

Федеральное агентство по образованию
Государственное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«Тихоокеанский государственный университет»

ОЦЕНКА ПАРАМЕТРОВ РОСТА МИКРООРГАНИЗМОВ В УСЛОВИЯХ ПЕРИОДИЧЕСКОГО И НЕПРЕРЫВНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Методические указания к выполнению лабораторной работы
по курсу «Основы микробиологии и биотехнологии»
для студентов специальности 280201.65 «Охрана окружающей
среды и рациональное использование природных ресурсов»

Хабаровск
Издательство ТОГУ
2010

УДК 573.6.086.83

Оценка параметров роста микроорганизмов в условиях периодического и непрерывного культивирования : методические указания к выполнению лабораторной работы по курсу «Основы микробиологии и биотехнологии» для студентов специальности 280201.65 «Охрана окружающей среды и рациональное использование природных ресурсов» / сост. Л. А. Гаретова, О. А. Кириенко. – Хабаровск : Изд-во Тихоокеан. гос. ун-та, 2010. – 16 с.

Методические указания разработаны на кафедре «Экология, ресурсопользование и безопасность жизнедеятельности». Рассматриваются методы культивирования, порядок выполнения работы, список литературы.

Печатается в соответствии с решениями кафедры «Экология, ресурсопользование и безопасность жизнедеятельности» и методического совета ИПЭ.

© Тихоокеанский
государственный
университет, 2010

Цель работы: освоение методов расчета кинетических характеристик роста микроорганизмов для прогноза перспектив культивирования в непрерывных условиях.

МЕТОДЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

В зависимости от способа подачи питательных веществ и отбора получаемых продуктов выделяют два основных способа культивирования: периодическое и непрерывное.

Периодическое культивирование. Периодическим (стационарным) называют такой метод культивирования, когда клетки микроорганизмов вносят в питательную среду и далее компоненты среды не поступают в сосуд и не удаляются из него. Простая периодическая культура, содержащая ограниченное первоначальное количество питательного субстрата, служит примером закрытой системы (например, рост микроорганизмов на чашках Петри или в колбах с питательной средой). Закрытой называют такую систему, в которой хотя бы один из существенных компонентов не может ни поступать в систему, ни покидать ее. Такое культивирование называется периодическим. В этих условиях популяция микроорганизмов проходит определенный цикл развития, выражающийся в смене периодов роста (рис. 1).

Продолжительность каждого периода зависит от вида культуры, количества и качества посевного материала, состава питательной среды и условий культивирования.

Выделяют несколько фаз в развитии культуры.

После введения в питательную среду инокулята (маточной культуры) обычно наблюдают *индукционный период (лаг-фазу) (I)*, в течение которого не происходит сколько-нибудь заметного увеличения биомассы или численности клеток. В этот период перестраивается метаболизм клетки, синтезируются ферменты, специфичные к использованию субстратов, активизируется биосинтез белка.

Индукционный период сменяется фазой *ускоренного роста (II)*, в течение которой быстро накапливается биомасса и продукты разных реакций.

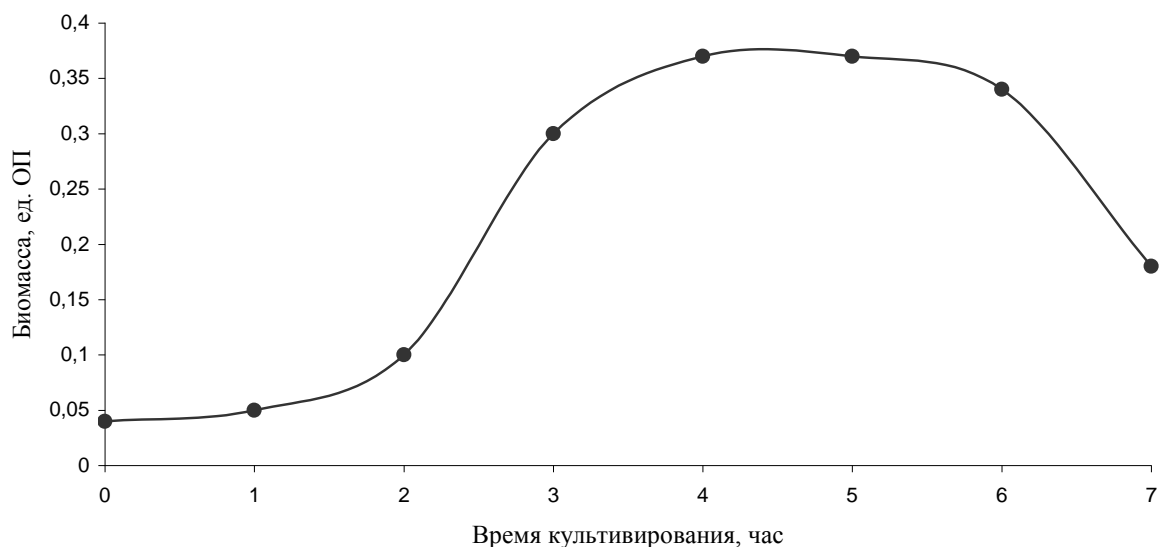


Рис. 1. Шесть фаз на кривой роста периодической культуры: I – лаг-фаза; II – фаза ускоренного роста; III – фаза линейного роста; IV – фаза замедления роста; V – стационарная фаза; VI – фаза отмирания

Фаза линейного роста (III) – время интенсивного логарифмического (экспоненциального) размножения. В этот период размножение бактерий идет с наибольшей скоростью и число клеток увеличивается в геометрической прогрессии. В результате такого интенсивного размножения бактерий происходит поглощение необходимых питательных веществ из среды и накопление в ней токсических (ядовитых) продуктов обмена. Это замедляет ритм размножения.

Фаза экспоненциального роста сменяется весьма непродолжительным периодом, в течение которого скорость роста культуры снижается до нуля. Это *фаза замедления роста (IV)*.

Затем рост культуры переходит в достаточно устойчивую и продолжительную *стационарную фазу (V)*. В этих условиях культура развивается в режиме постоянства общего числа клеток. При этом скорость прироста биомассы полностью компенсируется скоростью гибели и лизиса клеток.

Если система полностью истощается по субстрату, или накопление ингибирующих рост продуктов является значительным, то скорость прироста биомассы становится равной нулю. Происходят существенные физиологические изменения клеток и, как правило, наблюдается *фаза отмирания культуры (VI)*, сопровождаемая часто полным лизисом клеток.

Непрерывное культивирование – это процесс, происходящий в так называемой открытой системе, все компоненты которой могут поступать в систему и покидать ее. Непрерывное культивирование микроорганизмов, когда происходит, с одной стороны, приток питательной среды, с другой – отток биомассы и других продуктов, чаще используется при промышленном получении различных продуктов микробного синтеза. Культивирование микроорганизмов в производственных целях связано с особенностями роста и функций микроорганизмов. Это могут быть культуры, крайне различные по форме и сложности. Простейшей формой культуры является гомогенная суспензия микроорганизмов одного вида в определенном объеме водной среды, поддерживаемая в постоянных физических условиях и содержащая минимальное число определенных компонентов: источник углерода, азота, фосфора и других элементов. Процесс непрерывного культивирования осуществляется в специальных аппаратах – *ферментерах* (рис. 2).

Скорость разбавления (коэффициент разбавления или скорость протока) D рассчитывается по уравнению

$$D = F/V,$$

где F – скорость поступления питательной среды, л · ч⁻¹; V – объем ферментера.

Величина D соответствует объему среды, прошедшей через ферментер за 1 ч, обратная величина $1 / D$ показывает время пребывания микроорганизмов в ферментере.

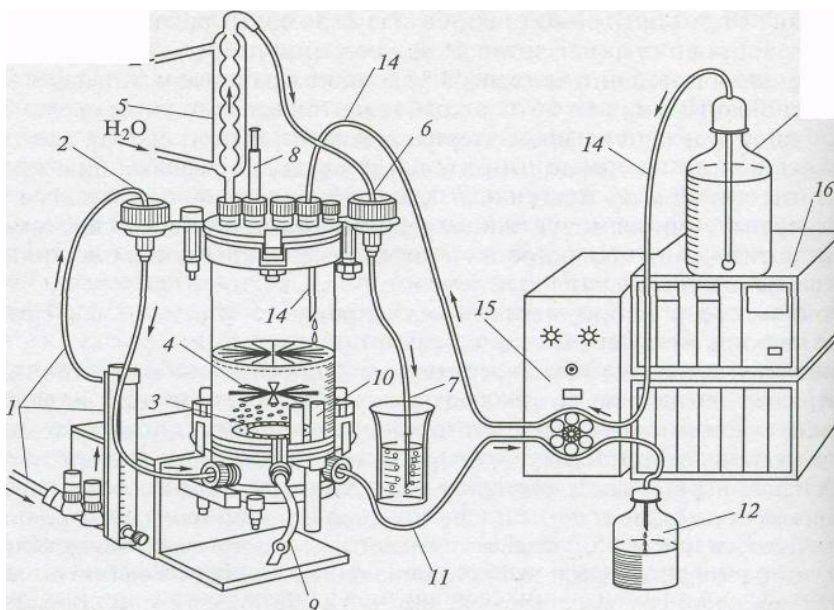


Рис. 2. Принципиальная схема ферментера «Ультроферм 1601» (ЛКВ, Швеция)

На рис. 2. изображена схема ферментера, работающего в режиме непрерывного культивирования микроорганизмов: 1 – подача магистрального воздуха через ротаметр; 2 – бактериальный фильтр для стерилизации поступающего воздуха; 3 – вход воздуха в ферментер через мелкие отверстия; 4 – магнитная мешалка; 5 – обратный холодильник для предотвращения испарения питательной среды; 6 – бактериальный фильтр для улавливания клеток микроорганизмов в отходящих газах; 7 – сосуд с дезраствором (5%-й раствор NaHCO_3) для обеззараживания отходящих газов; 8 – шприц со стерильным пеногасителем; 9 – шариковый пробоотборник; 10 – система нагрева питательной среды в ферментере; 11 – отвод суспензии микроорганизмов через перистальтический насос; 12 – сосуд для сбора суспензии микроорганизмов; 13 – сосуд со стерильной питательной средой; 14 – подача стерильной питательной среды через перистальтический насос; 15 – перистальтический насос; 16 – блок управления: поддержание значения pH среды (необходим датчик pH), температуры, количества растворенного в среде кислорода (необходим датчик O_2).

Контроль и управление процессами непрерывного культивирования осуществляется двумя путями: хемостатным и турбидостатным.

Хемостатное культивирование

Хемостат представляет собой ферментер, куда с постоянной скоростью поступает питательная среда и из которого с такой же скоростью происходит отток культуры. Обычно питательная среда содержит в избытке все компоненты за исключением какого-либо одного, например, источника азота, углерода, фосфора, магния, витаминов и т. п., который выполняет роль фактора, ограничивающего рост клеток (*лимитирующий фактор*). Хемостат при скорости протока (следовательно, и скорости роста) меньше μ_{\max} (максимальной скорости роста) представляет собой саморегулирующуюся систему. Эта система способна в течение продолжительного времени автоматически поддерживать постоянный уровень биомассы, скорость роста и концентрацию компонента среды, лимитирующего рост. Динамическое равновесие устанавливается при $\mu = D$.

Хемостатное культивирование дает возможность наблюдать особенности обмена веществ изучаемых микроорганизмов только в зависимости от скорости их роста или, напротив, сохраняя постоянную скорость роста клеток, изменять

условия среды. Кроме того, этот метод позволяет долгое время поддерживать клетки в определенном физиологическом состоянии.

Турбидостатное культивирование

При турбидостатном выращивании в ферментере поддерживается постоянный уровень биомассы, который по оптической плотности культуры регистрируется специальным прибором, снабженным фотоэлементом. Как только уровень биомассы поднимается выше заданного, сигнал фотоэлемента приводит в действие насос, подающий питательную среду. Необходимый уровень жидкости в аппарате поддерживается при помощи специального сливного устройства. Таким образом, скорость накопления биомассы управляет скоростью притока питательной среды. Рост микроорганизмов в турбидостате осуществляется без внешнего лимитирования. При этом скорость роста приближается к μ_{\max} .

ПОРЯДОК ВЫПОЛНЕНИЯ РАБОТЫ

1-й этап. Оценка параметров роста периодической культуры

Результаты количественного изучения роста микробных популяций могут быть представлены более информативно и точно, если анализируются различные параметры роста: удельная скорость роста, время генерации (время удвоения биомассы), лаг-период, фаза задержки роста, экономический коэффициент и т. д.

1. Удельная скорость роста культуры рассчитывается по данным концентрации биомассы в фазах активного роста культуры по формуле

$$\mu = \frac{\ln X_1 - \ln X_0}{T_1 - T_0},$$

где X_0 и X_1 – значения биомассы, соответствующие времени роста T_0 и T_1 .

Биомассу можно измерять весовым методом (г/л, мг/л), по данным нефелометрии оптической плотности (ОП) суспензии клеток микроорганизмов, в единицах ОП.

2. Время удвоения биомассы (время генерации). Каждая одиночная клетка бактерий при размножении образует 2 новые клетки, в благоприятных условиях среды обитания такие клетки будут размножаться в геометрической прогрессии, т. е. экспоненциально:

$$g = \frac{\ln 2}{\mu} \quad \text{или} \quad \frac{0.693}{\mu},$$

где g – время генерации, μ – удельная скорость роста.

3. Экономический коэффициент (или выход биомассы от потребленного субстрата) определяется из уравнения

$$Y = X / (S - S_0) \cdot 100 ,$$

где X – концентрация биомассы, S – начальная концентрация субстрата в среде, S_0 – остаточная концентрация субстрата в культуральной жидкости.

4. Длительность лаг-периода (L) определяется графически.

Если на графике зависимости биомассы от времени (см. рис. 1) прямую линию экстраполировать до уровня начальной биомассы, то отрезок, отсекаемый при этом на оси абсцисс, будет соответствовать L .

Задание 1

1. Построить кривую роста культуры по показателям оптической плотности (табл. 1).

2. Рассчитать параметры роста данной периодической культуры:

а) длительность лаг-фазы (по графику);

б) удельную скорость роста;

в) время генерации;

3. Используя данные табл. 2, рассчитать экономический коэффициент (выход биомассы от потребленного субстрата) для данной культуры.

2-й этап. Определение кинетических характеристик роста культур микроорганизмов для прогноза непрерывного культивирования

K_s , μ_{\max} , и Y являются важнейшими параметрами, характеризующими рост микроорганизмов в непрерывной и периодической культуре.

В настоящее время в промышленности для получения продуктов микробного синтеза используется метод непрерывного культивирования. Основным условием стабильного состояния культуры в непрерывном процессе является равенство удельной скорости роста (μ) и скорости разбавления (D).

Таблица 1. Зависимость биомассы X, единицы оптической плотности (ОП) от времени культивирования (Т) на углеродном субстрате

Номер варианта	Культура	Субстрат	Время культивирования, ч											
			0	2	4	6	10	20	30	40	50	60	70	80
1	<i>Candida utilis</i>	Глюкоза	0,10	0,10	0,11	0,12	0,20	0,30	0,55	0,60	0,62	0,63	0,64	0,64
2	<i>Rhococcus sp.</i>	Фенол	0,05	0,05	0,07	0,08	0,09	0,13	0,20	0,25	0,32	0,34	0,34	0,33
3	<i>Pseudomonas sp.</i>	Метанол	0,07	0,07	0,08	0,10	0,12	0,17	0,22	0,33	0,40	0,43	0,43	0,42
4	<i>Saccharomyces sp.</i>	Сахароза	0,10	0,10	0,11	0,12	0,13	0,18	0,25	0,31	0,38	0,44	0,47	0,48
5	<i>Methylococcus sp.</i>	Пропионат	0,05	0,05	0,05	0,05	0,06	0,08	0,11	0,20	0,30	0,38	0,44	0,44
6	<i>Cryptococcus sp.</i>	Маннит	0,05	0,05	0,06	0,07	0,09	0,15	0,19	0,28	0,35	0,36	0,36	0,36
7	<i>Rhodopseudomonas capsulata</i>	Ацетат	0,05	0,05	0,07	0,08	0,12	0,19	0,24	0,38	0,48	0,49	0,49	0,49
8	<i>Bacillus turing.</i>	Глюкоза	0,05	0,05	0,06	0,10	0,20	0,40	0,63	0,80	0,86	0,88	0,88	0,88
9	<i>Candida scotti</i>	Мальтоза	0,07	0,07	0,08	0,11	0,15	0,29	0,51	0,78	0,88	0,90	0,90	0,90
10	<i>Mycobacterium sp.</i>	Каприловая кислота	0,06	0,06	0,06	0,07	0,09	0,14	0,18	0,25	0,30	0,33	0,33	0,33

Таблица 2. Выход биомассы, начальная концентрация субстрата в среде и остаточные концентрации в культуральной жидкости

Но- мер вари- анта.	Культура	Субстрат	Биомасса, ед. ОП (X)	Начальная концентрация субстрата в среде, мг/л (S)	Остаточная концентрация субстрата в культуральной жидкости, мг/л (S ₀)
1	<i>Candida utilis</i>	Глюкоза	500	1000	100
2	<i>Rhodococcus</i> sp.	Фенол	200	500	50
3	<i>Pseudomonas</i> sp.	Метанол	100	250	20
4	<i>Saccharomyces</i> sp.	Сахароза	500	2000	1000
5	<i>Methylococcus</i> sp.	Пропионат	300	2000	900
6	<i>Cryptococcus</i> sp.	Маннит	550	1000	150
7	<i>Rhodopseudomonas capsulata</i> .	Ацетат	480	2000	800
8	<i>Bacillus turingiensis</i>	Глюкоза	540	1000	80
9	<i>Candida scotti</i>	Мальтоза	400	1000	100
10	<i>Mycobacterium</i> sp.	Каприловая к-та	200	1000	500

Скорость роста микроорганизмов определяется физиологическими особенностями штамма, условиями культивирования, природой утилизируемого углеродного субстрата и его концентрацией в среде. Высокие исходные концентрации некоторых компонентов среды могут ингибировать рост микроорганизмов. Наиболее важной характеристикой роста микроорганизмов является их теоретическая максимальная удельная скорость роста (μ_{\max}). Она рассчитывается при выборе перспективных культур для получения биомассы или продуктов метаболизма микроорганизмов в условиях непрерывного культивирования. Чем выше μ_{\max} при росте на конкретном субстрате, тем устойчивее и продуктивнее будет идти процесс получения необходимого продукта. С практической удельной скоростью роста (μ) она связана математическим выражением Моно и имеет следующий вид:

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_s + S}, \quad (1)$$

где μ – практическая удельная скорость роста; S – концентрация лимитирующего фактора в среде; K_s – константа насыщения (константа Михаэлиса-Ментена), равная концентрации лимитирующего фактора, при котором $K_s = 1/2$, величина K_s обратно пропорциональна *спродству организма к субстрату*. По своей форме уравнение Моно соответствует зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата при химических реакциях (уравнение Михаэлиса-Ментена).

Величину K_s можно определить в опытах, где суспензией клеток засевают среды с различными, но очень низкими концентрациями субстрата S . Через короткие интервалы времени (1, 2, 3 ч и далее) измеряют величину биомассы и вычисляют значение μ . Далее строят график зависимости μ от концентрации субстрата S (рис. 3). Проводят линию, параллельную оси абсцисс, на уровне самого высокого значения μ до пересечения с осью ординат.

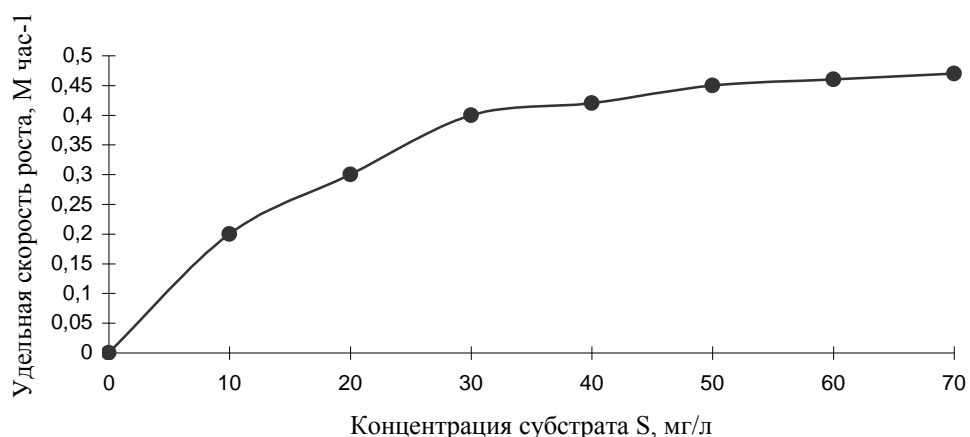


Рис. 3. Зависимость удельной скорости роста культуры (μ) от концентрации субстрата (S)

Количественное значение K_s рассчитывается графически экстраполированием величины $1/2 \mu_{\max}$ на ось абсцисс (концентрация субстрата).

Графоаналитический метод расчета условий непрерывного культивирования

Принцип метода состоит в сопоставлении графиков зависимости накопления биомассы от времени культивирования (см. рис. 1) с кривой продуктивности по выходу биомассы dt . Для этого в правой половине графика

зависимости образования биомассы от времени культивирования (кривая 1) наносят кривую зависимости продуктивности культуры по выходу биомассы от ее концентрации, т. е. dX/dt от X в тех же единицах оптической плотности (ед. ОП) (кривая 2).

Величина dX/dt рассчитывается по данным табл. 1.

Пример: $X_2 = 0,3$ ед. ОП; $X_1 = 0,15$ ед. ОП, тогда $dX/dt = 0,15$ ед. ОП.

На кривой 2 находим точку, соответствующую максимальному значению dX/dt . При пересечении перпендикуляра с осью абсцисс находим точку, которая соответствует состоянию динамического равновесия при непрерывном культивировании dX/dt (например, 0,15 ед. ОП). Проведя параллель по найденной точке до пересечения с осью ординат, находим показатель оптической плотности, соответствующий определенной концентрации биомассы X (например, 0,5 ед. ОП). Продлив эту прямую до пересечения с кривой 1, находим фазу роста, в которой будет поддерживаться культура. Опустив перпендикуляр на ось абсцисс со шкалой времени культивирования, находим время, необходимое для выхода культуры в нужную фазу роста и начала проточного культивирования. В стационарных условиях скорость потока (D) равна удельной скорости роста (μ). Их рассчитываем по формуле

$$D = \mu = \frac{dX/dt}{X} = \frac{0,15 \text{ ед. ОП/ч}}{0,5 \text{ ед. ОП}} = 0,3 \text{ ч}^{-1}.$$

Таким образом, находим, что если при оптической плотности культуры, равной 0,5 в ферментере включить проток со скоростью $0,15 \text{ ч}^{-1}$, то производительность процесса получения биомассы будет максимальна. Культивирование будет осуществляться в режиме *турбидостата*.

Задание 2

1. Построить график зависимости удельной скорости роста от концентрации субстрата для данной культуры на основании данных табл. 3.
2. Рассчитать значение теоретической μ_{\max} по формуле (1) при максимальном значении S (табл. 3).

3. По данным графика определить:

- а) значение константы Михаэлиса-Ментена (K_s);
- в) значение практической максимальной скорости роста (μ_{max}).

Таблица 3. Зависимость удельной скорости роста культур (μ) от концентрации субстрата (S)

Но- мер вари анта	Культура	Субстрат	Параметры							
			Смг/л	20	40	80	120	160	200	300
1	Candida utilis	Глюкоза	Смг/л	20	40	80	120	160	200	300
			μ ч ⁻¹	0,2	0,25	0,4	0,42	0,46	0,47	0,47
2	Rhodococcus sp.	Фенол	Смг/л	100	140	160	240	600	800	1000
			μ ч ⁻¹	0,03	0,05	0,15	0,18	0,20	0,20	0,2
3	Pseudomonas sp.	Метанол	Смг/л	10	20	30	40	50	60	80
			μ ч ⁻¹	0,5	0,65	0,75	0,8	0,82	0,85	0,9
4	Saccharomy- ces sp.	Сахароза	Смг/л	50	100	150	200	300	400	500
			μ ч ⁻¹	0,06	0,10	0,12	0,13	0,16	0,18	0,2
5	Methylococ- cus sp.	Пропио- нат	Смг/л	50	100	150	200	300	400	500
			μ ч ⁻¹	0,04	0,08	0,12	0,15	0,18	0,21	0,24
6	Cryptococcus sp.	Маннит	Смг/л	20	40	60	80	100	120	140
			μ ч ⁻¹	0,03	0,06	0,15	0,18	0,2	0,21	0,21
7	Rhodopseudo- monas caps.	Ацетат	Смг/л	10	20	30	40	50	60	70
			μ ч ⁻¹	0,01	0,02	0,05	0,08	0,1	0,12	0,13
8	Bacillus tur.	Глюкоза	Смг/л	20	40	60	80	100	120	140
			μ ч ⁻¹	0,01	0,02	0,04	0,06	0,08	0,12	0,13
9	Candida scotti	Мальтоза	Смг/л	50	100	150	200	300	400	500
			μ ч ⁻¹	0,01	0,02	0,03	0,05	0,08	0,12	0,13
10	Mycobacteri- um sp.	Каприло- вая к-та	Смг/л	10	20	30	40	50	60	80
			μ ч ⁻¹	0,02	0,04	0,1	0,15	0,18	0,2	0,21

4. Графоаналитическим методом рассчитать скорость протока для максимальной продуктивности культуры по выходу биомассы в единицах ОП (в режиме турбидостата), время культивирования в стационарных условиях и подключения подачи питательной среды (по вариантам 1-го этапа).

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Варфоломеев С. Д. Биотехнология: кинетические основы микробиологических процессов : учеб. пособие / С. Д. Варфоломеев, С. В. Калюжный. – М. : Высш. шк., 1990. – 296 с.
2. Градова Н. Б. Лабораторный практикум по общей микробиологии / Н. Б. Градова, Е. С. Бабусенко, И. Б. Горнова. – М. : ДеЛи принт, 2004. – 144 с.
3. Практикум по микробиологии : учеб. пособие / А. И. Нетрусов [и др.] ; под ред. А.И. Нетрусова. – М. : Академия, 2005. – 608 с.
4. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии с основами асептики и биотехнологии : учеб. пособие / Н. А. Заикина [и др.] ; под ред. Н. А. Заикиной. – Курск : КГМУ, 2002. – 236 с.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Методы культивирования.....	3
Порядок выполнения работы	7
1-й этап. Оценка параметров роста периодической культуры.....	7
Задание 1	8
2-й этап. Определение кинетических характеристик роста культур микроорганизмов для прогноза непрерывного культивирования.....	8
Задание 2	11
Библиографический список.....	12

ОЦЕНКА ПАРАМЕТРОВ РОСТА МИКРООРГАНИЗМОВ В УСЛОВИЯХ ПЕРИОДИЧЕСКОГО И НЕПРЕРЫВНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Методические указания к выполнению лабораторной работы по курсу «Основы микробиологии и биотехнологии» для студентов специальности 280201.65 «Охрана окружающей среды и рациональное использование природных ресурсов»

*Гаретова Людмила Александровна
Кириенко Ольга Александровна*

Главный редактор *Л. А. Суевалова*
Редактор *Н. Г. Петряева*

Подписано в печать 20.07.10. Формат 60x84 1/16.
Бумага писчая. Гарнитура «Таймс». Печать цифровая.
Усл. печ. 0,93. Тираж 100 экз. Заказ

Издательство Тихоокеанского государственного университета
680035, Хабаровск, ул. Тихоокеанская, 136.

Отдел оперативной полиграфии
издательства Тихоокеанского государственного университета
680035, Хабаровск, ул. Тихоокеанская, 136.