножуватися анаероби.

Завдання №2. Вивчення методів культивування анаеробів в ексикаторі.

Проведіть культивування анаеробних бактерій *Bifidobacterium bifidum* в ексикаторі.

1. 2 чашки Петрі з агаризованому середовищем засейте газоном анаеробної культурою - *Bifidobacterium bifidum*.

2. 1 чашку помістіть в ексикатор, на дно якого попередньо встановіть свічку, підпаліть її і закрийте кришкою, краї якої змащені вазеліном.

3. Ексикатор з чашкою Петрі всередині і 2 чашку Петрі поставте в термостат при температурі 37 ° С на 72 години.

4. На наступному занятті зробіть облік результатів досвіду, порівнявши зростання культури в двох чашках.

ЛІТЕРАТУРА:

Основна література:

1. Лысак В.В. Микробиология: Учебное пособие для студентов биологических специальностей. – Мн.: БГМУ, 2005. – 261 с.

2. Пирог Т.П. Загальна мікробіологія. – К.: НУХТ, 2004. – 471 с.

3. Пирог Т.П. Загальна мікробіологія: Підруч. – 2-е вид., доп. і перероб. – К.: НУХТ, 2010. – 632 с.

4. Промышленная микробиология / Под ред.. Н.С. Егорова. – М. Высш.шк., 1989. – 688 с.

5. Шлегель Г.Г. Общая микробиология. М.: Мир, 1987. – 567 с.

Інформаційні ресурси:

6. biotech.nuph.edu.ua

7. http://www.labprice.ua/ukrainski_naukovi_tovaristva/tovaristvo_mikrobiologiv_ukraini_im_sm_vinogradskogo_tmu

8. <http://www.antibiotic.ru/index.php>

9. <http://collegemicrob.narod.ru/microbiology/>

10. http://www.allvet.ru/knowledge_base/microbiology/mikrobiologiya.php

11. <http://www.grandars.ru/college/medicina/mikrobiologiya.html>

12. <http://mikrobiki.ru/>