

Министерство науки и высшего образования
Российской Федерации
Ярославский государственный университет им. П. Г. Демидова
Кафедра ботаники и микробиологии

Н. В. Шеховцова

Ю. В. Зайцева

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ И КЛЕТОК

Учебно-методическое пособие

Ярославль
ЯрГУ
2019

УДК 579(075.8)
ББК Е46я73
Ш54

*Рекомендовано
Редакционно-издательским советом университета
в качестве учебного издания. План 2019 года*

Рецензент
кафедра ботаники и микробиологии ЯрГУ

Шеховцова, Нина Валентиновна.
Ш54 Культивирование микроорганизмов и клеток : учебно-методическое пособие / Н. В. Шеховцова, Ю. В. Зайцева ; Яросл. гос. ун-т им. П. Г. Демидова. — Ярославль : ЯрГУ, 2019. — 60 с.

В пособии приведен теоретический и практический материал, необходимый для освоения дисциплины. Представлен комплекс лабораторных работ, позволяющий закрепить полученные знания, умения и навыки.

Пособие написано в помощь студентам, обучающимся в магистратуре по программе «Экспериментальная биология и биотехнологии», восполняя дефицит соответствующей учебно-методической литературы.

УДК 579(075.8)
ББК Е46я73

© ЯрГУ, 2019

Настоящее учебно-методическое пособие написано в помощь обучающимся в магистратуре по программе «Экспериментальная биология и биотехнологии» направления 04.06.01 «Биология» и предназначено для самостоятельной подготовки студентов к лабораторным занятиям по курсу.

Для освоения курса «Культивирование микроорганизмов и клеток» необходимы базовые знания по дисциплинам бакалавриата: «Микробиология и вирусология», «Ботаника» и «Физиология растений», «Зоология» и «Физиология человека и животных», «Генетика и селекция», «Введение в биотехнологию», по аналитической химии, математике и математическим методам в биологии.

В результате освоения дисциплины обучающийся должен знать фундаментальные основы культивирования микроорганизмов и клеток; уметь выбрать и реализовать способ культивирования при решении профессиональных задач, рассчитать скорость роста культуры; владеть готовностью применить методические основы дисциплины при решении задач экспериментальной биологии и биотехнологий. Полученные знания позволят студентам выполнять научные исследования биотехнологического профиля.

Настоящее учебно-методическое пособие может быть рекомендовано и для повышения квалификации работников пищевой и фармацевтической промышленности.

Тема 1. Методическое обеспечение культивирования микроорганизмов и клеток

1.1. Понятие биологической безопасности

Культивирование микроорганизмов и клеток возможно только в специализированных лабораторных или производственных помещениях. При этом возникают две проблемы. С одной стороны, выращиваемые культуры клеток должны быть защищены от возможности контаминации микроорганизмами окружающей среды, в том числе вносимыми персоналом. С другой стороны, работающие не должны подвергаться угрозе инфицирования теми биологическими агентами, с которыми они работают, поскольку концентрации микроорганизмов и клеток при культивировании намного выше, чем в окружающей среде. Поэтому любая микробиологическая лаборатория должна быть организована таким образом, чтобы обеспечивать безопасность работы с патогенными биологическими объектами (ПБА). К патогенным для человека биологическим объектам относят

- микроорганизмы (вирусы, бактерии, включая риккетсии, хламидии и микоплазмы; простейшие и грибы), в том числе модифицированные методами генной инженерии,
- яды биологического происхождения (токсины),
- гельминты,
- любые объекты и материалы биотической и абиотической природы, подозрительные на их содержание.

Согласно принятому в РФ документу «Классификация микроорганизмов — возбудителей инфекционных заболеваний человека, простейших, гельминтов и ядов биологического действия» ПБА по степени биологической опасности (патогенности) подразделяют на 4 группы:

- I группа* — возбудители особо опасных инфекций;
- II группа* — возбудители высоко контагиозных эпидемических заболеваний человека;
- III группа* — возбудители инфекционных болезней, выделяемые в самостоятельные нозологические группы;
- IV группа* — условно патогенные микроорганизмы (возбудители оппортунистических инфекций).

Следует отметить, что отечественная классификация ПБА, разработанная в соответствии с рекомендациями ВОЗ, отличается от классификации ВОЗ обратным порядком нумерации групп патогенности [9].

Степень биологической опасности определяется как свойствами самого ПБА, так и факторами, которые могут опасность повысить. К таким факторам относят

- организацию лабораторных работ;
- особенности выполняемых в лаборатории исследований (диагностические, экспериментальные или производственные);
- состояние защитных инженерных систем;
- знание и соблюдение персоналом правил биологической безопасности;
- профессиональную подготовленность специалистов.

Нормативно-правовая база обеспечения биологической безопасности РФ включает в себя санитарно-эпидемиологические правила (СП), и методические указания (МУ), их дополняющие. СП вводятся в действие постановлениями Главного государственного санитарного врача РФ.

Основными документами, регламентирующими работу микробиологических лабораторий, являются **санитарные правила:**

- «Порядок выдачи санитарно-эпидемиологического заключения о возможности проведения работ с возбудителями инфекционных заболеваний человека I–IV групп патогенности (опасности), генно-инженерно-модифицированными микроорганизмами, ядами биологического происхождения и гельминтами»;
- «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)»;
- «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности и гельминтами»;
- «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I–IV групп патогенности»

и методические указания

- «Организация работы при исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного микроорганизмами I–II групп патогенности»;
- «Организация работы при исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного микроорганизмами».

СП «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)» и «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности и гельминтами» в зависимости от группы патогенности микроорганизмов и вида исследований определяют требования

- к помещениям и оборудованию лабораторий,
- проведению работ в лаборатории,
- порядку использования средств индивидуальной защиты,
- обеззараживанию материала.
- уборке помещений;

а также регламентируют:

- мероприятия по локализации и ликвидации последствий аварий при работе с ПБА,
- организацию контроля выполнения требований биологической безопасности и др.

Каждый сотрудник лаборатории несет личную ответственность за соблюдение требований биологической безопасности.

1.2. Правила безопасной работы на занятиях

1. Порядок работы со спиртовками.

1.1. Открыть крышку спиртовки и с помощью пинцета поправить фитиль так, чтобы он был вытянут в вертикальном положении.

1.2. Зажечь спиртовку и не приподнимать держатель фитиля в течение всего времени её использования.

1.3. Над горящей спиртовкой не наклоняться, не подносить к ней легковоспламеняющиеся предметы (бумагу, вату и т. п.), не оставлять без присмотра, не прекратив её горение.

2. Работа в лаборатории микробиологии разрешается только в халатах, в ней нельзя есть и пить.

3. Работа с бактериальными культурами.

3.1. Клетки микроорганизмов для приготовления препаратов-мазков берут бактериологической петлей, открывая пробирку или чашку Петри в зоне пламени (в диаметре 2–7 см).

3.2. Оставшиеся на петле после приготовления препарата клетки микроорганизмов тщательно сжигают в пламени спиртовки. Прокаливание петли в этом случае начинают с участка проволоки, примыкающего к кольцу для того, чтобы микробная масса, оставшаяся на петле, подсохла. Затем петлю переводят в верти-

кальное положение и прокаливают докрасна. Такой порядок стерилизации петли необходим потому, что при быстром нагревании влажной микробной массы происходит её разбрызгивание и образуется аэрозоль, загрязняющий воздух. Только после прокаливания петлю можно положить на место.

3.3. Если посуда с чистой культурой разобьется, надо тщательно собрать разбитые части и поместить их в дезинфицирующий раствор (2–3 %-й раствор бикарбоната натрия, 3–5 %-й раствор фенола, 0,5–3 %-й раствор хлорамина и др. дезинфектанты), руки тщательно вымыть мылом, дезинфицирующим раствором. Тщательно протереть место попадания культуры дезраствором.

3.4. На столе, где ведут работу с бактериальными культурами, не должно быть лишних предметов, мусора.

3.5. После окончания работы рабочий стол протирают, руки тщательно моют с хозяйственным мылом.

1.3. Влияние физических и химических факторов на микроорганизмы

Для определенных видов микроорганизмов в окружающей среде существуют условия, оптимальные для их роста и размножения, другие виды в этих условиях не размножаются, но в течение ограниченного времени сохраняют жизнеспособность. Кроме того, действие ряда физических и химических факторов может подавлять размножение и вызывать гибель микроорганизмов. Жизнеспособность микробных клеток зависит от температуры воздействия, влажности, рН среды.

Температура. По диапазону предпочтительных температур различают 3 группы микроорганизмов: мезофильные, термофильные и психроактивные. Для **мезофильных** микробов диапазон оптимальной для размножения температуры составляет 20–40 °С; они обитают главным образом в организме человека и теплокровных животных, а в окружающей среде обычно проявляют метаболическую активность ограниченное время. Оптимальной для размножения патогенных и условно патогенных для человека и животных микроорганизмов является температура около 37 °С.

Психроактивные (активные при низких температурах) микроорганизмы размножаются при температуре от 0 до 15–20 °С,

они обитают в почве, пресной и морской воде, в организмах холоднокровных животных. Многие психроактивные бактерии хорошо размножаются при температурах, благоприятных для мезофилов. Например, некоторые виды бактерий родов *Pseudomonas* и *Yersinia*, способные вызывать заболевания человека, могут размножаться и при температуре бытового холодильника (4 °С) в пищевых продуктах [5].

Термофильные (теплолюбивые) микроорганизмы размножаются при температурах выше 40 °С, в оптимальном температурном диапазоне 55–70 °С. Термофильные грибы, бактерии и простейшие являются сапротрофами и обитают в почве. Вид *Bacillus stearothermophilus*, почвенную термофильную бактерию, применяют в качестве биоиндикатора контроля режимов термической стерилизации.

Термофильные и термоустойчивые микроорганизмы потенциально опасны как загрязнители фармацевтических производств, т. к. могут сохранять жизнеспособность при обеззараживании объектов с использованием высоких температур. Существуют экстремально термофильные прокариоты, живущие в горячих источниках при 80–110 °С. Экстремальные термофилы *Thermus aquaticus* и *Pirococcus woessii* являются источником термоустойчивых ферментов ДНК-полимераз, используемых для синтеза фрагментов ДНК *in vitro* методом ПЦР [5].

Влажность среды существенно влияет на жизнеспособность микроорганизмов. Условия размножения микробных клеток определяются доступностью в среде свободной воды, в которой питательные вещества растворяются и поступают в клетки. Большинство микроорганизмов размножаются в субстратах с высоким содержанием влаги. При дефиците влаги микроорганизмы прекращают размножаться, но могут сохранять жизнеспособность. Влажность субстрата зависит от относительной влажности воздуха в окружающей среде. Сильное обезвоживание субстрата и относительная влажность окружающей среды ниже 30 % приводят к гибели большинства микроорганизмов [5].

Наиболее устойчивы к обезвоживанию споры и цисты бактерий, простейших, грибов. Высушивание используют как один из методов длительного хранения микробных культур, а также некоторых лекарственных препаратов и пищевых продуктов.

Многие ксерофильные (сухотлюбивые) виды почвенных грибов могут размножаться при достаточно низком содержании влаги в субстрате. Такие грибы часто вызывают порчу растительного лекарственного сырья при хранении.

Значение рН среды. Большинство микроорганизмов лучше всего растет при значениях рН, близких к нейтральным. Многие бактерии предпочитают слабощелочные среды и размножаются при рН 8,0. Большинство грибов хорошо растет при рН 5–6. При низких значениях рН (≤ 3) большинство бактерий прекращает размножение и погибает. Исключение составляют некоторые ацидофильные виды (например, тибациллы). Отрицательное влияние низкой кислотности среды на большинство микроорганизмов, особенно на бактерии, используют при консервировании пищевых продуктов и лекарственных препаратов, получении комбинированных дезинфектантов и антисептиков.

Снижение жизнеспособности микроорганизмов и их гибель происходят при повреждающем действии различных факторов, нарушающих функционирование структурных компонентов клеток. Повреждающими факторами могут быть высокие температуры, разные виды излучений, химические вещества.

В основе губительного действия высоких температур лежат процессы денатурации белков, повреждения рибосом, цитоплазматических мембран клеток. Вегетативные формы психроактивных и мезофильных микроорганизмов наиболее чувствительны к высоким температурам и погибают при 50–60 °С через 30–60 мин. Значительно большей устойчивостью по сравнению с вегетативными клетками обладают споры микроорганизмов. Споры бацилл и клостридий выдерживают кипячение от нескольких минут до 3 ч (в зависимости от вида). Для уничтожения спор необходимо действие температур значительно выше температуры кипения (120–180 °С). Большинство вирусов достаточно быстро погибает под влиянием высоких температур. Относительной термоустойчивостью обладает вирус гепатита В, способный сохранять жизнеспособность при кипячении в течение 15–20 мин, а при температуре 60 °С — в течение нескольких часов [5].

Эффективность губительного действия высоких температур на клетки зависит от времени воздействия, значения рН среды и наличия в ней влаги. Отсутствие воды повышает термоустой-

чивость спор; в кислой среде клетки и споры погибают быстрее, чем при нейтральных значениях pH.

Повреждающее действие на микроорганизмы оказывают **ионизирующие и неионизирующие облучения**. К ионизирующим облучениям относят γ -лучи и ускоренные электроны, обладающие большой энергией и оказывающие мощное проникающее действие. В результате поглощения клеткой определенной дозы энергии излучения происходит ионизация воды и образование свободных радикалов (OH^\cdot , O_2^\cdot и др.), которые вступают в окислительные реакции, приводящие к нарушению структуры нуклеиновых кислот, белков, углеводов, липидов и гибели клеток. Чувствительность микроорганизмов к ионизирующим воздействиям повышается в присутствии воды, растворенного кислорода и при повышении температуры. К действию ионизирующей радиации наиболее чувствительны вегетативные клетки бактерий, более устойчивы клетки дрожжей и мицелиальных грибов, вирусы и споры бактерий.

Неионизирующими являются инфракрасное (ИК) и ультрафиолетовое (УФ) излучение. ИК-лучи обладают незначительным количеством энергии и оказывают в основном тепловое действие. УФ-лучи с длиной волны 260 нм вызывают фотохимические изменения в микробных клетках и действуют на ДНК. Под влиянием УФ-облучения разрываются водородные связи между комплементарными основаниями в ДНК и происходит образование димеров тимина в одной из цепей, что приводит к нарушению репликации и гибели микробных клеток. Значительной устойчивостью к действию УФ-облучения обладают споры бактерий, грибов, микробные клетки, образующие пигменты, вирус гепатита В [5].

При низких дозах и времени воздействия ионизирующее и УФ-облучение могут вызывать мутации в отдельных клетках микробной популяции и только частичную гибель остальных клеток.

Действие ряда **химических веществ с неспецифической антимикробной активностью** может вызывать гибель микроорганизмов или угнетать их размножение. Неспецифическая антимикробная активность таких соединений связана с наличием в микробных клетках, как правило, нескольких мишеней, которые могут быть и в клетках млекопитающих.

Основными группами антимикробных веществ неспецифического действия являются **поверхностно-активные вещества**

(ПАВ), окислители (пероксид водорода, оксид этилена), **галогенсодержащие соединения** (хлорсодержащие вещества, йодофоры), **алифатические спирты** (этанол, изопропанол), **производные фенола, соли тяжелых металлов** (серебра, ртути, меди); **альдегиды** (формальдегид, глутаровый альдегид) [5].

Катионные ПАВ (четвертичные аммониевые соединения, гуанидины) вызывают нарушение проницаемости цитоплазматических мембран микроорганизмов, могут блокировать активность мембранных ферментов.

Алифатические спирты также обуславливают нарушение проницаемости мембран микробных клеток, что приводит к их обезвоживанию и к денатурации белков.

Окислители, галогены и альдегиды действуют на сульфгидрильные и аминные группы белков (в том числе и ферментов), нарушая их структуру.

Под влиянием **пероксида водорода** может произойти диссоциация клеточных рибосом на субъединицы.

Оксид этилена и пероксид водорода вызывают нарушение структуры ДНК.

Катионы тяжелых металлов реагируют с тиоловыми группами белков и взаимодействуют с основаниями ДНК. Альдегиды, фенолы, соли ртути, гипохлорит натрия приводят к повреждению клеточной стенки бактерий. **ПАВ, соли ртути, глутаровый альдегид в высоких концентрациях** могут вызывать общую коагуляцию цитоплазмы микробных клеток.

Эффективность действия антимикробных химических веществ зависит от их структуры и концентрации, чувствительности (или устойчивости) микроорганизмов, времени воздействия, влияния факторов внешней среды, таких как температура, состав среды. Споры грибов и особенно бактерий более устойчивы к действию антимикробных средств, чем вегетативные клетки.

Действие высоких температур, ионизирующих и неионизирующих облучений, химических веществ с неспецифической антимикробной активностью используют для уничтожения микроорганизмов в процессах стерилизации, антисептики, дезинфекции и консервации.

1.4. Применение асептики, дезинфекции и антисептики

Важнейшим условием обеспечения качества целевого продукта по микробиологическим показателям является соблюдение правил асептики при культивировании микробных и клеточных культур.

Асептика (от греч. «*a*» — не, «*septicos*» — гнойный) — комплекс мероприятий, направленных на предотвращение попадания в (на) какой-либо объект (в том числе ферментер) или в окружающую среду различных микроорганизмов. Эти мероприятия включают специальные методы работы в асептических блоках, микробиологических боксах и «чистых» помещениях. Особенно важно создавать асептичные условия при изготовлении термолабильных препаратов, которые нельзя подвергать термической стерилизации. При их приготовлении проводят предварительную подготовку объектов: стерилизацию отдельных компонентов препарата, дезинфекцию воздуха и помещений, антисептическую обработку рук персонала.

Дезинфекция (от лат. «*infectia*» — инфекция и франц. «*des*» — отрицательная приставка) означает комплекс мероприятий по уничтожению во внешней среде не всех, а только определенных возбудителей инфекционных заболеваний. Различают механический, физический и химический способы дезинфекции. Дезинфекцию проводят в исследовательских лабораториях, производственных помещениях, учреждениях здравоохранения и т. п. Целью дезинфекционных мероприятий является санитарная подготовка помещений и оборудования для предотвращения возможности контаминации питательных сред, клеточных культур — объектов исследований, инструментов, для предотвращения распространения и передачи микроорганизмов — возбудителей инфекционных болезней среди персонала.

Дезинфекции подвергаются поверхности помещений (стены, полы, столы), воздух, оборудование, трубопроводы и технологическая одежда. Для этой цели применяют химические вещества неспецифического антимикробного действия, механические способы обработки, например отмывание с помощью моющих средств, и физические методы. В качестве физического воздействия, применяемого для дезинфекции воздуха, используют

УФ-облучение. Для достижения максимального противомикробного эффекта необходимо использовать механические, физические и химические способы дезинфекции в комплексе.

Антисептика — применение химических противомикробных веществ неспецифического действия для уничтожения микроорганизмов, находящихся в контакте с макроорганизмом. Промышленная антисептика предполагает обработку только рук персонала с целью исключения попадания микроорганизмов в готовую продукцию, а в медицинской практике антисептика используется для обработки раневой поверхности, слизистых оболочек и внутренних полостей организма человека с целью уничтожения патогенных и условно-патогенных микроорганизмов.

Вещества, применяемые в качестве антисептиков и дезинфектантов, должны соответствовать следующим основным требованиям:

- иметь широкий антимикробный спектр действия;
- быть нетоксичными для персонала;
- отличаться хорошей растворимостью в воде.

Губительное действие антисептиков и дезинфектантов может быть статическим (бактериостатическим, фунгистатическим) или цидным (бактерицидным, фунгицидным, спорицидным). В первом случае вещество задерживает размножение микробных клеток. Удаление такого вещества из среды сопровождается возобновлением размножения. Во втором случае вещество вызывает гибель микроорганизмов. Большинство химических антимикробных веществ обладает микробоцидным эффектом.

Все антисептики и дезинфектанты обладают выраженной реакционной способностью и различаются по спектру антимикробного действия. Дезинфектанты с высоким уровнем антимикробной активности губительно действуют на грибы, вирусы, бактерии, в том числе наиболее резистентные их виды (например, микобактерии).

В качестве антисептиков и дезинфектантов применяют ПАВ, алифатические спирты, окислители, хлорсодержащие и некоторые йодсодержащие соединения, глутаровый альдегид. Эти вещества применяют в концентрациях, не оказывающих токсического действия на организм человека.

К поверхностно-активным относят катионные ПАВ или четвертичные аммониевые соединения (ЧАС) — дегмин (1 %-й водный раствор ЧАС и высокомолекулярных спиртов), катамин АБ (бензалкония хлорид), цетилпиридиния хлорид; гуанидины — хлоргексидин; анионные ПАВ — сульфонол, натрия пальмитат, натрия холеат. ПАВ используют для обработки помещений, оборудования и рук персонала.

Алифатические спирты (этиловый, изопропиловый) применяют для обработки мелкогабаритного оборудования и рук персонала.

Хлорсодержащие соединения (гипохлориты натрия, кальция, хлорная известь) применяют в качестве дезинфектантов.

0,5 %-й раствор хлорамина Б используют как антисептик, а 3 %-й — в качестве дезинфектанта. Недостатком хлорсодержащих веществ является раздражающее действие на слизистые оболочки дыхательных путей персонала, а преимуществом перед дезинфектантами группы ПАВ и спиртами — действие на спорообразующие микроорганизмы.

Фенолсодержащие вещества (трикрезол, лизол) редко применяют в связи с токсичностью фенола.

Для антимикробной обработки часто применяют комбинированные препараты, содержащие соединения нескольких групп. Например, для дезинфекции помещений используют ПАВ в сочетании с пероксидом водорода (препарат «Перамин»), или несколько соединений одной группы (препарат «Септодор», содержащий 4 разных ЧАС), или «Септодорфорте», состоящий из 4 ЧАС и глутарового альдегида.

Для **антисептической обработки рук** в производственных и лабораторных условиях используют 70° этанол (этиловый спирт), раствор хлоргексидина в смеси с ПАВ (анионоактивным сульфонолом), 0,5 %-й раствор йодопирона, 0,5 %-й раствор хлорамина Б.

1.5. Методы стерилизации

Стерилизация — процесс полного уничтожения или удаления из объекта всех форм живых микроорганизмов и их спор.

Для уничтожения микроорганизмов используют **физические факторы** (высокую температуру, облучение) и **химические вещества** (окись этилена, пероксид водорода). Для удаления мик-

робных клеток из термолабильных растворов используют **фiltrацию**.

При выборе метода стерилизации учитывают сохранение биологической ценности препарата, эффективность действия на микроорганизмы, возможность образования токсических продуктов в процессе стерилизации.

К методам стерилизации с использованием высоких температур относят стерилизацию паром под давлением в автоклаве, дробную стерилизацию текучим паром и стерилизацию сухим горячим воздухом в печах Пастера.

Стерилизацию паром под давлением в автоклаве проводят при избыточном давлении водяного насыщенного пара 0,5; 1,0; 2,0 ати (атмосфер избыточных), что соответствует температурам 110; 120; 132 °С. Наиболее часто применяется режим стерилизации при температуре 119–121 °С и давлении пара 1,0–1,1 ати в течение 20–30 мин. При таком режиме стерилизуют препараты термоустойчивых веществ (в том числе физиологический раствор), воду, технологическую одежду для работы в асептических условиях, перевязочный материал и инструменты.

Для обработки некоторых объектов (например, питательных сред с углеводами) применяют режим 110 °С и 0,5 ати.

При температуре 132 °С проводят обеззараживание биологического материала.

Дробную стерилизацию текучим паром используют для обработки объектов, не выдерживающих температуру выше 100 °С (некоторые растворы, питательные среды с молоком). Термическую обработку проводят при 100 °С 3 раза по 30 мин с интервалом 24 ч, в течение которых прорастают споры, не погибающие при 100 °С.

Сухим горячим воздухом в печах Пастера при температуре 160–180 °С стерилизуют термостойкие объекты: стеклянную и фарфоровую посуду, металлические инструменты, термоустойчивые порошки (мел, тальк, оксид цинка), масла.

При **стерилизации ионизирующим облучением** используют γ -лучи (источником является радиоактивный элемент Co^{60}) и энергию ускоренных электронов. Такой метод применяют для объектов, утрачивающих свои свойства под действием высоких температур: изделий медицинской техники из полимерных

материалов (одноразовых шприцев, систем для переливания крови, катетеров, зондов, упаковочных материалов ЛС и др.). Для стерилизации растворов этот метод нельзя применять, т. к. образуются высокотоксичные продукты радиолиза воды.

УФ-облучение, обладающее низкой проникающей способностью, применяется лишь для стерилизации воздуха внутри помещений, а также дезинфекции поверхностей.

Химическая стерилизация предполагает использование токсических газов: оксида этилена, смеси ОБ (смесь оксида этилена и бромистого метила в весовом соотношении 1:2,5), формальдегида, глутарового альдегида. Глутаровый альдегид после активирования буферными системами используется для химической стерилизации тех материалов, которые нельзя стерилизовать другими методами. Эти вещества являются алкилирующими агентами, способными инактивировать активные группы в ферментах, ДНК, РНК, вызывая тем самым гибель микробов.

Стерилизацию можно проводить погружением в раствор стерилизуемого объекта.

Для химической стерилизации используют также окислители — 6 %-е растворы пероксида водорода, надкислоты, образуемые при смешивании H_2O_2 и кислот (уксусной, муравьиной); их применяют для обработки воздуха и поверхностей помещений, устойчивого к коррозии оборудования. Они оказывают спороцидное действие и обладают относительно низкой токсичностью. Для борьбы со спорообразующими бактериями также используют препараты на основе глутарового альдегида (глуторал) [5].

Газовую стерилизацию проводят газами — оксидом этилена в смеси с бромидом этила. Используют для обработки в специальных камерах изделий медицинской техники из термолабильных материалов, снабженных оптическими устройствами. Метод небезопасен для людей и окружающей среды, т. к. стерилизующие агенты остаются на объекте стерилизации.

Фильтрацию применяют для стерилизации термолабильных биологических жидкостей, не выдерживающих нагревания: растворов антибиотиков, ферментов, витаминов и др. Используют мембранные фильтры из полимерных материалов на основе эфиров целлюлозы, диаметр пор которых (0,22 мкм) меньше размера большинства микробных клеток.

Фильтрацию, лучевую и химическую обработку называют методами «холодной» стерилизации.

С целью проверки соблюдения режима стерилизации осуществляют **контроль работы стерилизующих устройств**. Для этого используют технические устройства (манометры или термометры) и различные химические индикаторы — вещества с известной температурой плавления (например, бензойную кислоту с температурой плавления 121 °С) и вещества, изменяющие цвет в условиях стерилизации. Надежным методом контроля является использование биологических индикаторов в виде суспензии спор бактерий, наиболее резистентных к определенному виду стерилизующего воздействия. Для контроля стерилизации паром под давлением в режиме 1,0–1,1 ати, 119–121 °С используют споры термофильной культуры *Bacillus stearothermophilus* в жидкой питательной среде. Индикаторы помещают вместе со стерилизуемыми объектами, после окончания стерилизации фиксируют достижение точки плавления, изменение цвета или оценивают жизнеспособность спор после инкубирования при оптимальной температуре для культуры, используемой в качестве биологического индикатора.

1.6. Правила приготовления питательных сред

Питательная среда должна удовлетворять всем потребностям выращиваемой клеточной культуры. Конструктивные и энергетические процессы у микроорганизмов крайне разнообразны, поэтому столь же разнообразны их потребности в питательных веществах. Из этого следует, что универсальных сред, одинаково пригодных для всех без исключения клеточных культур, не существует.

Пищевые потребности организма можно определить из элементного состава его биомассы (табл. 1). Элементный состав живой клетки показывает, в каких элементах организм нуждается в первую очередь. Оказалось, что элементные составы всех живых организмов примерно одинаковы (Гусев, Минеева, 1984).

Сырая биомасса на 80–90 % состоит из воды H_2O , которая служит источником протонов H^+ и активных форм кислорода O^{2-} . Сухое вещество, в свою очередь, на 95 % состоит из углерода, азо-

та, фосфора и серы. Калий, магний, кальций и железо необходимы клеткам в относительно большом количестве, поэтому их относят к макроэлементам, а марганец, кобальт, медь, молибден и цинк — в меньших количествах — их называют микроэлементами.

Таблица 1

**Элементный состав микробной клетки
(% от сухого вещества)**

Элемент	доля, %	Элемент	доля, %	Элемент	доля, %
C	50	S	1	Mg	0,5
O	20	K	1	Cl	0,5
N	14	Na	1	Fe	0,2
P	8	Ca	0,5	Все остальные	0,3

Различные аспекты потребностей микроорганизмов в углероде определяют разные подходы к их разделению на экологотрофические группы. Так, тип питания определяет пара «**автотрофы — гетеротрофы**». Первые способны в качестве единственного источника углерода использовать углекислоту, соединение, содержащее углерод в наиболее окисленной форме. Соответственно автотрофам в среду культивирования вносят бикарбонат натрия (NaHCO_3) или карбонаты (чаще CaCO_3). В некоторых случаях среду продувают воздухом, обогащенным углекислым газом (1–5 %), поскольку содержание углекислоты в атмосферном воздухе — не более 0,03 %. Гетеротрофам в качестве источника углерода вносят готовые органические вещества.

По количеству субстратов, необходимых культуре для синтеза биомассы, микроорганизмы подразделяют на прототрофов и ауксотрофов. **Прототрофы** способны синтезировать органические вещества клеток из одного источника углерода, их можно выращивать на минеральных синтетических средах с глюкозой в качестве единственного источника углерода и энергии. **Ауксотрофы** же нуждаются, помимо основного источника углерода, в дополнительных органических веществах, называемых факторами роста, которые добавляют в питательные среды в количестве на порядок меньшем, чем основной источник углерода. Как правило, факторами роста являются биологически активные вещества или прекурсоры синтеза основных макромолекул, напри-

мер: незаменимые аминокислоты, пуриновые и пиримидиновые основания, витамины и т. п. Предварительно их готовят в виде концентрированных растворов, которые добавляют в питательную среду в необходимом количестве прямо перед посевом. Как правило, концентрированные растворы факторов роста термолабильны, поэтому их стерилизуют автоклавированием при 0,5 ати, иногда кипячением или фильтрованием.

По специализации в отношении источника углерода среди микроорганизмов выделяют **специалистов** и **универсалов**. К специалистам относят микроорганизмы, способные расти на одном — двух субстратах. Классический пример — метанокисляющие бактерии, которые используют метан либо метанол. Универсалы способны в качестве единственных источников углерода и энергии использовать широкий круг самых разнообразных веществ: углеводы, органические кислоты и спирты, углеводороды, ароматические соединения и даже ксенобиотики. Примером такого рода являются бактерии семейства *Pseudomonadaceae*.

Кроме того, гетеротрофы разборчивы и в концентрации предлагаемого им органического вещества. По этому принципу среди них выделяют **олиго- и копиотрофов**. Эти термины введены в микробиологическую практику относительно недавно (Poindexter, 1981). Если термин «олиготрофы» сразу был принят отечественными микробиологами в отношении микроорганизмов, которые выигрывают конкуренцию при низких концентрациях питательных веществ, то термин «копиотрофы» не прижился. В русскоязычной литературе вместо него чаще применяют более привычное слово «сапротрофы» при описании микроорганизмов, которые нуждаются в высоких концентрациях органических веществ. Копиотрофов (сапротрофов) выращивают, например, на таких богатых натуральных средах, как МПБ или МПА (десятки г ОВ/л), а олиготрофов — на бедных, например на МПА, разбавленном в 10 раз, или голодном агаре, агаризованной природной воде и т. п. (мг и мкг ОВ/л).

Вторым основным компонентом питательной среды является источник азота. Азот входит состав клеток главным образом в восстановленных формах амина ($—NH_2$) или имино ($—NH$)-групп. Однако потребности в азоте могут быть удовлетворены различными азотсодержащими соединениями, в которых азот имеет разную

степень восстановленности. Для многих видов это могут быть соли аммония, например в виде хлоридов или сульфатов, а также гидроксида аммония. Однако следует учитывать, что в результате потребления клетками аммония при внесении NH_4Cl (NH_4) $_2\text{SO}_4$ среда подкисляется вследствие накопления аниона соответствующей кислоты, а NH_4OH , наоборот, сильно подщелачивает среду, поэтому в качестве источника азота используется редко.

Многие микроорганизмы в качестве источника азота способны использовать нитраты KNO_3 или NaNO_3 , которые, в отличие от солей аммония, являются физиологически щелочными, поскольку приводят к накоплению в среде катионов K^+ или Na^+ . Нитриты в кислых условиях для многих микроорганизмов токсичны, поэтому в качестве источника азота практически не используются (Егоров, 1983).

При культивировании микроорганизмов, нуждающихся в органических источниках азота, в среду приходится добавлять концентрированные растворы аминокислот. Следует иметь в виду, что аминокислоты — цистин и цистеин, а также амиды — глутамин и аспарагин стерилизуют только фильтрованием, остальные — 15 мин при 0,5 ати. Потребности микроорганизмов в нескольких аминокислотах удовлетворяют, добавляя в среду гидролизат белка (чаще гидролизат казеина).

Наконец, наиболее требовательных микроорганизмов выращивают на средах, содержащих белки или пептон — продукт их неполного расщепления, представляющий собой смесь поли- и олигопептидов, аминокислот, органических азотных оснований, солей и микроэлементов. Следует иметь в виду, что и аминокислоты и пептон могут одновременно служить и источником углерода.

Кроме того, азотфиксаторы способны использовать в качестве единственного источника азота молекулярный азот — N_2 . Для них соединений азота в питательную среду можно не вносить. Как правило, им достаточно азота, содержащегося в воздухе, но в некоторых случаях применяют культивирование в атмосфере азота.

Большинство витаминов как факторов роста вносят в концентрации 1 мкг/мл среды, фолиевую и п-аминобензойную кислоты — по 0,05 мкг/мл, биотин — 0,005 мкг/мл среды непосредственно перед засевом стерильной среды. Рекомендуется витамины готовить в виде растворов, концентрированных в 100 раз, в стериль-

ной посуде на стерильной дистиллированной воде. Исключение составляют рибофлавин, который растворяют в 0,02 н уксусной кислоте, и фолиевая кислота, которую приготавливают в 0,01 н NaOH, доводя затем концентрацию NaOH в растворе до 0,001 н. Полученные растворы стерилизуют прогреванием в водяной бане 3 мин. Тиамин стерилизуют фильтрованием. Растворы витаминов хранят в холодильнике при +4 °С, где они сохраняются не менее месяца. Хранение в темноте обязательно для фолиевой кислоты, пиридоксина и рибофлавина, т. к. они разрушаются на свету.

Такие добавки, как дрожжевой экстракт, дрожжевой автолизат, кукурузный экстракт, являются примерами смесей многих факторов роста, поэтому их применяют, когда культура нуждается в нескольких факторах роста или когда потребности в факторах роста достоверно не известны.

Кроме источников углерода, азота и факторов роста, микроорганизмы и клетки нуждаются в сере, фосфоре и ряде других элементов. Все они должны содержаться в доступной для культур форме. Как правило, достаточно внести эти элементы в виде минеральных солей. Поэтому так называемый «минеральный фон» сред для культивирования различных видов может быть сходным по составу.

В частности, потребности культур в сере удовлетворяют за счет сульфатов, несмотря на то что в клетках сера находится в восстановленной форме в виде сульфгидрильных групп. Редкие виды нуждаются в восстановленной сере. В этих случаях в качестве минерального источника серы чаще всего вносят сульфид натрия Na_2S , а органического — аминокислоту цистеин.

Потребности организмов в фосфоре обеспечиваются внесением солей фосфорной кислоты. Другие элементы, включая все необходимые металлы, клетки получают в виде катионов или анионов неорганических солей. Для избегания выпадения осадка в результате образования нерастворимых комплексов фосфатов с некоторыми катионами, в первую очередь с железом и кальцием, рекомендуется добавлять в среду от 0,001 до 1 г/л этилендиаминтетраацетата (ЭДТА), комплексообразующего соединения, которое постепенно отдает в раствор катионы по мере диссоциации.

K, Mg, Ca и Fe требуются организмам в относительно больших количествах, поэтому их включают в основной состав среды.

Другие металлы: Mn, Mo, Zn, Cu и Co — необходимы в следовых количествах (1 мкг — 1 мг на 1 л), их вносят в синтетические среды в виде концентрированного раствора микроэлементов в количестве 1 мл/л. В натуральные среды сложного состава их не добавляют, т. к. они а priori там присутствуют в следовых количествах.

Помимо источника углерода, каждая культура нуждается в источнике энергии. Для хемоорганогетеротрофов эту функцию выполняют те же органические вещества, которые являются источником энергии. Для хемолитотрофов в качестве источника энергии добавляют неорганические доноры электронов в виде восстановленных или не до конца окисленных соединений серы (H_2S , S^0 , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, SO_3^{2-}), азота (NH_4^+ , NO_2^-), молекулярного водорода H_2 или Fe^{2+} . Культуры фототрофов выращивают при естественном или искусственном освещении.

Лабораторное занятие 1

Содержание. Стерилизация питательных сред, инструментов и посуды.

Ход работы

1. Ознакомиться с работой автоклава, сушильного шкафа и фильтров для холодной стерилизации.

2. Зарисовать схему устройства автоклава.

3. Ознакомиться с журналом регистрации работы стерилизатора (приложение).

4. Подготовить к стерилизации мясо-пептонный бульон (МПБ) в пробирках (по 10 мл).

1. 5. Подготовить к стерилизации воду в пробирках (по 10 мл).

6. Подготовить к стерилизации чашки Петри, шпатели Дригальского, пипетки на 0,1–0,2; 1–2 и 10 мл.

7. Приготовить ватные пробки к пробиркам.

Материалы и оборудование: пипетки, градуированные разные; чашки Петри, шпатели Дригальского, пробирки биологические, ножницы, препаровальная игла, емкости для пробирок, вата, марля, нитки белые, бумага; сухой МПБ, весы.

Демонстрация: автоклав, сушильный шкаф, установка для мембранного фильтрования.

Вопросы для обсуждения

1. Принципы организации деятельности микробиологической лаборатории.
2. Техника безопасной работы в микробиологической лаборатории.
3. Правила асептики, дезинфекции и стерилизации.

Тема 2. Методы определения составляющих материального баланса клеточных культур

2.1. Определение числа жизнеспособных бактерий культуральными методами

Для определения числа жизнеспособных клеток в концентрированных суспензиях используют методы посева на плотные питательные среды в чашки Петри. Для этого сначала готовят ряд предельных десятикратных разведений из исходной культуры, используя пробирки, заполненные 9 мл стерильной водопроводной воды или физиологического раствора (0,5 % NaCl), или фосфатного буфера, а также новую стерильную пипетку на 1 мл при приготовлении каждого очередного разведения. Далее из трех последних разведений делают посев инокулята одним из описанных ниже методов.

Метод поверхностного посева: на поверхность плотной среды вносят по 0,05–0,1 мл инокулята, который затем распределяют по поверхности питательной среды шпателем Дригальского с помощью круговых движений.

Метод глубинного посева: сначала в пустые стерильные чашки Петри вносят по 1 мл инокулята, который затем заливают 20 мл расплавленной и охлажденной до 40–45 °С агаризованной питательной средой. Круговыми движениями чашки Петри, перемещаемой по поверхности рабочего стола, перемешивают содержимое и оставляют до полного застывания агара.

Метод двойного агара применяют в тех случаях, когда культура особенно чувствительна к отсутствию источников питания. В этом варианте сначала в чашки Петри заливают половину среды (10 мл), после её застывания засевают культуру поверхностным

способом (см. выше), а затем посев заливают второй половиной расплавленной и охлажденной до 40–45 °С агаризованной среды, распределяя среду по поверхности первого слоя путем перемещения чашки Петри круговыми движениями по поверхности стола.

Учет результатов чашечного посева. Подсчитывают число колоний на каждой чашке и заносят в протокол (табл. 2), где n_1 и n_2 — число колоний, выросших на двух чашках, засеянных параллельно из одного разведения.

Таблица 2

Протокол учета числа колоний на чашках Петри (n_i)

Разведение	МПА	\bar{n}
1:10 (10^{-4})	n_1	
	n_2	
1:100 (10^{-5})	n_1	
	n_2	
1:1000 (10^{-6})	n_1	
	n_2	

Колонии обычно учитывают в тех разведениях, где их вырастает не менее 20. Если колоний слишком много и сделать пересев нельзя, то подсчет ведут следующим образом:

1) делят поверхность чашки на секторы (в зависимости от густоты колоний от 16 до 64 секторов), подсчитывают количество колоний в одном секторе и пересчитывают на всю поверхность агаровой пластины;

2) в бумажном фильтре размером с чашку вырезают квадратик площадью 1 см² и подсчитывают число колоний в нескольких таких квадратиках, перемещая фильтр по всей поверхности чашки. Затем подсчитывают среднее количество в одном квадратике и переводят на площадь агаровой пластины.

После заполнения протокола (табл. 2) анализируют качество посева. При правильно произведенном посеве с увеличением разведения число выросших колоний должно уменьшаться не менее чем в 3 раза между соседними разведениями. Если эта закономерность имеет место, то для расчета числа гетеротрофных микроорганизмов соответствующей группы следует выбрать то разведение, из которого на чашке Петри выросло от 100 до 300 колоний.

Далее с помощью критерия χ^2 определяют возможность усреднения результатов. Для этого заполняют статистическую табл. 3.

Таблица 3

Вычисление среднего квадратичного отклонения χ^2

n_i	\bar{n}	$n_i - \bar{n}$	$(n_i - \bar{n})^2$
n_1			
n_2			
Сумма квадратичных отклонений			$\Sigma (n_i - \bar{n})^2$

С помощью полученных значений рассчитывают критерий χ^2 по формуле:

$$\chi^2 = \frac{(n_i - \bar{n})^2}{\bar{n}}, \quad (2.1)$$

где \bar{n} является средним арифметическим результатов двух повторностей (см. пример в табл. 4).

Значение величин χ^2 находят в статистических таблицах. В случае двукратной повторности следует воспользоваться величинами, рассчитанными для числа степеней свободы (α), равного 1 ($\alpha = i - 1$, где i — число повторностей). Из таблицы следует, что при 5 %-м уровне вероятности различие будет значимым при χ^2 не менее 3,841.

Таблица 4

Пример определения χ^2

n_i	\bar{n}	$n_i - \bar{n}$	$(n_i - \bar{n})^2$
201	192	9	81
183	192	-9	81
Сумма квадратичных отклонений			162

В данном примере $\chi^2 = 162/192 = 0,844$, что меньше 3,841. Следовательно, различия между повторными определениями не значимы и результаты можно усреднять.

Если $\chi^2 \geq 3,841$, то различия между повторными определениями значимы и усреднять результаты нельзя.

Тогда по совокупности признаков следует выбрать одну чашку Петри, где число колоний даст общий результат с наименьшей ошибкой.

Пересчет среднего числа выросших колоний (\bar{n}) на численность бактерий соответствующей группы (N) производят, исходя из предположения, что одной колониеобразующей единицей (КОЕ) является отдельная микробная клетка. Для этого используют формулу:

$$N = \frac{\bar{n} \cdot r}{v} \text{ [КОЕ/мл]}, \quad (2.2)$$

где \bar{n} — среднее число колоний на чашках Петри, засеянных из одного разведения, r — коэффициент разведения, v — объем инокулята (мл).

Оптимальным разведением считается то, при посеве из которого вырастает около 300 колоний на одной чашке [10]. Если с увеличением разведения количество колоний закономерно уменьшается, то КОЕ действительно представлено одной клеткой и для расчета численности можно использовать то разведение, которое дает максимальное значение N. Если эта закономерность нарушается, нужно логическим путем установить причину (нестерильность посева, агрегированность бактериопланктона и т. п.) и взять то значение, которое дает наиболее реальную величину.

2.2. Определение общей численности бактерий методом прямого счета по Виноградскому — Бриду

Приготовление препарата. На предварительно обезжиренном (лучше стерильном) предметном стекле парафиновым стеклоглафом (карандашом по стеклу) рисуют 2 квадрата размером 15×15 мм, используя трафарет.

Стерильной пипеткой на 0,1 мл наносят внутрь каждого квадрата минимальную каплю фиксированного объема. Микробиологической петлей, простерилизованной прокаливанием и охлажден-

ной в рабочей зоне пламени горелки, распределяют каждую каплю по всей площади квадрата. Мазок высушивают на воздухе.

Далее в один из квадратиков помещают вторую каплю фиксированного объема, повторив всю процедуру до полного высыхания препарата.

Затем препарат фиксируют в пламени горелки и окрашивают фуксином в течение 1–3 мин, после чего промывают дистиллированной водой и просушивают между кусочками фильтровальной бумаги. Препарат готов для микроскопирования.

Прямой счет. Далее с помощью сеточки Гаженко, вставленной в окуляр, подсчитывают число бактериальных клеток в каждом из двух препаратов, сделанных на одном предметном стекле. Результаты заносят в протокол (табл. 5).

Таблица 5

Результаты прямого счета бактерий

№ п/п поля зрения	Кол-во микробных клеток (n_i)	
	Квадрат 1 ($v_1 = \dots$)	Квадрат 2 ($v_2 = \dots$)
1	n_1	n_1
2	n_2	n_2
...		
z	n_z	n_z
Итого:	$\sum n_i$	$\sum n_i$

Микроскопирование проводят при максимальном увеличении, используя масляную иммерсию и синий светофильтр для более контрастной видимости клеток. Для прямого счета микробных клеток вставляют в окуляр микроскопа сеточку Гаженко, 9 маленьких квадратиков которой обычно составляют поле зрения.

На правильно приготовленных препаратах микроорганизмы равномерно распределены по поверхности, и в поле зрения находится около 50 микробных клеток, поэтому обычно просматривают 15–20 полей зрения, с тем чтобы сумма подсчитанных микроорганизмов составляла не менее 1 000. Если микробных клеток слишком много или слишком мало, то изменяют объем анализируемого образца воды.

При невозможности переделать препараты объем анализируемых образцов исходной воды следует варьировать сразу

при первоначальном приготовлении нескольких препаратов из одной пробы воды.

При неравномерном распределении микроорганизмов пустые поля зрения ($n_i = 0$) также вносят в протокол (табл. 5), отмечая нулем отсутствие микробных клеток.

Вычисления. Общую численность бактерий ($N_{\text{общ.}}$) для каждой повторности ($N_{i.}$) рассчитывают по формуле:

$$N_{\text{общ.}} = \frac{S \cdot \sum n_i}{Z \cdot s \cdot v} \text{ [кл/мл]}, \quad (2.3)$$

где S — общая площадь окрашенного на фильтре или стекле препарата (мм^2), $\sum n_i$ — сумма подсчитанных под микроскопом микробных клеток, Z — количество просмотренных полей зрения, s — площадь одного поля зрения (мм^2), v — объем образца воды, затраченный на приготовление окрашенного препарата (мл).

Площадь одного квадрата сеточки Гаженко оценивают, определяя размер его стороны с помощью объект-микрометра, который помещают вместо препарата на предметный столик, имея в виду, что минимальное деление его линейки составляет 0,005 или 0,01 мм (уточняется по маркировке объект-микрометра).

При усреднении значений общей численности бактерий, полученных в разных повторностях, определяют значимость различий по χ^2 (табл. 3) и считают, что величина $N_{\text{общ.}}$ есть случайная величина, которая подчиняется, как эмпирически установлено, нормальному распределению Пуассона. В этом случае среднее квадратичное отклонение (σ) равно \sqrt{N} , поэтому доверительный интервал для величины $N_{\text{общ.}}$ находится по формуле $N \pm \alpha \sqrt{N}$, где α — коэффициент, зависящий от выбранного значения доверительной вероятности ($\alpha = 2$ при вероятности, равной 0,95, и трехкратной повторности).

Определение биомассы микроорганизмов. Биомассу микроорганизмов (B) находят на основании общей численности бактерий ($N_{\text{общ.}}$) по формуле:

$$B = N \cdot v \cdot \rho \cdot f \text{ [г/мл]}, \quad (2.4)$$

где $N_{\text{общ.}}$ — численность бактериопланктона (кл/мл), v — вычисленный из измерений объем одной клетки (в среднем для водных

бактерий равный $0,5 \text{ мкм}^3$), ρ — плотность сырой бактериальной массы ($\approx 1 \text{ г/см}^3$) и f — фактор усыхания клеток ($\approx 1,6$).

Для вычисления необходимо единицы объема унифицировать и выразить в см^3 (мл). Чтобы избавиться от отрицательных степеней г/мл переводят в мкг/мл или мг/л.

Для определения сухой массы (V_c) в весовых единицах содержания углерода исходят из того, что сухое вещество в бактериальных клетках составляет 15% (85% — вода). Содержание углерода в сухом веществе бактерий обобщенно приравнивают к 50%. Тогда расчет принимает вид:

$$V_c = V \cdot 0,15 \cdot 0,5 \text{ [мкг С/мл, мг С/л]}, \quad (2.5)$$

На практике, если на препарате имеется несколько типов бактериальных клеток, различных по форме и размерам, подсчет следует вести отдельно для каждого морфотипа или вычислять средние размеры клеток (Копылов, 2008).

2.3. Определение биомассы по оптической плотности клеточной культуры

Измерение светорассеяния суспензией клеток позволяет мгновенно измерить биомассу, что во второй половине XX в. определило прогресс в изучении математических закономерностей роста микробных и клеточных культур, а также в развитии биотехнологий. Суспензии организмов рассеивают свет и кажутся мутными, если показатель преломления организма отличается от показателя преломления среды. Видимая мутность начинает проявляться, когда плотность бактерий достигает 10^6 ед/мл (Перт, 1973). Мутность можно измерять, определяя либо количество света, прошедшего через суспензию (абсорбциометрия), либо количество света, рассеянного суспензией (нефелометрия). Метод светорассеяния применим к суспензиям бактерий, дрожжей, спор и клеток млекопитающих.

На степень мутности суспензии организмов может оказывать влияние целый ряд физических и биологических факторов, из которых не все поддаются учету. При абсорбциометрии концентрация организмов x , длина светового пути l , интенсивности падающего I_0 и прошедшего I_t света находятся в следующих отношениях:

$$\log (I_0 / I_t) = A \cdot x \cdot l, \quad (2.6)$$

где A — величина постоянная при небольших концентрациях бактерий, но при больших начинает увеличиваться вследствие вторичного рассеяния, поскольку свет наталкивается более чем на одну частицу. Значение $\log (I_0 / I_t)$ называют оптической плотностью, или экстинкцией.

Для нефелометрии справедливо следующее уравнение:

$$\log (I_0 / I_s) = -B \cdot x \cdot l, \quad (2.7)$$

где I_s — интенсивность рассеянного света, а B — константа.

Степень и направление рассеянного света зависят от размера и формы частицы, длины световой волны и разницы между показателями преломления частиц и среды. Эти влияния выражают законы Пауэлла (Powell, 1963):

1) общее количество рассеянного света возрастает с увеличением отношения размера частиц к длине световой волны;

2) общее количество рассеянного света тем больше, чем больше различие между показателями преломления частиц и среды.

Согласно первому закону следует выбирать свет с наименьшей длиной волны. Однако обычно используют зеленый свет с длиной волны не менее 540 нм, поскольку более короткие волны могут вызывать избыточное поглощение света. О влиянии показателя преломления можно судить по контрастности колоний на плотных средах. Микрококки, в частности, более контрастны, чем *Azotobacter*, т. к. они имеют более высокий показатель преломления. На показатель преломления могут влиять концентрация твердых частиц и набухание клеток в гипотонической среде, поэтому рекомендуется делать поправку на показатель преломления и следить за тем, чтобы осмотическое давление добавляемой жидкости было равно тоничности суспензии. Для предотвращения изменения оптической плотности суспензии при изменении тоничности среды в клеточную суспензию добавляют токсичное соединение, например раствор формалина (1 %).

2.4. Определение количества органического вещества методом бихроматного окисления

Концентрации органических веществ (ОВ), растворимых и взвешенных, можно определять методом бихроматного окисления. Для этого к 1,6 мл исследуемой жидкости добавляют 2,4 мл серно-хромовой смеси, состоящей из 0,2 н раствора $K_2Cr_2O_7$ и концентрированной H_2SO_4 в соотношении 1:5 по объему. После перемешивания на вортексе смесь выдерживают в термостате при 140 °С в течение 20 минут. Затем смесь охлаждают и измеряют концентрацию Cr^{3+} при 590 нм на спектрофотометре или колориметре.

Концентрации потребляемого субстрата и образующегося продукта можно определять в культуральной жидкости после осаждения клеток центрифугированием при 3000 g, используя калибровочные графики, построенные по соответствующим веществам. До центрифугирования измеряют сумму взвешенных (клеток) и растворимых органических веществ.

Концентрацию взвешенного ОВ биомассы находят по разнице и рассчитывают с помощью калибровочных коэффициентов. Для этого количество затраченного на окисление бихромата калибруют по сухой массе клеток следующим образом. В предварительных опытах получают суспензии отмытых клеток различной плотности, например от 15 до 1500 мг/л, и определяют в них концентрацию взвешенных частиц бихроматным и весовыми методами.

Лабораторные занятия 2–3

Содержание. Определение численности бактерий методом прямого счета и косвенными методами посева на МПА в чашки Петри и нефелометрически.

Ход работы

1. Методом посева на агаризованную питательную среду в ч. Петри определить численность живых клеток в суспензии музейной культуры бактерий, выданной преподавателем.

2. В той же суспензии определить общую численность бактерий методом прямого счета.

3. Измерить оптическую плотность исходной суспензии микроорганизмов и в её двукратных разведениях.

4. Рассчитать сырую и сухую биомассу, исходя из общей численности бактерий.

5. Построить калибровочный график ОП($N_{\text{общ}}$).

Материалы и оборудование: предметное стекло, парафиновый стеклограф, покровное стекло 18×18 мм (трафарет), пипетка Пастера; пробирки с 9 мл стерильной водопроводной воды, пипетки на 1 мл, пипетки на 0,1–0,2 мл, ч. Петри с агаризованной средой, шпатели Дригальского; пипетка стерильная на 5 мл, кюветы на 5 мл, стаканчик со стерильной дистиллированной водой.

Демонстрация: фотометр КФК-3–«ЗОМЗ», определение КОЕ/мл на турбидофлюориметре «Био ТФ».

Вопросы для обсуждения

1. Прямые методы определения численности клеток в культуре.
2. Косвенные методы определения численности клеток.
3. Физические методы определения биомассы.
4. Расчетные методы определения биомассы.
5. Принцип работы турбидофлюориметра «Био ТФ».
6. Методы аналитической химии в определении составляющих материального баланса культуры.

Тема 3. Математические закономерности периодического роста клеточных культур

Рост клеточных культур (синтез биомассы) происходит в процессе утилизации ими источников биогенных элементов (конструктивный метаболизм) и энергии (энергетический метаболизм) и сопровождается в случае аэробных хемоорганогетеротрофных организмов потреблением молекулярного кислорода, необходимого для окисления субстрата, и выделением продуктов его полного (CO_2) и/или неполного окисления.

Наиболее полное описание микробного роста достигается с помощью математических моделей, т. к. они отражают постулируемый механизм протекания процесса и предсказывают его динамику. Основу их всегда составляют эмпирические данные, графическое изображение которых сопровождается вычислением

всевозможных кинетических и стехиометрических показателей, так называемых параметров роста. Основными экспериментально определяемыми параметрами являются удельная скорость роста μ , метаболический (q) и экономический (Y) коэффициенты.

Под удельной скоростью роста μ понимают скорость роста единицы биомассы x :

$$\mu = dx/dt \cdot 1/x. \quad (3.1)$$

Метаболический коэффициент q , или удельную скорость метаболизма, можно определить как удельную скорость любого ключевого метаболического процесса, например потребления субстрата s :

$$q_s = - ds/dt \cdot 1/x. \quad (3.2)$$

Информативным показателем метаболической активности может также служить интенсивность дыхания, которую можно измерять по образованию CO_2 (c):

$$q_c = - dc/dt \cdot 1/x. \quad (3.3)$$

Экономический коэффициент Y служит мерой эффективности использования источника углерода и энергии. Он определяется как выход биомассы на единицу потребленного субстрата ($Y_{x/s}$) или выделенного CO_2 ($Y_{x/c}$):

$$Y_{x/s} = - dx/ds \sim - \Delta x / \Delta s. \quad (3.4)$$

$$Y_{x/c} = dx/dc \sim \Delta x / \Delta c. \quad (3.5)$$

Сопоставление уравнений (3.1), (3.2) и (3.4) или (3.1), (3.3) и (3.5) дает следующие соотношения:

$$q_s = \mu / Y_{x/s} \text{ и } q_c = \mu / Y_{x/c}. \quad (3.6)$$

Рост микроорганизмов, безусловно зависит от физико-химических параметров среды, таких как температура, pH, активность воды, ионная сила раствора (Перт, 1978; Работнова, Прозмогова, 1979). Однако основополагающим фактором является лимитирующий питательный субстрата, его природа и концентрация в среде.

Как правило, потребление субстрата определяется кинетикой действия ферментативных реакций, транслокации или активного

транспорта. Они описываются уравнением Михаэлиса — Ментен, По аналогии для метаболического коэффициента можно записать:

$$q_s = Q_s \cdot s / (K_s + s), \quad (3.7)$$

где Q_s — максимальное значение q_s , достигаемое при $s \gg K_s$, а K_s — константа насыщения, равная той концентрации субстрата, при которой $q_s = 0,5 K_s$. Реально Q удобно измерять через так называемую потенциальную дыхательную активность, как удельное дыхание после добавления избытка лимитирующего рост субстрата (3.3).

Из уравнений (3.6) и (3.7) при $Y = const$ получаем уравнение Моно:

$$\mu = \mu_m \cdot s / (K_s + s), \quad (3.8)$$

которое описывает гиперболическое возрастание μ при увеличении s по насыщающей кривой от 0 до максимального значения μ_m .

В многочисленных опытах доказано, что величина K_s для одного и того же организма варьирует в зависимости от природы субстрата. Так, для кишечной палочки *Escherichia coli* она изменяется от 0,034 мкмоль, для триптофана (Shehata, Marr, 1971) до 100 мкмоль, для фруктозы (Jones-Mortimer, Kornberg, 1976).

Интегрирование уравнения (3.1) дает формулу, которая используется для определения μ графическим методом в динамике роста культуры:

$$\mu = (\ln x - \ln x_0) / (t - t_0). \quad (3.9)$$

Лабораторные занятия 4–5

Содержание. Определить удельную скорость роста музейной бактериальной культуры на определенной питательной среде.

Ход работы

1. В колбу, оснащенную пробоотборником, посеять культуру бактерий на свежую питательную среду и поставить на качалку с водяной баней.

2. В динамике периодического роста культуры измерять ОП суспензии через каждые 1–2 часа до стабилизации показателя.

3. В полулогарифмических координатах $\ln ОП(t)$ построить кривую роста периодической культуры.

4. Рассчитать удельную скорость роста культуры μ графическим способом.

5. Составить сводную таблицу определения μ на разных питательных средах по результатам работы всей подгруппы. Сделать заключение об оптимальной среде для исследованной культуры.

Материалы и оборудование: колба, оснащенная пробоотборником (0,5–1,0 л), со стерильной питательной средой, стерильные пробирки для отбора проб, фотометр КФК-3–«ЗОМЗ», стаканчик с дистиллированной водой, пипетки на 5 мл, фильтровальная бумага.

Демонстрация: фотометр КФК-3–«ЗОМЗ», визуализация кривой роста на турбидофлюориметре «Био ТФ».

Вопросы для обсуждения

1. Кривая роста периодической культуры.
2. Кинетические параметры роста культур клеток.
3. Математическое описание экспоненциального роста культур.
4. Удельная скорость роста и методы её определения.
5. Зависимость удельной скорости роста от концентрации и природы лимитирующего субстрата.
6. Возможности турбидофлюориметра в количественных исследованиях микробного роста.

Тема 4. Методические основы культивирования клеток и тканей высших растений

4.1. Требования асептики при выполнении работ по культивированию растительных объектов in vitro

Все работы с клеточными культурами растений требуют соблюдения **строгой стерильности**. Стерилизации подвергается ламинар-бокс, инструменты, посуда, питательные среды.

Подготовка помещений для стерильной работы включает тщательную влажную уборку и обработку всех поверхностей

дезинфицирующими средствами не менее 2 раз в месяц. Уборку начинают с самого дальнего угла и заканчивают выходом. Сначала протирают потолок и стены, затем поверхности мебели и оборудования, в конце пол. Для стерилизации помещений используют ультрафиолетовое облучение в течение 0,5–2 часов.

В ламинар-боксах асептика достигается подачей стерильного воздуха и УФ-лампами, обеспечивающими стерилизацию внутренней поверхности. Для работы в ламинар-боксе надевают стерильный халат. Непосредственно перед работой поверхность ламинар-бокса и руки обрабатывают 70 %-м этанолом.

Предварительная стерилизация инструментов (скальпели, пинцеты, микробиологические петли и т. д.) проводится сухим жаром в сушильном шкафу в течение 2 ч при 140 °С. Металлические предметы нельзя автоклавировать, т. к. под действием пара они ржавеют и тупятся. В процессе работы перед каждой манипуляцией инструменты стерилизуют, помещая их в фарфоровый стакан с 96 %-м этиловым спиртом и обжигая в пламени спиртовки.

4.2. Правила приготовления питательных сред для культивирования растительных клеток и тканей in vitro

При соблюдении условий стерильности успех в культивировании растительных клеток и тканей определяется прежде всего составом питательной среды. В состав питательных сред входит несколько основных групп компонентов: минеральные соли (макро- и микроэлементы), источники углерода, витамины, регуляторы роста, органические добавки, агар-агар.

Минеральные соли. Основой всех питательных сред для культивирования растительных эксплантов является смесь минеральных солей. Элементы, необходимые в относительно больших количествах, называют *макроэлементами*: N, P, K, Ca, S, Mg, Fe. Азот входит в состав среды в виде нитратов, нитритов, солей аммония; фосфор — в виде фосфатов; сера — в виде сульфатов. Железо используется в виде хелатов [FeO₄ или Fe₂O₄ с добавлением этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) или её натриевой соли Na₂ЭДТА (трилон Б)], что обеспечивает доступность железа в течение всего периода роста культуры.

Элементы, необходимые в очень незначительных количествах (0,025–20 мг/мл), называют *микроэлементами*: Cu, I, Zn, Mn, Mo, Co, B, — которые в сочетании с порфиринами образуют макромолекулы пигментов фотосинтеза, окислительно-восстановительных ферментов и выполняют в клетках и тканях структурную функцию.

Источники углерода. В качестве источника углерода при культивировании растительных клеток и тканей в питательные среды добавляют углеводы в концентрации 20–60 г/л. Обычно используют дисахариды (сахароза) или моносахариды (гексозы: глюкоза и фруктоза, пентозы: ксилоза и др.). Полисахариды используются крайне редко. Только некоторые типы тканей, например, опухолевые, содержат гидролитические ферменты и могут выращиваться на средах с добавлением полисахаридов (крахмал, раффиноза, целлобиоза).

Витамины. Для стимуляции биохимических реакций в культивируемых клетках используют витамины группы В (В₁, В₆, В₁₂), С (аскорбиновую кислоту), РР (никотиновую кислоту), мезоинозит.

Регуляторы роста. В состав питательных сред обязательно должны входить регуляторы роста. Ауксины вызывают дифференцировку клеток экспланта, а цитокинины индуцируют клеточные деления. В качестве ауксинов в питательных средах используют 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту, индолилуксусную кислоту (ИУК), фенилмасляную кислоту (ФМК), нафтилуксусную кислоту (НУК). Для индукции каллуса обычно необходимы высокие концентрации ауксинов, но при последующих пересадках их уменьшают. В качестве источника цитокининов искусственные питательные среды могут содержать кинетин, бензиламинопурин (БАП), зеатин.

В случае индукции стеблевого морфогенеза содержание ауксинов может быть снижено или они могут быть полностью исключены. На средах без гормонов растут опухолевые и «привыкшие» ткани. Автономность по отношению к обоим классам гормонов или к одному из них связана со способностью этих клеток продуцировать гормоны.

Органические добавки. В качестве биологических добавок для индукции первичного каллуса можно использовать расти-

тельные экстракты (5–20 % от общего объёма среды), которые содержат цитокинины — кинетин и зеатин, а также соединения с цитокининовой активностью (N,N-дифенилмочевину): эндосперм кокосового ореха или злаков, березовый или томатный сок, вытяжки из незрелых зерновок кукурузы, солодовый экстракт и др. В качестве комплексных органических добавок могут также использоваться дрожжевой экстракт, гидролизат казеина, смесь аминокислот и др.

Антибиотики вводятся в состав питательных сред для подавления бактериальной инфекции. Однако использование антибиотиков при культивировании клеток целесообразно только в случае кратковременных культур. Постоянное пассирование клеточных линий на среде с антибиотиком может способствовать отбору устойчивых штаммов бактерий.

Матрикс среды. Для культивирования растительных клеток и тканей *in vitro* применяют жидкие и агаризованные (твердые) среды. В качестве гелеобразующего вещества для приготовления твердых питательных сред используется агар-агар — полисахарид, выделенный из морских водорослей. Агар-агар образует с водой гель при pH 5,6–6,0. При низких pH агар не желатинизируется. Обычно к среде добавляют 0,7–0,8 % агара. Иногда в качестве уплотнителя и заменителя агар-агара используют полиакриламидные гели (биогели).

Вода, используемая для приготовления питательных сред, должна быть высокой степени чистоты. Разработаны высокоэффективные технологические процессы получения очищенной воды методами обессоливания, такими как ультрафильтрация, ионный обмен, обратный осмос, электролиз. Большое распространение получили мембранные системы очистки воды.

Антиоксиданты также могут входить в состав питательной среды. В качестве антиоксидантов чаще всего используют аскорбиновую кислоту, феруловую кислоту, глутатион, дитиотриэтол, диэтилтиокарбамат, поливинилпирролидон.

Значение pH среды играет важную роль для нормального роста и развития растений *in vitro* как на агаризованных, так и в жидких средах. Оптимальный рост культуры клеток растений обычно наблюдается при значениях pH среды от 5 до 6.

Для искусственных питательных сред растворы макро- и микросолей готовят заранее и используют многократно. Маточные растворы макросолей обычно превосходят рабочие по концентрации в 10–40 раз, микросолей — в 100–1000 раз, витаминов — в 1000 раз. Для приготовления маточного раствора каждую соль растворяют в отдельном сосуде при нагревании, затем сливают и доводят до нужного объема. В охлажденную смесь макросолей последним добавляют раствор солей магния, а в раствор микросолей — раствор солей молибдена (для предотвращения выпадения осадка). Маточный раствор хелата железа готовят и хранят отдельно от других солей. Неправильное приготовление хелатного железа может привести к выпадению в осадок после автоклавирования фосфатов кальция и магния. Маточные растворы солей хранят в холодильнике при +4 °С. Фитогормоны, как правило, плохо растворяются в воде. Поэтому предварительно эти вещества растворяют в небольших количествах спирта (ауксины, гиббереллины), в 0,5–1 н растворе HCl или KOH (цитокнины), затем подогревают до полного растворения (кроме абсцизовой кислоты и кинетина) и доводят до нужного объема. Витамины, фитогормоны, ферменты, растительные экстракты следует хранить при –20 °С.

Разработано много питательных сред, но большинство из них представляют модификации основных: Мурасиге — Скуга, Уайта, Шенка — Хильдебрандта, Гамборга (B5), Линсмайера — Скуга, Хеллера, Кнудсона, Чапека и др.

4.3. Требования к физическим условиям при культивировании клеток и тканей *in vitro*

Многие физические факторы, такие как температура, влажность, интенсивность и качество света, аэрация, оказывают влияние на рост и развитие растительных тканей *in vitro*. Оптимальные световой и температурный режимы можно создать с помощью климатических камер.

Свет. Для большинства растений оптимум освещенности составляет около 1000 люкс. В качестве источника света используют люминесцентные лампы. Большинство каллусных культур не нуждается в свете, т. к. они не имеют хлоропластов и питаются гете-

ротрофно. Исключение составляют некоторые зеленые каллусы. Однако свет может выступать как фактор, обеспечивающий морфогенез и активирующий процесс вторичного синтеза. Детерминированные к морфогенезу ткани переносят на свет и далее культивируют при освещенности 1000–4000 лк. Культивирование изолированных меристем и их микроразмножение также происходит на свету. Кроме интенсивности освещенности, на культуру ткани и её физиологические особенности влияет качество света. Свет разной длины волны регулирует процессы первичного и вторичного метаболизма. Также необходимо учитывать фотопериод, который требуется для данного культивируемого объекта.

Температура. Для большинства каллусных культур оптимальна температура 26 °С. При индукции морфогенеза температуру понижают до 18–20 °С.

Влажность в климатической камере должна составлять 60–70 %. Сухой воздух будет способствовать усыханию питательной среды, что может привести к изменению концентрации её компонентов и нарушению условий культивирования.

Аэрация имеет важное значение при суспензионном выращивании клеточных популяций. Особенно важно снабжение воздухом культивируемых клеток в больших объемах ферментеров. При выращивании клеток в небольших объемах нормальная аэрация достигается при постоянном перемешивании суспензии.

Лабораторное занятие 6

Содержание. Приготовление питательной среды Мурасиге — Скуга для культивирования растительных клеток и тканей *in vitro*.

Ход работы

1. Произвести расчеты содержания всех компонентов на заданный объем среды Мурасиге — Скуга, результаты занести в протокол (табл. 6).

2. Приготовить маточные растворы солей, витаминов и фитогормонов в соответствии с проведенными расчетами.

3. Приготовить питательную среду Мурасиге — Скуга.

Протокол приготовления питательной среды

Для приготовления 1 л жидкой среды Мурасиге — Скуга в стакан объемом 1 л налить 400 мл дистиллированной воды и поместить 30 г сахарозы. После растворения сахарозы добавить необходимые количества маточных растворов макросолей, микросолей, мезоинозита, глицина, витаминов (табл. 1). Дистиллированной водой довести объем до 950 мл. Измерить pH раствора, при необходимости довести pH до уровня 5,7–5,8 с помощью 0,1 н NaOH или HCl. Перелить среду в мерный сосуд объемом 1 л и довести объем до метки дистиллированной водой. Разлить среду порциями (100–250 мл) в чистые конические колбы, добавить агар-агар, закрыть горло колбы алюминиевой фольгой и проавтоклавировать.

Материалы и оборудование: химические стаканы, колбы, мерные цилиндры от 10 мл до 1 л, пробирки, автоматические дозаторы от 0,01 мл до 10 мл, весы аналитические, шпатели, электроплитка, магнитная мешалка, химические реактивы.

Демонстрация: автоклав, установка для мембранного фильтрования.

Лабораторное занятие 7

Содержание. Техника работы в стерильных условиях в ламинар-боксе при проведении работ с культурой клеток и тканей растений.

Ход работы

1. Провести тщательную влажную уборку помещения с применением дезинфицирующих средств.

2. Прокварцевать помещение в течение 1–1,5 часов. Соблюдать технику безопасности! Запрещено находиться в помещении во время кварцевания! По окончании кварцевания нельзя заходить в помещение в течение 15–20 минут!

3. Перед началом работы поместить в ламинар-бокс инструменты, посуду и материалы, необходимые для работы. Включить УФ-лампу.

4. Через 20 мин выключить УФ и включить биофильтры.

5. Зажечь спиртовку. Протереть руки и рабочую поверхность ламинар-бокса 70 %-м раствором спирта.

6. Предварительно расплавленную питательную среду (50–55 °С) перенести в бокс и разлить в стерильные сосуды.

7. При работе со стерильной посудой и материалом необходимо помнить, что нельзя проносить руки над открытой стерильной поверхностью. Стаканы и другие сосуды, закрытые крышками из фольги и бумаги, необходимо открывать следующим образом: бумагу снять до внесения стаканов в ламинар-бокс. Фольгу обжечь, пронося горло сосуда над пламенем спиртовки, затем осторожно развернуть края фольги и снять с помощью стерильного пинцета.

8. Закончив работу, закрыть сосуд следующим образом: обжечь горло сосуда, стерильным пинцетом обжечь крышку из фольги с двух сторон и закрыть горло сосуда. Когда фольга остынет, плотно прижать её к стенкам стакана.

9. Каждый сосуд этикетировать (маркером подписать дату, название питательной среды, фамилию исследователя).

10. Выдержать стаканы с питательной средой Мурасиге — Скуга в течение 48 часов. После выдерживания стаканы можно использовать для культивирования растений.

Материалы и оборудование: стерильная среда Мурасиге — Скуга, стерильные стаканчики на 100 мл, флаконы с 70 %-м спиртом, спиртовка, гипохлорит натрия, хлорамин, электроплитка, ультрафиолетовые лампы, ламинар-бокс, пинцеты, одноразовые салфетки.

Таблица 6

Питательная среда Мурасиге и Скуга

Состав	Молярность в среде	Содержание, мг/л	Содержание, мг / на заданный объем	Объем хранящегося рас- твора на 1 л среды, мл	Условия хранения маточного раствора, °С
Макроэлементы					
KNO ₃	$1,88 \cdot 10^{-2}$			100	+4
NH ₄ NO ₃	$2,06 \cdot 10^{-2}$				

Состав	Молярность в среде	Содержание, мг/л	Содержание, мг / на заданный объем	Объем хранящегося рас- твора на 1 л среды, мл	Условия хранения маточного раствора, °С
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,50·10 ⁻³				
CaCl ₂	3,00·10 ⁻³				
KH ₂ PO ₄	1,25·10 ⁻³				
Микроэлементы					
MnSO ₄ ·7H ₂ O	9,99·10 ⁻⁵			10	+4
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	2,99·10 ⁻⁵				
H ₃ BO ₃	1,00·10 ⁻⁴				
KJ	5,00·10 ⁻⁶				
Микроэлементы					
CuSO ₄ ·5H ₂ O	1,00·10 ⁻⁷			1	+4
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	1,00·10 ⁻⁶				
CoCl ₂ ·6H ₂ O	1,00·10 ⁻⁷				
Источник железа					
FeSO ₄ ·7H ₂ O	1,00·10 ⁻⁴			10	+4
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	1,00·10 ⁻⁴				
C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈					
Источник углерода					
Сахароза	8,80·10 ⁻²	30 г/л	—	—	—
Витамины и органические добавки					
Мезоинозит	4,90·10 ⁻⁴	1000		10	-20
Глицин	3,00·10 ⁻⁵	20			
Тиамин—HCl	3,00·10 ⁻⁷	50		1	
Пиридоксин— HCl	2,40·10 ⁻⁶	50			
Никотиновая кислота	4,66·10 ⁻⁶	50			

Вопросы для обсуждения

1. Основные компоненты питательных сред для культивирования растительных клеток и тканей *in vitro*.
2. Регуляторы роста растений и их применение в культуре клеток и тканей *in vitro*.
3. Подготовка помещений для стерильных работ.
4. Организация работы в ламинар-боксе.
5. Оптимальные физические условия при культивировании клеток и тканей *in vitro*.

Тема 5. Введение в культуру растительных клеток и тканей *in vitro*

Культура растительной ткани — широкий термин, который относится к культуре любой части растения (клеток, тканей или органов) в искусственных средах, в асептических контролируемых условиях.

Набор методов культуры растительной ткани появился в качестве экспериментального подхода для демонстрации клеточной теории, которая устанавливает, что все живые организмы состоят из клеток, а также концепции тотипотентности, которая определяется как генетический потенциал клетки восстанавливаться до целого многоклеточного организма. Ключевым достижением в культуре растительных тканей стал контроль морфогенеза с использованием различных комбинаций регуляторов роста, поскольку это позволило осуществлять регенерацию целых растений, открывая новые возможности применения систем *in vitro* для различных целей. В настоящее время методы культуры растительной ткани являются наиболее часто используемыми биотехнологическими инструментами для решения широкого круга фундаментальных и прикладных задач, таких как, изучение процессов развития растений, функциональные исследования генов, коммерческое размножение растений, создание трансгенных растений с заданными хозяйственно ценными признаками, селекция растений, получение внутривидовых или межвидовых соматических гибридов, получение высококачественного здорового растительного материала, сохранение исчезающих видов растений. Кроме того, культуры клеток, тканей и органов растений могут

служить источником вторичных метаболитов, представляющих интерес для фармацевтической промышленности.

В зависимости от источника получения различают культуру клеток (суспензия клеток и культура протопластов), культуру ткани (каллус и дифференцированные ткани) и культуру органов (любой орган, например зиготические зародыши, корни, побеги, пыльники).

5.1. Получение каллусных тканей *in vitro*

Каллусная ткань представляет собой один из видов клеточной дифференцировки. Она возникает путем неорганизованной пролиферации дедифференцированных клеток растения. В природе у растений каллусная ткань возникает в исключительных случаях, например при травмах. Эта ткань защищает место поранения (раневая паренхима), она накапливает питательные вещества для анатомической регенерации или регенерации утраченного органа.

Образование и рост каллусной культуры регулируется ауксинами и цитокининами. Для получения культивируемых каллусных клеток фрагменты тканей различных органов высших растений (экспланты) помещают в сосуды с питательной средой, содержащей ауксины. В качестве ауксинов используют 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4-Д), индолилуксусную кислоту (ИУК), индолил-масляную кислоту (ИМК), нафтилуксусную кислоту (НУК) в концентрации 0,5–10 мг/л в зависимости от вида экспланта. На питательных средах с большим содержанием ауксинов происходит дедифференцировка клеток экспланта, они утрачивают прежние функции, морфологию и возвращаются к состоянию делящихся клеток. Каллусная ткань, выращиваемая поверхностным способом, представляет собой аморфную массу тонкостенных паренхимных клеток, не имеющих строго определенной анатомической структуры.

Для регенерации растения из каллуса или экспланта используют среды с более высоким содержанием цитокининов. К распространенным цитокининам относятся: 6-бензиламинопурин (БАП), зеатин, 6-фурфуриламинопурин (кинетин).

Влияние регуляторов роста на особенности регенерации в культуре ткани и направление морфогенеза хорошо отображено в классической работе К. Миллера и Ф. Скуга еще в 1957 г. Каллу-

сную культуру из сердцевинной паренхимы стебля цветущего растения табака культивировали на среде с ИУК и кинетином (рис. 1). В зависимости от соотношения этих гормонов наблюдали следующие особенности: увеличение концентрации ауксина приводило к развитию корней, а превышение концентрации кинетина над ауксином — к образованию стеблевых почек и побегов.

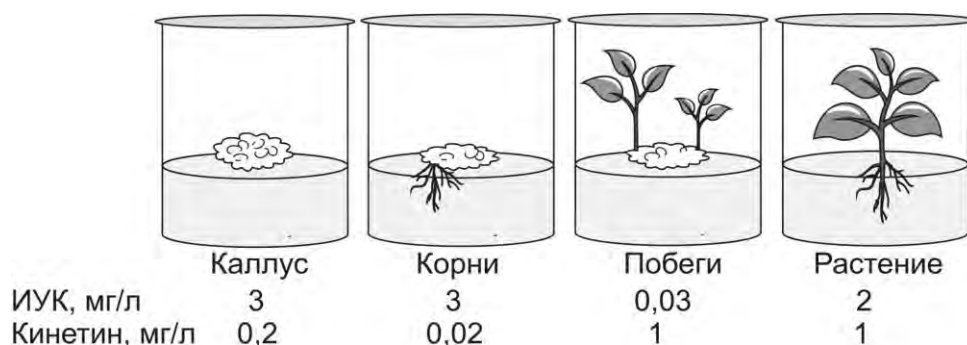


Рис. 1. Регулирование регенерации в культуре ткани сердцевинной паренхимы табака

В зависимости от источника получения различают каллусы гомогенные (содержат один тип клеток) и гетерогенные (содержат несколько типов клеток).

В зависимости от консистенции различают каллусы рыхлые, состоящие из оводненных, легко отделяющихся друг от друга клеток; средней плотности, с хорошо выраженными меристематическими очагами; плотные, состоящие из очень мелких клеток, и имеющие зоны редуцированного камбия и сосудов.

Цвет массы может варьировать от прозрачного белого или желтоватого до буро-коричневого. Темно-коричневая окраска характерна для стареющих каллусов и связана с накоплением в них фенолов, для избавления от которых в питательные среды вносят антиоксиданты.

Для предотвращения старения и отмирания каллусных клеток проводят пассирование или субкультивирование каллусной ткани. При этом первичный каллус периодически пересаживают на свежую питательную среду (обычно каждые 4 недели).

В биотехнологии для получения каллуса чаще всего используют те виды растений, которые и в обычных условиях легко укореняются и регенерируют. Каллусы можно получить практически из любой части растения. Однако нежелательно использо-

вать старые ткани с низким уровнем метаболизма, одревесневшие ткани, плохо пролиферирующие ткани (мякоть плодов и др.) или ткани, покрытые восками.

Большинство методов получения и культивирования каллуса разработано для табака. Клетки табака легко дедифференцируются и переходят к делению, образуя быстрорастущую каллусную ткань. Проращивание простерилизованных семян в асептических условиях часто дает наиболее пригодный материал для получения каллусов. Для культивирования каллусов из листьев табака используют среду Мурасиге — Скуга с добавлением ауксинов.

5.2. Стерилизация растительного материала при введении в культуру *in vitro*

Одним из основных условий успешного культивирования изолированных растительных клеток, тканей и органов является получение стерильного (свободного от микроорганизмов) растительного материала. Процесс стерилизации растительного материала можно условно разделить на несколько этапов.

На первом этапе проводят предварительную стерилизацию. Условия обработки материала варьируют в зависимости от объекта. Фрагменты стебля, корня или листа тщательно промывают в слабом растворе калийного мыла (2–3 раза), затем ополаскивают проточной водопроводной водой и помещают в спирт (на 1 мин в 70 %-й раствор спирта). Предварительная стерилизация семян — более длительная процедура. В зависимости от степени загрязненности выделяют три группы семян: 1) с очень незначительной зараженностью поверхности микроорганизмами (семена пшеницы, сорго, капусты); 2) с зараженностью только наружной поверхности семян (семена моркови, латука, шпината, томата, редиса, кукурузы); 3) с присутствием микроорганизмов на поверхности и внутри семени (семена риса, подсолнечника, соевых бобов, сосны). Первую группу семян легко обеззаразить любой стерилизующей обработкой. Вторая группа требует более тщательной поверхностной очистки. Вначале семена тщательно промывают в мыльной воде, затем в растворе перманганата калия и 70 %-м спирте. Наконец, третья группа семян не может быть очищена до тех пор, пока внутренние ткани не будут обеззараже-

ны. Процент семян с внутренним заражением микроорганизмами варьирует в зависимости от вида растения, продолжительности и условий хранения семян.

Второй этап стерилизации, как правило, проводится в асептических условиях в ламинарном боксе.

Предварительно простерилизованные ткани или органы погружают в стерилизующий раствор. В зависимости от объекта используют различные стерилизующие агенты. Наиболее применяемы в практике 0,5–5 %-е растворы гипохлорита натрия, 5–7 %-е растворы гипохлорита кальция, 2–10 %-е растворы хлорамина; 0,2 %-й раствор диацита, 3–18 %-е растворы перекиси водорода; 70 %-й раствор этанола и т. п. Для стерилизации можно также использовать хлорсодержащие растворы отбеливателей, например средство «Белизна» или дезинфицирующее средство «Domestos».

Для стерилизации растительного материала, инфицированного бактериями, применяют антибиотики (например, ткани корнчатогалловых опухолей). Чаще всего применяют стрептомицин и тетрациклин в концентрациях 10–80 мг/л, ампициллин в концентрации 200–400 мг/л, левомицетин, канамицин и другие.

В процессе стерилизации важно не только обеспечить достаточную степень чистоты растительного материала, но и сохранить его жизнеспособность. Необходимо подбирать такие концентрации стерилизующего агента, которые не будут повреждать растительную ткань или оказывать влияние на всхожесть семян, но в то же время обеспечить стерильность растительных образцов. Например, пыльники и молодые зародыши стерилизуют 1–6 %-м раствором хлорамина в течение 1–3 мин, сухие семена — в течение 30–60 мин.

На следующем этапе проводят отмывание объекта от стерилизующего раствора, или постстерилизацию. При этом растительный материал промывают несколькими порциями стерильной дистиллированной воды, выдерживая его в каждой порции в течение 10–15 мин.

На заключительном этапе стерильным инструментом вычленивают необходимые участки растительной ткани и переносят их на питательную среду. Меристемы изолируют под бинокулярным микроскопом или с использованием лупы.

Лабораторное занятие 8

Содержание. Получение стерильных проростков в культуре *in vitro*.

Ход работы

1. Семена пшеницы, табака и кресс-салата промыть мыльной водой; воду слить, а семена поместить в 70 %-й этанол на 1 мин.

2. Все последующие процедуры проводить в ламинар-боксе. Перед каждой манипуляцией необходимо обрабатывать инструменты спиртом и обжигать в пламени спиртовки.

3. Предварительно простерилизованные семена поместить в стаканчики, содержащие по 30 мл различных стерилизующих растворов (3 %-ю перекись водорода, 7 %-го хлорамина). Продолжительность стерилизации — 15 мин.

4. По истечении указанного времени слить стерилизующие растворы, налить в стаканчики немного стерильной воды. Затем слить воду и налить новую её порцию. Промывание водой продолжается в течение 1 ч со сменой через каждые 15 мин.

5. С помощью пинцета перенести по 2–3 штуки стерильных семян в стаканы, содержащие агаризованную среду Мурасиге — Скуга без гормонов.

6. Стерильно закрыть стаканы алюминиевой фольгой и поместить в термостат при температуре 22–24 °С.

7. Через 4–8 суток проверить чистоту посева и всхожесть семян. После прорастания семян перенести стаканы в условия фитостата с освещением 6 клк и температурой 20–22 °С.

8. Сравнить эффективность разных способов стерилизации семян. Определить процент инфицирования в результате неудовлетворительной стерилизации и процент прорастания семян. Результаты занести в протокол (табл. 7).

9. Сделать вывод об эффективности использованных в работе стерилизующих агентов и эффективности разных способов проращивания семян.

Материалы и оборудование: семена пшеницы, табака и кресс-салата, ламинар-бокс, сушильный шкаф, стаканы с питательной средой Мурасиге — Скуга, пинцеты, скальпели, флаконы с 96 %-м и 70 %-м спиртом, спиртовка, стерильная вата, колбы

объемом 200–300 мл, чашки Петри, стаканчики на 100 мл, стерильная дистиллированная вода, перекись водорода, хлорамин.

Таблица 7

**Протокол оценки эффективности стерилизации
и проращивания семян**

№	Вид семян	Стерили- зующий агент	Эффективность стерилизации			Эффективность проращивания		
			Общее кол-во семян, шт.	Кол-во стерильных семян, шт.	% инфицирования	Кол-во стерильных семян, шт.	Кол-во проросших семян, шт.	% прорастания

Лабораторное занятие 9

Содержание. Получение каллусной культуры из стерильных проростков табака.

Ход работы

1. Приготовить различные варианты среды Мурасиге — Скуга с добавлением: 1) 1,0 мг/л 2,4-Д + 0,2 мг/л БАП; 2) 1,0 мг/л ИУК + 0,2 мг/л БАП.

2. Стерильные проростки табака, сформировавшие несколько листочков, извлечь из пробирок и поместить в стерильную чашку Петри. Все действия выполнять в стерильных условиях, перед каждой манипуляцией необходимо обрабатывать инструменты спиртом и обжигать в пламени спиртовки.

3. Стерильным скальпелем вырезать сегменты у основания листа ближе к центральной жилке. Оптимальный размер эксплантов — 1–2 см в длину и 1 см в ширину.

4. Поместить экспланты на питательные среды. Сделать насечки по всей поверхности экспланта для лучшего каллусообразования.

5. Чашки Петри с эксплантами перенести в термостат при температуре 22–25 °С для индукций каллусогенеза.

6. Через 2–4 недели рассмотреть результаты опыта и зарисовать. Провести сравнение каллуса, полученного на среде с ИУК и на среде с 2,4-Д. Оформить выводы.

Материалы и оборудование: ламинар-бокс, стерильные проростки табака, чашки Петри со стерильной питательной средой Мурасиге — Скуга для индукции каллусогенеза, пинцеты, скальпели, 70 %-й спирт, спиртовка, стерильная вата.

Вопросы для обсуждения

1. Основные этапы стерилизации растительного материала при введении в культуру *in vitro*.

2. Типы стерилизующих агентов.

3. Получение стерильных проростков и область их использования.

4. Каллусогенез как основа создания клеточных культур.

5. Роль фитогормонов в индукции каллусогенеза.

6. Возможности использования каллусных культур в биотехнологии, генетике и селекции.

Тема 6. Микроклональное размножение растений

Клональное микроразмножение растений (КМР) — это техника *in vitro* для быстрого неполового размножения растений, идентичных исходному.

Этот метод имеет ряд преимуществ перед существующими традиционными способами размножения: возможность получения достаточного количества генетически однородного посадочного материала в течение всего года; высокий коэффициент размножения; оздоровление посадочного материала; сокращение продолжи-

тельности селекционного процесса; возможность размножения растений, которые трудно размножаются традиционными способами.

Процесс КМР можно разделить на несколько основных этапов (рис. 2):

1. Выбор подходящего экспланта и получение хорошо растущей стерильной культуры. При выборе экспланта необходимо использовать объекты, полностью сохраняющие генетическую стабильность на всех этапах процесса КМР.

2. Собственно микроразмножение, когда достигается получение максимального количества меристематических клонов.

3. Укоренение размноженных побегов с последующей адаптацией их к почвенным условиям.

4. Выращивание растений в условиях теплицы и подготовка их к реализации или посадке в поле.

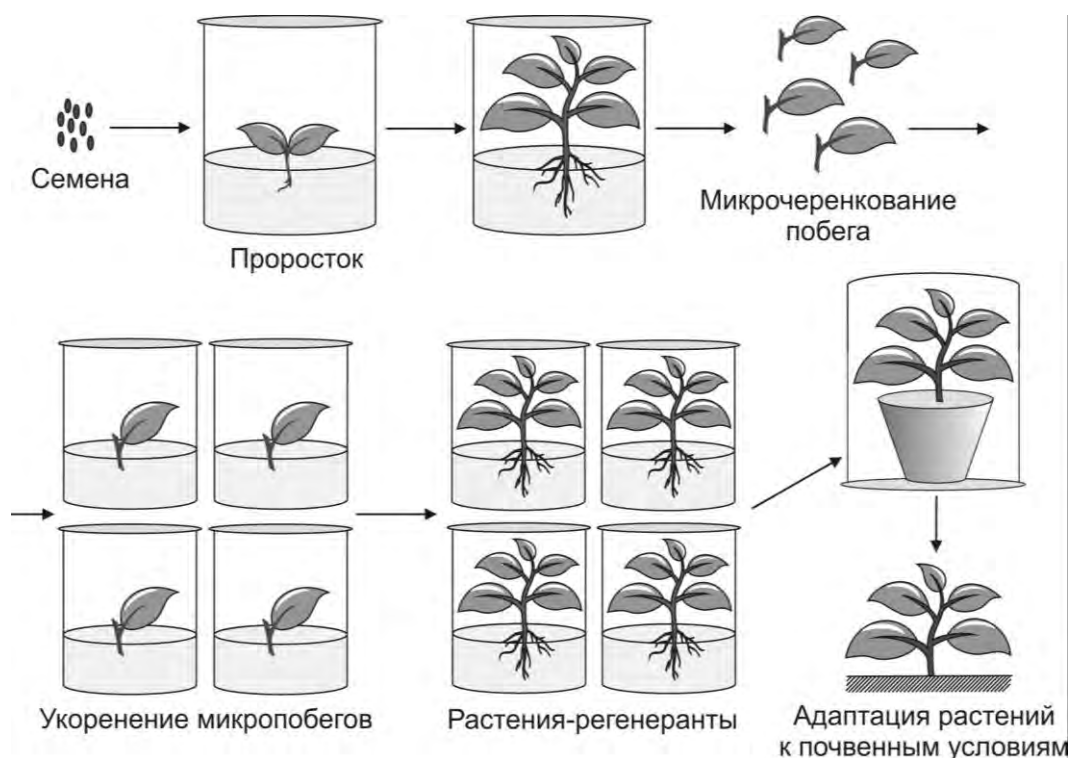


Рис. 2. Схема клонального микроразмножения растений микрочеренкованием

Одним из самых ответственных и трудоемких этапов является пересадка растений-регенерантов в субстрат. Неудачи на этапе адаптации могут приводить к массовой гибели растений, что значительно снизит эффективность всего процесса микроразмножения. Для успешной адаптации необходимо создать оптимальные условия для дальнейшего роста и развития растений, в чем важ-

ную роль играет правильный подбор субстрата и стартовый размер растений-регенерантов для перевода их в условия *ex vitro*.

Существует много методов КМР, однако все их можно разделить на два основных типа.

1. Активация развития уже существующих в растении меристем (апекс стебля, пазушные и спящие почки стебля) основывается на снятии апикального доминирования (подавление роста боковых почек растительного побега или наличие терминальной почки). Это может быть достигнуто двумя способами:

а) удалением верхушечной меристемы стебля и последующее микрочеренкование побега *in vitro* на безгормональной среде (рис. 2);

б) добавлением в питательную среду цитокининов, индуцирующих развитие многочисленных пазушных побегов. Далее побеги отделяют от первичного материнского экспланта и вновь самостоятельно культивируют на свежеприготовленной питательной среде, стимулирующей пролиферацию пазушных меристем и возникновение побегов более высоких порядков.

2. Индукция возникновения почек или эмбриоидов *de novo*:

а) образование адвентивных побегов тканями экспланта — это наиболее распространенный метод микроразмножения высших растений. Образования адвентивных почек можно добиться почти из любых органов и тканей растения (изолированного зародыша, листа, стебля, семядолей, чешуек и донца луковицы, сегментов корней и зачатков соцветий), если удастся получить их свободными от инфекции;

б) индукция соматического эмбриогенеза в клетках экспланта — дифференциация из соматических клеток зародышеподобных структур, которые по своему внешнему виду напоминают зиготические зародыши. Этот процесс включает инициацию эмбрионного каллуса, пролиферацию эмбрионально-суспензорной массы, получение и вызревания соматических зародышей;

в) дифференциация адвентивных почек в первичной и пересадочной каллусной ткани. Этот метод мало используется для получения посадочного материала *in vitro*, что связано с генетической нестабильностью каллусной культуры (изменение ploидности, структурные перестройки хромосом и накопление

генных мутаций, потеря культивируемыми клетками морфогенетического потенциала).

Лабораторное занятие 10

Содержание. Клональное микроразмножение растений черенкованием стерильных проростков.

Ход работы

1. Подготовить ламинар-бокс и инструменты к работе.
2. Стерильные проростки, сформировавшие 5–6 листочков, в стерильных условиях извлечь из пробирок и поместить в стерильную чашку Петри.
3. Стерильным скальпелем разделить побеги на микрочеренки (отрезки стебля с листом и пазушной почкой).
4. Черенки посадить в питательную среду на глубину междоузлия.
5. Пробирки закрыть пленкой и перенести в климатостат. Черенки культивируют при температуре 22–25 °С днем и 19–20 °С ночью, освещенности 6 клк и продолжительности фотопериода 16 ч.
6. Результаты рассмотреть и зарисовать через 2–4 недели. Сделать выводы о степени пролиферации почек различных культур.

Материалы и оборудование: стерильные проростки табака и картофеля, ламинар-бокс, стаканы и пробирки с питательной средой Мурасиге — Скуга, пинцеты, скальпели, ножницы, флаконы с 96 %-м и 70 %-м спиртом, спиртовка, стерильная вата, чашки Петри, стаканчики на 100 мл, дистиллированная вода, стерильная пленка.

Вопросы для обсуждения

1. Основные этапы микроклонального размножения растений.
2. Типы микроклонального размножения растений.
3. Методы снятия апикального доминирования.
4. Способы индукции возникновения почек или эмбрионов *de novo*.
5. Преимущества микроклонального размножения перед существующими традиционными способами размножения растений.

Учебно-методическое и информационное обеспечение дисциплины

А. Основная литература

1. Алешина, Е. С. Культивирование микроорганизмов как основа биотехнологического процесса : учеб. пособие / Е. С. Алешина, Е. А. Дроздова, Н. А. Романенко. — Оренбург : Оренбургский государственный университет, ЭБС АСВ, 2017. — 192 с. — URL : <http://www.iprbookshop.ru/71282.html>

2. Нетрусов, А. И. Микробиология : теория и практика : в 2 ч. Часть 1 : учебник для бакалавриата и магистратуры / А. И. Нетрусов, И. Б. Котова. — М. : Юрайт, 2017. — С. 114–129. — URL : <https://biblio-online.ru/viewer/B78A1E41-7F18-4559-A20E-F3AFF52C9DAF>

Б. Дополнительная литература

1. Биотехнология : теория и практика : учеб. пособие для вузов / Н. В. Загоскина, Л. В. Назаренко, Е. А. Калашникова, Е. А. Живухина; под ред. Н. В. Загоскиной, Л. В. Назаренко. — М. : Оникс, 2009. — 496 с.

2. Минкевич, И. Г. Материально-энергетический баланс и кинетика роста микроорганизмов / И. Г. Минкевич. — М. ; Ижевск : Регулярная и хаотическая динамика, 2005. — 352 с.

3. Мухачев, С. Г. Методика лабораторного культивирования аэробных микроорганизмов и определение энергетических параметров микробного роста : учеб. пособие / С. Г. Мухачев. — Казань : Казанский национальный исследовательский технологический университет, 2011. — 78 с. — URL : <http://www.iprbookshop.ru/61984.html>

4. Нетрусов, А. И. Введение в биотехнологию : учебник для студ. учреждений высш. образования / А. И. Нетрусов. — М. : Академия, 2014. — 281 с.

5. Нетрусов, А. И. Микробиология : теория и практика : в 2 ч. Часть 2 : учебник для бакалавриата и магистратуры / А. И. Нетрусов, И. Б. Котова. — М. : Юрайт, 2017. — 312 с. — URL : <https://biblio-online.ru/book/9BFAB8C4-38B2-4590-B1D2-BB0428C6CDD2>

6. Перт, С. Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток / С. Дж. Перт. — М. : Мир, 1978. — 333 с.

7. Сиделев, С. И., Математические методы в биологии и экологии : введение в элементарную биометрию : учеб. пособие / С. И. Сиделев. — Ярославль : ЯрГУ, 2012. — 138 с.

8. Шмид, Р. Наглядная биотехнология и генетическая инженерия / Р. Шмид ; под ред. Т. П. Мосоловой, А. А. Синюшина. — М. : БИНОМ ; Лаборатория знаний, 2014. — 324 с.

В. Ресурсы сети «Интернет»

Коллекция микроорганизмов Института экологии и генетики УрО РАН (г. Пермь). — URL : www.ecology.psu.ru/iegmcol/strains

Национальная немецкая коллекция микроорганизмов. — URL : www.dsmz.de/bactnom/

Американское микробиологическое общество. — URL : www.asmtusa.org

Международное научное общество по экологии микроорганизмов. — URL : www.isme-microbes.org

Центр экологии микроорганизмов Мичиганского университета (США). — URL : www.cme.msu.edu

Американское экологическое общество. — URL : www.esa.org

Центр микробной экологии Мюнхенского университета. — URL : www.edv.agrar.tu-muenchen.de/microbio/

Г
Журнал работы стерилизаторов воздушного, парового (автоклава), форма № 257/у

Дата	Марка, № стерилизатора	Стерилизуемые изделия		Упаковка	Время стерилизации		Режим		Тест-контроль			Подпись
		наимено- вание	количество		начало	конец	давление	темпе- ратура	биологи- ческий	терми- ческий	хими- ческий	

Оглавление

Тема 1. Методическое обеспечение культивирования микроорганизмов и клеток	4
1.1. Понятие биологической безопасности.....	4
1.2. Правила безопасной работы на занятиях.....	6
1.3. Влияние физических и химических факторов на микроорганизмы	7
1.4. Применение асептики, дезинфекции и антисептики...	12
1.5. Методы стерилизации.....	14
1.6. Правила приготовления питательных сред	17
Лабораторное занятие 1	22
Вопросы для обсуждения	23
Тема 2. Методы определения составляющих материального баланса клеточных культур	23
2.1. Определение числа жизнеспособных бактерий культуральными методами	23
2.2. Определение общей численности бактерий методом прямого счета по Виноградскому — Бриду	26
2.3. Определение биомассы по оптической плотности клеточной культуры	29
2.4. Определение количества органического вещества методом бихроматного окисления.....	31
Лабораторные занятия 2–3	31
Вопросы для обсуждения	32
Тема 3. Математические закономерности периодического роста клеточных культур	32
Лабораторные занятия 4–5	34
Вопросы для обсуждения	35
Тема 4. Методические основы культивирования клеток и тканей высших растений	35

4.1. Требования асептики при выполнении работ по культивированию растительных объектов <i>in vitro</i>	35
4.2. Правила приготовления питательных сред для культивирования растительных клеток и тканей <i>in vitro</i> ...	36
4.3. Требования к физическим условиям при культивировании клеток и тканей <i>in vitro</i>	39
Лабораторное занятие 6	40
Лабораторное занятие 7	41
Вопросы для обсуждения	44
Тема 5. Введение в культуру растительных клеток и тканей <i>in vitro</i>	44
5.1. Получение каллусных тканей <i>in vitro</i>	45
5.2. Стерилизация растительного материала при введении в культуру <i>in vitro</i>	47
Лабораторное занятие 8	49
Лабораторное занятие 9	50
Вопросы для обсуждения	51
Тема 6. Микрклональное размножение растений.....	51
Лабораторное занятие 10	54
Вопросы для обсуждения	54
Учебно-методическое и информационное обеспечение дисциплины	55
Приложение.....	57

Учебное издание

Шеховцова Нина Валентиновна

Зайцева Юлия Владимировна

Культивирование микроорганизмов и клеток

Учебно-методическое пособие

Редактор, корректор М. Э. Левакова

Верстка М. Э. Леваковой

Подписано в печать 27.06.2019. Формат 60×84 1/16.

Усл. печ. л. 3,49. Уч.-изд. л. 2,5.

Тираж 2 экз. Заказ

Оригинал-макет подготовлен
в редакционно-издательском отделе ЯрГУ.

Ярославский государственный университет
им. П. Г. Демидова.

150003, Ярославль, ул. Советская, 14.