

Manual of Methods for General Bacteriology

PHILIPP GERHARDT, Editor-in-Chief

Department of Microbiology and Public Health,
Michigan State University, East Lansing, MI 48824

R. G. E. MURRAY, Editor, I. Morphology

Department of Microbiology and Immunology,
University of Western Ontario, London, Ont., Canada N6A 5C1

RALPH N. COSTILOW, Editor, II. Growth

Department of Microbiology and Public Health,
Michigan State University, East Lansing, MI 48824

EUGENE W. NESTER, Editor, III. Genetics

Department of Microbiology,
University of Washington, Seattle, WA 98195

WILLIS A. WOOD, Editor, IV. Metabolism

Department of Biochemistry, Michigan State University,
East Lansing, MI 48824

NOEL R. KRIEG, Editor, V. Systematics

Biology Department, Virginia Polytechnic Institute,
Blacksburg, VA 24061

G. BRIGGS PHILLIPS, Editor, VI. Laboratory Safety

Health Industry Manufacturers Association, 1030 15th Street, N. W.,
Washington, DC 20005

American Society for Microbiology Washington, DC 20006 1981

МЕТОДЫ ОБЩЕЙ БАКТЕРИОЛОГИИ

В ТРЕХ ТОМАХ

1

Под редакцией
Ф. ГЕРХАРДТА и др.

Перевод с английского под редакцией
чл.-корр. АН СССР Е. Н. КОНДРАТЬЕВОЙ
и проф. Л. В. КАЛАКУЦКОГО

МОСКВА «МИР» 1983

ББК 28.4

М 59

УДК 576.80.85

М 59 **Методы общей бактериологии: Пер. с англ./Под ред. Ф. Герхардта и др. — М.: Мир, 1983. — 536 с., ил.**

Фундаментальное руководство, написанное учеными США и Канады, по методам, широко используемым в современной бактериологии. На русском языке книга выходит в трех томах. В первый том вошли методы световой и электронной микроскопии, фракционирования бактериальных клеток, приготовления сред для выращивания микроорганизмов, измерения роста микроорганизмов.

Предназначена для специалистов, работающих во всех областях микробиологии.

М 2003000000—447

041(0)—83

подп. изд-е—83, ч. 1

ББК 57 А

Редакция литературы по биологии

МЕТОДЫ ОБЩЕЙ БАКТЕРИОЛОГИИ

том 1

Научный редактор Т. И. Пономарева. Мл научи. редактор Р. Ф. Куликова. Художник А. В. Шипов. Художественный редактор А. В. Лисицын. Технический редактор Т. Д. Паиасюк. Корректор И. А. Дериколенко

ИБ № 3305

Сдано в набор 29.04.83. Подписано к печати 21.08.83. Формат 84×108¹/₁₆. Бумага типографская № 1. Гарнитура литературная. Печать высокая. Объем 8,38 бум. л. Усл. печ. л. 28,14. Усл. кр.-отт. 28,14. Уч.-изд. л. 31,01. Изд. № 4/2551. Тираж 11 300 экз. Зак. 1260. Цена 2 р. 60 к.

ИЗДАТЕЛЬСТВО «МИР», 129820, Москва, И-110, ГСП, 1-й Рижский пер., 2.

Московская типография № 11 Союзполиграфпрома при Государственном комитете СССР по делам издательств, полиграфии и книжной торговли. Москва, 113105, Нагатинская ул., д. 1.

© 1981 American Society for Microbiology

© Перевод на русский язык, «Мир», 1983

ПРЕДИСЛОВИЕ РЕДАКТОРОВ ПЕРЕВОДА

История микробиологии тесным образом связана с развитием и совершенствованием методов изучения и использования микроорганизмов. Богатый и разнообразный арсенал методов современной микробиологии продолжает непрерывно пополняться. Усилия в этой области находят отражение на страницах многих специальных журналов (*Journal of Microbiological Methods*, Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, публикуется с 1983 г.), продолжающихся изданий (*Methods in Microbiology*, eds. J. R. Norris, D. W. Ribbons, Academic Press, Inc., London, N. Y., вышло из печати 14 томов), трудов тематических симпозиумов (Tilton R. C., ed. 1982. *Rapid methods and automation in microbiology*, ASM Publication, Washington, D. C.), коллективных монографий (*The Prokaryotes*, A. Handbook on Habits, Isolation and Identification of Bacteria, eds. M. P. Starr et al., Springer Verlag, Berlin, N. Y., 1981) и т. д. Наряду с совершенствованием классических методов (приемов выделения микроорганизмов, их культивирования, идентификации, микроскопии и др.) происходит интенсивное расширение арсенала микробиологии методами, заимствованными у смежных дисциплин (генетики, молекулярной биологии, биохимии и биофизики). И если даже специалист в наши дни нередко вынужден затрачивать довольно много времени и усилий на поиск описаний подходящих методов, их апробацию и совершенствование, то решение подобной задачи для начинающих исследователей, практических работников и учащихся высших учебных заведений сопряжено с еще большими трудностями.

Коллективная монография «Методы общей бактериологии», с русским переводом которой имеет теперь возможность ознакомиться советский читатель, адресована прежде всего начинающим исследователям, практичес-

ким работникам и учащимся. Составители, авторы и редакторы сборника предприняли значительные усилия к тому, чтобы из широкого круга методов, представляющих реальный или потенциальный интерес для микробиологов и других исследователей, работающих с микроорганизмами, выбрать те, которые используются особенно часто, и дать их описание в доступной для воспроизведения форме. В сборник включены преимущественно не просто «новейшие» методы, но реально «действующие», т. е. те, которые успешно прошли апробацию в различных лабораториях, в том числе в лабораториях авторов отдельных глав. Таким образом, по своему характеру книга приближается к «Большому практикуму» по микробиологии и может претендовать на место не столько на полке библиотеки, сколько на лабораторном столе.

Текст глав сборника и списки цитированной литературы отражают усилия многих специалистов по созданию и совершенствованию микробиологических методов. Результаты этой работы представляют несомненный интерес для советских читателей. Некоторые трудности в смысле применения отдельных методов связаны с тем, что авторы рекомендуют использовать в работе конкретные приборы и реактивы зарубежного производства. Во многих случаях, однако, суть методов, цель применения и требования, предъявляемые к оценке полученных результатов, изложены столь детально, что воспроизведение метода в оригинальном или модифицированном виде вполне возможно. Книга будет полезна очень широкому кругу читателей — микробиологам, биохимикам и генетикам, занятым не только исследовательской и преподавательской работой, но и работающим на предприятиях микробиологической и медицинской промышленности, в сельском хозяйстве, здравоохранении, ветеринарии и т. п. — одним словом, всюду, где возникает необходимость в ежедневной грамотной работе с разнообразными микроорганизмами.

*Е. Н. Кондратьева
Л. В. Калакуцкий*

ПРЕДИСЛОВИЕ

Книга «Методы общей бактериологии» была задумана как краткое и доступное по цене руководство по наиболее важным и надежным методам, применяемым в бактериологической практике.

Книга охватывает все таксоны бактерий и посвящена проблемам теоретической и прикладной бактериологии. Поскольку в природе преобладают сапрофитные формы, паразитические и патогенные бактерии отдельно не рассматриваются. Не обсуждаются также специальные методы прикладных областей микробиологии, равно как и не делается попытка охватить всю микробиологию. Вирусы упоминаются только в связи с бактериофагами, используемыми в качестве векторов в процессе переноса генов, водоросли — только в связи с цианобактериями (сине-зелеными водорослями); дрожжи, плесневые грибы и простейшие упоминаются лишь вскользь.

Книга написана для тех, кто серьезно изучает предмет и нуждается в приобретении навыков, необходимых для проведения исследовательских и прикладных работ в области бактериологии. Пособие рассчитано главным образом на студентов старших курсов и начинающих научных работников, стремящихся получить более глубокие знания. Оно будет полезным для преподавателей при составлении заданий по лабораторной практике, а также для научных сотрудников в их экспериментальной работе. Книга содержит немало полезной информации для сотрудников отраслевых лабораторий и всех, кого по роду деятельности интересует затрагиваемый круг проблем.

По своему характеру и стилю эта книга о том, как надо работать. В ней освещено достаточно методологических принципов для того, чтобы понять, с какой целью и каким образом следует применять тот или иной метод. Прописи приведены в логической последовательности и

достаточно подробно, для того чтобы их можно было использовать без привлечения дополнительной литературы. Указаны наиболее типичные ошибки, затруднения и неожиданности, встречающиеся при использовании описываемых методик. В книге широко использованы примеры, рисунки, таблицы и схемы. При отборе методов учитывались частота их использования и надежность. Менее важные методы упомянуты в ссылках на оригинальную литературу, где дано их подробное описание. Авторы стремились по возможности обобщить методы таким образом, чтобы их можно было применить к любой вновь выделенной бактерии. Многие из них описаны на примере конкретных бактерий — хорошо известных авторам или часто используемых в бактериологической практике.

Методы, приведенные в этой книге, нужно рассматривать как проверенные на практике рекомендации компетентных исследователей, а не как «стандартные» или «наилучшие» методы. Тот факт, что Американское микробиологическое общество субсидировало и организовало издание этой книги, не следует рассматривать как рекомендацию, а описанные в ней методы — как «официально принятые» или «одобренные». Указание коммерческих источников оборудования и материалов не следует воспринимать как предпочтение одних и исключение других; если какие-то источники не названы вовсе, это сделано непреднамеренно.

Книга состоит из шести разделов, соответствующих основным разделам общей бактериологии, а главы, входящие в эти разделы, посвящены соответствующим областям методологии. Каждая глава — это самостоятельная и законченная часть книги. Десятичная система обозначения отдельных частей глав удобна для поиска необходимого материала, ссылок на другие разделы книги, а также для пользования предметным указателем. Все названия кратки и отражают существо вопроса, что также облегчает поиск. В конце каждой главы дается список литературы: вначале приводятся полные ссылки на литературу общего характера и краткие аннотации к ним, затем — сокращенные ссылки на специальную литературу. Некоторые главы дополнены списками фирм, поставляющих нужные приборы и материалы.

Тексты всех глав подвергались многостороннему и строгому рецензированию. После рецензирования и переработки все рукописи обсуждались на трех известных факультетах общей микробиологии разных университетов. И наконец, вся рукопись была внимательно проработана главным редактором с точки зрения ее содержания и соответствия замыслу. Такой процесс рецензирования и редактирования был не всегда легким, но чрезвычайно полезным. Мы просим читателей присылать свои замечания, благодаря которым мы сможем внести необходимые дополнения, сокращения и изменения в следующее издание.

История данного пособия восходит к 1923 г., когда Х. Дж. Кон впервые написал и опубликовал для Американского микробиологического общества несколько руководств по методам микробиологических исследований в виде отдельных листков. Позже Кон был членом редколлегии и председателем Комиссии по бактериологическим методам, которая издала сборник под названием «Методы изучения чистых культур бактерий» в виде папки с отрывными листами. Авторы сборника отказались от гонорара, и доход от продажи пособия поступил в пользу Общества. В 1957 г. по инициативе Комиссии под руководством М. Дж. Пелчара-младшего переработанное пособие было издано в виде книги под названием «Руководство по микробиологическим методам».

Выход в свет настоящего руководства был вызван растущим спросом на издание 1957 г., а также необходимостью радикального обновления его содержания. С самого начала было запланировано такое количество страниц для каждого автора, которое позволило бы выпустить книгу в одном томе при минимальном объеме и максимальной лаконичности. Мы стремились к тому, чтобы цена книги была доступна для студентов. Это стало возможным, так как Общество, которое непрерывно растет (в 1980 г. оно состояло из 30 000 членов), имеет теперь собственное издательство и поэтому может издавать книги большим тиражом при низкой стоимости. Более того, Общество является освобожденной от налогов неприбыльной организацией, а редакторы и авторы не получают зарплаты или гонораров.

ПРЕДИСЛОВИЕ

Я выражаю искреннюю благодарность всем, кто представил материал для книги; всем авторам и редакторам за прекрасное сотрудничество и работу по созданию книги; многочисленным рецензентам — за скрупулезные и конструктивные критические замечания; Эрвину Ф. Лесселу и его сотрудникам, которые вызвались переделать иллюстрации и графики в едином стиле; университетам и другим учреждениям, предоставившим помощь в лице сотрудников, а часто и в виде прямой финансовой поддержки для подготовки и редактирования рукописей; Цинтии Лоунсбери — автору обложки; а также издательскому отделу Американского микробиологического общества, в частности Эстелле Б. Брэдли — за окончательную редакцию книги и составление предметного указателя; руководителю отдела книг Черилу Кроссу и исполняющей обязанности главного редактора Джизелле Поллок. Каждый из нас с удовольствием внес свою лепту в дальнейшее развитие бактериологии.

Филипп Герхардт

МЕТОДЫ ОБЩЕЙ БАКТЕРИОЛОГИИ

Ф. Герхардт

Подобно общей части любой другой науки общая бактериология рассматривает не конкретные вопросы (скажем, отдельные виды бактерий), а проблемы в целом; ее методология охватывает основные процедуры, которые находят широкое применение в самых разнообразных лабораторных исследованиях. Данное руководство охватывает весь круг бактерий, описанных в «Кратком определителе бактерий Берги» без особого выделения каких-либо групп. Методы, приведенные в книге, могут быть полезными в любой области, где приходится иметь дело с бактериями, и могут применяться для решения всех практических задач, включающих использование бактерий.

Бактериология стала наукой только после того, как были разработаны уникальные методы, благодаря которым она продолжает оказывать влияние и проникать в такие появившиеся позднее области науки, как вирусология, иммунология и молекулярная биология. Разработанная Кохом техника использования чистых культур и впервые примененные Пастером иммунологические реакции и химический анализ и сейчас не утратили своего значения.

Методология общей бактериологии отражена в нашей книге с помощью такого построения изложения, которое типично для классических учебных пособий по этой дисциплине. Так, в книгу включены разделы по морфологии, росту, генетике, метаболизму и систематике, а также лабораторной технике безопасности. Эти разделы состоят из глав, соответствующих основным группам методов общей бактериологии. Часто подразделение материала несколько произвольно, поэтому некоторые методы упоминаются несколько раз; при этом указываются глава и раздел, где дано описание метода, а в конце книги имеется предметный указатель. К каждой главе прила-

гается список общей литературы и специальных статей, где содержится описание обсуждаемых методов.

Основным литературным источником для читателя, который интересуется описанием метода, не включенного в эту книгу, может служить многотомный труд нескольких авторов «Методы микробиологии» [5]. Прекрасным собранием методик является книга Мейнеллов «Теория и практика в экспериментальной бактериологии» [4]. Не теряет своего значения и предшествовавшее нашей книге «Руководство по микробиологическим методам» Американского бактериологического общества [8]. Методы медицинской микробиологии и иммунологии, многие из которых применимы в общей бактериологии, изложены в ряде работ, включая такие справочные пособия, как «Руководство по клинической микробиологии» [3] и «Руководство по клинической иммунологии» [6]. «Учебник микробиологии» [2] и «Микробиологический словарь» [7] относятся к общемикробиологической литературе. Дополнительная информация об имеющихся в продаже оборудовании и материалах содержится в ежегодном издании «Yellow Pages of Instrumentation, Equipment and Supplies» [1] и ежегодных специальных приложениях к журналам «American Laboratory», «Chemical Engineering» и «Science».

ЛИТЕРАТУРА

1. Industrial Research/Development. Yellow pages of instrumentation, equipment and supplies. Industrial Research/Development Publishers, Barrington, Ill, 1979.
2. Laskin A. I., Lechevalier H. CRC handbook of microbiology, 2nd ed, CRC Press Inc., Cleveland, 1978—1980.
Т. 1. Бактерии. Первые 120 страниц посвящены вводу описанию бактерий, следующие 340 страниц — описанию основных групп бактерий, последние 220 страниц содержат обычную учебную информацию, включая список коллекций культур.
Т. 2. Грибы, водоросли, простейшие и вирусы.
Т. 3. Аминокислоты и белки.
Т. 4. Углеводы, липиды и минеральные вещества.
3. Lennette E. H., Balows A., Hausler W. H. Jr., Truant J. P. (ed.). Manual of clinical microbiology, 3rd ed. American Society for Microbiology, Washington, D. C., 1980.
4. Meynell G. G., Meynell E. Theory and practice in experimental bacteriology, 2nd ed. University Press, Cambridge, England, 1970.
Прекрасное компактное (347 с.) справочное руководство, содержащее обсуждение и описание многих методов общей бактериологии.

МЕТОДЫ ОБЩЕЙ БАКТЕРИОЛОГИИ

Включает разделы, посвященные росту, культуральным средам, кислороду, двуокиси углерода и анаэробноз, стерилизации, световой микроскопии, количественному определению, генетическим методам.

5. *Norris J. R., Ribbons D. W. (ed.). Methods in microbiology, vol. 1—13, Academic Press, Inc., New York, 1969—1979.*

Т. 1, 2, 3А, 5А, 5Б, 6А, 6Б, 7А, 7Б, 8 и 9 посвящены методам общей бактериологии, т. 4 — микологии, т. 10—13 — методам типирования в эпидемиологии патогенных бактерий. В каждом томе дано содержание предыдущих томов. Стиль изложения у разных авторов различен, но чаще всего это подробный обзор с многочисленными ссылками на оригинальные статьи.

6. *Rose N. R., Friedman H. (ed.). Manual of clinical immunology, 2nd ed, American Society for Microbiology, Washington, D. C., 1980.*

7. *Singleton P., Sainsbury D. Dictionary of microbiology, John Wilson & Sons, Inc., New York, 1978.*

Полезная энциклопедия терминов, тестов, методов, таксонов, теоретических взглядов и т. д. Объем — 481 с. Статьи энциклопедии — от кратких определений до сжатых обзоров — охватывают широкую область теоретической и прикладной микробиологии, включая биохимию и генетику.

8. *Society of American Bacteriologists, Committee on Bacteriological Technique. Manual of microbiological methods, McGraw-Hill Book Co., Inc., New York, 1957.*

Эта книга объемом в 315 с. по-прежнему остается полезной, особенно ценны главы, посвященные методам окрашивания, приготовления сред и рутинным тестам, используемым при идентификации бактерий.

МОРФОЛОГИЯ

ВВЕДЕНИЕ

Р. Мюррэй

Микроскопы и использование эффективных методов микроскопии определяют основы микробиологии как одного из разделов биологической науки. Бактериология, в частности описательная, вобрала все достигнутое в области совершенствования микроскопических методов как простых, так и сложных, потому что вездесущие прокариотические организмы, с которыми она имеет дело, представляют собой действительно маленькие клетки. В настоящее время, когда клеточные компоненты можно изучать на уровне макромолекул и отдельных функциональных элементов, а некоторые процессы, происходящие в клетке, могут быть исследованы в клеточных фракциях, значительно возросли роль и частота применения методов анализа с высоким разрешением, в частности электронной микроскопии. Однако микроскопия, на каком бы уровне она ни осуществлялась, естественно, не исчерпывает всех возможностей исследования бактерий (или их компонентов) в природных местообитаниях или лабораторных культурах.

В первой части описаны подходы, которые, мы надеемся, читатель оценит как наиболее полезные и гарантирующие успех. Нам хотелось бы познакомить читателя с опытом многих исследователей, работающих в области бактериологии, и тем самым пополнить имеющиеся у него знания о бактериях. Главная же наша цель заключалась в том, чтобы показать, как сделать микроскоп, световой или электронный, более полезным, эффективным и ценным в работе. В иллюстративном материале особой нужды нет, так как основные параметры и устройство микроскопов подробно разбираются в учебниках и в цитируемой литературе, имеющейся в каждой главе. Поэтому мы приведем по возможности ясное описание пригодных, на наш взгляд, методик и акцентируем

внимание на возможных ошибках и трудностях. Одновременно мы пытаемся подчеркнуть, что многое можно сделать на очень простом оборудовании, причем умение приходит с опытом, который ничем не заменишь.

Световой микроскоп доступен и необходим всем микробиологам, но, поскольку его эффективное использование достигается не так уж часто, мы приводим в гл. 1 подробные рекомендации, знание которых необходимо каждому. В гл. 2 и 3 описывается использование светового микроскопа для получения информации о детальной структуре и для идентификации бактерий. Электронный микроскоп устроен значительно сложнее, чем световой. Как правило, его обслуживанием и регулировкой занимаются специалисты-профессионалы, которые инструктируют, помогают и дают советы. Поэтому в гл. 4 большое внимание уделяется методическим аспектам подготовки препаратов для микроскопии. Для успешного продолжения работы, начинающейся с разрушения бактериальных клеток и их фракционирования, описываемых в гл. 5, нужна как световая, так и электронная микроскопия. При этом в качестве главного средства контроля чистоты субклеточных фракций и установления связи между структурой и функцией применяется электронный микроскоп.

СВЕТОВАЯ МИКРОСКОПИЯ

Р. Мюррэй, К. Робиноу

Микроскопические исследования проводить легко и интересно, а их результаты отличаются четкостью, когда под рукой имеются микроскопы по крайней мере четырех различных типов. Лучше всего, если они постоянно готовы к работе и содержатся в порядке. Речь идет о 1) обычном, хорошо, но без излишеств оснащенном микроскопе, нужном для оценки в самом первом приближении, 2) фазово-контрастном микроскопе, 3) оптимально оборудованном микроскопе, настроенном на высокое разрешение деталей и приспособленном для фотографирования, и 4) люминесцентном микроскопе. Конечно, возможны различные сочетания, а иногда нужды исследователей удовлетворяются и при более ограниченном выборе.

В продаже имеются самые разнообразные микроскопы. Те из них, что производятся на лучших заводах, примерно одинаковы по качеству, а количество предлагаемых для них дополнительных приспособлений более чем достаточно. Они различаются главным образом конструкцией опорной части, и их выбирают исходя скорее всего из соображений удобства и личных симпатий. По-настоящему хорошие микроскопы дороги. Приложив усилия, можно делать хорошие работы на микроскопе общего назначения или даже на студенческом микроскопе, если оборудовать их первоклассной оптикой. Однако при этом трудно состязаться с работами, выполненными на приборах, которые поставляются лучшими фирмами-изготовителями. Выбор может зависеть также от технических требований. Всегда рекомендуется проводить прямые сравнения разных микроскопов и приспособлений на собственном материале при используемых в работе условиях. Поэтому нет необходимости обращать внимание на то, кем сделан инструмент. Главное — чтобы работа на хорошем микроскопе (независимо от времени

его изготовления) доставляла удовольствие, а широкий выбор приспособлений и умение пользоваться ими способствовали экономии времени и точности результатов. Применение плохо настроенных микроскопов с плохим освещением настолько широко распространено, что лишь немногие биологи представляют себе возможности микроскопа. Иногда исследователи приходят в изумление, когда им удается получить очень большое разрешение даже на студенческом микроскопе. Это возможно в том случае, если использовать принципы, изложенные в разд. 1.1 или 1.3 и 1.3.1.

1.1. ОБЫЧНАЯ МИКРОСКОПИЯ

Микроскопы, которые используют в общих целях в учебной комнате, в исследовательской лаборатории или в клинической лаборатории, могут иметь разные марки, обладать разным качеством и предназначаться для разных условий. В бактериологии вопросы, на которые можно ответить с помощью микроскопа, формулируются следующим образом. Обладают ли изучаемые объекты размером бактерий и окрашиваются ли они так же, как бактерии? Однородны ли они по форме и размеру? Какие это бактерии — грамположительные или грамотрицательные? Организмы или клетки одного или более чем одного типа присутствуют в препарате? и т. д. Для выяснения этих вопросов самые первые наблюдения можно, как правило, проводить, не достигая высшей степени разрешения. Сначала исследователя может удовлетворить и упрощенная процедура, поскольку хорошо известно, что для получения более высокого разрешения улучшения можно добиться почти на каждом этапе исследования.

Микроскоп (рис. 1.1) должен иметь:

1. Окуляры по крайней мере 10-кратного увеличения. Вместе с тем для детальных исследований бактериальных структур нужны компенсационные окуляры с большим увеличением ($12\times$ или $15\times$). Они закрепляются в тубусе микроскопа, который имеет фиксированную или регулируемую длину (до 180 мм или до величин, рекомендуемых заводом-изготовителем).

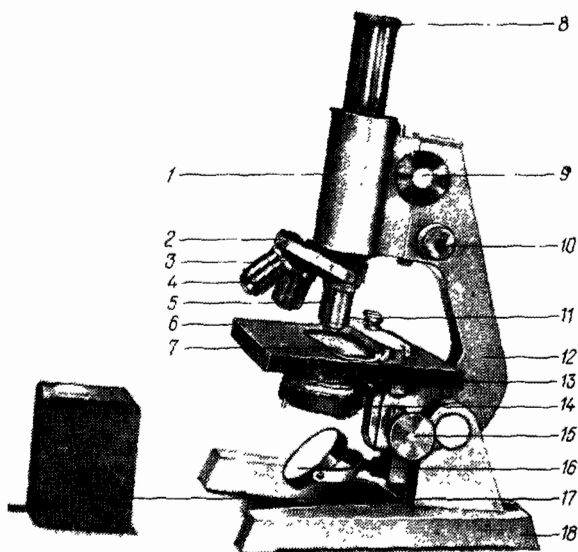


Рис. 1.1. Обычный оптический микроскоп, используемый для повседневной работы. 1 — тубус; 2 — револьвер со сменными объективами; 3 — иммерсионный объектив 40 $\times$; 4 — безыммерсионный объектив 40 $\times$; 5 — безыммерсионный объектив 10 $\times$; 6 — предметный столик; 7 — предметное стекло (объект); 8 — окуляр; 9 — макровинт; 10 — микровинт; 11 — препаратодержатель; 12 — штатив; 13 — конденсор; 14 — регулятор ирисовой диафрагмы; 15 — конденсорный винт; 16 — зеркало (плоская сторона); 17 — лампа; 18 — основание.

2. Слабые безыммерсионные объективы (10 $\times$ и 40 $\times$), которые необходимы для микроскопирования растущей культуры и для нахождения потенциально интересных полей зрения в препарате.

3. Ахроматический иммерсионный объектив (от 90 $\times$ до 100 $\times$), для которого иммерсией служит масло.

4. Предметный столик с механическим препаратодержателем или простыми пружинными зажимами. Если микроскоп снабжен препаратодержателем, последний должен легко сниматься, чтобы можно было просматривать под малым увеличением чашки Петри или окрашиваемые на предметных стеклах препараты.

5. Находящийся под столиком высококачественный конденсор (апланатический конденсор с тремя линзами

с предпочтительной числовой апертурой от 1,3 до 1,4). Конденсор этого типа необходим для объективов, с которыми работают при масляной иммерсии, поскольку он обеспечивает требуемое для них количество и качество света. Конденсор должен иметь ирисовую (апертурную) диафрагму, находящуюся под нижней линзой.

6. Источник света, либо смонтированный внутри микроскопа и имеющий ограниченную регулировку, либо (что предпочтительнее) внешний и перемещаемый. В последнем случае под конденсором монтируется зеркало (плоское с одной стороны и вогнутое с другой), положение которого можно менять; свет направляется вверх по оптической оси микроскопа за счет наклонного положения зеркала. Из множества различных ламп для большинства работ подходит круглая матовая лампа, над которой располагается линза типа «бычий глаз». Однако при исследовании окрашенных препаратов, особенно при освещении по Кёлеру (разд. 1.3.1), изображение значительно улучшается, если использовать лампу, которая дает четкое изображение источника света, снабжена держателем для светофильтра и ирисовой полевой диафрагмой. Проекционные лампы со спиральной нитью (дающие неравномерное изображение) нужно фокусировать на матовое стекло, служащее рассеивающей перегородкой и расположенное в держателе для светофильтра лампы; затем путем регулировки отражателя, находящегося в корпусе лампы, следует сместить одно из двух изображений нити так, чтобы витки одного приходились на промежутки между витками другого, и путем небольшой расфокусировки добиться возможно более однородного и яркого освещения поверхности, служащей источником света.

При работе с микроскопом выполняются следующие операции:

1. В положении, когда окуляр и объектив 10X занимают свои места, конденсор почти полностью поднят до уровня предметного столика, а апертурная диафрагма в конденсоре полностью открыта, зеркало поворачивают таким образом, чтобы направить свет вверх по оптической оси. Макровинтом устанавливают объектив в положение, при котором источник света находится в фокусе, после чего выводят его в центр с помощью зеркала.

При микроскопировании, как правило, используют *плоское* зеркало.

2. Помещают предметное стекло с препаратом на предметный столик и фокусируют объектив до получения резкого (не обязательно хорошо освещенного) изображения объекта, которое следует максимально улучшить регулировкой апертурной диафрагмы и положения конденсора.

3. По нашему опыту лучший способ определить оптимальное положение конденсора состоит в следующем. Снимают окуляр и смотрят через тубус на заднюю поверхность линзы объектива. В это же время регулируют положение конденсора таким образом, чтобы освещение объектива было самым полным и равномерным. Любое нарушение центрировки можно выявить и исправить поворотом зеркала. Затем уменьшают блики, закрывая диафрагму конденсора (если она есть) как раз настолько, чтобы освещенный участок задней линзы объектива только-только начал уменьшаться. Эту операцию выполняют для *каждого* объектива при первоначальной фокусировке на данный объект.

4. Возвращают окуляр на место и производят окончательную регулировку, добиваясь наилучшего освещения.

5. Поворотом револьвера с объективами устанавливают любой другой объектив. Многие фирмы, производящие микроскопы, поставляют парафокальные объективы (т. е. объективы, у которых фокальные плоскости почти совпадают). При установке остается достаточный зазор для безымерсионных объективов. Если же объективы не парафокальны, перед фокусированием иммерсионных объективов, имеющих малые фокальные расстояния, нужно слегка приподнять тубус микроскопа. Зазор становится еще меньше, если препарат накрыт покровным стеклом.

6. Если смотрят препарат с иммерсией, то наносят каплю масла на стекло с препаратом (в центр препарата) перед тем, как поместить его на предметный столик. Если же предварительно требуется отыскать нужное поле зрения при малом увеличении, то каплю масла удобно нанести, когда револьвер находится в промежуточном положении при переходе с одного объектива на

другой, перед тем как иммерсионный объектив окажется над каплей с маслом.

7. Чтобы научиться обращаться с иммерсионным объективом и фокусировать его, нужен некоторый практический навык и осторожное обращение с микроскопом (разд. 1.5 и 1.6), даже если передняя часть объектива способна вжиматься в целях защиты как линзы, так и предметного стекла от микроскописта с плохими руками. Глядя сбоку на предметное стекло, опускают объектив до поверхности масляной капли, а затем еще немного. Объектив опускают осторожно при помощи макровинта и следят за появлением изображения препарата, глядя в окуляр. После того как оно появляется, пользуются микровинтом. Настраивают освещение, как описано ранее, и подбирают оптимальное на свой глаз.

8. Если изображение неясное, плывет или только тусклое и нерезкое, значит, что-то сделано неправильно. Может быть, нуждается в очистке фронтальная линза объектива (для этого используют бумагу для линз). С иммерсионными объективами часто получается плохая картина из-за пузырьков воздуха в масле (пузырьки легко выявляются, если снять окуляр и посмотреть вниз через тубус). В этом случае поднимают объектив или поворачивают револьвер, чтобы вытереть с объектива масло (обычно пузырьки переходят на объектив) и вновь фокусируют изображение. Причиной плохого изображения может также служить случайно закрытая диафрагма, сдвинутая лампа или зеркало. Устранение других возможных неполадок см. в разд. 1.7.

Помните и выполняйте следующие простые правила работы с микроскопом.

Правило 1. Сфокусированное изображение должно быть хорошо освещено.

Правило 2. Если света слишком много, применяют нейтральный светофильтр или отодвигают подальше источник света. Для иммерсионных объективов, имеющих большую апертуру, важно избежать уменьшения освещаемой области опусканием конденсора или прикрыванием апертурной диафрагмы конденсора более чем на 10%, хотя это может оказаться полезным при использовании безыммерсионных объективов с маленькой апер-

турой и при просматривании живых неокрашенных клеток.

Правило 3. Если для объектива, который хотят использовать, света не хватает, то причина кроется либо в том, что свет чем-то заслонен, либо в том, что не подходит данная система освещения. В последнем случае следует заменить лампу или конденсор.

Правило 4. Исследуемый препарат должен быть частью (почти) однородной оптической системы и залит маслом, водой или соответствующей средой. Никаких деталей нельзя различить в высушенных окрашенных пленках бактерий, рассматриваемых с помощью безымерсионного объектива.

Правило 5. Линзы должны быть всегда чистыми и незапыленными, без следов пальцев, носа и туши с окрашенных ресниц.

Отдельные живые бактерии, дрожжевые клетки или грибные гифы хорошо видны даже при просмотре через дно чашки Петри с объективом 10 $\times$. При этом природа и состояние исследуемого материала устанавливаются без каких-либо дополнительных манипуляций. Здесь стоит сделать два следующих замечания, существенных при работе с чашками Петри: 1) лучшее освещение при обследовании чашки через дно обеспечивается использованием вогнутого зеркала и 2) искажение изображения за счет царапин на стекле или неровностей дна чашки в области, находящейся под микроскопом, можно устранить с помощью капли иммерсионного масла; каплю накрывают покровным стеклом, благодаря чему обеспечивается однородный световой путь и скрываются дефекты поверхности.

1.2. ФАЗОВО-КОНТРАСТНАЯ МИКРОСКОПИЯ

Микроскоп, который собран и постоянно используется для фазово-контрастной микроскопии, следует предпочесть тому, который работает и как фазово-контрастный и как обычный (после соответствующей замены оптики) на том же штативе. Для фазово-контрастной микроскопии требуется много света и гораздо бо́льшая оснащенность по сравнению с обычной микроскопией окрашен-

ных препаратов. Для уменьшения неизбежных хроматических аберраций пользуются зеленым светофильтром.

Существенным является центрирование фазовой пластинки, находящейся в конденсоре, по отношению к пластинке в задней фокальной плоскости объектива. Центрирование достигается проецированием их обеих при помощи фокусирующего окуляра («телескопа»), и приведением к центру создаваемой ими системы колец, для чего пользуются двумя регулировочными ручками по бокам конденсора.

Одно из преимуществ фазово-контрастной микроскопии перед темнопольной, которая применяется в настоящее время реже, заключается в полном использовании апертуры объектива, что влечет за собой необходимость применения самых высококачественных фазово-контрастных объективов. Это в свою очередь предполагает использование конденсора с достаточно большой апертурой и, так же как и раньше, применение компенсационных окуляров с увеличением $15\times$ или даже $20\times$, способных реализовать то высокое разрешение, которое дают объективы. Вполне доступны фазово-контрастные иммерсионные объективы средней силы ($40\times$ — $60\times$), которые дают хорошо очерченные полноценные изображения при работе с мицелием грибов и другими большими клетками. Наилучшие результаты получают, применяя объективы с увеличением $90\times$ и $100\times$ и числовой апертурой больше 1,0, используя иммерсию. Однако удовлетворительные результаты фазово-контрастная микроскопия дает и без применения иммерсии, например при подсчете бактерий, простейших и спор, проверке подвижности или при определении размера и формы. В том случае, когда хотят увидеть детальную внутриклеточную организацию живых организмов, следует обратить внимание на преломляющие свойства среды, в которой рассматриваются клетки; наилучших результатов достигают при добавлении в среду желатины до 15—30%. При этом показатели преломления среды и внутриклеточного содержимого становятся одинаковыми или почти одинаковыми, а фазовая задержка пропорциональна показателю преломления, умноженному на световой путь. В этих условиях уменьшаются также ореолы.

1.3. МИКРОСКОПИЯ С ВЫСОКИМ РАЗРЕШЕНИЕМ

Под «исследовательским микроскопом» имеют в виду микроскоп, позволяющий выявлять тонкую дегаальную структуру при большом увеличении. Он не предназначен для оценки результатов окраски по Граму, зато он помогает разрешать вопросы, которые касаются жгутиков и другого материала, требующего выявления тонких деталей. В этих целях самое пристальное внимание следует уделить качеству оптики. Чтобы достичь высокого разрешения, а также устранить хроматические и сферические аберрации, нужно с вниманием отнестись к основополагающим принципам.

Разрешение (R) есть наименьшее расстояние между точками детали в препарате, которые еще не сливаются в изображении, видимом в микроскоп или на фотографии. $R = \lambda / 2 \cdot (\text{ч. а.})$, где λ — длина волны применяемого света, а ч. а. — числовая апертура — мера светособирающей способности объектива. Для получения наименьших значений R следует применять коротковолновый свет, хотя, к сожалению, свет наиболее эффективной части спектра (а именно ультрафиолет в области 365 нм) не воспринимается глазом и не проходит через стекло. Чтобы использовать преимущества ультрафиолетового света, например в случае люминесцентной микроскопии, нужна оптика из кварца или плавикового шпата (флюорита) и необходимы не прямые методы наблюдения. Наилучшие результаты с видимым светом получают в желто-зеленой области спектра, поскольку аберрации объективов минимизируются именно для этой области длин волн. С точки зрения разрешения эта область, однако, является сравнительно длинноволновой.

Числовая апертура иммерсионного объектива обычно составляет 1,30 или 1,32, у наилучших объективов она достигает 1,4. Она представляет собой произведение синуса половины угла между крайними лучами пучка света, входящего в объектив, на показатель преломления среды, через которую свет проходит к объективу. Максимальное значение, которое может принимать функция синуса, не превышает 1,0, но показатель преломления среды, через которую свет проходит к объективу, можно

увеличить до значения показателя преломления оптического стекла (т. е. до 1,5150) применением иммерсионного масла. Именно это позволяет нам поднять числовую апертуру до значений выше 1,0 и, создав определенные условия, полностью использовать разрешающую силу дорогостоящих объективов со значениями апертур 1,30 или 1,32, выбитыми на их сверкающих оправках. Ахроматические и апохроматические объективы с большой числовой апертурой исправлены на сферическую aberrацию и на хроматическую aberrацию для двух или трех цветов в центре поля зрения (где в основном проводится работа при большом увеличении). Объективы обоих типов работают почти одинаково хорошо, оправдывая свою цену, особенно когда применяются узкополосные (интерференционные) светофильтры.

Объективы, наиболее подходящие для выполнения поставленной задачи, важно дополнить окулярами соответствующего качества. Для этого нужны *компенсационные окуляры*, названные так потому, что «они рассчитаны на исправление боковой хроматической ошибки, возникающей при увеличении в линзах объективов с большой апертурой и хорошей коррекцией aberrаций» [3]. Имеющийся опыт подтверждает правильность совета Шилабера [9], согласно которому «компенсационные окуляры должны иметь большую силу, желательно 15× или 20×. Возможности применения апохроматических объективов в сочетании с высокоразрешающими окулярами должны использоваться полностью; в противном случае тонкие детали, которые с их помощью могут быть выявлены на микрофотографиях, останутся невыясненными». Для тех, кто носит очки с сильными линзами, удобно и полезно приобрести специальные окуляры, с которыми можно работать в очках.

Оптимальная работа высокоразрешающих объективов зависит от *оптимального освещения*. Поле зрения должно быть освещено равномерно, яркости должно хватать для фотографирования. Свет от спиральных нитей ламп распределяется по их поверхности и, следовательно, по их изображению неравномерно, если он не рассеивается специальным матовым стеклом. Самыми лучшими бесструктурными источниками света стандартной яркости являются небольшие ртутные или цирконие-

вые дуговые лампы и менее дорогие удобные проекционные лампы с вольфрамовой бусинкой или ленточной нитью, изображение которых может целиком заполнить конденсор. Для широко применяемой *системы освещения по Кёлеру* (разд. 1.3.1) требуется оснастить лампу микроскопа двумя дополнительными устройствами: системой линз, способной проецировать резкое изображение источника света на входную плоскость конденсора, и находящейся перед этими линзами ирисовой полевой диафрагмой (см. ниже методику Кёлера). *Нейтральные светофильтры* (оптические пластины с алюминиевым покрытием) позволяют регулировать яркость до удобного для глаза уровня, а цветные светофильтры сужают спектр используемых для освещения длин волн. Имеются два вида цветных светофильтров: дорогие интерференционные светофильтры, пропускающие узкую область спектра и состоящие из двух полупосеребренных пластин со строго определенным зазором между ними, и рэтен-фильтры (Kodak), состоящие из двух квадратных стеклянных пластин (сторона квадрата 5 см) с полировкой оптического качества, между которыми заключен слой окрашенной желатины. Со временем эти светофильтры подсыхают из-за проникновения воздуха с ребер, однако они выпускаются в широком ассортименте цветов и плоскостей и являются ценными принадлежностями микроскопа. Красный светофильтр (рэтен № 29) или оранжевый светофильтр (рэтен № 22) делают плотные структуры прозрачными, а структуры, окрашенными голубыми красителями, более контрастными. Зеленый светофильтр (рэтен № 58B) применяется чаще других в связи с тем, что именно к зеленому цвету наиболее чувствительна наша сетчатка, а также потому, что обычно используемые в гистологических исследованиях красители имеют красный цвет и при наблюдении через зеленый светофильтр контраст изображения сильно возрастает.

Зеркала с задней отражающей поверхностью (т. е. имеющие зеркальную поверхность за слоем стекла) хороши в повседневной работе и долговечны. Однако они не дают оптимального освещения, поскольку отражения источника света с передней поверхности стекла и с задней, где находится отражающий слой металла, не совпадают и перекрываются. То же происходит с изображе-

нием отверстия полевой диафрагмы, когда к окончательно получаемому изображению добавляется нежелательный рассеянный свет (методика Кёлера). *Зеркала же с передней отражающей поверхностью* не имеют защитного покрытия и дают лишь единственное отражение.

Самый важный элемент на пути света от лампы к объективу и к глазу — это *конденсор*, находящийся под предметным столиком. Апертуры объективов со значениями от 1,30 до 1,32 будут полностью эффективны только в том случае, если числовая апертура конденсора равна им по величине или больше. Такие конденсоры также обычно бывают ахроматическими или апланатическими, соответствуя в этом отношении описанным выше объективам. Здесь следует вспомнить о роли показателя преломления в выражении для числовой апертуры: разрешающая способность объективов с большой числовой апертурой реализуется только тогда, когда среда, через которую проходит свет после его поступления в конденсор и прохождения через объект и систему линз объектива, является однородной и стеклоподобной на всем пути. Иными словами, высокое разрешение получают тогда, когда иммерсионное масло находится между конденсором и предметным стеклом, а не только между покровным стеклом и линзой объектива.

Если в исследовательском микроскопе все налажено: окуляр, объективы, конденсор соответствующего качества, зеркало с передней отражающей поверхностью, на которое от яркого однородного источника поступает свет, прошедший через зеленый светофильтр, — он готов к работе. Чтобы проявились все его достоинства, необходима только хорошая подготовка препарата.

1.3.1. Освещение по Кёлеру

Для иммерсионного объектива освещение по Кёлеру (почти оптимальное освещение) достигается следующим образом:

1. Фокусирование изображения нити лампы осуществляют с помощью белого листка, помещаемого на зеркале под конденсором. При этом лампу располагают так, чтобы изображение нити (предпочтительно ленточной) целиком заполняло отверстие конденсора; это можно увидеть, убрав листок с зеркала.

2. Для визуальных наблюдений на пути света устанавливают соответствующие светофильтры. Полностью открывают все диафрагмы. Если используется лампа со спиральной нитью, то вблизи конденсора (разд. 1.1) помещают матовое стекло.

3. На конденсор наносят масло (одну каплю масла с высокой вязкостью) и поднимают его до соприкосновения с такой же каплей, нанесенной на предметное стекло (разд. 1.5).

4. При снятом окуляре приблизительно центрируют освещение глядя на заднюю линзу объектива с маленьким увеличением, в фокусе которого находится препарат. При этом регулируют положение зеркала и конденсора на максимальное центрирование и равномерное освещение. Пузырьки воздуха в масле и другие помехи общего характера легко выявляются в этих условиях и должны быть по возможности устранены (разд. 1.1).

5. Вставляют окуляр и просматривают препарат в целом, чтобы найти интересные области.

6. На покровное стекло наносят масло (разд. 1.5), меняют объектив на иммерсионный и устанавливают фокус.

7. Делают отверстие диафрагмы лампы минимальным и фокусируют его край конденсором в плоскости препарата (при этом в фокусе находятся и объектив, и конденсор). Вновь регулируют отверстие диафрагмы лампы так, чтобы ее край совпадал с краем поля зрения.

Замечание. Если по краям диафрагмы лампы образуется неравномерная цветная бахрома, то конденсор требует центровки. Для этого поворотом двух его регулировочных ручек следует смещать конденсор в ту сторону, где бахрома окрашена в *красный* цвет, центрируя апертуру зеркалом по мере движения. Смещение прекращают, когда цвета бахромы распределяются симметрично.

8. Удалив окуляр (увеличение которого должно быть не меньше 12X или 15X) и глядя вниз через тубус, уменьшают апертурную диафрагму конденсора, чтобы устранить блики и отражения. Уменьшение не должно составлять больше $\frac{1}{10}$ диаметра задней линзы объектива; чрезмерное уменьшение снижает разрешающую способность.

9. Вставляют окуляр и устанавливают соответствующие светофильтры для визуальных наблюдений или фотографирования.

10. Те же принципы применяются и к безымерсионным объективам, но в этом случае нет необходимости наносить иммерсионное масло на конденсор, если качество последнего удовлетворительное.

1.4. ЛЮМИНЕСЦЕНТНАЯ МИКРОСКОПИЯ

В люминесцентном микроскопе к оптике предъявляются те же требования, которые были описаны выше в случае обычного исследовательского микроскопа. Различия в эксплуатации и конструкции относятся к генерированию и передаче света с длинами волн, пригодными для возбуждения флуоресцирующих красителей (флуорохромов) или естественной флуоресценции в объекте, а также к детектированию света для тех длин волн, которые возникли в объекте в результате флуоресценции. Поскольку для возбуждения нужны, как правило, малые длины волн в области, близкой к ультрафиолетовой, лампа (обычно ртутная дуговая лампа высокого давления), линзы конденсора и любые другие линзы на пути от лампы к объекту должны быть изготовлены из материала (обычно флюорит), хорошо пропускающего свет таких длин волн. Существенным моментом является использование зеркала с передней отражающей поверхностью (без стеклянного слоя). Иммерсионное масло для объектива и конденсора не должно флуоресцировать (например, специальное синтетическое масло или масло сандалового дерева).

Самое главное для микроскописта — правильно расположить светофильтры на пути света. В приборах разных фирм-изготовителей светофильтры расположены по-разному, однако для них существуют следующие общие принципы:

1. Между объективом и окуляром должен находиться *запирающий светофильтр*, отсекающий ультрафиолет. Этот светофильтр защищает глаза от вредного воздействия ультрафиолета.

2. Между лампой и объектом должны располагаться возбуждающие и задерживающий светофильтры. *Воз-*

буждающие светофильтры представляют собой интерференционные фильтры с узкой областью пропускания (например, 365 нм), соответствующей используемому флуорохрому. Они непрозрачны для большей части видимого света, и поэтому фон, видимый глазом при просмотре препарата, получается черным или темно-синим. *Задерживающий светофильтр* отсекает ультрафиолет, но пропускает видимый свет, что необходимо для выбора поля зрения и предварительной фокусировки при обычном освещении.

Системы освещения могут быть разных типов: 1) с передачей света через конденсор, находящийся под предметным столиком, 2) темнопольное освещение с использованием специального конденсора и 3) верхнее освещение через объектив. Системы второго и третьего типа обладают преимуществами эффективной темнопольной системы, поскольку возбуждающий пучок не дает избыточного постороннего света для глаза и не мешает выявлению более слабого флуоресцентного света от образца. В системе третьего типа конденсором служит объектив, вследствие чего отпадает проблема центрирования. Одновременно при этом сводятся к минимуму потери слабого излучения флуоресценции, обусловленные поглощением в толще образца. Возбуждающий пучок отражается вниз по направлению к объективу с помощью светоделительного зеркала, которое находится в боковом окне тубуса микроскопа. Это зеркало отражает свет с возбуждающими длинами волн, но пропускает видимый свет, функционируя, таким образом, в качестве барьерного светофильтра.

Клетки или другой исследуемый материал реагируют с флуорохромами (например, с ксантиновыми, акридиновыми, хинолиновыми производными и т. д.) как с красителями, а также с веществами, которые высвобождают флуорохромы (например, флуоресцеин). Это позволяет проводить локализацию и распознавание антигена. О том, как обращаться с микроскопом и светофильтрами, а также о необходимых предосторожностях лучше всего узнать у человека, имеющего опыт работы с микроскопом, или прочитать в руководствах, выпускаемых изготовителями. Получаемые результаты можно фиксировать на пленке, цветной или черно-белой.

В связи с тем, что: 1) выход флуоресценции мал (меньше 1:100), 2) флуоресцирующая часть образца незначительна (в большинстве случаев) и 3) для большинства флуорохромов характерна тенденция флуоресценции к затуханию со временем, интенсивность флуоресценции, как правило, низка и поэтому мы рекомендуем следующее:

1. Работать в темноте или в хорошо зашторенной комнате.

2. Не применять линз и светофильтров, в которых нет необходимости (не нужно и матовое стекло у осветителя), и укорачивать световые пути настолько, насколько позволяет система.

3. В случае вспомогательных линз проверять, в каком положении они дают наибольшее количество света. Полностью открывать конденсорную (апертурную) диафрагму.

4. Использовать окуляры малого увеличения ($8\times$), поскольку интенсивность воспринимаемого флуоресцентного света находится в обратной экспоненциальной зависимости от общего увеличения.

5. Для фотографирования использовать высокочувствительные пленки.

6. Если имеется возможность, пользоваться верхним, а не нижним освещением.

1.5. ИММЕРСИОННЫЕ МАСЛА

Иммерсионные масла предназначены для использования с иммерсионными объективами, благодаря чему передней линзе объектива обеспечивается среда с необходимыми преломляющими свойствами. Их показатель преломления близок к показателю преломления стекла, поэтому масло и стекло составляют однородную систему. Иммерсионные масла «проясняют» также высушенный на стекле бактериологический препарат благодаря тому, что они проникают в окрашенные клетки и покрывают их.

Имеющиеся в продаже масла, рекомендованные изготовителями микроскопов, проверены и с гарантией не оказывают кислотного или растворяющего воздействия на линзы или их крепления; заменители не рекомен-

дуются, их использование может привести к ложной экономии. Выбор масла зависит от конкретных требований. Может, например, потребоваться особо вязкое масло, если нужно, чтобы оно заполняло очень широкие промежутки или не вытекало при работе с горизонтальным или обращенным микроскопом, а для люминесцентной микроскопии особенно важно, чтобы масло возможно меньше флуоресцировало. Для общих целей предпочитают масло с высокой вязкостью (мы используем масло типа В с вязкостью 1250 сП фирмы Cargille Laboratories Inc., Cedar Grove, NJ 07009), которое почти не стекает и не растекается. Единственная трудность, порождаемая высокой вязкостью, заключается в более длительном удержании маслом пузырьков воздуха, но этого можно избежать.

Иммерсионные объективы следует всегда протирать после использования или по крайней мере в конце рабочего дня. Современные неокисляющиеся масла доставляют меньше забот, чем традиционное кедровое масло (которое затвердевает и оставляет неприятные следы), но и они все же претерпевают медленные изменения; к тому же они могут затечь куда не следует.

Предупреждение. Масла безопасны в работе, но до 1972 г. в их состав часто входили производные полихлорированного дифенила, которые в настоящее время признаны канцерогенными и токсичными; поэтому просмотрите старые пузырьки!

Никогда не берите масла больше, чем нужно (обычно хватает одной капли). Хороший пузырек для масла помогает уменьшить беспорядок в работе. Используйте либо сжимаемый пузырек, либо стеклянный пузырек с широким основанием и приспособлением для нанесения масла (стеклянная палочка или проволоочная петля), которое прикреплено к крышке пузырька. Среди лучших вариантов укажем двухкамерный пузырек, в котором крышка превращена в емкость для масла, а внизу содержится ксилол для протирки.

Приведение в контакт конденсора с нанесенным на него маслом и предметного стекла может быть самой трудной операцией для тех, у кого не очень хорошие руки. Масло должно обладать высокой вязкостью, и при работе с ним необходимо соблюдать некоторые предо-

сторожности как при установке, так и при удалении препарата. Лучше всего действовать так:

1. Нанести каплю масла на верхнюю линзу конденсора, после чего опустить конденсор ниже уровня предметного столика. При нанесении капли следить за тем, чтобы в масло не попадали пузырьки воздуха.

2. Нанести каплю масла на нижнюю сторону предметного стекла под тем местом, которое вы хотите посмотреть.

3. Опустить предметное стекло на предметный столик микроскопа так, чтобы капля оказалась в центре отверстия, и придерживать предметное стекло, подгоняя препаратодоводитель или зажимы, которые должны его фиксировать.

4. Поднять конденсор так, чтобы обе капли встретились и чтобы его верхняя линза была полностью покрыта маслом.

5. Установив нужный объектив на фокус, настроить конденсор, чтобы получить освещение по Кёлеру (разд. 1.3.1).

6. При разборке системы, прежде чем убрать предметное стекло с образцом, следует опустить конденсор. В результате активных боковых перемещений масло может затечь под предметный столик. Об этом нужно помнить и каждый раз проверять, протирая после работы специальной бумагой верхнюю линзу.

7. Для нанесения иммерсии годятся только конденсоры с несъемной или навинчивающейся верхней частью. Наносить масло на подвижную верхнюю часть некоторых «универсальных» конденсоров (т. е. часть, которую с помощью рычажка отводят в сторону при работе с низким увеличением) нужно в высшей степени осторожно или не наносить его совсем.

1.6. УХОД ЗА МИКРОСКОПОМ

Микроскопы отличаются прочностью и долговечностью. При надлежащем уходе и некоторой защите (особенно от неблагоприятного воздействия содержащего кислоты воздуха некоторых лабораторий) они прослужат положенный им срок или даже больше. Однако

для этого необходимо выполнять следующие правила по уходу за микроскопом.

1. Защищать микроскоп от попадания песка и пыли. Следует закрывать микроскоп, когда он не используется; лучше всего использовать жесткий прозрачный стеклянный или пластмассовый колпак, вмещающий в себя микроскоп и его принадлежности. Не допускать скопления пыли, которая может проникнуть в линзы и механические части микроскопа.

2. Чистить и смазывать движущиеся части, особенно реечный механизм и шестерни (подойдет смазка для шестерен игрушечных поездов, имеющихся в соответствующих магазинах) следует по возможности реже. Не следует использовать для несущих поверхностей и зубчатых колес в качестве смазки жидкое масло, так как в этом случае тубус или конденсор могут опускаться под собственным весом.

3. Регулярно чистить предметный столик, вытирать любой пролитый на него материал.

4. Держать линзы чистыми, особенно тщательно очищать их после работы с иммерсионным маслом. Никогда не пускать в ход пальцы вместо специальной протирочной ткани для линз (см. ниже).

5. Не пытаться ремонтировать линзы объективов или сложные механизмы с точной настройкой. Лучше предоставить делать это специалистам. Хорошему микроскопу профессиональная чистка и настройка нужна раз в 20 лет или около этого. Те, кто имеет дело с микроскопами, обычно связаны с ремонтными мастерскими или могут порекомендовать их.

6. Тубус все время должен быть закрыт окуляром, а в объективные гнезда должны быть вставлены объективы или заглушки, чтобы по возможности не допускать попадания пыли в тубус.

Старые, заслуженные микроскопы можно почистить, отремонтировать, если в этом есть необходимость, и снова дать им возможность хорошо служить. Старые латунные корпуса (как они элегантны!) можно протереть сначала тряпочкой, слегка смоченной в масле, а затем сухой. Современную отделку достаточно протирать влажной тряпочкой.

Оптические поверхности требуют специального ухода. В связи с этим должны выполняться некоторые общие правила.

1. Необходимо иметь достаточный запас ткани для линз («линзовой бумаги»), мягкую щетку (кисточка размером 0,6 см, для акварельных красок), резиновую грушу (с прикрепленной к ней короткой тонкой резиновой трубкой). Все эти предметы должны находиться вблизи того места, где вы занимаетесь микроскопией. Следует содержать эти предметы в чистоте, лучше всего в коробке с крышкой.

2. Непроставшую пыль легко удалить, смахнув ее кисточкой, сдувая резиновой грушей или протирая тканью оптическую поверхность, на которую лучше предварительно подышать.

3. Следы от пальцев или другой приставший маслянистый материал и грязь можно вытереть тканью для линз, обернув ее вокруг пальца и слегка увлажнив ксилолом или бензолом. Нельзя заливать линзы растворителями и использовать спирт, эфир или ацетон. Это опасно тем, что последние могут проникнуть в клей между линзами. Если у линзы есть выступающая оправа, края линзы можно очистить линзовой бумагой, наведенной на палочку.

4. Если ксилол не удаляет грязь, стоит попробовать смочить бумагу дистиллированной водой.

5. Масло, жидкое и застывшее, эффективно удаляется только что отломленным кусочком пенопласта (распространенный упаковочный материал), если прижать его к передней линзе объектива и производить вращательные движения (способ Пабста, цитируемый Джеймсом [7]). Такая легкость удаления масла обусловлена липофильными свойствами пенопласта. Поскольку ксилол растворяет пенопласт, их нельзя использовать совместно.

6. Обычно масло с линз объектива и конденсора удаляют линзовой бумагой (большую его часть), а остатки его окончательно снимают бумагой, увлажненной ксилолом.

7. Никогда не следует разбирать объектив, чтобы почистить составляющие его элементы, так как расстояния между линзами играют очень существенную роль.

Пыль с задней линзы выдувают или снимают очень чистой кисточкой.

8. Постоянно существующая проблема — это пыль на окулярах, которая дает темные пятна, движущиеся по кругу, когда вы вращаете окуляр. Окуляры устроены довольно просто (верхняя и нижняя линзы с распорной вставкой и диафрагмой между ними), и обе их линзы легко вывинтить. Если при очистке наружных верхней и нижней поверхностей пятна не исчезают, по-видимому, их дают частицы на внутренних поверхностях. Следует обратить особое внимание на поверхности просветленных линз (имеющие антиотражательное покрытие, перебивающееся цветами радуги) и с осторожностью применять щеточку или ткань при их очистке.

9. *Нельзя касаться пальцами оптических поверхностей!*

10. Чистые линзы значительно улучшают качество изображения.

1.7. НЕИСПРАВНОСТИ

Перечень неисправностей, их причин и способов устранения, приведенный в табл. 1.1, взят из превосходной книги Джеймса [7]. Если все это не подходит к тому, с чем вы столкнулись, нужно обратиться к книгам или к опытному микроскописту (или лаборанту), обслуживающему микроскопы, и выяснить природу неполадки — механической, оптической или кроющейся в исследуемом образце. Если дело в оптике, проверьте ее по порядку вдоль светового пути, начав с лампы и затем переходя к конденсору, образцу, объективу и окуляру. Регулировкой на каждом из этих этапов определите ее влияние на исправность; в этом вам поможет табл. 1.1.

1.8. ОПТИМАЛЬНЫЕ УСЛОВИЯ РАБОТЫ

Долгие часы сидения перед микроскопом сильно утомляют исследователя, если он не нашел для работы удобную и прямую позу. Если стол и стул не соответствуют друг другу по высоте, то работающий или сутулится, или слишком вытягивается. При такой ситуации не помогут никакие наклонные тубусы с окулярами. Си-

1. СВЕТОВАЯ МИКРОСКОПИЯ

Таблица 1.1. Распространенные неисправности, встречающиеся в световой микроскопии, их причины и способы устранения [7]

Неисправность	Возможные причины	Способы устранения
Макровинт ходит слишком тяжело	Неправильная регулировка хода	Для многих видов штативов регулировка осуществляется легко (обычно перемещением двух регулировочных головок в противоположных направлениях)
	Загрязнение реечного механизма	Почистить и нанести новую смазку
Тубус или предметный столик самопроизвольно опускаются под собственным весом (изображение расфокусируется)	Неправильно отрегулирована зубчатая передача и (или) слишком жидкая смазка	То же
	Неисправная система наводки на фокус	Действовать, как в случае первой неисправности
Микровинт не движется в одну из сторон	Микровинт находится в крайнем положении	Установить при помощи револьверной насадки объектив 10×; поместить микровинт в среднее положение и вновь вывести объект в фокус с помощью макровинта
Расфокусировка в результате незначительного движения микровинта (особенно при работе с иммерсионными объективами)	Объективы плохо винчены в револьверную насадку К объективу пристало липкое из-за нанесенного на него масла покровное стекло	Способ устранения очевиден Применять менее вязкое иммерсионное масло; прочнее прижимать образец

Неисправность	Возможные причины	Способы устранения
Неясное пятнистое изображение	Грязь или смазка на <i>окуляре</i> (пятна движутся при вращении окуляра в тубусе) или <i>объективе</i> ; загрязнение <i>покрывного стекла</i> (пятна движутся при смещении образца) или любой поверхности в системе освещения	Очистить соответствующие поверхности
Четко сфокусированные пятна или точки, смещающиеся и исчезающие при перемещении конденсора вверх и вниз	Загрязнение источника света или рассеивающего экрана перед ним, если условия освещения критические, загрязнение крышки встроенного осветителя или прилежащего к нему светофильтра при освещении по Кёлеру	См. выше; при невозможности достичь загрязненной поверхности с целью ее очистки слегка изменить фокусировку конденсора
Неясное изображение, которое нельзя хорошо сфокусировать	Не та среда перед объективом (масло вместо воздуха, воздух вместо масла, пузырьки воздуха в масле); загрязнение передней линзы объектива, через которую проходит свет Слишком толстое покрывное стекло, чрезмерно толстый слой среды, в которую заключен препарат	Заменить среду; удалить загрязнение Применить объектив с корректирующей втулкой или (что лучше) иммерсионный объектив

Неисправность	Возможные причины	Способы устранения
Поле зрения освещено не полностью	Неравномерно расположенные остатки иммерсионного масла на покровном стекле, если используется безымерсионный объектив с большим увеличением	Очистить сухой тканью или бумагой; избегать кислоты, так как он может размягчить или растворить среду, в которую заключен препарат
	Предметное стекло на предметном столике перевернуто препаратом вниз (только в случае объективов с большим увеличением)	Перевернуть предметное стекло; убедиться в том, что метка с обозначением препарата не наклеена на противоположную сторону
	Световой путь частично заслонен держателем светового фильтра Объектив не зафиксирован в нужном положении Конденсор (или регулируемые линзы) не находится на оптической оси	Способ устранения очевиден
Поле зрения освещено неравномерно	Неправильно расположено зеркало Не отцентрирован конденсор (при критических условиях освещения)	Слегка подвигать конденсор вверх и вниз; поставить перед источником света матовое стекло
	Неоднородность источника света и (или) рассеивающего экрана при критических условиях освещения	

Продолжение табл. 1.1

Неисправность	Возможные причины	Способы устранения
Через поле зрения проплывает мутное пятно; после этого пропадает фокус изображения (при работе с масляной иммерсией)	Пузырек воздуха в иммерсионном масле; масло в плоскости изображения при работе с безымерсионным объективом	Убрать масло с объекта и нанести новое, тщательно очистить препарат и объектив
Четко очерченные яркие пятна в изображении	Поперечные отражения внутри микроскопа (часто серповидные или кольцевидные) Продольные отражения в тубусе, приводящие к появлению пятен света более округлой формы	Попробовать другой окуляр, правильно установить освещение по Кёлеру Применить просветленные линзы, сменить пару объектив — окуляр
Нерезкие яркие пятна в изображении	Загрязнение поверхности линз, расположенных выше или ниже объекта, или воздух в иммерсионном масле на конденсоре (различайте эти случаи, пользуясь приведенными выше разъяснениями)	Если не удастся установить, где находится загрязнение, нежелательный эффект можно сгладить, открыв по больше диафрагму конденсора

денья должны регулироваться по высоте (включая табуреты в учебных лабораториях). Если работающий отличается высоким ростом, то можно выпилить деревянный брусок определенной высоты и подложить его под микроскоп на стол; в этих условиях его тело будет иметь прямое положение. Главная цель этих подгонок состоит в том, чтобы тот, кто работает с микроскопом, мог смотреть в тубус, минимально изгибая шею или спину. При удобном положении напряжение и неприятные физические ощущения, которые могут возникнуть, сведены к минимуму.

1.9. ФОТОГРАФИРОВАНИЕ С ПОМОЩЬЮ МИКРОСКОПА

Возможность точного фиксирования результатов на пленку имеется при всех видах микроскопии независимо от длины волны используемого света. Прежде всего важно выполнять технические требования, благодаря чему возможна наиболее точная регистрация изображений. В целях контроля можно рассмотреть каждую деталь снимаемого изображения, за исключением случая, когда используются совершенно необычные длины волн. Имеются превосходные книги, в которых подробно описываются и разъясняются эти требования [3, 5, 7, 9].

К наиболее общеупотребительным относятся три типа аппаратов:

1. Насадочная окулярная фотокамера с рулоном пленки (обычно 35 мм). Над окуляром в такой камере обычно располагается светоделительное устройство, позволяющее видеть изображение, чтобы его можно было сфокусировать, через боковой окуляр. Все дополнительные детали помещаются на тубусе микроскопа.

2. Встроенные фотокамеры, разработанные рядом фирм, изготавливающих микроскопы. Эти фотокамеры имеют экспонометры и устройства для задания выдержки. Обычно они отвечают поставленным целям; к ним прилагаются описания с правилами пользования.

3. Аппараты старого типа с гофрированными светонепроницаемыми мехами (используются редко). Такой аппарат помещают на подставке рядом с микроскопом и подсоединяют основание мехов к световыводящему патрубку, в свою очередь соединяемому с верхней частью тубуса микроскопа. В верхней части аппарата устанавливается рамка, которая изготавливается либо под обычную пленку, либо под пленку типа Polaroid.

Успех при фотографировании с помощью микроскопа и получении в результате фотоотпечатков во всех случаях зависит от следующих факторов:

1. Качества препарата, надлежащим образом закрепленного и помещенного точно в фокусе.

2. Качества оптики, правильно настроенной и освещаемой (метод Кёлера следует предпочесть другим),

позволяющей получать наилучшее из возможных изображений, а также от подбора цветных светофильтров.

3. Соединения фотокамеры и микроскопа, при котором не должно быть вибраций.

4. Правильно подобранной пленки и фотобумаги, а также от их обработки, обеспечивающей оптимальный размер зерна при правильном контрасте и диапазоне плотности.

5. Правильно выбранного общего увеличения.

Как 1-й, так и 2-й пункты уже подробно обсуждались. В 3-м пункте существуют некоторые проблемы, поскольку при сочленении фотографических устройств с тубусами микроскопов образуются и передаются вибрации. Отчасти они возникают оттого, что нажим на спуск затвора сдвигает светоделитель, а затем приводит в действие сам затвор; эти движения порождают сохраняющиеся во времени вибрации. Затвор, задающий время экспозиции, лучше всего расположить между лампой и микроскопом. Вибрация не имеет значения при использовании фотокамер, снабженных мехами, которые создают своего рода световой манжет вокруг окуляра, позволяющий камере и микроскопу быть независимыми и не касаться друг друга. Все же вибрации следует сводить к минимуму, чему помогает прочный, массивный, не касающийся стены стол.

Пленка должна быть панхроматической с чувствительностью 60—100 ед. ASA (чтобы экспозиции находились в хорошо контролируемых пределах), но при фазово-контрастной микроскопии гораздо лучше использовать пленку с большей чувствительностью (300—400 ед. ASA), поскольку уровень освещенности здесь значительно ниже. Экспонетр позволяет воспроизводить выдержки, установленные в контрольном опыте.

Если в вашем отделе или лаборатории собрались выкинуть старый фотоаппарат с мехами, приберегите его, потому что это самый лучший аппарат, позволяющий проводить работы высочайшего качества, пусть и не самый удобный.

Прежде чем печатать микрофотографии, вы должны подумать об общем увеличении и о том, какую деталь вы хотите показать. При обработке пленки следует при-

держиваться инструкций изготовителя, это гарантирует получение хорошего контраста. Зерно на проявленной пленке не позволяет печатать снимки с увеличением больше чем в 2—2,5 раза. В благоприятных условиях при микроскопии обычных бактерий, как правило, получают общее увеличение 1500, что необходимо для выявления тонкой детальной структуры. Поэтому изображения большего размера, получаемые на куске пленки в камере старого образца, для которой при печати обычно достаточно увеличение в 1,25—1,5 раза, лучше, чем значительно более мелкие изображения на 35-миллиметровой пленке. Если полученные микрофотографии по резкости и качеству изображения уступают картине, наблюдаемой в микроскоп, попытайтесь все повторить. Независимо от используемой камеры важна точность фокусировки. При использовании аппарата с мехами удобен такой прием: помещают на место фотопленки (или фотопластинки) плоскую стеклянную пластинку с меткой, нанесенной на ее нижнюю сторону; на эту метку наводят зрительную трубу, глядя в которую, затем регулируют фокусировку всей системы. При желании можно использовать также традиционные матовое стекло и черную накидку.

Фотографии следует увеличивать до формата, позволяющего легко различать важные детали; объект при этом должен занимать большую часть фотографии.

1.10. ИСТОЧНИКИ ИНФОРМАЦИИ

Книги по световой микроскопии и фотографии в микроскопии легко доступны — от энциклопедий до брошюр в бумажной обложке. Однако в книгах можно найти лишь основные принципы *микроскопирования*. Научиться удовлетворительно работать с микроскопом можно только под чьим-то непосредственным руководством, приобретая практический навык, немалую часть которого составляет искусство приготовления хороших препаратов. Микроскопии бактерий посвящено множество различных книг, но ее принципы универсальны. В приводимом ниже перечне (1—10) представлены различные типы опубликованных по данному вопросу работ.

1.11 ЛИТЕРАТУРА

1. Anonymous. *Photography through the microscope*. Eastman Kodak Co., Rochester, N. Y.
Это пример брошюр, которые выпускаются фирмами-изготовителями, связанными какими-то сторонами своей деятельности с микроскопией. Последние их варианты можно получить у подобных этой фирм или их агентов. По большей части это превосходные издания.
2. *Barer R.* *Lecture notes on the use of the microscope*. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1968).
Советы опытного микроскописта.
3. *Bradbury S.* *The optical microscope in biology*. Edward Arnold, London (1976).
Это маленькая брошюра, в которой ясно изложен материал по разрешающей способности микроскопов и современным видам микроскопии.
4. *Cargille J. J.* *Immersion oil and the microscope*. Technical Reprint 10—1051. R. P. Cargille Laboratories, Cedar Grove, N. J. (1975).
Другая брошюра, выпущенная фирмой-изготовителем. Комментарии см. выше [1].
5. *Culling C. F. A.* *Modern microscopy — elementary theory and practice*. Butterworths and Co., London (1974).
Комментарии см. выше [3].
6. *Engle C. E. (ed.)*. *Photography for the scientist*. Academic Press, Inc., New York (1968).
Общие вопросы научной фотографии, включая микрофотографию.
7. *James J.* *Light microscopic techniques in biology and medicine*. Martinus Nijhoff Medical Division, Amsterdam (1976).
Прекрасная современная книга, в которой освещена теория и практика с упором на последнюю. В ней даются советы по специальным и усовершенствованным методикам и их применению, включая фазово-контрастную, интерференционную, темнопольную, поляризационную и люминесцентную микроскопию.
8. *Möllring F. K.* *Microscopy from the very beginning*. Carl Zeiss, Oberkochen, Federal Republic of Germany.
Еще одна брошюра, выпущенная фирмой-изготовителем. Комментарии см. выше [1].
9. *Shillaber C. P.* *Photomicrography in theory and practice*. John Wiley and Sons, Inc., New York (1944).
Ничто, по-видимому, не заменит этого классического произведения, в котором досконально и в то же время доступным языком разбираются свойства линз в объективах, свойства окуляров и конденсоров. В нем подробно изложены приемы хорошего освещения, взвешены преимущества различных иммерсионных сред, разбираются практические и теоретические вопросы микроскопии.
10. *Slayter E. M.* *Optical methods in biology*. John Wiley and Sons, Inc., New York (1970).
Эта книга — источник теоретических основ большинства видов микроскопии и введение в аналитические процессы, включая дифракцию, спектроскопию и сопряженные оптические методы. В ней освещаются принципы, но нет практических рекомендаций.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ СВЕТОВОЙ МИКРОСКОПИИ

Р. Мюррэй, К. Робиноу

Развитие методов электронной микроскопии ослабило стремление исследователей получить как можно больше информации цитологического характера методами световой микроскопии. Тем не менее эти методы еще очень полезны для общего изучения бактерий и заполнения пробелов на уровне распознавания клеточных компонентов между живой клеткой, с одной стороны, и изображением, которое дает электронный микроскоп, — с другой. Приготовить образцы для световой микроскопии нетрудно, а получаемые с ее помощью результаты очень ценны как с эстетической, так и с научной точки зрения.

В ряде мест этой главы упоминаются или подразумеваются следующие полезные предметы.

1. Пинцет с плоскими незазубренными захватывающими поверхностями, изогнутыми под углом 30° , удобный для вынимания покровных стекол; изогнутый заостренный ювелирный пинцет с незазубренными кончиками также хорош для этой цели.

2. Нож для нарезания агаровых блоков. Для этой цели годны все виды инструментов, но обычные ножи или скальпели портятся при стерилизации в пламени. Поэтому лучше всего пользоваться нихромовой проволокой, конец которой, обработанный на наковальне, имеет узкую листовидную форму. Отрезанный довольно короткий кусок этой проволоки закрепляют в держателе петли и стерилизуют в пламени.

3. Колумбийские кюветы для окрашивания. Они облегчают работу с препаратами, нанесенными на покровные стекла, при их хранении, отмывке и окрашивании. Кюветы сделаны с таким расчетом, чтобы вмещать квадратные покровные стекла со стороной 22 мм (A. H. Thomas Co., Philadelphia, Pa.).

2.1 ЖИВЫЕ КУЛЬТУРЫ

При микроскопии препаратов живых культур используют очень полезный информативный метод типа «висячая капля». Так называется препарат, когда капля с культурой свисает с покровного стекла в лунку, сделанную в толстой пластинке из прозрачной пластмассы (разд. 3.2.3). При этом бактерии находятся в ростовой среде, располагаясь в плоскости, прилежащей к покровному стеклу. Поскольку обычно их берут из колонии в виде отдельных клеток, естественное взаиморасположение клеток не сохраняется, а из-за толщины подвешенного материала и возникающих оптических трудностей разрешение невелико. Несмотря на эти ограничения, данный метод можно использовать для прослеживания действия токсичных химических агентов и антибиотиков на рост клеток и их форму. Если необходимы длительные наблюдения в более оптимальных для микроскопии условиях, исследуют культуры, находящиеся на предметном стекле, а не препараты типа «висячая капля»; при этом их можно сделать достаточно тонкими и эффективно изучать, используя соответствующую оптику. Лучше всего применять фазово-контрастную микроскопию, но в большинстве случаев анализ можно проводить и с помощью обычной оптики.

2.1.1. Агаровая пластинка

Для приготовления агаровых пластинок рекомендуется следующая методика. Чистые стерильные предметные стекла дважды (или большее число раз) погружают в расплавленный агар соответствующего состава, который находится в чашке Петри. С нижней стороны стекол агар вытирают увлажненной тканью. Используя бинокулярную лупу, бактерии вносят в выбранную на верхней стороне стекла область с помощью вытянутого из пастеровской пипетки стеклянного волокна или стеклянной палочки. Кончик волокна смачивают в водном растворе пептона, слегка прикасаются им к колонии или культуре нужной бактерии, переносят приставшие к кончику бактерии в каплю водного раствора пептона на свежей поверхности агара и распределяют каплю по по-

верхности. Обрезают агар вокруг выбранной области, кладут сверху покровное стекло и по его краям заливают воск. Если участок питательного агара меньше покровного стекла, то будет поступать воздух при минимальном высыхании. Соответствующие модификации и методические детали можно продумать и для анаэробов с целью получения информации о форме и размере их клеток, а также способе роста.

2.1.2. Желатино-агаровая пластинка

Изменения в деталях внутреннего строения становятся видимыми при фазово-контрастной микроскопии, если использовать твердую питательную агаровую среду с большим коэффициентом преломления [1]. Такую среду получают добавлением желатины до 14—18% [9]. Высокие концентрации подходят для грамположительных бактерий, в то время как для грамотрицательных бактерий могут понадобиться более низкие концентрации. Вместо желатины применяют также [11] поливинилпирролидон (до 30%). Этот методический прием позволил Мэйзону и Поуэлсону [3] проследить за процессом деления нуклеонидов в растущих бактериях и сделать фотографии на разных стадиях этого процесса.

При необходимости культуры на пластинках можно фиксировать для окрашивания и даже подготовить для электронной микроскопии; однако образцы с таким мало погруженным в среду материалом [2, 7], находящимся в одной плоскости, требуют значительного мастерства в обращении и получении срезов. Покровное стекло с приставшей к нему неповрежденной культурой и средой следует удалить с пластинки для фиксации и заливки в пластмассу. Легче всего удалить стекло с помощью полоски ленты MuLag или какой-нибудь липкой этикетки.

2.2. ФИКСИРОВАННЫЕ ПРЕПАРАТЫ

2.2.1. Фиксация по Боуэну

Препараты, в которых клетки по виду больше всего соответствуют живым, получают фиксацией *in situ*; при описании формы клеток и способов их роста наиболее полезны именно такие препараты. Их готовят следу-

щим образом. Бактерии выращивают на твердой среде в чашке Петри, внося в нее столько материала, чтобы через *несколько* клеточных делений образовался или сплошной монослой клеток, или еще не слившиеся микроколони, в которых клетки не нагромождены друг на друга. В процессе роста состояние клеток контролируют с помощью микроскопа при низком увеличении (с десятикратным объективом). Если для приготовления препаратов клетки нужно брать из жидкой среды, то переносят соответствующее количество суспензии на пластинку с хорошо подсушенной агаровой средой и дают жидкости впитаться в слой агара. Кусочки агара вырезают из той области, где наблюдается правильное распределение клеток. Лучше всего вырезать квадратный слой агара со стороной около 1 см и перевернуть его стороной с *микроорганизмами вниз* на покровное стекло размером 22×22 мм, не придавливая агар к стеклу и предотвращая скольжение. В этом случае клетки прилежат к стеклу, сохраняя свое взаимное расположение. Покровное стекло с лежащим на нем слоем агара осторожно опускают в чашку Петри, содержащую достаточное для покрывания агарового слоя количество фиксатора Боуэна.

Водонасыщенная пикриновая кислота	75 мл
Формалин	25 м
Ледяная уксусная кислота	5 м

Эти компоненты смешивают и хранят в закупоренном пузырьке. Растворимость пикриновой кислоты — 1,4 г/100 мл при 20 °С; в качестве исходного следует хранить водонасыщенный раствор и по мере надобности использовать его для приготовления фиксатора.

В одной чашке можно фиксировать несколько кусочков агара. Их оставляют на некоторое время в покое для полного проникновения фиксатора (минимум на 45 мин и максимум на 4 ч) и фиксации клеток на покровном стекле. Агар может отойти от стекла сам по себе или можно помочь ему отделиться, удерживая внизу покровное стекло пинцетом и приподнимая агар кончиком ножа резким движением; при этом следует избегать бокового смещения слоя вдоль стекла. Затем покровное стекло отмывают водой и кладут в 70%-ный этанол, где оно лежит до момента окрашивания.

2. ПРЕПАРАТЫ ДЛЯ СВЕТОВОЙ МИКРОСКОПИИ

Фиксированные по Боуэну препараты лучше всего окрашиваются разведенными растворами основных красителей. Подходят для этого 0,01%-ные растворы кристаллического фиолетового, тионина или метиленового синего, которыми прокрашивают в течение 1—5 мин. Точное время окрашивания определяют в предварительных экспериментах. Для окрашивания цитоплазматических включений могут применяться другие красители (разд. 3.3.11). Основные красители прокрашивают богатую рибосомами цитоплазму преимущественно в хорошо сохранившихся, фиксированных по Боуэну клетках; нуклеоплазма не окрашивается, она негативно выявляется точно так же, как и при фазово-контрастной микроскопии живых клеток. Описанный способ фиксации не годится для окраски нуклеоплазмы по Гимзе, даже после обработки рибонуклеазой или кислотного гидролиза.

Клеточные стенки не прокрашиваются (наиболее убедительно это продемонстрировано на образующих нити представителях рода *Bacillus*), но их можно эффективно выявить обработкой фиксированных по Боуэну клеток 5%-ной (вес/объем, в воде) дубильной кислотой в течение 20 мин с последующей промывкой и окраской 0,01%-ным кристаллическим фиолетовым, достаточной по времени для интенсивного прокрашивания стенок. Предварительная обработка насыщенным раствором хлористой ртути в течение 5 мин также позволяет окрасить клеточную стенку основными красителями, такими, как кристаллический фиолетовый, тионин, виктория синяя [10]. Однако абсолютно надежного метода нет, причем наибольшие трудности возникают с грамотрицательными бактериями.

Заключают препарат в воду или разбавленный краситель (последний полезен, если интенсивность окрашивания недостаточна для фотографирования), аккуратно промокают его, чтобы удалить избыток воды сверху и по краям покровного стекла, и заливают по краю покровного стекла воск, васпар или лак для ногтей. Из препарата можно удалить воду и сделать его постоянным, применив заливку смолой, но результат при этом не всегда удовлетворяет исследователя. Лучший способ сделать препарат вечным — сфотографировать его, а для этого описанный прием идеален.

Некоторые клетки не пристают хорошо к стеклу после фиксации через слой агара или применения метода пленочного прилипания (см. ниже). Эту трудность можно частично преодолеть, если предварительно покрыть поверхность покровного стекла тонкой пленкой сывороточного или яичного альбумина и дать ей высохнуть. Образующаяся пленка может дать в готовом препарате слабоокрашенный фон, но в целом результат получается очень неплохой. Положительно заряженная пленка из полилизина может оказаться еще более эффективной, чем две вышеупомянутые [4].

2.2.2. Фиксация парами

Клетки, распределенные по поверхности агаровых слоев, независимо от того, были они там выращены или перенесены из другой среды, удобно фиксировать для световой микроскопии парами четырехокси осмия или альдегидов, таких, как формальдегид или глутаральдегид. Правда, при этом способе не подавляются все ферменты, и поэтому он не всегда годится для фиксации в цитохимических исследованиях. Ниже мы подробно опишем метод фиксации OsO_4 , поскольку это один из самых распространенных и полезных методов. Для него характерны следующие этапы.

1. Приготавливают 1%-ный или 2%-ный раствор четырехокси осмия (вес/объем) в дистиллированной воде. Кристаллический реактив OsO_4 определенного веса поставляется в запаянной ампуле. Ампулу разбивают и вносят ее содержимое в соответствующий объем воды. Кристаллы растворяются медленно, поэтому приготовление нужно начинать за 1 или 2 дня до использования.

Предупреждение. OsO_4 — раздражающий агент, его пары опасны для глаз и слизистых оболочек, поэтому с ним необходимо работать под тягой. Хранят реактив в холодном темном месте и желательно в темных склянках, чтобы предотвратить образование черного неактивного продукта.

2. Кусочки агара на предметном стекле с клетками наверху помещают в закрытую кювету с несколькими миллилитрами раствора OsO_4 . В качестве опоры для стекол используют стеклянные шарики, лежащие на дне

кюветы. Благодаря этому предметные стекла с агаром находятся над раствором фиксатора.

3. В течение 1,5—2 мин парам дают возможность адсорбироваться.

4. Предметные стекла вынимают и накрывают слой агара покровным стеклом. Покровное стекло захватывают специально предназначенным для этого пинцетом и быстрым резким движением поднимают его вверх, отделяя от агара. Иногда поступают иначе: переворачивают кусочек агара на покровное стекло и резко сбрасывают его кончиком ножа, так чтобы некоторые клетки остались на стекле.

5. Немедленно опускают покровное стекло в колумбийскую кювету с 70%-ным этанолом, где его можно держать, пока все не будет готово для последующей окраски.

Методы окрашивания могут быть теми же, что и для препаратов, фиксированных по Боуэну. Как и в том случае, цитоплазма окрашивается основными красителями, такими, как тионин, а нуклеоплазма не окрашивается. Однако нуклеоплазма имеет вид более узких пятен, чем при фазово-контрастной микроскопии живых клеток. Фиксированные OsO_4 препараты пригодны для окрашивания нуклеоплазмы по Гимзе либо после гидролиза рибонуклеазой (100 мкг/мл в 1 мМ MgSO_4 в течение 30 мин), либо после гидролиза кислотой. Последний метод состоит из следующих стадий.

1. Покровное стекло с фиксированными клетками помещают на 6—8 мин в 1 н. HCl при 60°C.

2. Отмывают его в воде.

3. Окрашивают раствором Гимзы (10 капель краски на 10 мл 0,067 М фосфатного буфера, pH 6,6) в течение 10 мин (или более) в случае почти всех грамотрицательных бактерий.

4. Промывают буфером и смотрят в микроскоп, проверяя, нормальная ли получилась окраска. (На этом этапе хорошо помогает водоиммерсионный объектив, но он не обязателен.)

5. Закljučают препарат в воду или разведенный краситель. Последний вариант хорош для грамотрицательных бактерий, поскольку их цитоплазма может быть еле видна.

Нуклеоплазма окрашивается в сине-фиолетовый цвет, а цитоплазма — в розоватый. Первая стадия этого метода, безусловно, представляет собой основу для окраски по Фельгену, и нуклеоплазма, содержащая ДНК, после гидролиза окрашивается в красный цвет реактивом Шиффа [8].

Пленочные препараты, фиксированные таким способом, могут быть очень полезны при изучении изменений в клетках, подвергшихся множественной обработке в агаре или в жидкой культуре, например, во время фаговой инфекции [5]. Следует обратить внимание на то, что во время фиксации нуклеоплазма реагирует на наличие в среде катионов, избыток которых приводит к конденсации хроматина [6].

2.3. ЛИТЕРАТУРА

1. Barer R., Ross R. F. A., Tkczk S. Refractometry of living cells. *Nature* (London), 171, 720—724 (1953).
Основные положения, касающиеся показателя преломления в средах при фазово-контрастной микроскопии.
2. Girbardt M. Eine Zielschnittmethode für Pilzzellen. *Microscopie*, 20, 254—264 (1965).
Полезные советы по пленочному прилипанию культур на предметных стеклах.
3. Mason D. J., Powelson D. M. Nuclear division as observed in live bacteria by a new technique. *J. Bacteriol.*, 71, 474—479 (1956).
Описаны наблюдения последовательных этапов деления нуклеоидов бактерий, которые иллюстрируются фазово-контрастными микрофотографиями.
4. Mazia D., Schatten G., Sale W. Adhesion of cells to surfaces coated with polylysine. *J. Cell Biol.*, 66, 198—200 (1975).
5. Murray R. G. E., Whitfield J. F. Cytological effects of infection with T5 and some related phages. *J. Bacteriol.*, 65, 715—726 (1953).
Применение световой микроскопии в цитологии при изучении фаговых инфекций.
6. Murray R. G. E., Whitfield J. F. The effects of the ionic environment on the chromatin structures of bacteria. *Can. J. Microbiol.*, 2, 245—260 (1956).
Наблюдения, в которых уделено особое внимание действию катионов на нуклеоидную структуру.
7. Patton A. M., Marchant R. An ultrastructural study of septal development in hyphae of *Polyporus biennis*. *Arch. Microbiol.*, 118, 271—277 (1978).
Другой пример методики пленочного прилипания.
8. Piekarski G. Zytologische Untersuchungen an Bakterien mit Hilfe der Feulgenschen Nuclealreaktion. *Arch. Microbiol.*, 8, 428—439 (1937).

2. ПРЕПАРАТЫ ДЛЯ СВЕТОВОЙ МИКРОСКОПИИ

Применение реакции Фёльгена для четкого выявления очертаний бактериальных нуклеондов.

9. *Robinow C. F.* The preparation of yeasts for light microscopy. *Methods Cell Biol.*, 11, 1—22 (1975).
Практическая рекомендация по применению желатино-агаровых культур на стеклах.
10. *Robinow C. F., Murray R. G. E.* The differentiation of cell wall, cytoplasmic membrane and cytoplasm of gram-positive bacteria by selective staining. *Exp. Cell Res.*, 4. 390—407 (1953).
Выявление клеточных стенок методами окраски.
11. *Schaechter M., Williamson J. P., Hood J. R., Koch A. L.* Growth, cell and nuclear divisions in some bacteria. *J. Gen. Microbiol.*, 29, 421—434 (1962).
Описан способ увеличения показателя преломления среды для фазово-контрастной микроскопии.

МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ В СВЕТОВОЙ МИКРОСКОПИИ

Р. Дойч

Чтобы охарактеризовать ту или иную бактерию, обычно специфические морфологические детали выявляют с помощью световой микроскопии. Некоторые используемые при этом методы, возникшие еще на заре микробиологической науки, с честью выдержали испытание временем.

Эти классические методы дают самую ценную информацию. Однако важно понимать методологические ограничения, касающиеся деталей формы или структуры, поскольку при *любой* лабораторной процедуре препарат может подвергаться некоторым изменениям, правда в большинстве случаев незначительным. Как бы то ни было, данные, полученные при микроскопировании бактерий, необходимы, но обычно недостаточны для идентификации последних (гл. 20). Часто, однако, ошибки в идентификации происходят из-за неверных суждений о форме, результатах окраски по Граму или подвижности вновь выделенных форм.

3.1. ВЗЯТИЕ ПРОБ

Наблюдать живые бактерии непосредственно в их естественной среде обитания довольно трудно. К тому же получаемая при этом информация может быть очень неполной. Для этого имеется ряд причин:

1. Не в каждой среде обитания на единицу массы приходится большое количество бактерий. Например, чтобы получить достаточное для изучения количество морских или озерных микроорганизмов, их нужно, как правило, концентрировать пропусканием через целлюлозные или поликарбонатные фильтры или центрифугированием.

2. В некоторых средах содержится слишком много бактерий на единицу массы. Поразительное множество бактерий и других микроорганизмов попеременно с раз-

личными частицами обнаружено в отстое сточных вод или в фекалиях. В данном случае материал нужно разводить одним из многих имеющихся буферов с биполярными ионными свойствами. Некоторые почвы и морские отложения содержат очень мало бактерий, причем эти бактерии смешаны с большим количеством непрозрачного коллоидного вещества, которое с трудом можно отличить от бактерий.

3. Большинство бактерий, составляющих природную флору какой-либо среды, не имеют особых отличительных морфологических признаков. Исключения составляют, например, звездообразный *Prosthecomicrobium*, снабженный капсулой *Sphaerotilus* или трихомы рода *Caryophanon*.

Поскольку бактерии в водной суспензии имеют оптические свойства, сходные со свойствами воды, и их трудно наблюдать с помощью обычного микроскопа в проходящем свете, пробы лучше исследовать с использованием позитивного или негативного фазового контраста или с помощью темнопольной микроскопии. Если последние варианты недоступны, нужно опустить конденсор и уменьшить освещение, чтобы повысить контраст, даваемый обычным микроскопом.

При непосредственной работе с пробами, бактериологическими петлями, предметными стеклами с нанесенными на них капельками и покровными стеклами, а также во время приготовления препаратов в процессе работы с ними существует масса возможностей для бактериального загрязнения пальцев, рабочих поверхностей, одежды и оборудования. Важно соблюдать необходимые предосторожности, уделять внимание мелочам в работе и не забывать об источниках опасности, особенно работая с патогенными микроорганизмами. Помните, что даже фиксированные препараты организмов, содержащих эндоспоры, могут сохранить какой-то уровень жизнеспособности.

К инструментам для взятия бактериальных проб относятся большая петля (диаметром 3 мм), маленькая петля (диаметром 1 мм) и прямая игла для внесения. Они бывают разных типов — платиновые, никхромовые и т. п. (иглы предпочтительно иметь никхромовые); длина их должна быть такой, чтобы после насадки на стек-

лянную или алюминиевую ручку, ими можно было легко манипулировать при посеве в чашки, отборе материала колоний и внесении в пробирки со средами.

3.2. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ МИКРОСКОПИРОВАНИЯ

Для исследования живых бактериальных клеток разработан ряд методов. При микроскопировании можно использовать культуры, выращенные в жидких средах, однако для получения нужного числа бактерий они нуждаются, как правило, в разведении стерильной средой. Культуры, выращенные на твердых средах, можно суспендировать с помощью стерильной петли или иглы в капле стерильной жидкой среды или какого-нибудь раствора, *но не водопроводной воды*, до слабого помутнения (разд. 2.5.1). Следует помнить, что возраст культуры и физико-химические параметры среды могут быть причиной ненаследуемых (фенотипических) модификаций как внепротоплазматических компонентов (жгутики и капсулы), так и компонентов, находящихся внутри собственно клетки (различные включения); все эти компоненты являются важными признаками, по которым ведется идентификация. Вместе с тем специальные операции или пересевы, производимые в лаборатории, могут благоприятствовать развитию мутантов, имеющих наследственно измененные по сравнению с диким типом черты строения. Изменения могут быть стабильными и нестабильными, но очевидно, что при описании формы и структуры бактерий условия содержания культуры должны быть строго определенными, так как старение культуры и изменения состава среды могут быть причиной ряда морфологических изменений.

Специальные методы исследования растущих культур бактерий были описаны в гл. 2. Ниже мы приводим три метода, которые часто используются при исследовании живых клеток в целях идентификации.

3.2.1. Влажные препараты живых клеток

Для приготовления влажных препаратов одну каплю пробы (около 0,05—0,1 мл) помещают на *чистую* обезжиренную (предварительным нагревом в течение 20 мин

3. МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ В СВЕТОВОЙ МИКРОСКОПИИ

при 400 °С) поверхность предметного стекла (толщиной 0,8—1,0 мм) и накрывают ее покровным стеклом. Последнее имеет квадратную форму со стороной 22 мм, а толщина его составляет от 0,13 до 0,16 мм (номер 1 или 1½). Чтобы предотвратить конвекционные токи, смещение или высыхание, зазор между покровным и предметным стеклами герметично заливают васпаром (смесь равных объемов петролатума и парафинового воска), петролатумом, свечным воском (используя фитиль свечи в качестве кисточки для нанесения расплавленного воска в пламени вспомогательной горелки, но не самой свечи) или прозрачного лака для ногтей.

В течение короткого промежутка времени в этих препаратах можно наблюдать подвижность облигатных аэробных бактерий, однако, как только кислород истощится, бактерии прекращают движение. Если ввести в среду небольшие пузырьки воздуха, то их активность продлевается.

Для рассматривания влажных препаратов рекомендуется фазово-контрастная микроскопия, причем для получения наилучших результатов следует использовать как можно более тонкую водную пленку. Кусочек промокающей бумаги, положенный поверх покровного стекла до герметизации, способствует выводу излишнего количества жидкости (так что в препарате остается лишь необходимая для просмотра тонкая пленка) и подсушиванию поверхности потенциальных полей зрения.

Тепло от источника света может нарушить оптимальные движения бактерий. Если наблюдения ведутся в течение длительного периода времени, рекомендуется вставлять тепловой фильтр. Поскольку белый свет может вызывать нарушение подвижности, применяют зеленый светофильтр, лучше других реализующий коррекции, даваемые линзами, и хорошо воспринимаемый глазом наблюдателя. Нагревание пробы предотвращают также с помощью задерживающей оптической вставки, заполненной 5-сантиметровым слоем раствора Мора [50 г сульфата железа и аммония, 1,3 мл 33%-ной (объем/объем) серной кислоты и 250 мл дистиллированной воды].

3.2.2. Метод висячей капли

Этот метод заключается в следующем. Каплю пробы помещают в центре чистого покровного стекла, которое затем переворачивают и устанавливают над углублением в специальном предметном стекле так, чтобы капля висела на покровном стекле. Капля должна быть достаточно маленькой, чтобы она не касалась дна углубления. Для герметизации и фиксирования стекла на месте рекомендуется капнуть маленькую каплю воды на край покровного стекла.

Препараты типа «висячая капля» имеют некоторые недостатки, связанные с вогнутостью углубления предметного стекла, кривизной капли и увеличенной толщиной предметного стекла, которая порождает оптические aberrации. Различная глубина фокусировки, требуемая для просмотра пробы от края к центру, затрудняет наведение фокуса на отдельную клетку, особенно если она подвижна; лучше всего фокусировка удастся на краю капли. Некоторых трудностей избегают, если используют предметные стекла с лунками, имеющими плоское дно. Тогда их можно заполнить образцом и накрыть покровным стеклом, как описано выше.

3.2.3. Метод висячего агарового слоя

Для приготовления препаратов живых клеток типа «висячая капля» существует хорошее приспособление — пластина из прозрачной пластмассы с высверленным в центре отверстием, имеющим диаметр около 1 см. Покровное стекло с висящей на нем каплей помещают над отверстием, а для того, чтобы стекло удерживалось на месте, на его край наносят каплю иммерсионного масла или воды. Подобным образом к стеклу можно прикрепить тонкий слой агара с растущей культурой или островками колоний, размазанных по стерильной находящейся рядом с ними поверхности. Образующую отверстием камеру можно закрыть, прикрепив снизу покровное стекло.

3.2.4. Негативное окрашивание

Этот вид окрашивания дает возможность самыми простыми, а зачастую и самыми быстрыми способами получить информацию о преломляющих свет включениях, таких, как сера или гранулы поли- β -оксимасляной кислоты, и о спорах [12]. При его осуществлении взятый петлей 7%-ный (вес/объем) водный нигрозин (или тушь, или конго красный) тщательно перемешивают с бактериальной суспензией на покровном стекле, размазывают смесь до образования тонкой пленки и высушивают на воздухе. Затем кладут покровное стекло на предметное пленкой вниз и фиксируют его положение одной-двумя каплями свечного воска.

В приготовленных подобным образом препаратах, содержащих вместо заливки воздушный слой, бактерии не прокрашиваются и выделяются на темно-синем фоне ярким свечением. В дальнейшем они даже могут быть использованы в работах по изучению характера и степени разрушения клеток (гл. 5). Негативно окрашенные препараты не следует применять для измерения длины и ширины клеток (см. ниже), так как вокруг клеточной стенки может находиться капсула или слой слизи. Более того, отрицательно заряженные частицы коллоидного нигрозина не реагируют с клеточной поверхностью, поскольку при физиологических значениях pH последняя также заряжена отрицательно. При высыхании коллоидной пленки благодаря одинаковому заряду коллоидных частиц и бактерий черный край высыхающей пленки находится на относительно значительном, хотя и маленьком абсолютно расстоянии от истинной границы клетки. В результате видимый размер бактерии оказывается больше, чем действительный, даже если нет капсулы.

В растворах нигрозина могут завестись посторонние микроорганизмы; предотвратить это помогает небольшая добавка формальдегида, не ухудшающая свойств раствора.

3.2.5. Простое окрашивание

Морфологические исследования бактерий, как правило, проводятся на фиксированных и окрашенных препаратах. При использовании только одной краски процесс

называют простым окрашиванием. Исследуемую пробу распределяют по предметному стеклу на площади 1 см². Для этого достаточно одной петли культуры, выращенной в жидкой среде, или одной капли стерильной дистиллированной воды, в которой суспендировано *небольшое* количество культуры, взятой с твердой среды с помощью иглы или петли. (Бульонные культуры не всегда подходят из-за образующегося при фиксации белкового преципитата; поэтому во многих случаях можно улучшить качество препарата фиксацией в формалине с последующими центрифугированием и отмывкой.) Когда препарат высыхает, производят тепловую фиксацию (фламбирование), проводя несколько раз предметное стекло материалом вверх над пламенем горелки Бунзена, чтобы убить выжившие организмы и обеспечить прикрепление бактериальной пленки к стеклу. Высушивание и нагревание вызывают сжатие и деформацию бактерий и могут нарушить структуру связей между клетками; не забывайте об этом при интерпретации морфологических данных.

Более четко, хотя и с большими затратами времени, фиксацию осуществляют с помощью химических агентов. Проста и часто вполне удовлетворительна фиксация 5%-ным формалином (объем/объем) в течение нескольких минут, особенно для окраски по Граму (разд. 3.3.5). Подробное описание фиксации четырехокисью осмия (разд. 2.2.2) и по Боуэну (разд. 2.2.1) см. в гл. 2. В последнем случае берут бактерии, выросшие за несколько часов в микроколонии или распределенные до монослоя на твердой среде в чашке Петри. Кусочек агара с бактериями вырезают, фиксируют и переносят на покровное стекло, а затем окрашивают соответствующим образом одним из основных красителей или специально обрабатывают для получения цитохимической информации. Эту методику применяют к молодым культурам всего через несколько часов после посева на агар, когда формируется сплошной слой из микроколоний. Лучше всего заливать агар соответствующей суспензией и отсасывать избыток пастеровской пипеткой, наклоня чашку. После этого чашку подсушивают и инкубируют. *Влажные* пленки бактерий на покровных стеклах фиксируют и до высушивания, выдерживая их в парах 2%-но-

го (вес/объем) водного OsO_4 в течение 2—3 мин. Но намного лучше фиксировать клетки, подготавливая их к окраске, после того как клеточная суспензия была распределена по поверхности стерильного агара и жидкость впиталась в агар.

В описанных выше методах бактерии находятся на покровном стекле, а предметное стекло служит основанием. С цитологической точки зрения лучше, если фиксированные химическим путем и слегка окрашенные бактерии *при монтировании препарата будут в воде и если их высыхание предотвращено на всех этапах обработки*. Препараты, фиксированные OsO_4 , не прокрашиваются достаточно хорошо при простом окрашивании, если они не прошли вторую фиксацию, например фиксатором Шаудина [6,6 мл насыщенной HgCl_2 , 33,3 мл абсолютного этанола и 2%-ная (объем/объем) ледяная уксусная кислота, добавленная перед использованием; 6,9 г HgCl_2 в 100 мл воды при 20°C дает насыщенный раствор].

Клетки, интенсивно окрашенные для общеморфологического изучения, получают погружением на короткий срок препаратов, фиксированных нагреванием или химическими агентами, в растворы основных красителей, таких, как кристаллический фиолетовый (на 10 с) и метиленовый синий (на 30 с), после чего их промывают водопроводной или дистиллированной водой и подсушивают впитывающим воду материалом. Готовят красители следующим образом:

Кристаллический фиолетовый (по Хукеру)

Кристаллический фиолетовый	2 г
Этанол 95%-ный (объем/объем)	20 мл
Щавелевокислый аммоний 1%-ный (вес/объем) водный	80 мл

Кристаллический фиолетовый растворяют в этаноле, затем добавляют раствор щавелевокислого аммония и выдерживают перед использованием 48 ч.

Метиленовый синий (по Лёфлеру)

Метиленовый синий солянокислый	1,6 г
Этанол 95%-ный (объем/объем)	100 мл
КОН 0,01%-ный (вес/объем) водный	100 мл

Готовят насыщенный спиртовой раствор метиленового синего, добавляя краситель к спирту. Затем вливают 30 мл этого раствора в раствор КОН.

Если клетки окрашиваются слабо или совсем не окрашиваются одним из этих красителей, то их можно окрасить карболфуксином; при этом не исключено, что они окажутся кислотоустойчивыми в отношении красителя (разд. 3.3.6). Для большинства бактерий достаточно выдержать в этом красителе несколько секунд; это очень мощный краситель, и часто он дает чрезмерную окраску. Однако в случае микобактерий необходимо нагревание или добавление поверхностно-активных веществ, причем, для того чтобы карболфуксин проник через клеточную стенку, содержащую воскоподобные компоненты, требуется какое-то время.

3.2.6. Постоянные препараты

Окрашенные бактериальные пленки на покровных стеклах можно смонтировать в препарат, заключив их в воду на предметном стекле и запечатав края покровного стекла петролатумом, прозрачным лаком для ногтей или свечным воском. Такие препараты временны, их можно использовать лишь в течение нескольких дней, они представляют собой превосходный материал для микрофотографирования. Чтобы увеличить срок хранения, окрашенные и высушенные на покровном стекле пленки бактерий нужно осветлить в ксилоле и положить на каплю канадского бальзама на предметное стекло; следует избегать применения избыточного количества бальзама, а в крайнем случае вытирать его тканью, смоченной в ксилоле. Имеются в продаже и нейтральные среды для заключения препаратов, такие, как, например, флотекс, DPX и пермаунт. Эти среды состоят из пластмассы (полистирол) с пластификатором (трикрезилфосфат), растворенной в органических растворителях (толуол, ксилол). Флотекс можно наносить прямо на окрашенную бактериальную пленку, находящуюся на предметном стекле, без применения покровного стекла. Пермаунт является нейтральной средой, которая не закисляется и не обесцвечивается при хранении; при заключении в пермаунт удастся избежать накопления пузырьков воздуха под покровным стеклом.

3.3. ОБНАРУЖЕНИЕ ПРИЗНАКОВ

Как было показано, описываемые ниже методы удовлетворительны для выявления характерных признаков бактерий, необходимых для их идентификации. Вместе с тем их можно улучшить или модифицировать; литература изобилует описаниями незначительных изменений, которые, как выяснилось, были необходимы для получения оптимальных результатов в специфических условиях. В особой заботе при фиксации, окраске и микрофотографировании нуждаются цитологические препараты. Меры предосторожности, которые необходимы при работе с ними, приводятся здесь, а также в гл. 1 и 2. Методы, которые описаны ниже, считаются рутинными, но это самые эффективные методы (особенно если дело касается цитоплазматических включений) применительно к химически фиксированным препаратам, при обработке которых на всех этапах избегают высушивания.

3.3.1. Размер

К сожалению, измерения длины и ширины бактерий далеко не всегда проводятся с необходимой точностью из-за неизбежных технических трудностей. Границы клеток живых бактерий, исследуемых в фазово-контрастном или темнопольном микроскопе, видны не четко. При фазово-контрастной микроскопии границы клеток плохо видны из-за ореолов, которые ухудшают также видимость деталей внутреннего строения. Улучшения можно достичь, поместив микроорганизмы в среду с большим показателем преломления, что нетрудно сделать, если добавить желатину до концентрации 15—30% (вес/объем) [9]. Точную концентрацию, при которой получают наилучшие результаты, нужно определять экспериментально для каждого типа микроорганизмов и их компонентов.

Менее точный метод заключается в быстром высушивании на предметных стеклах тонкой пленки 15—20%-ного (вес/объем) раствора желатины. Пленки применяют для монтирования препаратов в жидкой среде; желатина при этом набухает, иммобилизуя погруженные в нее

клетки, и благодаря ее присутствию улучшаются фазовые соотношения между микроорганизмом и средой.

В фиксированных и окрашенных препаратах микроорганизмы в некоторой степени деформируются, причем степень деформации зависит от примененной методики; понятно, что при этом получают лишь *приблизительные* размеры. В высушенных окрашенных пленках, даже если они приготовлены из фиксированного формалином материала, не выявляется клеточная стенка. Обработка клеток дубильной кислотой и окраска кристаллическим фиолетовым делают клеточную стенку видимой, но при этом ширина бактерий больше по сравнению с той, которая характерна для живых клеток в жидкой среде или в окрашенных препаратах после высушивания на стекле. Эта методика не очень хороша для грамотрицательных бактерий.

Микроскопические измерения производятся с помощью либо калиброванного окуляра-микрометра, либо филярного микрометрического окуляра. *Окуляр-микрометр*, состоящий из стеклянного диска, на котором имеется ряд регулярно расположенных условно обозначенных отметок, устанавливается поверх полевой диафрагмы окуляра после отвинчивания верхней части. *Объект-микрометр* — это стеклянная пластинка, специально размеченная линиями, отстоящими друг от друга ровно на 10 мкм; при наведении на фокус линии окуляра-микрометра накладываются на линии объекта-микрометра. Если, к примеру, между двумя соседними линиями последнего помещается 10 линий окуляра-микрометра, то каждый просвет между ними равен 1,0 мкм. После калибровки объект-микрометр больше не нужен, но для каждого применяемого объекта калибровку следует проводить заново.

Филярный микрометрический окуляр имеет измерительную нить, положение которой регулируется вращающейся микрометрической ручкой. Каждому *полному* обороту ручки соответствует номинальное значение 10 мкм, нить при этом смещается на 1,0 мм. Переместив нить на известное по объекту-микрометру расстояние и подсчитав число делений на барабане ручки, пройденных при этом, можно прикинуть, сколько микрометров приходится на одно деление барабана.

3.3.2. Форма

Для идентификации и в описательных целях (гл. 20) форму бактерий принято обозначать следующим образом: прямая, изогнутая, спиральная, коккобациллярная, ветвящаяся, плеоморфная, с квадратным концом, с округлым концом, лентовидная и веретенковидная. К этим классическим терминам можно, пожалуй, добавить звездчатую, стебельчатую и дольчатую формы. Взаимное расположение отдельных бактерий описывается такими терминами, как одиночные пары, короткие цепи (менее пяти бактерий), длинные цепи (более пяти бактерий), скопления, тетрады, октеты, комки и нити.

Когда в учебнике бактерии описываются с помощью этих терминов, подразумевается, что природные ансамбли не нарушены. Вместе с тем при чрезмерном встряхивании, например, длинные цепи клеток могут разбиваться, а из одиночных клеток могут образовываться комки. Разрушение длинных цепей или других непрочных группировок клеток сводят к минимуму добавлением к культуре формальдегида до 1—2% (объем/объем); культуру инкубируют с формальдегидом 15 мин, затем ее центрифугируют и ресуспендируют в воде для приготовления пленок или негативного окрашивания. Эта процедура особенно рекомендуется для стрептококков. Следует также принимать во внимание последствия, связанные с возрастом культуры и составом среды.

3.3.3. Способ деления клеток

Способ деления данной бактерии обычно не выявляется при первом поверхностном осмотре препарата; для этого требуются продолжительные наблюдения живых клеток в подходящей среде [5, 10]. Методики простого окрашивания не позволяют с достаточной точностью определить, к какому типу относится деление — делению на две или на три клетки, делению почкованием или фрагментацией. Для этой цели может оказаться необходимым окрашивание клеточной стенки или даже электронная микроскопия.

3.3.4. Подвижность

Поступательное перемещение бактерий за счет жгутиков можно наблюдать во влажных препаратах, применяя в большинстве случаев слабый или безыммерсионный сильный объектив. Скорость перемещения бактерий варьирует, и медленно движущиеся организмы следует отличать от тех, которым свойственно лишь броуновское движение. Описаны некоторые неподвижные мутанты, обладающие жгутиками (тип *fla⁺ mot⁻*). Чтобы убедиться в том, что жгутики действительно присущи данной бактерии, а также чтобы определить их расположение (полярное, перитрихиальное, латеральное), требуются методы с применением окрашивания (разд. 3.3.10).

Если используется обычный конденсор и масляно-иммерсионный объектив, для улучшения контраста количество света нужно уменьшить апертурной диафрагмой, а конденсор опустить. Наиболее эффективный (и наиболее демонстративный) способ наблюдения за подвижными микроорганизмами при малом увеличении — это темнопольная микроскопия. Необходимые для нее специальные конденсоры доступны далеко не всем, однако вполне удовлетворительное темное поле можно получить, применив для освещения иммерсионный конденсор от фазово-контрастного микроскопа и расположенную на нужном месте фазовую пластинку; наблюдения при этом ведут с помощью *обычных* (не фазово-контрастных) объективов с увеличением 10× или 45×. Иммерсионная жидкость на конденсор не наносится, а его положение, для которого характерно самое хорошее темное поле, находится экспериментальным путем. С помощью этого ухищрения оказывается возможным видеть под малым увеличением даже спирохеты!

Некоторым бактериям присущ особый тип поступательного движения при контакте с твердой поверхностью, известный как «скольжение». Это относительно медленное, моментами прекращающееся, а затем возобновляющееся продвижение в направлении, параллельном продольной оси организма. Для скольжения характерна частая смена направлений движения и отсутствие наружных локомоторных органелл [8]. Такого типа подвижность можно предположить, если при микроскопиче-

ском обследовании (с безиммерсионными объективами большого увеличения) краев колоний обнаруживают отделенные от самого края одиночные клетки или группы клеток. Часто в первичной среде выделения скольжение не выявляется; обычно его легче обнаружить на твердых средах с небольшим количеством питательных веществ, соответствующих их содержанию в естественной для данной группы среде обитания.

Скольжение следует отличать от **роения**, которое выражается в движении за счет жгутиков в особых условиях. Роение — это распространение микроорганизмов по относительно сухим поверхностям, например агара, где они движутся в виде больших протяженных островков или микроколоний [6]. У наблюдаемых при этом скоплений постоянно меняются очертания — от коротких языковидных выступов и изолированных групп до переплетающихся полос, чередующихся с пустотами. В местах этих пустот видны следы движения, часто рассматриваемые в качестве признака скольжения и хорошо сохраняющиеся фиксацией по Боуэну *in situ* (разд. 2.2.1). Молодые активные культуры нитевидных организмов, передвигающихся скольжением, оставляют волнообразные, завитые или спиралевидные рисунки. Поступательное перемещение путем скольжения происходит со скоростью 10—15 мкм/с.

3.3.5. Окраска по Граму

Окраска по Граму представляет собой самый важный метод идентификации бактерий. Теоретически возможно разделение бактерий на две группы: грамположительные и грамотрицательные; реально же имеются случаи, когда одни и те же бактерии характеризуются как «грамвариабельные». С тех пор как метод был впервые разработан Кристианом Грамом в 1884 г., опубликованы многочисленные модификации окраски по Граму.

Пленка бактерий для окрашивания на предметном стекле может быть получена прямым методом из культуры в жидкой или твердой среде [случай простого окрашивания (разд. 3.2.5)], но лучше всего приготовить ее из фиксированной формалином отмытой пробы. Несколько дополнительных минут, потраченных на суспендирование бактерий в 5%-ном (объем/объем) формали-

не, сбор и промывка их центрифугированием, окупаются тем, что при этом размер и форма клеток хорошо сохраняются, клетки прокрашиваются равномерно, а беспорядочно разбросанные преципитаты из жидких культуральных сред отсутствуют. В любом случае рекомендуется высушивать пленку на воздухе и фиксировать ее нагреванием, как для простого окрашивания. Важно стандартизировать методику окраски по Граму [4]. Одинаковые результаты дают два способа окраски — в модификации Хукера и в модификации Бёрка.

Окраска по Граму в модификации Хукера

Раствор А для приготовления красящего реактива:

Кристаллический фиолетовый (с гарантированным 90%-ным содержанием сухого вещества)	2,0 г
Этанол 95%-ный (объем/объем)	20 мл

Раствор В для приготовления красящего реактива:

Щавелевокислый аммоний	0,8 г
Дистиллированная вода	80 мл

Растворы А и В смешивают для получения красящего реактива кристаллического фиолетового. Оставляют на 24 ч и перед использованием фильтруют через фильтровальную бумагу.

Протрава:

Йод	1,0 г
Йодистый калий	2,0 г
Дистиллированная вода	300 мл

Йод и йодистый калий размельчают в ступке и медленно добавляют воду при постоянно продолжающемся размельчении, пока йод не растворится. Хранят в темной склянке.

Растворитель для обесцвечивания:

Этанол 95%-ный (объем/объем)	

Дополнительный краситель:

Сафранин О [2,5% (вес/объем) в 95%-ном (объем/объем) этаноле]	10 мл
Дистиллированная вода	100 мл

Методика:

1. Высушенную на воздухе фиксированную нагреванием бактериальную пленку погружают на 1 мин в красящий раствор кристаллического фиолетового.

2. Пленку промывают в слабой, идущей под углом струе водопроводной воды в течение 2 с.

3. Пленку помещают в йодную протраву на 1 мин.

4. Промывают пленку в слабой, идущей под углом

3. МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ В СВЕТОВОЙ МИКРОСКОПИИ

струе водопроводной воды в течение 2 с, после чего ее подсушивают промокательной бумагой.

5. Погружают пленку на 30 с в 95%-ный (объем/объем) этанол, взбалтывая последний, после чего пленку подсушивают промокательной бумагой.

6. Погружают пленку на 10 с в дополнительный краситель.

7. Промывают пленку в слабой, идущей под углом струе водопроводной воды до исчезновения окраски в стоке, после чего пленку подсушивают промокательной бумагой.

Окраска по Граму в модификации Бёрка

Раствор А:

Кристаллический фиолетовый (с гарантированным 90%-ным содержанием сухого вещества)	1,0 г
Дистиллированная вода	100 мл

Раствор В:

Двууглекислый натрий	1,0 г
Дистиллированная вода	100 мл

Иодная протрава:

Иод	1,0 г
Иодистый калий	2,0 г
Дистиллированная вода	100 мл

Протраву готовят так же, как при модификации Хукера.

Растворитель для обесцвечивания (Предупреждение: осторожно, легко воспламеняется!):

Этиловый эфир	1 объем
Ацетон	3 объема

Дополнительный краситель:

Сафранин О (с 85%-ным содержанием сухого вещества)	2,0 г
Дистиллированная вода	100 мл

Методика:

1. Высушенную на воздухе фиксированную нагреванием бактериальную пленку погружают в раствор А, добавляют 2—3 капли раствора В и выдерживают в течение 2 мин.

2. Отмывают пленку иодной протравой, после чего покрывают ее на 2 мин свежей протравой.

3. Пленку промывают в слабой, идущей под углом струе воды из-под крана в течение 2 с; поверхность во-

круг пленки подсушивают промокательной бумагой, но саму пленку предохраняют от высыхания.

4. На пленку при наклонном положении предметного стекла по каплям наносят обесцвечивающий растворитель до тех пор, пока в скапывающем со стекла растворителе не исчезнет окраска. После этого пленку подсушивают на воздухе.

5. На 5—10 с пленку погружают в дополнительный краситель.

6. Пленку промывают в слабой, идущей под углом струе водопроводной воды до исчезновения окраски в стоке и подсушивают ее промокательной бумагой.

При использовании любой из методик грамположительные бактерии окрашиваются в голубой или фиолетовый цвет, а грамотрицательные — в красный.

Грамотрицательные бактерии могут выглядеть как грамположительные, если бактериальная пленка слишком толста, а обесцвечивание не проведено до конца. В то же время грамположительные микроорганизмы могут выглядеть, как грамотрицательные, если пленка чересчур обесцвечена; особенно это характерно для культур, очень долго находившихся в стационарной фазе роста. Некоторые виды *Bacillus* грамположительны лишь в течение нескольких делений после прорастания спор. Грамположительные организмы могут окраситься как грамотрицательные, если нарушена механически целостность их клеточных стенок в результате гибели клеток, автолиза, действия ферментов (например, лизоцима), высушивания на стекле и последующего увлажнения. Для получения хороших результатов лучше всего готовить относительно прозрачные пленки (со слабой замутненностью) из молодых активно растущих культур, так как более старые культуры имеют тенденцию давать неустойчивые реакции. Целесообразно в качестве контроля использовать известные грамположительные и грамотрицательные микроорганизмы.

3.3.6. Окрашивание на кислотоустойчивость

Второе важное тинкториальное свойство бактерий заключается в том, что некоторые из них плохо обесцвечиваются смесью кислота — спирт после окрашивания го-

рячими растворами карболфуксина. В эту маленькую группу, известную под названием «кислотоустойчивая», входят некоторые актиномицеты, микобактерии, отдельные родственные им бактерии и покоящиеся эндоспоры.

Метод окрашивания на кислотоустойчивость по Цилю — Нильсену

Карболфуксиновый краситель:

Основной фуксин	0,3 г
Этанол 95%-ный (объем/объем)	10 мл
Фенол (кристаллы, расплавленные при нагревании)	5 мл
Дистиллированная вода	95 мл

Основной фуксин растворяют в этаноле и затем добавляют растворенный в воде фенол. Раствор перемешивают и оставляют стоять несколько дней. Перед использованием его фильтруют.

Растворитель для обесцвечивания:

Этанол 95%-ный (объем/объем)	97 мл
Соляная кислота (концентрированная)	3 мл

Дополнительный краситель:

Метиленовый синий, солянокислая соль	0,3 г
Дистиллированная вода	100 мл

Методика:

1. Предметное стекло с высушенной на воздухе и фиксированной прогреванием бактериальной пленкой помещают на держатель для предметных стекол, находящийся над кюветой. Погружают пленку в карболфуксиновый краситель. Предметное стекло осторожно подогревают снизу на горелке Бунзена или на горячей пластине до отхождения паров (не допускать кипения!). В этих условиях препарат держат 5 мин, периодически подогревая его по мере надобности (перегрев вызывает разбрызгивание краски и растрескивание стекла). Пленку промывают слабой, идущей под углом струей водопроводной воды до исчезновения окраски в стоке.

2. Пленку погружают в обесцвечивающий раствор и сразу же отмывают водой из-под крана, как описано выше. Обесцвечивание и отмывку повторяют до тех пор, пока пленка на вид не станет бледно-розовой.

3. Погружают пленку на 20—30 с в дополнительный краситель, отмывают водопроводной водой, как описано выше, подсушивают промокательной бумагой и смотрят в микроскоп.

Кислотоустойчивые бактерии выглядят красными, а все остальные — синими.

Кислотоустойчивость того или иного организма можно также определить флуоресцентным методом. У этого метода есть одно преимущество, заключающееся в том, что стекла с образцами, в которых подозревается присутствие, например, микобактерий, можно просматривать под объективом с увеличением 60X, а не 100X; следовательно, все стекло целиком можно просмотреть за короткое время.

Метод Труанта окрашивания на кислотоустойчивость [13]

Реактив для флуоресцентной окраски:

Аурамин О, CI 41000	1,50 г
Родамин В, CI 749	0,75 г
Глицерин	75 мл
Фенол (кристаллы, расплавленные при нагревании)	10 мл
Дистиллированная вода	50 мл

Оба красителя тщательно перемешивают с 25 мл воды и фенолом. Затем добавляют оставшуюся воду и глицерин и снова перемешивают. Получившийся реактив для флуоресцентной окраски фильтруют через стекловату и хранят при 4°C или при комнатной температуре.

Растворитель для обесцвечивания:

Этаиол 70%-ный (объем/объем)	99,5 мл
Соляная кислота (концентрированная)	0,5 мл

Дополнительный краситель:

Марганцовокислый калий	0,5 г
Дистиллированная вода	99,5 мл

Методика:

1. Погружают слегка фиксированную нагреванием бактериальную пленку на 15 мин в реактив для флуоресцентной окраски при 20—37°C.

2. Промывают пленку под слабой, падающей под углом струей дистиллированной воды, пока сток не станет бесцветным.

3. На 2—3 мин погружают пленку в обесцвечивающий растворитель, затем промывают дистиллированной водой, как описано выше.

4. Погружают пленку в дополнительный краситель на 2—4 мин.

5. Отмывают дистиллированной водой, как описано выше, и подсушивают промокательной бумагой.

Просматривают образцы в люминесцентный микроскоп с использованием возбуждающего светофильтра BG-12 и запирающего светофильтра OG-1. Клетки кислотоустойчивых бактерий флуоресцируют желто-оранжевым светом на темном фоне.

3.3.7. Эндоспоры

Неокрашенные эндоспоры живых бактерий имеют при наблюдении в обычный микроскоп черное обрамление и ярко светятся в плоскости, находящейся немного выше положения истинного фокуса. Не следует считать, однако, что любая сильно преломляющая свет структура внутри бактерии — это эндоспора, особенно если отсутствует информация о теплоустойчивости (разд. 20.1.52). Прямой тест на присутствие эндоспор возможен благодаря явлению, которое наблюдается [12] во многих эндоспорах после погружения в окислитель в кислой среде (например, 0,1%-ный KMnO_4 в 0,3 н. HNO_3 или 0,3 н. HCl). При этом оболочка споры теряет целостность, а часть ее протоплазмы, теперь легко окрашиваемая основными красителями, выпячивается наружу через образовавшуюся брешь. Из-за поразительной скорости происходящего события (менее 20 мин пребывания в растворе окислителя) этот тест заслуживает названия «проверки на лопанье» (porping test). Его удобно проводить, помещая высушенную на покровном стекле пленку спор на 10—20 мин в раствор окислителя; «лопнувшие» споры видны без окраски, хотя последняя делает их более легко различимыми.

Имеется несколько удовлетворительных методов для окрашивания эндоспор в бактериях. При использовании простейшего из них — негативного окрашивания — получают нефиксированные препараты, материал которых имеет негативный вид. Для осуществления метода взятый петлей 7%-ный (вес/объем) водный нигрозин смешивают на покровном стекле с набранной петлей культурой, смесь распределяют в виде тонкой пленки и высушивают на воздухе. Покровное стекло переворачивают пленкой вниз, помещают на предметное стекло и

закрепляют в нескольких местах свечным воском. Эндоспоры выглядят, как сильно преломляющие свет сферические или эллипсоидальные образования, находящиеся как внутри, так и за пределами клеток бактерий [12].

Эндоспоры очень устойчивы к простому окрашиванию, но, будучи однажды окрашенными, они довольно устойчивы и к обесцвечиванию. Полезным методом позитивного окрашивания бактериальных эндоспор является метод Дорнера.

Метод окрашивания эндоспор по Дорнеру

1. Образец, фиксированный нагреванием на предметном стекле, высушивают на воздухе и покрывают его квадратным кусочком промокательной бумаги или салфетки, подогнанным по размеру стекла.

2. Насыщают бумагу раствором карболфуксина (разд. 3.3.6) и выпаривают его 5—10 мин, как описано выше, поддерживая влажное состояние добавлением красителя по мере надобности. Выпаривать можно и по-другому, помещая стекла на штатив, находящийся над емкостью с кипящей водой.

3. Удаляют промокательную бумагу и обесцвечивают пленку смесью кислота — спирт в течение 1 мин; промывают водопроводной водой и подсушивают промокательной бумагой.

4. Высушивают тонкий, нанесенный на предметное стекло слой водного насыщенного раствора нигрозина и просматривают стекло в микроскоп (раствор нигрозина готовят следующим образом: смесь 10 г нигрозина и 100 мл дистиллированной воды погружают на 30 мин в кипящую воду, охлаждают и для лучшего хранения добавляют 0,5 мл формалина; перед использованием смесь фильтруют).

Вегетативные клетки бесцветны, эндоспоры окрашены в красный цвет, а фон — в черный.

В модифицированном методе Дорнера в пробирке смешивают водную суспензию бактерий с равным объемом карболфуксина. Пробирки опускают на 10 мин в кипящую водяную баню. Затем набранный петлей 7%-ный водный нигрозин смешивают на покровном стекле с небольшим количеством (одна петля) подвергшейся нагреванию суспензии бактерий; после подсуши-

вания на воздухе образуется тонкая пленка. Результаты получают те же, что указаны выше, но методика менее трудоемкая.

Метод окраски эндоспор по Шеферу — Фултону

В этом методе вместо карболфуксина применяется 0,5%-ный (вес/объем) водный малахитовый зеленый. Образец высушивают на воздухе на предметном стекле, фиксируют нагреванием, покрывают промокательной бумагой или бумажной салфеткой, пропитанной до насыщения красителем, и помещают на 5 мин над кипящей водой. Стекло промывают водопроводной водой и бактериальную пленку дополнительно окрашивают 30с сафранином, как в случае окраски по Граму. Затем вновь промывают и подсушивают пленку промокательной бумагой. Эндоспоры окрашиваются в ярко-зеленый цвет, а вегетативные клетки — в красно-коричневый.

3.3.8. Цисты

Бактериальные цисты, имеющиеся у видов *Azotobacter* например, при простом окрашивании прокрашиваются слабо; обычно они выглядят, как сферические тела, окруженные толстыми, но плохо прокрашенными стенками. Описанный ниже метод [14] пригоден для выявления цист азотобактера, в том числе форм, образующихся до созревания цист.

Окрашивание цист

Реактив:

Ледяная уксусная кислота	8,5 мл
Сульфат натрия (безводный)	3,25 г
Нейтральный красный	200 мг
Светло-зеленый S.F. желтоватый	200 мг
Этанол 95%-ный (объем/объем)	50 мл
Дистиллированная вода	100 мл

Все химические реагенты и красители добавляют в воду при постоянном перемешивании в течение 15 мин и затем смесь фильтруют через мембранный фильтр (с диаметром пор 0,5 мкм).

Методика:

Реактив наносят на образец и просматривают влажный препарат под микроскопом. Вегетативные клетки азотобактера окрашиваются в желтовато-зеленый цвет;

на ранних стадиях формирования цист темно-зеленая цитоплазма несколько отстоит от наружной клеточной стенки, их разделяет красно-коричневый слой. В зрелых цистах центральная часть выглядит темно-зеленой и отделяется неокрашенной интиной от расположенной снаружи красно-коричневой экзины.

3.3.9. Капсулы и слои слизи

Капсулы и слои слизи образуются некоторыми бактериями в специфических культуральных условиях. Лучше всего они видны во влажных препаратах, поскольку составляющие их сильно гидратированные коллоидные полимеры легко разрушаются и сокращаются в размерах при высушивании и фиксации.

Самым простым и наиболее эффективным из трех методов окраски капсул, описанных ниже, является метод Дюгида.

Метод окраски капсул по Дюгиду

1. На чистое предметное стекло петлей наносят тушь и смешивают ее с культурой. Покровное стекло помещают таким образом, чтобы была накрыта лишь часть смеси.

2. Сложенной много раз промокательной бумагой сильно прижимают покровное стекло к предметному стеклу до появления тонкого коричневатого слоя жидкости между ними. Препарат смотрят под большим увеличением, применяя безыммерсионные и иммерсионные объективы.

Капсулы выглядят прозрачными зонами вокруг преломляющих свет микроорганизмов на коричневатом-черном фоне.

Метод окраски капсул по Гиссу

1. Взятую петлей бактериальную суспензию смешивают с каплей нормальной лошадиной сыворотки или снятого молока на предметном стекле.

2. Высушивают пленку на воздухе и мягко фиксируют ее нагреванием.

3. Покрывают пленку красящим реактивом кристаллического фиолетового (кристаллический фиолетовый

0,1 г, дистиллированная вода 100 мл) и нагревают до появления пара.

4. Отмывают кристаллический фиолетовый 20%-ным (вес/объем) водным раствором сульфата меди ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$). Подсушивают впитывающим воду материалом и смотрят в микроскоп.

Капсулы выглядят бледно-голубыми, а сами микроорганизмы — темно-фиолетовыми.

Метод окраски капсул по Антони

1. Высушенную на воздухе пленку окрашивают в течение 2 мин 1%-ным (вес/объем) водным раствором кристаллического фиолетового.

2. Краситель отмывают 20%-ным (вес/объем) водным раствором сульфата меди ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), удаляют избыток последнего и подсушивают впитывающим влагу материалом.

Капсулы выглядят светло-голубыми, а микроорганизмы — темно-фиолетовыми.

3.3.10. Жгутики

Хотя Кох разработал способ окраски жгутиков более чем столетие назад, существующие в настоящее время соответствующие методики не отличаются легкостью и надежностью. Поскольку толщина бактериальных жгутиков лежит за пределами разрешения светового микроскопа (жгутики имеют диаметр около 10—30 нм), для того чтобы их увидеть, необходимо, так сказать, «вымазать их дегтем и обваливать в перьях». Неподвижные бактерии лишены жгутиков, однако известны организмы, жгутики которых «парализованы» (fla^+mot^-).

Метод окраски жгутиков по Грэу

Раствор А:

Дубильная кислота [20%-ная (вес/объем) водная]	2 мл
Калийные квасцы [$\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$], насыщенные водные]	5 мл
Хлористая ртуть, насыщенный водный раствор	2 мл
Основной фуксин 3%-ный (вес/объем) в 95%-ном (объем/объем) этаноле	0,4 мл

Краситель желательно добавлять к остальным ингредиентам непосредственно перед использованием и конечный раствор отфильтровывать.

Раствор В:

Карболфуксин, приготовленный по Цию (разд. 3.3.6)

Методика:

1. Обычные бактерии удобно выращивать на косячках агар с соответствующим содержанием питательных веществ. За 0,5 ч до взятия пробы в пробирку с косячком добавляют водный раствор пептона, в который переходят микроорганизмы, так как жидкая среда является наиболее подходящей в подобных экспериментах. Затем пробу центрифугируют, чтобы освободиться от составных элементов среды, промывают и вновь центрифугируют. Осадок осторожно (чтобы предотвратить потерю жгутиков) ресуспендируют в 10%-ном (объем/объем) водном формалине до получения слегка мутной суспензии.

2. Суспензию петлей наносят на предметное стекло, наклоняют его под углом 45° и подсушивают препарат на воздухе.

3. Фильтруют прямо на пленку раствор А и оставляют его на ней приблизительно на 6 мин. Точное время следует определить экспериментально.

4. Раствор А смывают с предметного стекла дистиллированной водой.

5. На пленку кладут кусочек промокательной бумаги и заливают на 3 мин раствором В.

6. Удаляют промокательную бумагу, промывают предметное стекло дистиллированной водой, осторожно подсушивают впитывающим влагу материалом и смотрят в микроскоп.

Жгутики и клетки бактерий окрашиваются в красный цвет. Значительная доля успеха в осуществлении метода зависит от использования абсолютно чистых обезжиренных предметных стекол. Чтобы обеспечить чистоту стекол, их нагревают либо в пламени горелки Бунзена, до тех пор пока пламя по краям стекла не становится желтым (после чего стеклам дают остыть), либо в муфельной печи в течение 20 мин при 400 °С (предметные стекла в печи располагают так, чтобы они не соприкасались). После охлаждения стекла используют немедленно или хранят в емкости, не содержащей пыли. Стекла также становятся очень чистыми, если их сначала протереть жидким очистителем Bon Ami, а затем

3. МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ В СВЕТОВОЙ МИКРОСКОПИИ

бумажной тканью Kleenex. Не рекомендуется применять для очистки стекол, на которых красят жгутики, такие очищающие агенты, как хромовая кислота или 50%-ный (объем/объем) спирт.

Метод окраски жгутиков по Ляйфсону

Раствор 1:

Хлористый натрий	1,5 г
Дистиллированная вода	10 мл

Раствор 2:

Дубильная кислота	3,0 г
Дистиллированная вода	100 мл

Раствор 3:

Уксуснокислый <i>n</i> -розанилин	0,9
Солянокислый <i>n</i> -розанилин	0,3
Этанол 95%-ный (объем/объем)	100 мл

Смешивают равные объемы растворов 1 и 2; затем два объема получившейся смеси приливают к одному объему раствора 3. В охлажденном виде полученная смесь хранится 1—2 мес.

Методика:

1. Высушенный на воздухе образец готовят в соответствии с 1-м и 2-м этапами метода Грэя.

2. Восковым стеклогграфом очерчивают вокруг бактериальной пленки прямоугольник.

3. Наносят на предметное стекло 1 мл раствора красителя, так чтобы нисколько не вытекло за пределы восковой линии. Оставляют краситель приблизительно на 7—15 мин; оптимальное время реакции следует определить экспериментально.

4. Как только на поверхности красителя образуется золотистая пленка и при освещении снизу будет видно, что вся пленка сплошь покрыта осадком, краситель удаляют, заставляя «плыть» эту пленку по поверхности пущенной из-под крана струи воды. Пленку высушивают на воздухе и смотрят в микроскоп.

Тела и жгутики бактерий окрашиваются в красный цвет.

3.3.11. Цитоплазматические включения

У многих бактерий, выращиваемых в определенных условиях, в результате обменных процессов в цитоплазме образуются отложения, которые называют включе-

ниями. Среди них — отложения жира, поли- β -оксимасляной кислоты, полифосфата, крахмалоподобных полисахаридов, серы и различных кристаллов. Некоторые из них представляют собой полимеризованные ненужные продукты, а другие можно отнести к запасам питательных веществ. Для выявления этих включений, которые к тому же преломляют свет, применяется несколько методик окраски.

Окрашивание поли- β -оксимасляной кислоты

Для выявления цитоплазматических включений в бактериях используют следующий метод:

1. Фиксированную нагреванием бактериальную пленку образца на предметном стекле погружают в раствор 0,3%-ного (вес/объем) судана черного В, приготовленного на этиленгликоле. Фильтруют и окрашивают в течение 5—15 мин (время определяют экспериментально).

2. Краситель сливают и препарат высушивают на воздухе, положив предметное стекло на промокательную бумагу.

3. Несколько раз погружают и промывают предметное стекло в ксилоле, а затем подсушивают впитывающим ксилол материалом.

4. Дополнительно окрашивают препарат в течение 5—10 с 0,5%-ным (вес/объем) водным сафранином.

5. Промывают предметное стекло водопроводной водой, подсушивают и смотрят в микроскоп.

Включения поли- β -оксимасляной кислоты выглядят как черно-синие капельки, в то время как цитоплазма окрашивается в розовый цвет.

Окрашивание полифосфата

Включения, состоящие из неразветвленных структур с элементным составом $M_{n+2}P_nO_{3n+1}$, выявляют следующим образом.

1. Бактериальную пленку образца на предметном стекле фиксируют нагреванием.

2. Окрашивают пленку в течение 10—30 с в растворе метиленового синего по Лёфлеру или в 1%-ном (вес/объем) толуидиновом синем.

3. Отмывают краситель водопроводной водой, подсушивают и смотрят в микроскоп.

При окраске метиленовым синим гранулы полифосфата выглядят шариками, имеющими цвет от синего до фиолетового, а вся остальная цитоплазма окрашивается в светло-голубой цвет. Толуидиновый синий окрашивает метакхроматически, и гранулы имеют красный цвет на фоне голубой цитоплазмы.

Окрашивание полисахаридов с использованием реактива Шиффа

Этим методом выявляют гликогеноподобные вещества.

1. Пленку суспензии на предметном стекле фиксируют нагреванием.

2. На 5 мин на стекло наносят раствор периодата [20 мл 4%-ной (вес/объем) иодной кислоты в воде, 10 мл 0,2 М водного ацетата натрия и 70 мл 95%-ного этанола; защищать раствор от света!].

3. Отмывают стекло 70%-ным (объем/объем) этанолом.

4. На 5 мин наносят на предметное стекло восстанавливающий раствор, содержащий 300 мл этанола, 5 мл 2 н. соляной кислоты, 10 г иодистого калия, 5 г тиосульфата натрия (пятиводного), 200 мл дистиллированной воды. Восстанавливающий раствор готовят следующим образом: к раствору иодистого калия и тиосульфата натрия в дистиллированной воде сначала приливают этанол, а затем соляную кислоту. Смесь перемешивают и оставляют на некоторое время для выпадения в осадок серы, после чего собирают надосадочную жидкость.

5. Отмывают стекло 70%-ным (вес/объем) этанолом.

6. Окрашивают препарат реактивом Шиффа в течение 15—45 мин (точное время следует определить экспериментально). Реактив Шиффа готовят следующим образом: 2 г основного фуксина растворяют в 400 мл кипящей дистиллированной воды, охлаждают до 50°C и фильтруют через фильтровальную бумагу. Добавляют к фильтрату 10 мл 2 н. соляной кислоты и 4 г метабисульфита калия. Сосуд плотно закупоривают и оставляют на 12 ч в холодном темном месте. Добавляют такое количество 2 н. соляной кислоты (~10 мл), чтобы при высы-

хании на предметном стекле реактив не давал розового налета. Реактив Шиффа хранят в темноте.

7. Несколько раз отмывают стекло раствором, состоящим из 2 г метабисульфита калия и 5 мл концентрированной соляной кислоты, в 500 мл дистиллированной воды.

8. Отмывают препарат водопроводной водой и дополнительно окрашивают 0,002%-ным (вес/объем) водным раствором малахитового зеленого в течение 2—5 с.

9. Отмывают препарат водопроводной водой, подсушивают и смотрят в микроскоп.

Полисахариды окрашиваются в красный цвет, все остальные компоненты цитоплазмы — в зеленый.

Метод окраски полисахаридов алциановым синим

Для выявления полисахаридов можно также использовать алциановый синий. Обычно применяют 1%-ный (вес/объем) раствор алцианового синего в 95%-ном (объем/объем) этаноле, а в качестве дополнительного красителя используют карболфуксин. Последовательность операций такова:

1. Пленку препарата на предметном стекле фиксируют нагреванием.

2. Окрашивают пленку в течение 1 мин разведенным в 9 раз (в воде) алциановым синим, приготовленным, как описано выше.

3. Отмывают препарат водопроводной водой и высушивают.

4. Дополнительно очень быстро окрашивают (не следует допускать переокрашивания!) препарат карболфуксином (разд. 3.3.6) и сразу же отмывают водопроводной водой. Высушивают пленку на воздухе и смотрят в микроскоп.

Полисахариды окрашиваются в голубой цвет, а другие составляющие цитоплазму компоненты — в красный.

3.4. СПЕЦИАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ

В этот раздел включен ряд методов, которые не являются столь обычными, чтобы их применять при первом ознакомлении с пробами.

3.4.1. Спирохеты

Спирохеты не прокрашиваются удовлетворительно «обычными» красителями, хотя свободноживущие спирохеты хорошо видны в нигрозиновых пленках. Размеры (толщина) многих из них находятся на пределе разрешения светового микроскопа. Обычно эти бактерии наблюдают живыми с помощью прямой темнопольной или фазово-контрастной микроскопии. Полезно знать, что в пленках, окрашенных по Гимзе, спирохеты флуоресцируют ярким золотисто-желтым светом при просмотре с темнопольным освещением.

Хорошие результаты обычно получают при использовании метода Фонтаны.

Метод окрашивания спирохет по Фонтане

Раствор А (фиксатор):

Уксусная кислота	1 мл
Формалин	2 мл
Дистиллированная вода	100 мл

Раствор В (протрава):

Фенол	1 г
Дубильная кислота	5 г
Дистиллированная вода	100 мл

Раствор С:

К 0,5%-ному (вес/объем) водному раствору нитрата серебра приливают 10%-ный (вес/объем) раствор водной гидроокиси аммония (по каплям) до тех пор, пока образовавшийся вначале осадок только-только начинает растворяться.

Раствор D:

Этанол абсолютный

Методика:

1. Высушивают на воздухе пленку на предметных стеклах, очищенных тем способом, который применяют при окрашивании жгутиков.

2. Фиксируют пленку в растворе А в течение 1—2 мин.

3. Отмывают пленку в растворе D в течение 3 мин.

4. Наносят на пленку раствор В и нагревают в течение 30 с, пока не начинает подниматься пар.

5. Отмывают пленку дистиллированной водой и высушивают препарат.

6. Наносят на пленку раствор С и нагревают, пока

не начинает подниматься пар, а сама пленка не становится коричневой. Пленку отмывают, высушивают и смотрят в микроскоп.

Спирохеты выглядят коричневато-черными.

3.4.2. Микоплазмы

Микоплазмы, вероятно, представляют собой самые маленькие бактерии, которые можно наблюдать в световой микроскоп и которые с трудом поддаются индивидуальному распознаванию из-за сильно выраженного плеоморфизма. Характерные колонии микоплазм, имеющие вид яичницы-глазуньи, наблюдают при прямой микроскопии чашек с агаром. Для анализа колоний полезен подход, разработанный Динесом и заключающийся в том, что препараты смотрят после того, как на место роста бактерий наносят каплю метиленового синего и накрывают ее покровным стеклом. В случае объектов, близких по размерам к пределам разрешения, оптические измерения при фазово-контрастной микроскопии затруднены по двум причинам. Первая — это ореольные артефакты и вторая — присущие фазовому контрасту особенности формирования изображения, благодаря которым круглые объекты выглядят меньше, чем они есть на самом деле. В морфологических исследованиях и при изучении подвижности микоплазм применяются влажные препараты. Что же касается типа микроскопирования, то рекомендуются методы фазового контраста и темнопольного освещения. Если нужны окрашенные препараты микоплазм, то предпочтительнее использовать несколько модифицированную методику окраски по Гимзе (см. ниже), которую следует применять к предварительно фиксированным организмам. Фиксировать микоплазмы лучше раствором Боуэна (разд. 2.2.1) непосредственно в слое агара, лежащем на покровном стекле.

3.4.3. Риккетсии

Риккетсии являются облигатными внутриклеточными паразитами (за исключением *Rickettsia quintana*), которые, как правило, имеют палочковидную форму, встречаются парами и обладают выраженным плеоморфиз-

мом. Их можно видеть в пленках инфицированной ткани при прямом микроскопическом анализе, если окрасить препараты по Гимзе или по Гименецу. Большинство риккетсий при этом имеют вид фиолетовых коккобациллярных микроорганизмов с различной длиной — от 0,25 до 2 мкм. Чаще всего наблюдаются пары и короткие цепи. Самая маленькая риккетсия — *Coxiella burnetii* (размер — $0,25 \times 1$ мкм) — выглядит, как окрашенная с двух полюсов палочка, находящаяся в цитоплазме инфицированных клеток. Риккетсии тифа и пятнистой лихорадки в целом крупнее (ширина — 3—0,6 мкм, длина — 1,2 мкм). Риккетсии пятнистой лихорадки обнаружены как в ядрах, так и в цитоплазме инфицированных клеток и часто окружены ореолом, иногда ошибочно принимаемым за капсулу.

Инфицированные ткани можно прямо анализировать в флуоресцентном микроскопе, используя специфические антисыворотки, меченные изотиоцианатом флуоресцеина. При окраске по Граму риккетсии красятся как грамотрицательные.

Метод окраски риккетсий по Гимзе

Исходный концентрированный раствор:

Порошок красителя Гимзы	0,5 г
Глицерин	33 мл
Абсолютный метанол (свободный от ацетона)	33 мл

Порошок красителя Гимзы растворяют в глицерине при 55—60 °С в течение 1,5—2 ч. Добавляют метанол, тщательно перемешивают и оставляют стоять на некоторое время. Хранят реактив, в котором нет осадка, при комнатной температуре.

Для использования одну часть исходного концентрированного раствора разводят в 40—50 раз нейтральной дистиллированной водой или забуференной водой, рН 6,8.

Методика:

1. Образец на предметном стекле высушивают на воздухе, фиксируют 5 мин в абсолютном метаноле и вновь высушивают на воздухе.

2. Наносят на образец свежеприготовленный раствор Гимзы на 1 ч.

3. Отмывают 95%-ным (объем/объем) этанолом для удаления избытка красителя, высушивают на воздухе и

смотрят в микроскоп с целью выявления базофильно окрашенных организмов, находящихся внутри цитоплазмы.

Метод окраски риккетсий по Гименецу

Исходный концентрированный раствор:

Основной фуксин	10 г
Этанол 95 %-ный (объем/объем)	100 мл
Фенол 4 %-ный (вес/объем), водный	250 мл
Дистиллированная вода	650 мл

Сначала краситель растворяют в этаноле, а затем добавляют другие ингредиенты. Перед использованием красящий раствор выдерживают в течение 48 ч при 37 °С.

При использовании красителя исходный концентрированный раствор разводят в отношении 1:2,5 фосфатным буфером, рН 7,45, приготовленным смешиванием 3,5 мл 0,2 М Na_2HPO_4 , 15,5 мл 0,2 М Na_2HPO_4 и 19 мл дистиллированной воды. Затем краситель фильтруют. Он может храниться 3—4 дня, но каждый раз перед использованием должен фильтроваться. При окраске этим методом требуется также 0,8 %-ный (вес/объем) водный раствор щавелевокислого малахитового зеленого.

Методика:

1. Образец фиксируют нагреванием и наносят на него на 1—2 мин красящий раствор.
2. Отмывают водопроводной водой и окрашивают в течение 5—10 с малахитовым зеленым.
3. Вновь отмывают образец водопроводной водой и второй раз окрашивают малахитовым зеленым.
4. Тщательно отмывают предметное стекло водопроводной водой, подсушивают промокательной бумагой и смотрят в микроскоп.

Риккетсии выглядят как окрашенные в красноватый цвет бактерии на зеленом фоне.

3.4.4. Водные бактерии

При прямом микроскопировании проб морской воды, как правило, выявляется лишь немного бактерий. Для концентрирования микроорганизмов с целью определения их общего числа в единице объема, а также с целью выявления различных морфологических типов приме-

няется фильтрация. Один из способов фильтрации [7] заключается в следующем.

Фильтры из поликарбоната диаметром 25 мм (с диаметром пор 0,2 мкм) предварительно окрашивают в течение 5 мин в 0,2%-ном (вес/объем) растворе иргаленового черного (цветовой индекс среди кислых черных красителей № 107, Union Carbide Corp., New York, N. Y) в 2%-ной (объем/объем) уксусной кислоте, отмывают дистиллированной водой и помещают в увлажненном виде в стеклянный аппарат для фильтрования (Millipore Corp., Bedford, Mass.). Заготовленные фильтры, высушенные после предварительной окраски и промывки, перед использованием увлажняют дистиллированной водой, лишенной бактериальных клеток, на специальном держателе для фильтра. Пробу морской воды, фиксированную нейтрализованным (с помощью BaCO_3) глутаральдегидом [доведенным до концентрации 0,1% (объем/объем)], выливают в воронку над фильтром. Затем к пробе добавляют 0,1%-ный (вес/объем) раствор акридинового оранжевого (с 40%-ным содержанием красителя в исходном реактиве) в 0,02 М трисе, pH 7,2 (при 20°C) с таким расчетом, чтобы конечная концентрация красителя составила 0,01% (вес/объем). После прокрашивания в течение 3 мин проба с акридиновым оранжевым просасывается (под действием приложенного отрицательного давления 125 мм рт. ст.) через мембранный фильтр. Затем фильтр вынимают из аппарата и кладут на каплю иммерсионного масла (типа I, F или A; Cargille Laboratories, Inc., Cedar Grove, N. J.), находящуюся на предметном стекле. Другую каплю наносят сверху и накрывают покровным стеклом. Эти операции следует проводить быстро, чтобы фильтр не высох. Препарат просматривают в стандартном микроскопе, оснащенном системой возбуждения люминесценции падающим светом, включающей в себя 100-ваттную галогеновую лампу, возбуждающий светофильтр BG-12, запирающий светофильтр LP-510 и светоделитель FT-510. Бактерии, находящиеся на фильтре, люминесцируют зеленым светом; при этом можно наблюдать отдельные морфологические типы.

Другой, занимающий много времени способ пропагандирует Хенрици. Он рекомендует подвешивать пред-

метные или покровные стекла в исследуемой воде на несколько часов или дней, а затем окрашивать и микроскопировать их. В этом случае происходит отбор микроорганизмов, обладающих свойством прикрепляться к поверхностям, характерным для многих обитателей пресных и соленых вод.

3.4.5. Почвенные бактерии

Известны неселективные методы прямого микроскопического изучения почвенных бактерий [3, 11]. В качестве миниатюрных предметных стекол используют специальные стеклянные капилляры разной ширины с прямоугольным сечением (Carlson Scientific Inc., Matteson, IL 60443). Существуют капилляры, у которых одна стенка очень тонкая (0,17 мм). Устройство для взятия проб, так называемый пелоскоп, состоит из набора четырех или пяти пучков прямоугольных в сечении капилляров длиной 1—2 см, по пять капилляров в пучке. Пелоскоп заполнен стерильной дистиллированной водой и прикреплен к держателю (с маркированной миллиметровой шкалой) посредством резиновой полоски. Его вертикально опускают в исследуемый образец почвы. По истечении определенного срока пелоскоп извлекают и исследуют под микроскопом, чтобы увидеть «микробные ландшафты» в капиллярах. Рекомендуются тщательно отмыть пелоскоп водой и удалить из держателя захваченные клетки. Каждый капилляр снаружи протирают дочиста бумагой для линз и затем просматривают тонкой стенкой вверх. При помощи специальных методик капилляры можно превратить в вечные препараты [11].

Другой простой способ, позволяющий произвести отбор (конечно же, неполный) почвенных микроорганизмов для микроскопического изучения, заключается в следующем. Пробу почвы помещают на дно часового стекла или маленькой чашки. При помощи пастеровской пипетки снизу к ней добавляют воду до тех пор, пока над пробой не появится водная поверхность. На эту поверхность кладут покровные стекла или электронно-микроскопические сетки, к которым прикрепляются микроорганизмы, находящиеся в поверхностной пленке.

3.5. ЛИТЕРАТУРА

3.5.1. Общая литература

1. *Norris J. R., Ribbons D. W. (ed.). Methods in microbiology, vol. 5A, Academic Press, Inc., New York, 1973.*
Материал, представленный в первой части этого тома, особенно полезен как дополнение к тому, что излагалось в данной главе. В частности, укажем следующие главы:
I. Microscopy and micrometry, by L. B. Quesnel, p. 1—103.
II. Staining bacteria, by J. R. Norris and H. Swain, p. 105—144.
III. Techniques involving optical brightening agents, by A. M. Patton and S. M. Jones, p. 135—144.
IV. Motility, by T. Iino and M. Enomoto, p. 145—163.
2. *Paik G., Suggs M. T. Reagents, stains, and miscellaneous test procedures, p. 930—950. In E. H. Lennette, E. H. Spaulding, and J. P. Truant (ed.), Manual of clinical microbiology, 2nd ed. American Society for Microbiology, Washington, D. C., 1974.*
Приведены некоторые дополнительные методики и соответствующая библиография по медицинской микробиологии.

3.5.2. Специальная литература

3. *Aristovskaya T. V. The use of capillary techniques in ecological studies in microorganisms, p. 47—52. In T. Rosswall (ed.), Modern methods in the study of microbial ecology. Swedish National Science Research Council, Stockholm (1973).*
4. *Bartholomew J. W. Variables influencing results, and the precise definition of steps in gram staining as a means of standardizing the results obtained. Stain Technol., 37, 139—155 (1962).*
5. *Casida L. Interval scanning photomicrography of microbial cell populations, Appl. Microbiol., 23, 190—193 (1972).*
6. *Henrichsen J. Bacterial surface translocation: a survey and classification, Bacteriol. Rev., 36, 478—503 (1972).*
7. *Hobbie J. E., Daley R. J., Jasper S. Use of Nucleopore filter for counting bacteria by fluorescence microscopy, Appl. Environ. Microbiol., 33, 1225—1228 (1977).*
8. *MacRae T. H., McCurdy H. D. The isolation and characterization of gliding motility mutants of *Myxococcus xanthus*. Can. J. Microbiol., 22, 1282—1292 (1976).*
9. *Mason D. J., Powelson D. M. Nuclear division as observed in live bacteria by a new technique, J. Bacteriol., 71, 474—479 (1956).*
10. *Noller E. C., Durham N. N. Sealed aerobic slide culture for photomicrography, Appl. Microbiol., 16, 439—440 (1968).*
11. *Perfil'ev B. V., Gabe D. R. Capillary methods of investigating micro-organisms, Oliver and Boyd, Edinburg, 1969.*
12. *Robinow C. F. Morphology of bacterial spores, their development and germination, p. 207—248. In: I. C. Gunsalus and R. Y. Stanier (ed.), The bacteria, vol. 1, Academic Press, Inc., New York (1960).*
13. *Truant J. P., Brett W. A., Thomas W. Fluorescence microscopy of tubercle bacilli stained with auramine and rhodamine. Henry Ford Hospital Med. Bull., 10, 287—296 (1962).*
14. *Vela G. R., Wyss O. Improved stain for visualization of *Azotobacter* encystment, J. Bacteriol., 87, 476—477 (1964).*

ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ

Р. Коул, Т. Попкин

Исследователь, собирающийся работать на электронном микроскопе и никогда не сталкивавшийся с ним ранее, должен перенять опыт от специалистов, работая вместе с ними, причем желательно на такой же модели, на которой он планирует проводить эксперименты. Предварительно он должен запастись руководствами и справочниками и, возможно, пройти подготовку на специальных курсах. Методы электронной микроскопии, предлагаемые нами в данной главе, предназначены для тех, кто имеет доступ к микроскопу и должен проводить бактериологические исследования. Исследователи могут почерпнуть для себя много полезного, не только занимаясь на курсах, но и осваивая необходимые манипуляции с помощью квалифицированного оператора, а также привлекая необходимые сведения, изложенные в руководствах и литературе по общим вопросам [1—14]. Мы не будем здесь дублировать все эти источники инструкций, так как для каждого микроскопа существуют собственные правила работы.

В отличие от светового микроскопа, в отношении которого предполагается, что каждый, кто на нем работает, способен использовать его наилучшим образом, электронный микроскоп — специализированный прибор, который настраивается и обслуживается специалистами. Это связано с расходами на запасные части и производством ремонтных работ, осуществляемых по контракту с обслуживающим предприятием-изготовителем. Для того чтобы оправдать капитальные вложения и затраты, связанные с организационными трудностями, в большинстве случаев на одном электронном микроскопе работает много людей. Часто к электронным микроскопам прилагаются устройства для производства срезов, получения реплик методами напыления сколов и травления замороженных образцов и, возможно, для других видов

микроскопии, в том числе — сканирующей электронной микроскопии. Те, кто отвечает за бесперебойную работу микроскопов, устанавливают правила и нормы обращения с ними, обеспечивающие сохранность оборудования и непрерывность работы, и строго следят за соблюдением этих правил. Работающему с микроскопом следует с вниманием и заботой отнестись к прибору (некоторые его части устроены очень тонко, и *имеет* большое значение, какие ручки крутят при его настройке), а также к тому, кто будет работать после него («золотое правило»). Работающий на электронном микроскопе должен быть также предельно честным в отношении действий, которые он предпринимает (или не предпринимает), чтобы можно было быстро преодолеть затруднения, возникающие при эксплуатации и устранении неполадок.

Необходимо придерживаться следующих правил.

1. На любом приборе и при выполнении любой манипуляции вас должны контролировать не только для того, чтобы вы лучше его освоили, но и для того, чтобы вы сами и отвечающий за микроскоп оператор знали слабые места в вашей подготовке.

2. Если микроскоп не работает, ведет себя странно или требует приложения необычных для нормальной работы усилий, *остановите* эксперимент на безопасной стадии, обдумайте все и обратитесь за помощью к специалистам.

3. Не поддавайтесь соблазну произвести самостоятельный ремонт, лучше честно признаться в совершенных ошибках и обратиться за помощью к специалистам.

4. Ведите записи, даже если на данном электронном микроскопе не заведен такой порядок, обязательно отмечайте время своей работы и регистрируйте все случаи отклонения от нормы.

5. Делайте собственные записи последовательных процедур и имейте их с собой во время работы. Используйте контрольный список, который должен включать, например, следующие пункты.

Положения ручек и выключателей при включении и налаживании прибора (а также при выключении)

Пусковые манипуляции

Требования по готовности прибора к работе

Процедуры по настройке, выполняемые повседневно

Центрировка диафрагмы объективной линзы

Настройка конденсора

Компенсация астигматизма

Действия по переходу на широкопольное сканирование

Рабочие операции и обращение с фотокамерой

Предупредительные сигналы и реакция на них

Действия по ликвидации аварийной обстановки и обеспечению безопасности

Действия по выключению прибора с последующим приведением его в исходное состояние.

Усилия, связанные с качественным приготовлением образцов и тщательным выполнением методических требований, а также настойчивость и экспериментальное искусство в работе с электронным микроскопом будут вознаграждены хорошими микрофотографиями и должны быть по достоинству оценены как научным руководителем, так и самим микроскопом.

Ценность электронного микроскопа заключается в его способности разрешать объекты, которые не разрешаются оптическим микроскопом в видимом или ультрафиолетовом свете. Короткая длина волны электронов, которая уменьшается в прямой зависимости от подаваемого ускоряющего напряжения, позволяет разрешать, т. е. различать как отдельные объекты, отстоящие друг от друга всего на $2\text{\AA}$ (0,2 нм или 0,0002 мкм) или даже меньше, в то время как предел разрешения световой оптики лежит вблизи 0,2 мкм (он зависит от длины волны используемого света). На практике самые лучшие современные электронные микроскопы просвечивающего типа в самых оптимальных условиях работы (т. е. при соответствующих вакууме, центрировке линз, ускоряющем напряжении, чистоте прибора, физической стабильности и качестве приготовленного образца) дают разрешение в диапазоне 0,5—1,0 нм. Но биологические образцы имеют вполне определенную толщину; реально предел разрешения для срезов достигает около 2,5 нм, а для негативно контрастированных препаратов — около 1,0 нм. Чтобы улучшить разрешение, нужны мастерство и хорошо налаженный прибор. Образцы и поддерживающие пленки-подложки с большой толщиной увели-

чивают рассеивание электронов, что ведет к заметному ухудшению разрешения.

Полезно перечислить некоторые ограничения электронной микроскопии. В связи с тем что образцы исследуются в условиях высокого вакуума, необходимого для получения пучка электронов, они, очевидно, должны быть неживыми и высушенными. Природа проникновения пучка электронов в биологический образец и прохождения через него такова, что степень контраста на фотографии или при непосредственном наблюдении мала и в противоположность разрешению падает с увеличением ускоряющего напряжения. Следовательно, образец должен иметь минимальную толщину и его необходимо селективно окрашивать или контрастировать солями тяжелых электроноплотных металлов.

Поскольку электронный микроскоп обладает повышенным разрешением по сравнению со световым, оказалось возможным получить на нем значительно большее полезное увеличение. В современных электронных микроскопах достигается огромное прямое увеличение изображения на смотровом экране или фотопленке, но для большинства образцов, если не ставить целью разрешить отдельные макромолекулы, вполне удовлетворительны увеличения на экране или пленке $5000\text{--}15\,000\times$ (последующего увеличения в $5\text{--}10$ раз при фотопечати негативов более чем достаточно); при этом обычно получают стабильные изображения. Качество результатов зависит не только от уже упомянутых условий работы, но также от способа приготовления образцов, мастерства в управлении прибором и от фотографической техники.

Благодаря высокому разрешению, наличию различных препаративных методов и большому выбору соответствующей техники микроскопирования удастся выявлять детали бактериальных структур. Например, с помощью солей тяжелых металлов, окружающих бактерию и проникающих в поверхностные неровности, получают контрастирование за счет дифференциальной задержки электронов. Этот эффект, известный как *негативное контрастирование*, аналогичен эффекту применения нигрозина в световой микроскопии. Однако, если в клеточной стенке или мембране нет разрывов, позволяющих

проникать контрастирующему красителю, с помощью этого метода нельзя увидеть никаких структур внутри цитоплазмы. В этом случае клеточные компоненты изучают после специального разрушения клеток, фракционирования структур и последующего негативного контрастирования.

Детали внутреннего строения *in situ* выявляют на срезах бактерий, залитых в полимерный материал; предварительно бактерии фиксируют химически и обрабатывают солями тяжелых металлов для получения необходимого контраста. Часть электронов проходит через образец, а другие рассеиваются компонентами структуры, в результате чего формируется изображение на люминесцирующем смотровом экране или пленке. Электронный микроскоп, в котором изображение получают благодаря прохождению (просвечиванию) электронов (по крайней мере части из них) через образец, называют просвечивающим (или трансмиссионным). Такие микроскопы обладают самыми широкими возможностями применения в микробиологии [53—63].

Благодаря техническому прогрессу недавно появился также сканирующий (растровый) электронный микроскоп. Некоторые современные модели электронных микроскопов устроены так, что сочетают в себе возможности как просвечивающего, так и сканирующего микроскопов, и их можно переоборудовать с одного типа на другой.

При сканирующей электронной микроскопии, как следует из названия, пучок электронов быстро сканирует поверхность образца, вызывая излучение, которое посредством катодно-лучевой трубки формирует изображение на светящемся экране; этот процесс сходен с формированием телевизионного изображения. Образец прежде всего фиксируют химическим путем, высушивают в критической точке, чтобы избежать деформации и напыляют в вакууме золотом или другим тяжелым металлом. Разрешение, достигаемое с помощью сканирующего электронного микроскопа, заметно улучшилось со времени его появления, но оно до сих пор меньше (в лучших выпускаемых промышленностью образцах около 3,0 нм), чем в обычных просвечивающих электронных микроскопах. Сканирующий электронный микроскоп дает только картину поверхностей, но позволяет полу-

чать сразу трехмерное изображение, поэтому отпадает необходимость трудоемких процедур приготовления реплик интактных, фрагментированных или полученных замораживанием — скалыванием клеток бактерий, обязательных в случае трансмиссионной электронной микроскопии. В бактериологии [64—75] сканирование наиболее эффективно с целью выявления отростков и других поверхностных структур, для определения формы и топографических отношений как в колониях, так и на поверхностях инфицированных тканей.

В этой главе описывается небольшое число методов, которые мы в соответствии с собственным опытом считаем полезными для исследователя, изучающего анатомию бактерий. Мы делаем акцент на применении негативно контрастированных препаратов и тонких срезов образцов для анализа в просвечивающем электронном микроскопе. Здесь нет описания операций по управлению и эксплуатации электронного микроскопа [15—19], но есть краткая информация о необходимых для работы материалах и их поставщиках (разд. 4.6 и 4.7). Предполагается, что доступны вспомогательные приборы и что помощь в работе могут оказать опытные операторы. Мы поставили своей целью снабдить обучающегося сведениями о методах приготовления образцов и способах интерпретации результатов. Хотя помимо методов и оборудования, на которых делается акцент, будут упоминаться и другие, детальную информацию о них можно найти, лишь обратившись к специальной литературе, другим руководствам и журнальным статьям. В конце главы мы приводим литературу по общим вопросам [1—14] и перечень источников специальной информации.

4.1. ПРОСВЕЧИВАЮЩАЯ ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ

4.1.1. Негативное контрастирование [20—33]

Микроскопические сетки [20—23]

Для электронной микроскопии промышленностью выпускаются стандартные сетки диаметром 2,3 или 3,0 мм. Они изготавливаются из различных металлов и

имеют разную частоту ячеек; наиболее распространен вариант медных сеток с частотой ячеек 200 меш (частота в мешах обозначает число рядов в сетке на расстоянии в один дюйм). Одна сторона у сеток матовая, а другая — блестящая. Перед нанесением поддерживающих пленок-подложек сетки следует очистить, обработав их для этого ацетоном или какими-либо другими растворителями. Однако некоторые предприятия-изготовители выпускают уже достаточно очищенные сетки, которые можно дополнительно не обрабатывать.

Пленки-подложки [20—23]

Хотя для поддержания объектов, залитых в эпоксидные смолы (см. ниже), можно использовать сетки без пленок-подложек, жидкие образцы для негативного контрастирования нужно помещать на пленки-подложки, покрывающие сетки. Обычно это нитроцеллюлозные или коллоидные (парлодиевые), поливинилформоловые (формваровые) или углеродные пленки. Пленки из первых двух веществ, относящихся к пластмассам, часто стабилизируют дополнительным тонким углеродным слоем. Формвар — наиболее удовлетворительный материал для пленок-подложек, и мы рекомендуем следующий способ его применения.

1. Приобрести материалы, перечисленные в разд. 4.6.1.

2. Приготовить рабочий 0,2%-ный раствор формвара в дихлорэтаноле, используя исходный концентрированный 0,5%-ный раствор и указанный растворитель.

3. Отмыть предметные стекла мыльным раствором (или раствором детергента) и водой и тщательно промыть их дистиллированной или деионизованной водой. Высушить стекла, пользуясь как *промокашкой* неволокнистым протирачным материалом, ни в коем случае не прибегая к протиранью, чтобы избежать наведения заряда статического электричества. Чистые стекла можно хранить по отдельности, проложив между ними кусочки неволокнистого протирачного материала.

4. Наполнить одну кювету Коплина (Coplin jar) рабочим раствором 0,2%-ного формвара, а в другую внести 4—5 капель дихлорэтана и накрыть ее. В последней

создается атмосфера растворителя, что способствует равномерному высыханию предметных стекол, покрытых формваром.

5. Поместить два или три предметных стекла в кювету с раствором формвара и оставить их там на 3—5 мин. Вынуть стекла по одному и перенести во вторую кювету для «высушивания». После высушивания вынуть и положить стекла на неволокнистый протирочный материал. Очищенной спиртом бритвой по периметру надрезать слой формвара с обеих сторон.

6. Наполнить закрывающуюся стеклянную чашку (дно которой с наружной стороны покрыто черной липкой лентой) деионизованной водой до образования выпуклого мениска у самого верха. Провести чистой стеклянной палочкой, находящейся в контакте с верхними краями чашки, по поверхности воды от края до края чашки, чтобы выровнять мениск и собрать с поверхности всю пыль. (Для перетекающей при этом через край воды под чашку можно подставить поднос.)

7. *Осторожно*, держа вертикально над подносом покрытое пленкой стекло, капнуть из пастеровской пипетки по бритвенным надрезам формваровой пленки 10%-ную плавиковую кислоту. (Пипетку каждый раз после использования выбрасывать.) *Сразу же, но не спеша* погрузить находящееся в вертикальном положении стекло в воду. Пленки формвара будут медленно сходиться с обеих сторон стекла на водную поверхность, плавая на ней. Визуально проверить пленки (желательно под светом люминесцентной лампы), чтобы оценить их однородность и толщину. Они должны иметь цвет от серого до серебристо-серого и в соответствии с картиной интерференционных полос могут иметь разброс в толщине ± 60 нм. Теоретически идеальные значения толщины 10—20 нм достигаются очень редко.

Если однородность или толщина пленки неудовлетворительны, следует повторить описанные выше этапы с некоторыми модификациями. Если пленки неоднородны, стекла, покрытые формваром, нужно сушить дольше и погружать в воду более медленно. Если пленка слишком толста, следует развести раствор формвара дихлорэтаном; если слишком тонка — добавить в раствор немного исходного концентрированного 0,5%-ного формвара и

повторить все сначала. При использовании плавиковой кислоты, отделяющей при протравливании формвар от стекла, получают более воспроизводимые результаты, чем при обычном способе, когда на стекло просто дышат.

8. Если плавающие по поверхности воды пленки удовлетворяют всем требованиям, следует аккуратно поместить на них сетки (матовой стороной вниз). Участков пленки с заведомыми нарушениями лучше избегать, чтобы все сетки находились почти в одинаковых условиях.

9. Разрезать пополам кружок фильтровальной бумаги (Whatman № 1) и, держа половинку над полосой формваровой пленки с сетками, медленно опускать ее на поверхность до тех пор, пока она не пропитается равномерно водой. Затем погрузить бумагу в воду, перевернуть ее и вынуть из воды вместе с пленкой и сетками, которые оказываются при этом между фильтровальной бумагой и пленкой формвара.

10. Поместить бумажный полукруг с сетками в чашку Петри на другой кусок фильтровальной бумаги и неплотно закрыть чашку крышкой на время сушки.

Замечание: не применяйте слишком волокнистую фильтровальную бумагу, так как волокна могут повредить пленку.

После высушивания сетки поднимают за край специальным тонкозаостренным пинцетом. При этом пленка должна разорваться точно по периметру сетки, оставшись на ее поверхности. Если это не происходит или если пленки разрываются не точно по периметру сетки, значит, они слишком толсты; однако чрезмерная толщина может быть лишь на некоторых участках пленки, в то время как другие могут быть вполне удовлетворительными. Пленки, имеющие большие дырки (чего удастся обычно избежать, применяя плавиковую кислоту, вместо того чтобы дышать на пленку при ее отделении от стекла), не способны хорошо удерживать жидкость, причем дырки бросаются в глаза при микроскопировании. Большие дырки в подложке получаются также в результате того, что при высушивании окружающая пленку среда обладает слишком высокой влажностью. Чересчур тонкие пленки легко разрываются под действием пучка электронов.

Из-за ионизации и последующих изменений электростатического заряда пленки расширяются и сжимаются, вызывая смещение образца при увеличении и уменьшении интенсивности электронного пучка. Любое возникающее движение приводит к смазыванию фотографического изображения тем больше, чем больше используемое увеличение. Часто регулировка интенсивности пучка и короткое выжидание приводят к стабилизации. Мы считаем, что формваровые пленки, приготовленные описанным способом, вполне удовлетворительны для обычных целей при увеличении, не превышающем 50 000, если тот, кто управляет микроскопом, внимательно следит за условиями микроскопирования и длительностью фотоэкспозиции. Однако для выявления тонких деталей и для работы при большом увеличении используют более стабильные пленки, которые получают путем напыления тонкого (2,0—3,0 нм) слоя углерода. Тонкие пленки чистого углерода предотвращают смещение образцов и улучшают разрешение, поскольку они более равномерны и имеют более тонкую структуру. Их готовят почти полным растворением и удалением большей части пластмассового компонента из покрытых углеродом пленок или отделением на воду углеродных пленок со стеклянных или свежерасщепленных слюдяных поверхностей точно так же, как это делается в случае обычных подложек. Сетки, покрытые углеродными пленками, имеются в продаже. Хотя у этих пленок есть большие преимущества, позволяющие проводить тонкие эксперименты с субклеточными частицами и вирусами, работать с ними нелегко, так как эти нежные и хрупкие пленки требуют осторожного обращения с ними. Пленки можно приготовить также напылением частиц углерода очень малых размеров при испарении углерода с угольных электродов в вакууме [10^{-5} — 10^{-6} мм рт. ст. (1,33—0,13 нПа)]. Эту процедуру осуществляют в напылительной установке — устройстве, для которого существует несколько выпускаемых промышленностью моделей. В современных напылительных установках, включающих либо просто устроенные, либо автоматические управляющие системы, процесс напыления сеток почти автоматизирован; они представляют собой неотъемлемую часть каждой электронно-микроскопической лаборатории. Подробно с

использованием напылительных установок (сюда входят также контрастирование образцов и получение их реплик при обработке тяжелыми металлами) читатель может ознакомиться в специальных источниках информации [44, 45].

Окрашивание

Негативное «окрашивание» (контрастирование) — это процесс заключения бактерий или других частиц в тонкую пленку разбавленного раствора соли тяжелого металла, которая затем высыхает на стекле. В отношении используемых красителей и методов их применения (см. ниже) существует множество вариантов. Стандартная методика, применяемая в нашей лаборатории, включает два этапа — сначала нанесение образца, а затем окрашивание 2%-ным молибдатом аммония, как описано ниже.

1. Край сетки с пленкой наверху помещают на край трижды сложенной полоски липкой ленты (и внизу и вверху липкой стороной наружу), прижатой к покровному стеклу.

2. Пастеровской пипеткой на сетку наносят каплю бактериальной или другой суспензии, подлежащей исследованию. Площадь, которую занимает капля, должна совпадать с поверхностью сетки. (Капля удерживается поверхностным натяжением мениска; неводные суспензии или суспензии, содержащие поверхностно-активные вещества, не удерживаются на сетке.)

3. Каплю оставляют на сетке на 1 мин или больше, чтобы бактерии или другие частицы пристали к поверхности пленки. Оптимальное время выдерживания, которое зависит от природы пленки и ее заряда (гидрофильности), а также размера и природы частиц, определяют методом проб и ошибок. Для улучшения адгезии и распределения частиц можно усилить гидрофильные свойства подложки, применяя покрытые пленкой сетки, выдержанные в холодильнике или недавно облученные ультрафиолетовым светом; для сведения к минимуму электростатического заряда сетки помещают в камеру с высоким вакуумом, где происходит тлеющий разряд или разряд при помощи катушки Теслы. Эффективно также

непосредственно перед нанесением капли образца на сетку использовать пушку зеростата.

4. Вершиной маленького треугольника из фильтровальной бумаги ватман № 1, прикасаются к капле и забирают большую ее часть. Затем тут же краем бумаги прикасаются к краю сетки и быстро забирают остатки жидкости.

5. Пока поверхность сетки не просохла, на нее наносят каплю 2%-ного молибдата аммония.

6. Через 30—60 с удаляют каплю красителя, как описано выше. Время обработки определяют экспериментально.

7. Сеткам дают возможность высохнуть и затем исследуют их с помощью электронного микроскопа.

Для негативного окрашивания суспензий существует несколько взаимозаменяемых методов. В одном из них смешивают равные объемы (можно использовать и другие отношения) красителя и суспензии, наносят одну каплю на сетку, а затем либо сразу, либо по прошествии определенного времени (например, 30 с) удаляют избыток жидкости. Обычно каплю лучше всего наносить сразу после смешивания, поскольку происходящее со временем взаимодействие частиц и красителя может приводить к нестабильным результатам. Иногда выгодно захватить тонкую пленку смеси платино-иридиевой петель размером чуть больше площади сетки (например, диаметром 3,2 мм) и нанести ею смесь на сетку, лежащую на промокательной бумаге; этим обеспечивается более равномерное распределение частиц. Сетку высушивают и просматривают. Если нанесенного материала больше, чем должно быть в тонкой пленке, то избыток следует удалить фильтровальной бумагой.

Другой метод негативного окрашивания заключается в том, что сетке дают возможность плавать последовательно по поверхности капли суспензии, капли фиксатора или другого агента, капли промывочной воды (несколько раз; см. ниже «Отмывка») и капли с красителем, вслед за чем, как и обычно, сетку подсушивают фильтровальной бумагой (см. выше этап 6-й). Капли удобно наносить на пластинку зубного воска, сполоснутого дистиллированной или деионизованной водой для удаления пыли и растворимых солей.

Иногда смеси красителя и суспензии распыляют на сетки, но для этого нужен специальный аппарат; этот метод наиболее полезен для количественной оценки вирусов и других маленьких частиц [26].

При изучении бактерий особенно полезен способ нанесения сеток, покрытых пленкой, на бактериальный газон или колонии. Сразу же после снятия сеток удаляют лишнюю жидкость и проводят окрашивание. Этим способом можно исследовать природное состояние бактерий и их пространственные взаимосвязи, не нарушенные набиранием в пипетку или другими процедурами, для которых характерны сдвиговые усилия. Подобные процедуры могут вызвать отрыв жгутиков, ворсинок или других хрупких структур. Описанный способ полезен также для быстрого определения морфологического типа фага, вызвавшего образование стерильного пятна на газоне индикаторной культуры бактерий.

Отмывка

Отмывка сетки — полезная дополнительная процедура, следующая за нанесением суспензии, но предшествующая негативному контрастированию (в двухэтапном методе). Ее проводят для того, чтобы удалить остатки клеток, а также излишки солей и белка, выпадающие в осадок под действием некоторых красителей и ухудшающие изображение исследуемых компонентов. Отмывку проводят, быстро прикасаясь поверхностью сетки к капле воды, причем эту операцию повторяют несколько раз с новыми каплями дистиллированной воды или еще какой-либо жидкости. Другой способ отмывки заключается в том, что сетку препаратом вниз помещают на влажную поверхность полоски тонкой согнутой фильтровальной бумаги ватман № 1, которая через край впитывает отмывающую жидкость из маленького стаканчика или чашки Петри. В любом из этих случаев сетку окрашивают сразу же после удаления избытка жидкости фильтровальной бумагой.

Помимо воды, для отмывки могут быть испытаны различные растворы; при их выборе следует учитывать свойства исследуемых частиц, а также то, что соли и другие вещества, мешающие окрашиванию, должны

быть обязательно удалены. Во многих случаях для отмывки лучше всего применять 1%-ный водный ацетат аммония, поскольку он не реагирует с бактериями, микоплазмами, мембранами, вирусами и большинством внутриклеточных компонентов, а также потому, что его избыток улетучивается в условиях вакуума электронного микроскопа. При первом знакомстве с микроорганизмами из жидких культур в большинстве случаев образующийся после центрифугирования осадок суспендируют в небольшом количестве ацетата аммония и суспензию наносят на сетку. Центрифугирование бактерий в любых целях, в том числе на этапе фиксации и отмывки препаратов, готовящихся методом заливки (разд. 4.1.2), удобнее и быстрее всего проводить в настольных центрифугах, таких, как центрифуги фирм Brinkmann или Eppendorf. Объем конической пластмассовой пробирки в них не должен превышать 1,5 мл.)

Красители

В качестве красителей для негативного окрашивания используются различные соли тяжелых металлов. Наш опыт свидетельствует о том, что самой подходящей солью является молибдат аммония, так как он хорошо распределяется, не реагирует с белками и большинством других компонентов суспензии и его концентрацию легко регулировать для создания требуемой степени контраста [32]. Пожалуй, чаще других используются растворы фосфорновольфрамового натрия и калия, в целом удовлетворительные при нейтральных значениях pH. Широко применяются соли урана, поскольку их молекулы, обладающие небольшими размерами, хорошо проникают в поверхностные неровности и тем самым улучшают разрешение тонких деталей. Уранилацетат, который, как правило, имеется в электронно-микроскопических лабораториях, потому что его используют также при окрашивании срезов, дает хорошие результаты при концентрации $\sim 1\%$ или меньше. Но его растворы имеют очень низкий pH (около 2,5), и, даже будучи частично нейтрализованным непосредственно перед использованием, он начинает выпадать в осадок при pH выше 4,5. Некоторые структуры ура-

нилацетат окрашивает позитивно, и на одной и той же сетке могут быть видны участки как позитивно, так и негативно окрашенные. Ко всему прочему, он действует как фиксатор на белки и нуклеиновые кислоты, вызывает сжатие и округление ограниченных мембранами клеток (например, микоплазм), разрушает некоторые белковые структуры при рН 4,5 и должен применяться только для чистых и хорошо отмытых препаратов. В связи с этим особую ценность приобретает уранилоксалат, так как его можно использовать при нейтральных значениях рН. Иногда также используют уранилформиат, кремневоольфрамвокислый натрий и другие соли. Соли урана обладают незначительной радиоактивностью и токсичностью, поэтому во время работы с ними необходимо быть осмотрительными.

Некоторые исследователи советуют добавлять к ряду красителей (например, к фосфорновольфрамату, но не к солям урана) с целью улучшения их распределения незначительные количества удерживающих воду агентов, таких, как сывороточный альбумин, крахмал или сахара [22]. Не все находят это полезным или необходимым, особенно в тех случаях, когда требуются большие увеличения или хороший фон.

Фиксация

Иногда перед негативным контрастированием оказывается полезной химическая фиксация микроорганизмов. Ее применяют для того, чтобы избежать структурных изменений и искажений из-за действия растворов с разными рН и осмотическими свойствами, из-за действия самих красителей или из-за высушивания в красителе. Фиксацию проводят в растворах глутаральдегида низкой концентрации, а иногда суспензию на сетке подвергают действию паров глутаральдегида в закрытом сосуде. Перед окраской фиксированные бактерии нуждаются в отмывке либо прямым способом, либо путем отмывки сеток методами, упомянутыми выше. В итоге часто наблюдается в какой-то степени позитивное окрашивание, а задержка красителя вокруг фиксированного микроорганизма такова, что для окрашивания можно применять значительно менее концентрированные растворы красителя.

«Подводные камни», трудности, предосторожности

Много указаний на трудности, встречающиеся в электронной микроскопии, уже было сделано в предшествующих разделах. Когда говорят о доступности электронного микроскопа, подразумевают наличие по крайней мере одного опытного оператора, хорошо знакомого с обслуживанием и эксплуатацией напылительных установок, ультрамикротомов и самого микроскопа. При наблюдении негативно контрастированных образцов особенно важно добиться нужной степени контраста и разрешения, применяя соответствующее ускоряющее напряжение (обычно 60—80 кВ). Заостренные катодные нити электронной пушки желательны, но не обязательны. Загрязнение колонны микроскопа, апертур и образца сводится к минимуму, если заботиться о надлежащем использовании охлаждаемого жидким азотом противозагрязнительного устройства и самоочищающихся золотых апертур объектива. Чтобы устранить дрейф образца, нужно терпеливо провести предварительные эксперименты с электронными пучками разной интенсивности и использовать углеродно-пластмассовые или чисто углеродные пленки-подложки. Повреждение или изменение тонкой структуры под действием пучка электронов, а также образование пятен красителя вокруг образца и на самом образце можно свести к минимуму, если научиться быстро наводить фокус при наименьшей допустимой интенсивности пучка. Для фотографирования при этом следует использовать как можно более короткие выдержки, которые, если учесть применяемую систему проявления фотопленки, соответствуют достижению желаемого контраста. Наилучшие результаты обычно получают с короткими выдержками при относительно низком увеличении; каждый микроскопист методом проб и ошибок определяет для используемого им микроскопа и изучаемого объекта те увеличения, при которых легче всего производится фокусирование и получаются наиболее четкие результаты.

В красителях и в отмывающих растворах (ацетат аммония) или даже в деионизованной и дистиллированной воде при долгом хранении иногда появляются бактерии. Если есть подозрение на присутствие в растворах

бактерий, их проверяют в электронном микроскопе. Рабочие растворы красителей (обычно 2%-ные растворы молибдата аммония, фосфорно-вольфрамового калия и уранилацетата) хранят в небольших пузырьках, наполняемых по мере надобности из бутылей (с соблюдением стерильности). Загрязненные растворы можно отфильтровать, но лучше всего сделать их заново, чтобы избежать неприятностей, вызываемых маленькими частичками, которые способны проходить через большинство фильтров. Растворы уранилацетата нужно защищать от света, обертывая соответствующую емкость фольгой; их необходимо фильтровать (диаметр пор фильтра 0,2 мкм), если образовался осадок. Удобно разливать растворы пластмассовым шприцем с насаженным на него фильтром типа Swinney.

Распределение по подложке красителя и исследуемых частиц, даже если применяются уже упомянутые методы, может быть неудовлетворительным; поэтому для экономии времени и пользы дела следует готовить две или большее число сеток с одним и тем же материалом.

Сетки просматривают в микроскоп при малых увеличениях. Подходящая для эксперимента сетка, приготовленная путем промокания капли, характеризуется градиентным распределением частиц и красителя от одного края до другого, в пределах которого можно найти область с удовлетворительной плотностью частиц. Если в исходной суспензии концентрация частиц низка или промокание капли дает плохие результаты, то частицы и краситель могут быть найдены лишь на очень маленькой области сетки.

При обработке молибдатом аммония на фокусирующем экране получают менее контрастное изображение по сравнению с обработкой фосфорновольфрамовыми солями и уранилацетатом, и поэтому для работы с ним требуется некоторый опыт. Однако на негативах, проявленных надлежащим образом, получают очень контрастное изображение с большим набором оттенков, воспроизводимых при печати. Молибдат аммония имеет тенденцию плотно окружать большинство бактерий почти непроницаемым слоем. Поэтому для получения хороших результатов на таких крупных объектах, как клет-

ки бактерий, часто требуется окрашивание в течение коротких интервалов времени растворами небольшой концентрации (0,1—0,5 %).

Ожидаемые результаты

Какого рода информацию об основных чертах структуры бактерий можно получить методом негативного контрастирования? Это самый простой и самый быстрый метод, который только можно применить (исключая прямой просмотр, который почти бесполезен из-за отсутствия контраста), и поэтому его следует использовать первым. Можно быстро определить размер и форму микроорганизмов, подтвердить наличие жгутиков (вероятно, уже предполагавшееся при изучении подвижности) и выявить их расположение и тонкую структуру. Можно детализировать другие поверхностные отростки, такие, как ворсинки и фимбрии, или убедиться в присутствии слоя слизи или вещества капсулы. Выявляются также различия между прокариотами, окруженными мембраной, но лишенными клеточной стенки (микоплазмы или L-формы бактерий), и прокариотами, имеющими клеточную стенку.

Природу клеточной оболочки определяют путем разрушения клеток и фракционирования клеточных структур, благодаря чему появляется возможность ясно различить упорядоченную тонкую структуру слоев клеточной стенки. Этот прием позволяет разделить и сделать видимыми такие компоненты, как мембраны, мезосомы, другие цитоплазматические мембранные системы, газовые вакуоли, метаболические гранулы, рибосомы, жгутики, ворсинки и т. д. (Гидродинамические силы, возникающие при отборе раствора шприцем или при чрезмерно интенсивном пропускании его через пипетку, могут привести к отрыву жгутиков и ворсинок от клеточной поверхности.) Краситель проникает в периплазматическое пространство между мембраной и клеточной стенкой, и, благодаря тому что он заполняет все образуемые мембраной углубления, выявляются очертания мезосом. Это в свою очередь позволяет быстро (и обычно точно) определить, какую бактерию изучают — грамотрицательную или грамположительную.

Негативное контрастирование представляет собой также удобный способ наблюдения за деградацией клеток при их постепенном разрушении и за изменениями, вызываемыми обработкой такими агентами, как ферменты, антибиотики, поверхностно-активные вещества и т. д.

Используемый непосредственно, а лучше после индукции, метод негативного контрастирования незаменим при быстром обнаружении лизогенного состояния путем нахождения бактериофагов или еще не собранных их компонентов, что имеет большое значение при изучении ультраструктуры и стадий развития вирусов, а также взаимодействий вируса с клеткой-хозяином.

Результаты негативного контрастирования и других способов анализа с помощью трансмиссионной электронной микроскопии можно найти в работах, список которых приведен в конце главы [53—63].

4.1.2. Приготовление срезов [34—43]

Прокариотические клетки, которые собираются анализировать с помощью срезов, должны быть химически фиксированы, промыты и обезвожены для заливки в материал, способный прочно затвердевать. После заливки можно нарезать очень тонкие срезы, затем обработать препарат растворами солей тяжелых металлов и исследовать в электронном микроскопе. Хотя применяются многие различные комбинации, мы считаем, что в целом достаточно использовать фиксацию в глутаральдегиде и четырехокиси осмия или только в четырехокиси осмия с последующей заливкой в среду Спарра [43]. Имеется целый набор пластических материалов для заливки, но для обычных целей вполне подходит среда Спарра.

Осми-глутаральдегидная фиксация

1. К клеточной суспензии или жидкой культуре добавляют равный объем 5%-ного глутаральдегида в 0,2 М Na-какодилатном буфере, pH 7,4 (конечная концентрация глутаральдегида 2,5%). В другом варианте клетки центрифугируют и суспендируют осадок в 2,5%-ном глу-

таральдегиде в какодилате. (Какодилат токсичен; поставщики и прописи для этих и других веществ приводятся в разд. 4.6 и 4.7.) Перед этим этапом проводят отмывку в свежей среде или соответствующем буфере. Для некоторых прокариот, особенно некоторых микоплазм, лучше отказаться от какодилата и готовить глутаральдегид в разных концентрациях на свежей культуральной среде, чтобы сбалансировать осмотические свойства и (или) pH.

2. Пробы фиксируют 2—3 ч при комнатной температуре. В действительности время можно варьировать: обычно достаточно любого интервала больше 20 мин. (Мы с успехом подвергали обработке бактерии, путешествовавшие через всю страну в глутаральдегиде в течение нескольких дней.)

3. Осадок дважды промывают в веронал-ацетатном буфере Келенбергера с помощью центрифугирования.

4. Промытый осадок суспендируют в 1%-ной четырехокси осмия и оставляют на 6—16 ч при комнатной температуре. (Фиксированный глутаральдегидом осадок перед проведением этого этапа можно заключить в агар: см. этапы 6—8.) *Предупреждение:* работать с летучими и токсичными фиксаторами и другими веществами следует под тягой или по крайней мере надев очки и респиратор, чтобы защитить эпителий роговицы и дыхательных путей. Если чувствуется запах четырехокси осмия, глаза могут подвергнуться опасному воздействию паров. Для того чтобы исключить возможность повреждений, в лаборатории в определенном месте должен находиться комплект для промывки глаз [Nalge Co], используемый в случае необходимости.

5. Центрифугируют и промывают почерневший осадок, вновь суспендируют его в веронал-ацетатном буфере и еще раз центрифугируют.

6. Готовят 2%-ный агар марки «Noble» на веронал-ацетатном буфере и охлаждают его до 45°C. Добавляют к осадку 2—3 капли этого агара и быстро перемешивают при помощи теплой пастеровской пипетки.

7. Этой же пипеткой суспензию быстро разливают по очищенному спиртом предметному стеклу и дают агару застыть. Бактерии должны находиться в достаточной концентрации и быть равномерно распределенными. Чи-

стым бритвенным лезвием из застывшего агара нарезают кубики с ребром 1 мм.

8. Кубики суспендируют в 0,5%-ном водном уранилацетате и оставляют при 4°C на 16 ч. [Раствор уранилацетата нужно профильтровать (фильтры с диаметром пор 0,2 мкм, Millipore Corp.), чтобы предотвратить кристаллизацию при этой температуре.]

Осмиевая фиксация

1. Центрифугируют клеточную суспензию или культуру.

2. Осадок промывают, суспендируют его в свежей культуральной среде или веронал-ацетатном буфере, центрифугируют и суспендируют в среде с триптоном или в триптическом соевом бульоне. (Применять эти растворы не обязательно, но обычно они улучшают выявление рибосом и нуклеоидов [58, 59, 62].)

3. Взвесь центрифугируют и суспендируют осадок в 0,1%-ной четырехокиси осмия, приготовленной на веронал-ацетатном буфере. Фиксацию проводят в течение 2—4 ч при комнатной температуре.

4. Далее поступают так же, как на описанных выше этапах, с 3-го по 8-й.

Обезвоживание и заливка средой Спарра

1. Обработанные уранилацетатом агаровые кубики дважды помещают для промывки в 70%-ный этанол, каждый раз на 15 мин. Делают это в кювете на 4,5 мл (одна аптекарская драхма), используя 2—3 мл этанола.

2. Последовательно промывают пробы в 80%-ном и 95%-ном этаноле, по 15 мин в каждом.

3. Пробы помещают в 100%-ный этанол на 30 мин.

4. Этанол сливают и к пробам вновь добавляют 1 мл свежего 100%-ного этанола. Затем вносят 1 мл полной среды Спарра и смесь тщательно, но осторожно перемешивают. В этих условиях пробы оставляют на 30 мин, время от времени перемешивая, или до тех пор, пока кубики не осядут на дно кюветы (среду легче всего удалять, применяя разовые пластмассовые шприцы.)

5. Добавляют 1 мл среды Спарра и повторяют операцию.

6. Заменяют среду на новую (2,0 мл) и оставляют на 1—2 ч, пока кубики не осядут на дно.

7. В капсулы Бима размером 00 вкладывают типовые метки (в соответствующем держателе) и заливают в каждую один и тот же объем полной среды Спарра. (Мы заливаем 0,55 мл, чтобы окончательно получающийся блок точно входил в зажим микротомы фирмы LKB.)

8. При помощи заостренной деревянной палочки в каждую заполненную капсулу помещают по одному пропитанному кубику (6-й этап). Кубик должен опуститься на дно капсулы через 1 мин.

9. Капсулы со снятыми крышками (чтобы обеспечить улетучивание остатков любого растворителя) помещают в сушильный шкаф при 70°C на 16 ч для полимеризации. Сразу после вынимания из шкафа блоки, образовавшиеся в капсулах, могут показаться слегка мягкими, но они приобретут оптимальную для резки твердость через 2—4 ч при комнатной температуре.

Другие фиксаторы и среды для заливки

Для специальных целей разработано много разных фиксаторов, применяемых в различных комбинациях и разной последовательности. К ним относятся перманганаты и различные альдегиды, принципы использования которых, включая эффекты, зависящие от pH, буферов, ионной силы, концентрации, температуры и длительности фиксации, обсуждаются в многочисленных книгах [34—39]. Для заливки применяют очень много сред [34—39] по отдельности или в смесях, причем выбор среды отчасти зависит от того, какая из них доступна. Чаще всего, вероятно, применяется эпон 812 (хотя есть сведения, что он вскоре не будет поставляться производящей его фирмой, а будет заменен подобными средами, выпускаемыми другими фирмами). Для заливки используются также дуркупан, аралдит, мараглас, вестопал, для специальных целей различные метакрилаты и множество эпоксидных смол. Подробное описание свойств этих сред и советы по их применению читатель

найдет в соответствующей литературе. Мы остановились здесь на детальном описании единственной методики, которая является наиболее удовлетворительной.

Подготовка блоков

Перед тем как делать срезы, застывшие блоки, находящиеся в капсулах Бима или в капсулах других типов, следует вынуть и довести до подходящих размеров и формы. Заливать можно в плоские желатиновые капсулы или в специальные плоские формы, и в соответствии с этим существуют различные методы подготовки блоков [42]. Новейшие модели микротомов часто содержат устройства для подготовки блоков; такие устройства выпускаются также отдельно. Методика подготовки блоков заключается в следующем.

1. Капсулу обжимают со всех сторон плоскогубцами, чтобы блок не очень плотно прилегал к ее стенкам. Затем сжимают вершину пирамиды капсулы и продвигают блок до полного высвобождения. (Блоки можно также высвобождать с помощью продольных бритвенных разрезов капсулы с двух сторон.) Блок закрепляют в держателе вершиной пирамиды вверх и помещают держатель в зажим микротомы.

2. Глядя в бинокулярный микроскоп, подрезают очищенной этанолом бритвой верхушку пирамиды блока (по которой будет проходить срез после установки в ультрамикротоме), чтобы он смог войти в ячейку. Обрезают блок со всех четырех сторон под углом 30° (угол пирамиды у блока, находящегося в капсуле, равен 60°), продвигаясь по направлению вниз от образовавшейся площадки; в результате остается маленькая усеченная пирамида (верхняя поверхность — квадрат со стороной ~ 1 мм), из которой готовят срезы. Тщательно работающий исследователь, обладающий определенным навыком, быстро выучивается получать хорошие блоки, срезаемая поверхность которых имеет трапециевидную форму. Однако лезвие бритвы обязательно оставляет после себя относительно крупные бороздки, которые идут под прямым углом к верхней площадке усеченной пирамиды; в связи с этим при прохождении среза на поверхность может выступать вода, мешающая получению хо-

роших результатов. Мы предпочитаем делать дальнейшую тонкую доводку поверхности, по которой пойдет срез, и боковых граней пирамиды микротомом; при этом любые неровности на гранях располагаются параллельно краям верхней поверхности блока. Тонкая доводка при помощи микротома описана в литературе [42].

Приготовление срезов

Поскольку в каждой лаборатории существуют свои методики и свои способы работы на микротоме, мы не будем описывать здесь сам процесс нарезания. Описание методов, приемов работы на микротоме и скрытых трудностей, с которыми при этом сталкиваются, подробно изложено во многих работах и руководствах по электронной микроскопии, а также в проспектах и инструкциях, выпускаемых изготовителями микроскопов [39, 40, 42]. Помимо этого, некоторые фирмы (например, LKB Instruments) проводят семинары или организуют в соответствии с поступившими запросами краткие курсы обучения по работе на ультрамикротоме. Мы полагаем, что исследователь, изучающий анатомию бактерий, имеет возможность обратиться за помощью к специалисту по ультрамикротомии, который способен проинструктировать его или в крайнем случае довести до нужного качества срезы, уже заключенные на сетках и готовые к окраске.

Ножи

Для приготовления ультратонких срезов применяются как стеклянные, так и алмазные ножи. Стеклянные ножи, которые, безусловно, дешевле, готовятся вручную или (с большей точностью и в больших количествах) при помощи аппарата, делающего ножи, такого, например, как LKB 7800 Knife Maker. Производство стеклянных ножей описано в литературе [34—40, 42] и в сопроводительных руководствах к соответствующим аппаратам. Стеклянные ножи используются лишь для подготовки верхней и боковых поверхностей блоков. Выбор ножа для приготовления срезов зависит от финансовых возможностей, вкусов и опыта исследователя, а также

от применяемого для заливки полимера. В некоторых случаях предпочитают стеклянные ножи, использование которых дает прекрасные результаты. Использование алмазного ножа дает более воспроизводимые результаты, по мере того как оператор привыкает к его режущим и другим свойствам при постоянном применении стандартной заливки. Требования к углу лезвия могут различаться в зависимости от типа заливки, так что необходимая величина угла должна оговариваться при покупке алмазных ножей. В случае самых общепринятых сред для заливки бактериальных препаратов (эпон, мараглас, аралдит), а также для несколько более мягкой среды Спарра, которую мы используем чаще всего, вполне подходит величина угла от 42 до 45°. При заливке этими средами, тщательном исполнении всех операций и соблюдении предосторожностей в работе можно использовать один алмазный нож хорошего качества в течение 5 лет и более. Естественно, срок службы ножа зависит также от количества производимых с его помощью срезов.

Окраска уранилацетатом

Поскольку по описанной методике материал, находящийся в блоке, окрашивается еще до заливки, окраска срезов уранилацетатом обычно не требуется. Если хотят дополнительно усилить контраст или если находящийся в блоке материал не окрашен, то поступают следующим образом.

1. Наполняют соответствующее количество крышек от капсул Бима размером 00 1%-ным уранилацетатом, приготовленным либо на воде, либо на 70%-ном этаноле, до появления положительного мениска. (Если растворы водные, то капли можно наносить на пластинку чистого зубного воска.)

2. Каждую сетку со срезом, обращенным вниз, опускают на поверхность красителя, так чтобы она держалась на плаву. Пастеровской пипеткой осторожно отсасывают небольшое количество жидкости, добиваясь центрального расположения сеток в крышке.

3. Сетки накрывают крышкой от чашки Петри и пробы оставляют окрашиваться на 30 мин.

4. Крышки поднимают, сетки берут пинцетом, погружают для промывки три раза в дистиллированную воду и высушивают на фильтровальной бумаге.

Окрашивание цитратом свинца

Некоторые экспериментаторы в своих целях используют окраску только уранилацетатом, но иногда получаемый при этом контраст бывает относительно слабым, а увеличение длительности окрашивания приводит к нежелательной зернистости. Для придания дополнительного контраста и для окрашивания некоторых компонентов, слабо проявляющихся за счет одного лишь урана, применяют обычно цитрат свинца (разд. 4.6.4). Его удобно хранить, а при разливке пластмассовым шприцем легко исключить контакт этого реактива с воздухом. В нашей лаборатории принята следующая схема его использования.

1. Окрашивание проводят в стеклянной чашке Петри, дно которой покрыто застывшим зубным воском. Пластмассовым чашкам восковое покрытие не требуется, так как единственная преследуемая при этом цель — получить выпуклые, изолированные друг от друга капли красителя.

2. Три маленькие склянки для взвешивания наполняют бидистиллированной или деионизованной водой и в дальнейшем используют их для промывки.

3. В камеру для окрашивания ставят пластмассовую чашку для культур тканей с размерами 35×100 мм на диске из фильтровальной бумаги, имеющем немного большие размеры. Чашку наполняют гранулами NaOH, а бумагу смачивают 0,02 н. NaOH.

4. Наносят несколько капель раствора цитрата свинца на восковую или пластмассовую поверхность. Немедленно накрывают все крышкой от чашки Петри, чтобы избежать образования нерастворимого карбоната свинца за счет взаимодействия с CO_2 воздуха. Присутствие в чашке NaOH также предотвращает появление нерастворимого карбоната свинца, так как щелочь поглощает CO_2 с образованием углекислого натрия.

5. Когда все готово, поднимают крышку и на каждую округлую каплю кладут в перевернутом виде сетки

поверхностью среза вниз. Камеру быстро закрывают крышкой и оставляют для прокрашивания на 3—5 мин (оптимальное время определяют экспериментально).

6. Сетку вынимают пинцетом и быстро погружают по пять раз подряд в каждую промывную склянку с водой. Для удаления воды прикасаются краем сетки к фильтровальной бумаге и оставляют на ней сетки для просушивания.

Замечание: по неизвестным причинам кратковременная обработка уранилацетатом, за которой следует обработка цитратом свинца, приводит к более интенсивному включению свинца.

4.1.3. Прямая микроскопия

Бактериальные препараты можно прямо исследовать с помощью трансмиссионного электронного микроскопа; при этом, однако, экспериментатор лишается тех преимуществ по усилению контраста, которые дают негативные красители. Исследуемые микроорганизмы можно вырастить на формваровой или коллодиевой подложке или поместить их на эти подложки и просматривать на любой стадии роста. Однако и в этом случае исследователь получит очень ограниченную информацию, за исключением опытов, когда интересуются электроноплотным материалом, присущим самому образцу. Вместе с тем негативно контрастированные образцы позволяют получать гораздо большую информацию о структуре, тогда как время, затрачиваемое на негативное контрастирование, совершенно незначительно.

К другим методам прямого исследования относятся имеющие высокое разрешение темнопольная электронная микроскопия и электронно-оптическая фазовая микроскопия. Эти методы не имеют большого значения для исследователей, начинающих изучать структуру бактерий, так как, чтобы их применять, нужны специальные микроскопы и особая обработка образцов. Специальным методом является также высоковольтная электронная микроскопия, которая, помимо того, что она дает высокое разрешение, позволяет исследовать образцы с большой толщиной без излишнего повреждения электронным

пучком. (Интересующихся отсылаем к цитируемой литературе, в особенности к многотомнику [7], т. 3, гл. 3 и 4.)

4.1.4. Оттениение металлами [44, 45]

Из-за растущей популярности и доступности сканирующих электронных микроскопов использование оттениения металлами сокращается. Однако, подобно сканирующему микроскопу, этот метод позволяет получать детальные изображения поверхностных структур и определять размеры бактерий, что может оказаться полезным ввиду большей разрешающей способности трансмиссионного электронного микроскопа; им можно легко воспользоваться в отсутствие сканирующего электронного микроскопа.

Тень формируется в результате отложения под определенным углом электроноплотного материала на образце во время пребывания в вакуумном испарителе. Те области, которые расположены под углом к направлению напыления металла, остаются не покрытыми им и, будучи менее электроноплотными, пропускают электроны. В результате электроны как бы очерчивают эти области, которые на обработанном негативе видны в виде черных теней. Поскольку выглядит это, как позитивное изображение, обычно (хотя и не всегда) негативы обращают контактным способом и для воспроизведения позитивного изображения окончательные фотографические отпечатки получают с обращенных негативов. (Техника оттениения хорошо описана в гл. 5 [11] и в гл. 4 и 5 т. 2 многотомника [7].) Прямое оттениение испаряющимися металлами применяется по отношению к целым клеткам или их компонентам, бактериофагам или различным суспензиям; этот метод используется также для анализа реплик, приготовленных из интактных препаратов или при замораживании—скалывании и замораживании—травлении (см. ниже). Помимо очерчивания поверхностных неровностей и периодически повторяющихся структур, техника оттениения может применяться для измерения высоты образца по вертикали посредством нахождения длины тени и геометрических расчетов, опирающихся на известный угол оттениения. Измерению

помогает нанесение на сетку в целях калибровки стандартного объекта, такого, например, как латексные шарики известного размера. Оттенивание проводится следующим образом.

1. Исследуемый образец, не содержащий внешних загрязнений, предварительно фиксируют, но это не обязательно.

2. Образец помещают на покрытую формваром сетку и подсушивают. Сетку прикрепляют к липкой с обеих сторон ленте, находящейся на предметном стекле, вместе с маленьким кусочком тонкой фильтровальной бумаги, служащим визуальным индикатором количества напыленного при испарении металла. (На части кусочка бумаги делают складки, чтобы иметь для сравнения напыленные и ненапыленные стороны.)

3. Предметное стекло помещают в напылительную установку на столик для образцов. (Мы применяем вращающийся столик Fullam № 1205 в испарителе модели Varion VE 10, снабженном охлаждаемой жидким азотом ловушкой для увеличения вакуумного разрежения. В каждой лаборатории имеются свои приборы и приемы изменения угла оттенения между сеткой с образцом и нитью металла.)

4. Платино-палладиевую проволоку закручивают вокруг удерживаемой между электродами вольфрамовой нити (Fullam № 1623), сделанной из стандартной вольфрамовой проволоки диаметром 0,7 мм. Платино-палладиевая проволока длиной 1 мм содержит 80% платины и 20% палладия (Fullam № 1221). Перед ее закручиванием сначала разогревают в вакууме вольфрамовую нить до белого каления и только после этого открывают испаритель и укрепляют платино-палладиевую проволоку. (При этом происходит дегазация вольфрамовой нити, что улучшает вакуум во время последующего испарения металла и снижает напряжения, возникающие в проволоке при ее изгибе; это способствует увеличению срока службы нити.)

5. Источник металла — обмотанную вокруг вершины V-образной вольфрамовой нити платино-палладиевую проволоку — располагают примерно в 12 см над сетками под желаемым углом. После того как в испарителе устанавливается хороший вакуум (10^{-5} мм рт. ст.), вклю-

чают быстрый нагрев металла до точки плавления. В таком состоянии система находится до тех пор, пока не испарится весь металл или пока напыление на видимой глазом индикаторной фильтровальной бумаге не покажется достаточным. Чтобы судить об этом, требуются некоторый навык и опыт.

6. Иногда, чтобы получить минимальный фон и меньшую по сравнению с платинопалладиевым сплавом зернистость, полезно применять напыление окисью вольфрама. Для этого V-образную вольфрамовую нить нагревают на воздухе, пока она не покроется желтой окисью вольфрама (WO_2). Кристаллы окиси вольфрама счищают скальпелем, оставляя их лишь на вершине V-образной нити; нить помещают в испаритель между электродами и далее проводят оттенение, как описано выше.

4.1.5. Получение реплик [44, 45]

Реплики представляют собой слепки (отпечатки), которые ввиду их непрочности и прозрачности для электронов не подходят для прямого микрофотографирования и должны напыляться металлом. Тонкие пленки материалов, прозрачных по отношению к электронам (обычно коллодия, формвара или поливинилового спирта), находясь в контакте с изучаемыми поверхностями и структурами, образуют слепок, тем самым как бы очерчивая их. Реплики, в которых в процессе отслаивания от поверхности-оригинала и перехода пленки в плавающее состояние оказались захваченными некоторые частицы, считают ложными.

Получение реплик существенно для анализа поверхностей методом замораживания — скалывания и замораживания — травления. Обычно реплики готовят (с применением платино-углеродного напыления) на сколотых образцах, содержащихся при -100°C . Техника замораживания — скалывания играет важную роль при исследовании внутренней структуры клеточной мембраны, а также образцов, которые не фиксировались и не изменялись путем химических воздействий. Однако для ее применения необходимо специальное оборудование и соответствующий опыт в работе. Описание конкретных методов получения реплик выходит за рамки настоящего руководства [46—48].

4.1.6. Нуклеиновые кислоты

С тех пор как вышла работа Кляйншмидта и Цана [74], нанесение отдельных молекул нуклеиновых кислот на белковый или другой монослой с последующим контрастированием ураном и оттенением вращающегося образца с целью микроскопирования стало широко распространенным приемом, претерпевшим некоторые модификации. Метод Кляйншмидта и Цана, чрезвычайно важный в молекулярной микробиологии и генетике микроорганизмов, хорошо описан в соответствующих работах [71—73, 75] и во многих специальных публикациях. Определение гомологии молекул плазмидных ДНК можно найти в разд. 15.3.5.

4.2. СКАНИРУЮЩАЯ ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ

Характерные черты и преимущества сканирующей электронной микроскопии отмечались выше, в вводном разделе. Для бактериолога ценность микроскопии этого вида заключается в том, что с ее помощью можно получать трехмерное изображение микроорганизмов, различать детали строения поверхностей (в пределах разрешения) и выявлять пространственные взаимосвязи бактерий, растущих в виде разнообразных ансамблей. Приготовление образцов включает в себя фиксацию находящегося на поверхности (например, на покровном стекле) материала, закрепление в держателе (этого этапа может не быть), иногда промывку и другие обработки, высушивание до критической точки или другими способами и обычно — напыление золотом или еще каким-либо тяжелым металлом в вакууме перед микроскопированием. На эти процедуры уходит довольно много времени, и для их выполнения нужны специальные навыки. Если учесть также недоступность сканирующего электронного микроскопа для многих лабораторий, то станет ясно, что исследователю, изучающему бактериальные структуры, по-видимому, не стоит начинать микроскопический анализ со сканирования — легче и быстрее достаточно детальную информацию можно получить с помощью негативного контрастирования. Для

тех, кто имеет все необходимое и интересуется применением сканирующей электронной микроскопии для решения отдельных проблем, предлагаются многочисленные литературные источники [49—52, 64—70].

4.3. ФОТОГРАФИЯ

Электронные микрофотографии являются итогом, отражающим деятельность микроскописта, поэтому правильная съемка и обработка фотографий представляют собой существенные этапы исследования. Большинство микроскопов приспособлены для съемок на фотопластины, рулонную пленку или и на то, и на другое. Рулонная пленка (35 мм) дешева и ее легко хранить. Стеклопластиковые фотопластины легко бьются, тяжелы и требуют множества дорогих приспособлений для хранения. В настоящее время стеклянные пластины в основном заменены на покрытые эмульсией пленки, сделанные на основе эстара, которые устойчивы к изменению размеров и удобны для хранения.

Основная трудность, связанная с работой с фотопленками, заключается в том, что как эмульсия, так и основа поглощают водяные пары. Поэтому предусмотрительный микроскопист хранит их покрытыми светонепроницаемыми пластинами вместе с набором алюмоосушителей. Пластины делают из листа алюминия, идущего на изготовление заслонки перед игольчатым вакуумным клапаном. Пленку, отрезанную на нужную длину, или отстоящие друг от друга стопки нарезанной пленки помещают для высушивания на подложку в виде сетки. На дно сосуда, находящегося в темной комнате, ставят поддон с пятиокисью фосфора, которую перемешивают при каждом его открывании и в случае необходимости заменяют. Умеренное разрежение и химический осушитель способствуют хранению пленки в сухом виде. Благодаря наличию предварительного вакуума устраняется необходимость продолжительной работы вакуумного насоса в электронном микроскопе. В некоторых микроскопах осушители встроены, но они редко удовлетворяют рекомендованным выше условиям хранения.

По нашему опыту для обычных целей лучше всего подходит мелкозернистая позитивная пленка (Kodak;

35 мм), если только микроскоп приспособлен для работы с ней. Для камер с фотопластинами мы применяем Kodak Electron Image film № 4489 — пленку в виде листов, сделанную на основе эстара, которая имеет превосходную стабильность размеров и устойчива к разрыву. Она заменяет стеклянные пластины и сходную по свойствам пленку (№ 4463), не поступающую больше в продажу. За более подробными инструкциями следует обратиться к проспекту Kodak Data Release, с. 198, выпущенному вновь в феврале 1980 г., в котором описаны характеристики этой пленки и способы ее проявления. Это вполне естественно, что в любом случае прежде всего необходимо познакомиться с данными и рекомендациями, предоставляемыми фирмой-изготовителем. Затем с опытом придет умение устанавливать выдержку, проявлять и добиваться на негативе желаемого контраста.

Умение фокусировать и получать резкие негативы приходит с опытом, но полезно напомнить, что при больших увеличениях точно установленный фокус не обязательно является лучшим для печатания негатива. Поэтому неплохо иметь привычку делать 3—5 «околофокусных» снимков для каждого нужного поля зрения, пытаясь получить истинный фокус в положении, немного отклоняющемся от среднего. Смещение при каждом шаге меняется от 0,05 мкм (при увеличении на пленке 30 000X) до 0,4 мкм (при увеличении на пленке 4000X).

При печатании электронных микрофотографий требуется особое внимание к мельчайшим деталям. Очень важно пользоваться высококачественным увеличителем. Имейте в виду, что увеличители с конденсорами, работающими от точечного источника, передадут каждую царапину, имеющуюся на неэмульсионной стороне пленки. Для воспроизводимости полезны автоматические экспонометры, калибруемые для каждого типа применяемой фотобумаги один раз (например, Lectra PTM-4A Densitimer). Следует иметь широкий выбор фотобумаги, поскольку неизбежна некоторая разница в негативах. Этому удовлетворяет система множественной градации фотобумаги с применением соответствующих светофильтров или набора бромированных типов бумаги с номерами контрастности от 2 до 6. В последнее время участилась

практика поставки бумаги с эмульсией, покрытой специальной смолой (обозначается RC — от англ. resin-coated). Такая бумага быстро обрабатывается и быстро высыхает, а главное ее достоинство состоит в том, что она не нуждается в глянцеваии. В больших лабораториях применяют аппараты для автоматизированной обработки, стабилизированную фотобумагу, увеличители с автоматическим контролем контраста и т. п.

Поскольку в разных лабораториях электронные микроскопы, условия съемки, качество пленок и обычные процедуры обработки несколько различаются, мы не будем здесь приводить детальные описания методик Исследователю, осваивающему все это, следует проконсультироваться с опытными исследователями и ознакомиться с приведенными в списке литературы статьями по этому предмету [76—82].

4.4. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Микроскопист должен уметь соотносить увиденное им в электронном микроскопе или на электронных микрофотографиях с тем, что уже известно (или не известно) об анатомии бактерий, т. е. уметь интерпретировать свои результаты. Для этого необходимо иметь некоторые знания в исследуемой области; предполагается, что исследователь, собирающийся изучать бактерии с помощью электронного микроскопа, прослушал курс лекций или читал соответствующую литературу и в общих чертах знаком с ультраструктурой микробов. К сожалению, иллюстрированные атласы, по которым можно легко и быстро сравнивать различные роды и типы микроорганизмов, редки и их трудно найти. К полезным источникам, если только они доступны, относятся атлас, который составили Авакян и др. [53] (текст написан по-русски, а названия бактерий — по-английски), статьи в книге под редакцией Фулера и Ловелока [54, 56, 57, 60, 63], работы Гринхала и Эванса по грибам [55], Ликфелда по бактериям [61], а также Корменди [66] и Ёшии с соавторами [70] по сканирующей электронной микроскопии в микробиологии. В дополнение или взамен этого обучаемый может положиться на советы на-

ставника в подборе изобилующей ныне литературы по электронной микроскопии бактерий.

В точном смысле слова «интерпретация» может толковаться как извлечение наибольшего количества информации из электронной микрофотографии. Обычно это относится к деталям тонко организованной, периодически повторяющейся структуры, которая присутствует, например, в жгутиках или дополнительных белковых слоях клеточной оболочки. Для квалифицированной работы получение удовлетворительной микрофотографии — только первый этап; она включает также методы увеличения изображения и реконструкции, в том числе обработку с помощью вычислительной техники. Для этих методов требуется сложное оптическое и другое оборудование, доступное не для каждой электронно-микроскопической лаборатории, описание которого выходит за пределы поставленных перед данным руководством целей. Интересующиеся могут обратиться за советом к специалистам или ознакомиться с соответствующей литературой [76—82].

4.5. ИДЕНТИФИКАЦИЯ

Предметом специальных исследований является определение сходства или различий бактериальных антигенов, а также их локализации независимо от того, где находятся антигены — внутри или на поверхности клетки. Большое значение имеет также изучение клеточной локализации ферментов и других клеточных компонентов. Для реализации этого полезны методы с применением метки, благодаря которым появляется возможность микроскопически идентифицировать добавленные вещества, выявить их специфическое связывание с другими компонентами или химические взаимодействия. Существует несколько подобных методов, но большинство из них требует слишком много времени, некоторые технически сложны, а некоторые редко дают удовлетворительные результаты. Имея все это в виду, мы не будем здесь подробно останавливаться на этих сложных методах, а ограничимся лишь замечаниями относительно их принципов и ссылками.

4.5.1. Антигены

В наиболее широко используемых методах выявления бактериальных антигенов *in situ* применяются фракции антисывороток или антител, меченных флуоресцирующими красителями, такими, как флуоресцеин или родамин (разд. 1.4.). Связывание, которое происходит исключительно с поверхностными антигенами интактных бактерий, выявляется с помощью оптической темнопольной микроскопии с ультрафиолетовым светом, прошедшим через соответствующие светофильтры, чтобы вызвать характеристическую эмиссию флуорохрома в видимой области. Этот метод очень важен в диагностических и таксономических исследованиях, и поэтому промышленностью выпускается множество меченых антисывороток. По теории и практике этого вопроса опубликовано много трудов [83—85].

Принцип использования флуоресцирующих антител был приспособлен и для электронной микроскопии: антитела или гаптены соединяются с электроноплотными веществами (например, с железосодержащим белком ферритином) или такими, которые могут быть сделаны электроноплотными уже после реакции антиген — антитело (например, с антителом связывается пероксидаза из хрена, которой после связывания дают возможность реагировать с диаминобензидином). На практике используется множество комбинаций, включающих антисыворотки с различными специфичностями, фрагменты антител, гаптены, а также такие маркеры для визуализации, как небольшие вирусы и т. п. Эти методы, применимые к целым бактериям, позволяют локализовать *поверхностные* антигены точнее, чем это делают с помощью оптического микроскопа. Преимущества электронной микроскопии становятся еще более очевидными, когда меченые антитела применяют еще до фиксации, заливки и приготовления срезов, так что метка видна в тонких срезах. В некоторых случаях аналогичным образом метят не антитела, а другие вещества с известной специфичностью: чаще всего применяются лектины растений, такие, как конканавалин А, которые специфично связываются с сахарными остатками [88].

Выявление *внутриклеточных антигенов* [89] в интактных бактериях представляет собой более сложную задачу, чем локализация поверхностных антигенов, так как антитела не способны проходить через интактную клеточную оболочку. Поэтому методы решения задач такого рода опираются прежде всего на приготовление тонких срезов бактерий, переносимых затем на поверхность растворов с мечеными антителами, после чего следует промывка, иногда окрашивание и затем исследование с помощью электронного микроскопа. Главная трудность заключается в выборе среды для заливки, которая должна давать доступ для связывания антителам в *водном растворе*. В этих целях испробовано много различных веществ (метакрилаты, сшитый альбумин, различные протравленные пластмассы и эпоксидные смолы), но ни одно из них не может считаться удовлетворительным во всех отношениях; в этой области необходимы дальнейшие исследования. Интересующиеся могут получить общее представление о методах и проблемах иммуноцитохимии или иммуноэлектронной микроскопии, изучив предлагаемую литературу [87—91].

4.5.2. Ферменты

Проблема точной локализации ферментативных активностей в той форме, в какой они реализуются в клетке, давно стоит на повестке дня в гистохимии, а ныне — в цитохимии на уровне электронной микроскопии. Для ферментов разных типов используются различные методы. Это зависит от того, насколько возможно применение искусственных или меченых субстратов, которые в нормальных условиях транспортируются в клетку и вступают в реакцию, образуя продукт, видимый либо в световой, либо в электронный микроскоп. Изучению ферментативных активностей посвящена обширная литература, на которой мы не можем останавливаться из-за ограниченного объема настоящего руководства. Необходимую информацию читатель найдет в многочисленных работах, которые публикуются в журналах, посвященных исключительно гистохимии и цитохимии [86].

4.5.3. Радиоавтография

Другая большая область знаний, исследования в которой, подобно использованию меченых антител в гистохимии, перешли с оптического на электронно-микроскопический уровень, посвящена изучению поведения внутри клетки веществ, меченных радиоактивными атомами, их распределению и локализации. Радиоактивная техника применима к широкому кругу проблем, но в случае бактерий (из-за их малого размера) необходимо особое внимание к условиям опыта и качеству эмульсии, которая должна обеспечивать минимальную зернистость. Принципы и методы техники с применением радиоактивных веществ достаточно полно описаны в ряде книг [92—95].

4.6. МАТЕРИАЛЫ

Поставщики перечисленных ниже материалов обозначены буквами (в скобках) в соответствии со списком, представленным в разд. 4.7.

4.6.1. Материалы для приготовления пленок-подложек

Формвар, порошок (и, к, о, т)

Растворы формвара (и, к, т)

Дихлорэтан (з, и, к, о, п, т)

Чистые микроскопические стекла

Неволокнистый протирочный материал (и, к, о, р,)

Большие металлические (или пластмассовые) лотки или кюветы

Большая стеклянная чашка с вертикальными стенками. Оптимальные размеры 200×80 мм (культуральная чашка Vitro; о, у). Крышка должна быть ровной и гладкой. Дно и стенки постоянно покрыты черной изолентой, чтобы легче было видеть плавающие пленки на черном фоне

Черная изоляционная лента

Стеклянная палочка, длина которой больше диаметра чашки

Стеклянные кюветы Коплина для окрашивания (а, з, о, у)

Пастеровские пипетки и резиновые груши

10%-ная плавиковая кислота в тефлоновом контейнере (з)

Бритвенные лезвия, отмытые спиртом

Фильтровальная бумага (Whatman № 1), кружки диаметром 9,0 см (а, з)

Стандартные чашки Петри диаметром 9,0 см

Ножницы

Пинцет для сеток Dumont № 5 или эквивалентный ему (и, к, о, п, с, т). (Вокруг основания пинцета можно сделать одну-две петельки из нихромовой проволоки, которые продвигаются вперед для смыкания кончиков пинцета на сетке, что помогает предотвратить случайное выпадение сеток. Если такие петельки сделаны, нет необходимости покупать дорогостоящий пинцет, имеющий специальную конструкцию для захвата сеток.)

Медные сетки, предварительно очищенные (е, и, к, л, о, п, с, т)

Люминесцентная лампа

4.6.2. Материалы для приготовления углеродных пленок

Высоковакуумные испарители и дополнительные принадлежности (б, и, к)

4.6.3. Материалы для негативного контрастирования

Сетки с подложкой, приготовленные, как описано, или купленные (и, к, т)

Липкая лента (Tape Tare) (а, з, о)

Предметные стекла

Зеростат (г, о)

Пастеровские пипетки

Ацетат аммония (з, п)

Молибдат аммония (з, н, т)

Фосфорно-вольфрамовый калий (е, и, к, о, п, т)

Уранилацетат (е, з, и, к, п, с, т)

4.6.4. Материалы для фиксации, заливки, приготовления срезов и окраски срезов

Глутаральдегид (е, з, и, к, о, п, т)

На-какодилатный буфер

4. ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ

Может быть куплен как буфер или как набор заранее отмеренных ингредиентов (т). В другом варианте концентрацию какодилата натрия (е, з, и, к, о, п, т) доводят в воде до 0,2 М, а рН — до 7,2, добавляя HCl. (*Предупреждение* какодилат токсичен; необходимо избегать контакта с ним и вдыхания содержащих мышьяк паров)

Веронал-ацетатный буфер

Может быть куплен как буфер (к, п) или приготовлен из вероната натрия (п) по следующей прописи для *исходного концентрированного раствора*:

Веронал натрия (барбитал натрия)	2,94 г
Ацетат натрия, водный	1,94 г
Хлористый натрий	3,4 г
Дистиллированная вода	100 мл

Из этого раствора готовят каждый день *рабочий буфер*:

Исходный концентрированный раствор	25,0 мл
Дистиллированная вода	96,5 мл
1 н. HCl	3,5 мл
1 н. CaCl ₂ (110,98 г/л)	1,25 мл

В колбу на 125 мл вливают 25 мл концентрированного раствора. К 90 мл воды в мерном цилиндре на 100 мл добавляют 3,5 мл 1 н. HCl и доливают до 100 мл водой. Этот раствор вливают в колбу с концентрированным раствором, добавляют туда 1,25 мл 1 н. CaCl₂ и перемешивают. (*Замечание*: если клетки, которые должны промываться в этом буфере, до этого подвергались действию фосфатов или в культуральных средах, или в фосфатном буфере, необходимо иметь для начальных промывок рабочий буфер, приготовленный без CaCl₂, чтобы избежать выпадения осадка фосфата кальция. После такой предварительной промывки можно пользоваться полным буфером.)

Защитные очки

Четырехокись осмия (е, з, и, к, о, п, т)

Агар марки Noble (в)

Уранилацетат (е, з, и, к, о, п, т)

Триптон (в)

Триптический соевый бульон (в)

Стеклянные кюветы с закручивающейся крышкой объемом в одну аптекарскую драхму (о, п)

Респиратор, Gasfoe (м)

Разовые пластмассовые контейнеры объемом в 4,5 унции (около 130 мл) (а, ж, з)

Среда Спарра:

Поставляется в виде набора (и, к, п) или в виде ингредиентов (т), которые должны использоваться для приготовления исходной смеси, как описано ниже.

Исходная смесь:

ERL-4206 (двуокись винилциклогексана)	30 г или 27,0 мл
DER-736 (диглицидиловый эфир пропилен-гликоля, эпоксицидная смола)	24 г или 22,8 мл
NSA (нонениллантарный ангидрид)	78 г или 76,5 мл

Под тягой или надев специальную маску, добавляют все три компонента в указанном выше порядке в разовый контейнер Falcon № 4013 с перемешиванием на магнитной мешалке. В течение 5 мин перемешивают при комнатной температуре. Эту концентрированную смесь без затвердителя можно хранить в плотно закрытом сосуде при -4°C 3—5 мес. При таком хранении перед открыванием сосуда и после взятия смеси оставшуюся смесь следует выдерживать в течение времени, достаточного для повышения ее температуры до комнатной, чтобы избежать конденсации воды, способной ее испортить.

Полная смесь:

Чтобы приготовить полную смесь, 22 мл концентрированной смеси помещают в разовый контейнер, добавляют 0,24 мл затвердителя S-1 (диметиламиноэтанола) и перемешивают на магнитной мешалке в течение нескольких минут при комнатной температуре. (Для каждого бактериального осадка или другого образца, который должен быть залит, но не для каждого агарового кубика, в который заключен объект, следует использовать по крайней мере 6 мл полной смеси. Этого объема хватит для приготовления нужного количества смесей, применяемых на этапах с 4-го по 6-й при проведении обезвоживания и заливки, а также для заполнения трех капсул Бима. Ясно, что если из каждого образца хотят получить больше чем три блока, нужно взять больше смеси. Аналогичным образом, если работа одновременно ведется более чем с тремя осадками или образцами, начальный объем полной смеси должен быть больше чем 22 мл; последнюю готовят в тех же пропорциях.) Время, в течение которого хранящаяся в контейнере полная смесь может использоваться, составляет всего 2 дня.

Капсулы Бима (каталоговый номер 23200, размер 00) (и, к, о, п, т)

Сушильный шкаф

Центрифуга Brinkmann 3200 (Erpendorf).

Плоскогубцы

Бритвенные лезвия с одним режущим краем

Ультрамикротом

Стеклянные пластинки

Аппарат для изготовления стеклянных ножей

Алмазный нож (д)

Зубной воск

Склянки для взвешивания

Пластмассовая чашка для культур тканей, 35×
×100 мм

Гранулы NaOH

Чашки Петри, стеклянные или пластмассовые

Цитрат свинца:

Выпускается готовый к применению препарат (и, к, о, п, т).

Может быть также приготовлен по методу Рейнольдса (J. Cell Biol., 17, 208—212, 1963), как описано ниже.

В 50-миллилитровую мерную колбу добавляют:

Нитрат свинца	1,33 г

Цитрат натрия	1,76 г

Дистиллированную воду	30,0 г

Встряхивают в течение 1 мин и выдерживают при комнатной температуре 30 мин. Добавляют 8 мл свежеприготовленного 1 н. NaOH и разводят водой до 50 мл

4.7. ФИРМЫ-ИЗГОТОВИТЕЛИ

- a. Curtin-Matheson Scientific, Inc., 10727 Tucker St., Beltsville, MD 20705
- б. Denton Vacuum Inc., Cherry Hill Industrial Center, Cherry Hill, NJ 08003
- в. Difco Laboratories, P. O. Box 1958A, Detroit MI 48232
- г. Discwasher, Inc., 1407 N. Providence Rd. Columbia, MO 65201 (or local photo stores)
- д. Dupont Instruments, Biomedical Division, Newtown, CT 06470
- е. Electron Microscopy Sciences, P. O. Box 251, Fort Washington, PA 19034
- ж. Falcon Labware Division, 1950 Williams Dr., Oxnard CA 93030
- з. Fisher Scientific Co., 1 Reagent Lane, P. O. Box 375, Fairlawn, NJ 07410
- и. Ernest F. Fullam, Inc., P. O. Box 444, Schenectady, NY 12301
- к. Ladd Research Industries, Inc., P. O. Box 901, Burlington, VT 05401
- л. LKB Instruments, Inc., 12221 Parklawn Dr., Rockville, MD 20852
- м. Mine Safety Appliances Co., Pittsburgh, PA 15208
- н. Nalge Co., Division of Sybion Corp., Rochester, NY 14602
- о. Ted Pella Co., P. O. Box 510, Tustin, CA 92680
- п. Polysciences, Inc., Paul Valley Industrial Park, Warrington, PA 18976
- р. Sorg Paper Co., Middletown, Ohio 45042
- с. SPI Supplies, P. O. Box 342, West Chester, PA 19380
- т. Tousimis Research Corp., P. O. Box 2189, Rockville, MD 20852
- у. Wheaton Scientific (Vitro), 1000 North 10th St., Millville, NJ 08332

4.8. ЛИТЕРАТУРА

4.8.1. Общая литература

1. *Benedetti E. L., Favard P. (ed.). Freeze-etching: techniques and applications. Société Française de Microscopie Électronique, Paris. 1973.*

Достаточно полный источник информации по замораживанию — травлению.

2. *Dawes C. J.* Biological techniques in electron microscopy. Barnes and Noble, Inc., New York, 1971.
Счень полезная брошюра, в которой содержатся методы, прописи, приложения и литература по общим вопросам.
3. *Fuller R., Lovelock D. W. (ed.)*. Microbial ultrastructure. The use of the electron microscope. Academic Press, Inc., New York, 1976.
Включены хорошие примеры результатов применения к микроорганизмам различных методов.
4. *Glauert A. M. (ed.)*. Practical methods in electron microscopy, vol. 1—6. American Elsevier Publishing Co., Inc., New York, 1972.
Под этим названием до 1977 г. вышло шесть томов. Каждый из них разделен на части (например, Ультрамикротомия, Методы окрашивания срезов, Радиоавтография и иммуноцитохимия и т. д.). Некоторые из частей выпущены отдельно в бумажных обложках и служат в лабораториях подручным справочным материалом.
5. *Goldstein J. I., Yakowitz H. (ed.)*. Practical scanning electron microscopy. Plenum Press, New York, 1975.
Помимо этого заголовка у сборника есть и подзаголовок — «Электронный и ионный анализ микропроб»; он посвящен в основном физическим и теоретическим вопросам и приложениям к небологическим объектам.
6. *Harris R. J. C. (ed.)*. The interpretation of ultrastructure. Academic Press, Inc., New York, 1962.
Содержит некоторые ценные ранние методы.
7. *Hayat M. A.* Principles and techniques of electron microscopy. Biological applications, vol. 1—9. Van Nostrand Reinhold Co., New York, 1970.
Под одним и тем же названием до 1978 г. вышло девять томов, посвященных главным образом трансмиссионной электронной микроскопии. В последние восемь, изданные под редакцией Хэйата, включены главы, написанные другими авторами; они перечислены по отдельности, часть из них полезна для микробиологов.
8. *Hayat M. A.* Basic electron microscopy techniques. Van Nostrand Reinhold Co., New York, 1972.
Хорошее описание методов, необходимых для начинающих заниматься электронной микроскопией.
9. *Hayat M. A.* Positive staining for electron microscopy. Van Nostrand Reinhold Co., New York, 1975.
10. *Hayat M. A. (ed.)*. Principles and techniques of scanning electron microscopy. Biological applications, vol. 1—6. Van Nostrand Reinhold Co., New York, 1974.
До 1978 г. вышло шесть томов с этим заголовком. Так же как и в предыдущей серии томов по трансмиссионной электронной микроскопии, в главах, составляющих эти тома, рассматриваются частные и узкие области; некоторые из них имеют для микробиолога непосредственное прикладное значение, а все в совокупности ценны для тех, кто пытается расширить свой кругозор в электронной микроскопии. Относящиеся к микробиологии главы отдельно перечисляются в других разделах литературы к данной главе.

11. *Kay D. (ed.). Techniques for electron microscopy, 2nd ed. F. A. Davis Co., Philadelphia, 1965.*
Книга с тщательным описанием методов, в которой ценно все.
12. *Koehler J. K. (ed.). Advanced techniques in biological electron microscopy. Springer-Verlag, New York, 1973.*
Детально разбирается несколько методов; имеет немалую ценность для того, кто только начинает приобретать опыт.
13. *Meek G. A. Practical electron microscopy for biologist, 2nd ed. John Wiley and Sons, Inc., New York, 1976.*
Довольно полно охватывает большинство методов.
14. *Wells O. C. Scanning electron microscopy. McGraw-Hill Book Co., New York, 1974.*
В основном изложена теория вопроса. Только в гл. 12 («Гистологические и цитологические методы работы со сканирующим электронным микроскопом в биологии и медицине», автор А. Бойд) затрагиваются соответствующие методы, но без акцента на микроорганизмы.

4.8.2. Литература по частным вопросам, скомпонованная по предметному принципу

Теория и практика электронной микроскопии

15. *Agar A. W. In: D. Kay (ed.), Techniques for electron microscopy, 2nd ed., p. 1—42. F. A. Davis Co., Philadelphia, 1965.*
16. *Agar A. W., Alderson R. H., Chescoe D. In: A. M. Glauert (ed.), Practical methods in electron microscopy, vol. 2, p. 1—190. American Elsevier Publishing Co., New York, 1974.*
17. *Dawes C. J. Biological techniques in electron microscopy, p. 1—15. Barnes and Noble, Inc., New York, 1971.*
18. *Siegel B. M. In: B. M. Siegel (ed.), Modern developments in electron microscopy, p. 1—79. Academic Press, Inc., New York, 1964.*
19. *Wischnitzer S. In: M. A. Hayat (ed.), Principles and techniques of electron microscopy. Biological applications, vol. 3, p. 3—50. Van Nostrand Reinhold Co., New York, 1973.*

Сетки и подложки

20. *Baumeister W., Hahn M. In: M. A. Hayat (ed.), Principles and techniques of electron microscopy. Biological applications, vol. 8, p. 1—112. Van Nostrand Reinhold Co., New York, 1978.*
21. *Bradley D. E. In: D. Kay (ed.), Techniques for electron microscopy, 2nd ed., p. 58—74. F. A. Davis Co., Philadelphia, 1965.*
22. *Dawes C. J. Biological techniques in electron microscopy, p. 107—114. Barnes and Noble, Inc., New York, 1971.*
23. *Hayat M. A. Principles and techniques of electron microscopy. Biological applications, vol. 1, p. 323—333. Van Nostrand Reinhold Co., New York, 1970.*

Негативное контрастирование

24. *Anderson T. F. In: R. J. C. Harris (ed.), The interpretation of ultra-structure, p. 251—262. Academic Press, Inc., New York, 1962.*
25. *Bradley D. E. In: D. Kay (ed.), Techniques for electron microscopy, 2nd ed., p. 75—83, 87—89. F. A. Davis Co., Philadelphia, 1965.*

26. *Brenner S., Horne R. W.* Biochim. Biophys. Acta, **34**, 103—110 (1959).
27. *Dawes L. J.* Biological techniques in electron microscopy, p. 146—148. Barnes and Noble, Inc., New York, 1971.
28. *Haschemeyer R. H., Myers R. J.* In: M. A. Hayat (ed.), Principles and techniques of electron microscopy. Biological applications, vol. 2, p. 101—147. Van Nostrand Reinhold Co., New York (1972).
29. *Horne R. W.* In: D. Kay (ed.), Techniques for electron microscopy, 2nd ed., p. 328—355. F. A. Davis Co., Philadelphia, 1965.
30. *Huxley H. E., Zubay G. J.* Mol. Biol., **2**, 10—18 (1960)
31. *Kay D.* In: J. R. Norris and D. W. Ribbons (ed.), Methods in microbiology, vol. 9, p. 177—214. Academic Press, Inc., New York (1976).
32. *Muscatello U., Horne R. W. J.* Ultrastruct. Res., **25**, 73—83 (1968).
33. *Valentine R. C., Horne R. W.* In: R. J. C. Harris (ed.), The interpretation of ultrastructure, p. 263—277. Academic Press, Inc., New York, 1962.

*Препараты в виде срезов (фиксация, обезвоживание, заливка, при-
готовление срезов, окрашивание)*

34. *Dawes C. J.* Biological techniques in electron microscopy, p. 17—105. Barnes and Noble, Inc., New York, 1971.
35. *Glauert A. M.* In: D. Kay (ed.), Techniques for electron microscopy, 2nd ed., p. 166—212. F. A. Davis Co., Philadelphia, 1965.
36. *Glauert A. M.* In: D. Kay (ed.), Techniques for electron microscopy, 2nd ed., p. 254—282. F. A. Davis Co., Philadelphia, 1965.
37. *Glauert A. M.* In: A. M. Glauert (ed.), Practical methods in electron microscopy, vol. 1, p. 1—216. American Elsevier Publishing Co., New York (1975).
38. *Glauert A. M., Phillips R.* In: D. Kay (ed.), Techniques for electron microscopy, 2nd ed., p. 213—253. F. A. Davis Co., Philadelphia, 1965.
39. *Hayat M. A.* Principles and techniques of electron microscopy. Biological applications, vol. 1, p. 3—51. Van Nostrand Reinhold Co., New York (1970).
40. *Knobler R. L., Stempak J. G., Laurencin M.* In: M. A. Hayat (ed.), Principles and techniques of electron microscopy. Biological applications, vol. 8, p. 113—155. Van Nostrand Reinhold Co., New York (1978).
41. *Luft J. H.* In: J. K. Koehler (ed.), Advanced techniques in biological electron microscopy, p. 1—34. Springer-Verlag, New York, 1973.
42. *Reid N.* In: A. M. Glauert (ed.), Practical methods in electron microscopy, vol. 3, p. 217—353. American Elsevier Publishing Co., New York (1975).
43. *Spurr A. R. J.* Ultrastruct. Res., **26**, 31—43 (1969).

Реплики, напыление металлом

44. *Bradley D. E.* In: D. Kay (ed.), Techniques for electron microscopy, 2nd ed., p. 96—152. F. A. Davis Co., Philadelphia, 1965.
45. *Henderson W. J., Griffiths K.* In: M. A. Hayat (ed.), Principles and techniques of electron microscopy. Biological applications, vol. 2, p. 151—217. Van Nostrand Reinhold Co., New York (1972).

Замораживание—травление, замораживание—скалывание

46. *Benedetti E. L., Favard P.* (ed.). Freeze-etching: techniques and applications. Société Française de Microscopie Electronique, Paris, 1973.
47. *Bullivant S.* In: J. K. Koehler (ed.), Advanced techniques in biological electron microscopy, p. 67—112. Springer-Verlag, New York, 1973.
48. *Koehler J. K.* In: M. A. Hayat (ed.), Principles and techniques of electron microscopy. Biological applications, vol. 2, p. 53—98. Van Nostrand Reinhold Co., New York (1972).

Сканирующая электронная микроскопия

49. *Black J. T.* In: M. A. Hayat (ed.), Principles and techniques of scanning electron microscopy. Biological applications, vol. 1, p. 1—43. Van Nostrand Reinhold Co., New York (1974).
50. *Cohen A. o L.* In: M. A. Hayat (ed.), Principles and techniques of scanning electron microscopy. Biological applications, vol. 1, p. 44—112. Van Nostrand Reinhold Co., New York (1974).
51. *Hayat M. A., Zirkin B. R.* In: M. A. Hayat (ed.), Principles and techniques of electron microscopy. Biological applications, vol. 3, p. 311—319. Van Nostrand Reinhold Co., New York (1973).
52. *Hayes T. L.* In: J. K. Koehler (ed.), Advanced techniques in biological electron microscopy, p. 153—214. Springer-Verlag, New York, 1973.

Трансмиссионная электронная микроскопия в микробиологии

53. *Авакян А. А., Кац П. Н., Павлова Н. Б.*, Атлас патогенных бактерий человека и животных, Медицина, М., 1972.
54. *Glauert A. M., Thornley M. J., Thorne K. J. I., Sleyter U. B.* In: R. Fuller and D. W. Lovelock (ed.), Microbial ultrastructure. The use of the electron microscope, p. 31—47. Academic Press, Inc., New York, 1976.
55. *Greenhalgh G. N., Evans L. V.* In: C. Booth (ed.), Methods in microbiology, vol. 4, p. 518—565. Academic Press, Inc., New York (1971).
56. *Highton P. I.* In: R. Fuller and D. W. Lovelock (ed.), Microbial ultrastructure. The use of the electron microscope, p. 161—173. Academic Press, Inc., New York (1976).
57. *Hodgkiss W., Short J. A., Walker P. D.* In: R. Fuller and D. W. Lovelock (ed.), Microbial ultrastructure. The use of the electron microscope, p. 51—71. Academic Press, Inc., New York (1976).
58. *Kellenberger E.* In: R. J. C. Harris (ed.), The interpretation of ultrastructure, p. 233—246. Academic Press, Inc., New York, 1962.
59. *Kellenberger E., Ryter A., Sechaud J. J.* Biophys. Biochem. Cytol., 4, 671—678 (1958).
60. *Lawn A. M.* In: R. Fuller and D. W. Lovelock (ed.), Microbial ultrastructure. The use of the electron microscope, p. 73—86. Academic Press, Inc., New York (1976).
61. *Lickfeld K. G.* In: J. R. Norris and D. W. Ribbons (ed.), Methods in microbiology, vol. 9, p. 127—176. Academic Press, Inc., New York (1976).

62. Ryter A., Kellenberger E. Z. Naturforsch. Teil B, 13, 597—605 (1958).
63. Walker P. D., Short J. A., Roper G. In: R. Fuller and D. W. Lovelock (ed.), Microbial ultrastructure. The use of the electron microscope, p. 118—146. Academic Press, Inc., New York, 1976.

Сканирующая электронная микроскопия в микробиологии

64. Bulla L. A., Jr., Julian G. St., Hesselstine C. W., Baker F. L. In: J. R. Norris and D. W. Ribbons (ed.), Methods in microbiology, vol. 8, p. 2—33. Academic Press, Inc., New York (1973).
65. Kondo I. In: M. A. Hayat (ed.), Principles and techniques of scanning electron microscopy. Biological applications, vol. 6, p. 309—316. Van Nostrand Reinhold Co., New York (1978).
66. Kormendy A. C. In: M. A. Hayat (ed.), Principles and techniques of scanning electron microscopy. Biological applications, vol. 3, p. 82—108. Van Nostrand Reinhold Co., New York (1975).
67. Nanninga N. In: E. L. Benedetti and P. Favard (ed.), Freeze-etching: techniques and applications, p. 151—179. Société Française de Microscopie Electronique, Paris, 1973.
68. Nickerson R. W., Bulla L. A., Jr., Kurtzman C. P. In: M. A. Hayat (ed.), Principles and techniques of scanning electron microscopy. Biological applications, vol. 1, p. 159—180. Van Nostrand Reinhold Co., New York (1974).
69. Passmore S. M., Bole B. In: R. Fuller and D. W. Lovelock (ed.), Microbial ultrastructure. The use of the electron microscope, p. 19—29. Academic Press, Inc., New York, 1976.
70. Yoshii Z., Tokutaga J., Tawara J. Atlas of scanning electron microscopy in microbiology. Igaku Shoin, Ltd., Tokyo (The Williams and Wilkins Co., Baltimore), 1975.

Электронная микроскопия нуклеиновых кислот

71. Bradley D. E. In: D. Kay (ed.), Techniques for electron microscopy, 2nd ed., F. A. Davis Co., Philadelphia, 1965.
72. Davis R. W., Simon M., Davidson M. Methods Enzymol., 21, 413—428 (1971).
73. Kay D. In: R. Norris and D. W. Ribbons (ed.), Methods in microbiology, vol. 9, p. 177—214. Academic Press, Inc., New York (1976).
74. Kleinschmidt A. K., Zahn R. K. Z. Naturforsch. Teil B, 14, 770—779 (1959).
75. Thomas J. O. In: M. A. Hyat (ed.), Principles and techniques of electron microscopy. Biological applications, vol. 9, p. 64—83. Van Nostrand Reinhold Co., New York (1978).

Электронные микрофотографии, интерпретация и увеличение изображения

76. Agar A. W., Alderson R. H., Chescoe D. In: A. M. Glauert (ed.), Practical methods in electron microscopy, vol. 2, p. 191—276. American Elsevier Publishing Co., New York (1974).
77. Farnell G. C., Flint R. B. In: M. A. Hayat (ed.), Principles and techniques of electron microscopy. Biological applications, vol. 5, p. 19—61. Van Nostrand Reinhold Co., New York (1975).
78. Frank J. In: J. K. Koehler (ed.), Advanced techniques in biological electron microscopy, p. 217—274. Springer-Verlag, New York, 1973.

4. ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ

79. *Hawkes P. W.* In: M. A. Hayat (ed.), Principles and techniques of electron microscopy. Biological applications, vol. 8, p. 262—306. Van Nostrand Reinhold Co., New York (1978).
80. *Horne R. W., Markham R.* In: A. M. Glauert (ed.), Practical methods in electron microscopy, vol. 1, p. 327—435. American Elsevier Publishing Co., New York (1972).
81. *Markham R., Frey S., Hills G. J.* Virology, **20**, 88—102 (1963).
82. *Peters K.-R.* In: M. A. Hayat (ed.), Principles and techniques of electron microscopy. Biological applications, vol. 7, p. 118—143. Van Nostrand Reinhold Co., New York (1977).

Флуоресцирующие антитела

83. *Goldman M.* Fluorescent antibody methods. Academic Press, Inc., New York, 1968.
84. *Kawamura A., Jr.* Fluorescent antibody techniques and their applications. University Park Press, Baltimore, 1977.
85. *Walker P. D., Batty I., Thomson R. O.* In: J. R. Norris and D. W. Ribbons (ed.), Methods in microbiology, vol. 5A, p. 219—254. Academic Press, Inc., New York (1971).

Цитохимия

86. *Glauert A. M.* In: D. Kay (ed.), Techniques for electron microscopy, 2nd ed., p. 274—282. F. A. Davis Co., Philadelphia, 1965.

Иммуноцитохимия

87. *Glauert A. M.* In: D. Kay (ed.), Techniques for electron microscopy, 2nd ed., p. 292—303. F. A. Davis Co., Philadelphia, 1965.
88. *Hayat M. A.* Positive staining for electron microscopy, p. 194—209. Van Nostrand Reinhold Co., New York, 1975.
89. *Kraehenbuhl J. P., Jamieson J. D.* Int. Rev. Exp. Pathol., **13**, 1—53 (1974).
90. *Walker P. D., Batty I., Thomas R. O.* In: J. R. Norris and D. W. Ribbons (ed.), Methods in microbiology, vol. 5A, p. 219—254. Academic Press, Inc., New York (1971).
91. *Williams M. A.* In: A. M. Glauert (ed.), Practical methods in electron microscopy, vol. 6, p. 1—217. Elsevier/North Holland, Inc., New York (1977).

Радиоавтография

92. *Glauert A. M.* In: D. Kay (ed.), Techniques for electron microscopy, 2nd ed., p. 282—292. F. A. Davis Co., Philadelphia, 1965.
93. *Salpeter M. M., Bachmann L.* In: M. A. Hayat (ed.), Principles and techniques of electron microscopy. Biological applications, vol. 2, p. 221—279. Van Nostrand Reinhold Co., New York (1972).
94. *Salpeter M. M., McHenry F. A.* In: J. K. Koehler (ed.), Advanced techniques in biological electron microscopy, p. 113—152. Springer-Verlag, New York (1972).
95. *Williams M. A.* In: A. M. Glauert (ed.), Practical methods in electron microscopy, vol. 6, p. 1—217. Elsevier/North Holland, Inc., New York (1977).

ПОЛУЧЕНИЕ КЛЕТОЧНЫХ ФРАКЦИЙ

К. Шнайтман

Схемы фракционирования на субклеточном уровне не могут быть универсальными, они обязательно должны быть индивидуальными. В них необходимо учитывать не только особенности отдельных организмов, но и тип органелл, которые выделяют, а также характер информации, которую требуется получить. Мы не будем здесь рассматривать все многочисленные схемы фракционирования, применяемые для бактерий и других микроорганизмов, а опишем лишь некоторые общепринятые методы разрушения клеток и фракционирования их содержимого, используемые для бактерий, и приведем несколько примеров применения этих методов к фракционированию кишечной палочки (*Escherichia coli*).

5.1. МЕТОДЫ РАЗРУШЕНИЯ КЛЕТОК

Выбор метода разрушения клеток является важнейшим моментом при построении схемы клеточного фракционирования. При выборе такого метода необходимо иметь в виду следующее.

1. Соответствует ли метод разрушения клеток типу исследуемого организма? Единой методики, которая давала бы хорошие результаты для всех типов бактерий, не существует. Например, один из возможных методов разрушения большинства грамотрицательных бактерий — продавливание клеток в прессе Френча — не очень эффективен по отношению к грамположительным коккам. Во встряхивающем гомогенизаторе Брауна полностью разрушаются клетки грамположительных кокков (Braun MSK shaker) и значительно повреждаются клетки грамотрицательных бактерий.

2. Не повреждаются ли при использовании избранного метода субклеточные органеллы? Такая проблема существует, например, при работе с ультразвуком. Пу-

тем обработки ультразвуком эффективно разрушаются самые различные бактериальные клетки, однако часто при этом повреждаются внутриклеточные органеллы.

3. Имеется ли необходимое оборудование? Многие механические устройства, с помощью которых бактериальные клетки эффективно разрушаются, очень дороги и поэтому малодоступны в обычных условиях или не подходят для обработки требуемого количества материала.

4. Какая методика является самой простой? Методики, в соответствии с которыми необходима длительная инкубация, или методики, включающие много сложных этапов, нередко дают плохой выход или приводят к потере ферментативной активности.

При разрушении клеток любым способом должна контролироваться степень разрушения. Часто с этой целью подсчитывают относительное число выживших клеток, но, видимо, это не лучший способ контроля, так как клетки могут утратить жизнеспособность и без потери внутриклеточного содержимого. Хорошим способом контроля является световая микроскопия влажных препаратов, но только в том случае, если она осуществляется количественно путем подсчета относительного числа оставшихся интактными клеток в счетной камере какого-либо типа. Это необходимо потому, что иногда при разрушении клеток образуются субклеточные фрагменты, которые слишком малы, чтобы их можно было различить в световом микроскопе. Чтобы отличать интактные клетки от лишенных содержимого «теней» или больших фрагментов клеточной оболочки, применяют фазово-контрастную микроскопию, а также негативную окраску нигрозином или тушью. Если клетки разрушают по методике, в соответствии с которой они переходят в сферопласты или протопласты в осмотически стабилизированной среде, важно определить процент такого перехода; при этом лучше воспользоваться счетной камерой, чем просто просматривать влажные препараты. Лизированные протопласты или сферопласты часто плохо видны в световой микроскоп, и одного лишь качественного сравнения числа этих структур, оставшихся интактными, с числом нормальных клеток недостаточно.

Другой эффективный метод контроля заключается в отборе проб по ходу разрушения и их центрифугировании в таком временном и скоростном режиме, который достаточен для осаждения интактных клеток. Надосадочную жидкость проверяют затем на содержание белка и других поглощающих в ультрафиолете веществ (т. е. нуклеиновых кислот) или специфических цитоплазматических ферментов; таким образом определяют степень выхода этих компонентов из подвергаемых разрушению клеток.

Ниже мы остановимся на нескольких конкретных методиках, которые применяют для разрушения клеток. См. также разд. 18.1.3 и 22.1.

5.1.1. Продавливание с помощью пресса

Продавливание с помощью пресса представляет собой, вероятно, самый распространенный и самый полезный метод разрушения клеток. Некоторое количество бактериальной суспензии (объемом 5—40 мл с содержанием клеток до 30 об. %) помещают в стальной цилиндр с плотно пригнанным поршнем, имеющим маленький выпускной клапан с узким отверстием; с клапаном соединена выводящая трубка. Цилиндр с поршнем ставят под 10-тонный гидравлический пресс. По мере того как поршень опускается, клетки разрушаются большими гидродинамическими силами, возникающими при прохождении клеточной суспензии через отверстие выпускного клапана. У этого метода есть ряд преимуществ. Во-первых, нет проблемы с охлаждением, так как цилиндр и поршень пресса охлаждают заранее, а нагрев происходит только при прохождении клеток через отверстие клапана. Температура вытекающей жидкости повышается на 5—10°C, но эту жидкость можно быстро охлаждать, если собирать в металлическую пробирку или стакан, помещенные в ледяную баню. Во-вторых, разрушение происходит практически мгновенно, и суспензия разрушенных клеток не подвергается дополнительным гидродинамическим воздействиям, которые могли бы повредить субклеточные частицы. В-третьих, при использовании гидравлического пресса удовлетворительного качества можно проводить эксперименты в хорошо вос-

производимых условиях. К тому же на степень разрушения не влияет плотность клеточной суспензии, фаза роста, в которой были собраны клетки, или среда, в которой клетки суспендированы.

Установка типа пресса Френча состоит из цилиндра, поршня, выпускного клапана и подающей нагрузку станины (American Instrument Co. [Aminco], Rockville, MD.). В старых моделях этого пресса использовали быстро изнашивающийся клапан со стальной иглой, который часто повреждался во время работы. Вместо него можно использовать выпускаемый сейчас клапан с подогнанным по размеру нейлоновым шариком (Aminco). Он позволяет поршню доходить до дна цилиндра, не вызывая повреждений, и обеспечивает более однородное разрушение. Удобен также гидравлический пресс с приводом от мотора; пресс можно устанавливать на постоянное усилие в диапазоне скоростей движения поршня (Aminco; или Enerpac, Inc., Butler, Wis.).

Клеточную суспензию загружают в цилиндрическую ячейку и помещают под гидравлический пресс. Поршень пресса опускается на поршень ячейки, пока не разовьется максимальное усилие. До этого момента выпускной клапан закрыт, а затем его медленно открывают до тех пор, пока поршень не пойдет медленно вниз.

Перед разрушением *E. coli* клетки собирают, отмывают один раз и суспендируют в объеме буфера [0,01 м НЕРЕС (N-2-гидроксиэтилпиперазин-N'-2-этансульфоновая кислота), pH 7,4 при 0°C], составляющем 0,1 объема взятой культуры. Добавляют немного панкреатической рибонуклеазы и дезоксирибонуклеазы (0,1 мг/мл) и разрушают суспензию на прессе Френча под давлением $14 \cdot 10^7$ Па. После разрушения добавляют $MgCl_2$ до конечной концентрации 1 мМ и удаляют неразрушившиеся клетки центрифугированием при 5000 g в течение 5 мин. Mg^{2+} нужен для того, чтобы функционировала дезоксирибонуклеаза; его добавляют после разрушения, чтобы предотвратить стабилизацию рибосом. Рибонуклеаза действует в отсутствие Mg^{2+} . Можно использовать и другие буферы, например фосфатный, но трис-буфера или хелатирующих агентов следует избегать, чтобы предотвратить повреждение наружной клеточной мембраны.

Пресс Френча эффективен при разрушении грамотрицательных и некоторых грамположительных бактерий (особенно бацилл). Эндоспоры и грамположительные кокки в нем не разрушаются, для этих устойчивых клеток более действенно баллистическое разрушение или обработка лизоцимом.

Пресс Рибби сходен по принципу действия с прессом Френча; различия между ними состоят в том, что пресс Рибби развивает большее давление (в нем можно разрушать эндоспоры и некоторые наиболее устойчивые клетки) и имеет систему охлаждения. Его конструкция обеспечивает безопасную работу с патогенными микроорганизмами, однако, к сожалению, этот пресс больше не выпускается.

5.1.2. Разрушение ультразвуком

Для разрушения клеток применяют разнообразные ультразвуковые генераторы с вибрирующим пестиком. Высокочастотная вибрация наконечника пестика вызывает кавитацию, т. е. образование микроскопических пузырьков газа, движущихся с большой скоростью вблизи наконечника. Порождаемые этими быстро движущимися пузырьками большие гидродинамические силы приводят к разрушению клеток. Такой метод разрушения заманчив, так как подобные дезинтеграторы недороги и эффективны. Однако методу ультразвукового разрушения присущи недостатки, ограничивающие его применение в исследованиях, связанных с фракционированием клеточного содержимого.

Основной недостаток заключается в том, что разрушение происходит не мгновенно; для того чтобы разрушилась достаточная доля клеток, клеточную суспензию нужно обрабатывать в течение периода времени от 30 с до нескольких минут. В этот период высвобожденные субклеточные частицы подвергаются тем же самым большим гидродинамическим воздействием, что и неразрушенные клетки. Мембранные пузырьки деградируют до маленьких липопротеидных фрагментов, не осаждающихся при ультрацентрифугировании, а мембранные белки заметно перераспределяются между различными мембранами (например, между внутренней и наружной мембранами у грамотрицательных бактерий).

Во время разрушения клеток ультразвуком довольно трудно поддерживать низкую температуру образца. При этом может происходить вспенивание, вызывающее денатурацию белка, а кроме того, из-за кавитации может ускоряться окисление чувствительных к кислороду ферментов и ненасыщенных липидов. Трудности, связанные с образованием пены и поддержанием нужной температуры, сводятся к минимуму, если пробу подвергать не одной продолжительной, а нескольким кратковременным обработкам и охлаждать в перерывах между обработками. С проблемой окисления можно справиться, если проводить обработку пробы в атмосфере аргона. Нельзя сказать, что рассматриваемый метод отличается хорошей воспроизводимостью, так как эффективность обработки ультразвуком зависит от вязкости пробы, а также от размера, формы и химического состава сосуда, в котором находится проба (например, в стеклянном стакане разрушение клеток проходит гораздо более эффективно, чем в пластмассовом, который поглощает часть энергии ультразвука). *Предупреждение:* работающие с ультразвуком должны надевать на уши защитные приспособления, если только обработку не проводят в звукопоглощающем боксе.

Ультразвуковая обработка не очень хороша для первичного разрушения клеток, однако она эффективна для лизирования сферопластов (что осуществляется в методике разделения наружной и внутренней мембран грамотрицательных бактерий по Осборну и Мунсону [8]) как способ разбивания комков из внутриклеточных органелл и для суспендирования отцентрифугированных осадков. Для этих целей достаточны очень короткие ультразвуковые обработки, в процессе которых внутриклеточные органеллы не повреждаются.

5.1.3. Баллистическое разрушение

Термином «баллистическое разрушение» обозначают разнообразный набор методов, в которых бактерии разрушаются силами сдвига, развивающимися, когда суспензия клеток очень сильно встряхивается или перемешивается вместе с маленькими стеклянными или пластмассовыми шариками. Для этого промышленностью

выпускается множество устройств, которые очень детально описаны в обзорах Сэлтона [10] и Хьюджеса с соавторами [4].

В ранних работах широко применялись два устройства — аппарат Микля для встряхивания и аппарат для встряхивания, насаживаемый на ось центрифуги типа International [14]. Ни в одном из них не обеспечивалось поддержание низкой температуры во время встряхивания, и поэтому приходилось часто прерывать процесс для охлаждения пробы. Эти устройства больше не выпускаются промышленностью, они заменены тканевым дезинтегратором Брауна (Braun MSK; B. Braun Melsungen Apparatebau, Melsungen, Federal Republic of Germany), который поставляется в США многими фирмами, специализирующимися на выпуске лабораторного оборудования. Дезинтегратор Брауна имеет контейнер для пробы объемом 65 мл, который качается в горизонтальной плоскости с частотой 2000—4000 колебаний/мин. Охлаждение обеспечивается струей жидкого CO_2 , направляемой к контейнеру с пробой. В большинстве случаев клетки разрушаются за 3—5 мин при температуре ниже 4°C .

Дезинтегратор Брауна применяют, если требуется выделить клеточные стенки и отдельные ферменты из грамположительных бактерий. Как правило, при этом пользуются методикой Ворка [14].

Суспензию клеток (30 мл с содержанием сухого вещества 20—50 мг/мл) в подходящем буфере смешивают с 20 мл шариков Ballotini № 12 в соответствующем контейнере (для воздуха важно оставить не меньше 20% объема емкости) и в течение 0,5 мин для охлаждения контейнера через аппарат пропускают CO_2 . Затем в течение 3,5—5 мин в зависимости от типа клеток пробу встряхивают с частотой 3000 движений в минуту. Шарики удаляют низкоскоростным центрифугированием или пропусканием смеси через грубый стеклянный фильтр. Некоторые исследователи предпочитают использовать вместо стеклянных шариков пластмассовые, как описано Россом [9], чтобы свести к минимуму денатурацию ферментов. Если описанную выше методику применяют для выделения клеточных стенок, то пробу после встряхивания немедленно подвергают обработке, обеспечи-

вающей инактивацию автолитических ферментов [14].

Эндоспоры бактерий разрушают в дезинтеграторе Брауна при встряхивании сухих спор с сухими шариками (5 г сухих спор плюс 15 г шариков), как описано выше, и затем суспендируют их в буфере, как описано Стейнбергом [12].

5.1.4. Измельчение в твердом состоянии

Клетки можно разрушить размалыванием концентрированной биомассы или лиофилизированных клеток абразивами, такими, как корунд, или измельчением в твердом состоянии, которое достигается при продавливании замороженной суспензии или биомассы через маленькое отверстие или щель. Хьюджес с соавторами [4] дали полное описание этих методов. Промышленностью выпускается аппарат для измельчения замороженной клеточной массы икс-пресс (LKB-Produkter AB, Bromma, Sweden), в котором эффективно разрушаются как грамположительные, так и грамотрицательные клетки. Однако этот аппарат имеет ограниченную емкость, относительно дорог и сложен в работе. К тому же у него нет особых преимуществ перед прессом Френча или дезинтегратором Брауна.

5.1.5. Обработка мурамидазами

Для приготовления протопластов грамположительных бактерий используют яичный лизоцим. Обычно гидролиз этим ферментом проводят в растворе сахарозы (0,3—0,5 М) при нейтральном или слабощелочном значении pH. Обработка лизоцимом в концентрациях от 0,1 до 1,0 мг/мл в течение 30 мин должна приводить к 100%-ному образованию протопластов. Для контроля этого процесса применяется фазово-контрастная микроскопия. Протопласты стабильны при малых концентрациях Mg^{2+} и Ca^{2+} (в диапазоне 0,5—5 мМ). Реакцию гидролиза проводят как на холоду, так и при комнатной температуре.

В продаже имеются препараты мурамидаз, имеющих более широкую субстратную специфичность, чем яичный лизоцим; они могут быть очень эффективными

при гидролизе клеточной стенки грамположительных бактерий, устойчивых к яичному лизоциму. К этим препаратам относятся лизостафин, мурамидаза из *Staphylococcus staphyloolyticus* (Sigma Chemical Co., St. Louise, MO) и мурамидаза из *Chalaropsis* sp. (Miles Laboratories, Inc., Elkhart, Ind.). Работать с этими ферментами следует осмотрительно, поскольку они не так хорошо очищены, как яичный лизоцим, и часто содержат примеси протеаз, липаз или нуклеаз.

В отличие от грамположительных бактерий фактически все грамотрицательные бактерии имеют в своем составе муреин, который чувствителен к лизоциму. Однако наружная мембрана грамотрицательных бактерий непроницаема для лизоцима, и для того чтобы лизоцим подействовал, ее целостность должна быть нарушена. Этого добиваются замораживанием — оттаиванием. предварительной обработкой ЭДТА или в некоторых случаях обработкой антибиотиками, действующими на мембраны, такими, как полимиксин В. Гидролиз муреина в грамотрицательных бактериях не приводит к удалению наружной клеточной мембраны, поэтому образующиеся чувствительные к изменению осмотического давления структуры называют не протопластами, а сферопластами.

Сферопласты кишечных бактерий можно приготовить, как описано ниже, по методике Осборна и Мунсона [8]. Культуры центрифугируют и суспендируют в 0,1 первоначального объема охлажденного 0,75 М раствора сахарозы в 10 мМ трис-ацетатном буфере, рН 7,8. К пробе добавляют лизоцим до конечной концентрации 0,1 мг/мл и инкубируют суспензию на льду в течение 2 мин. Перевод клеток в сферопласты осуществляется в ходе медленного разведения суспензии в течение 8—10 мин двумя объемами холодного раствора 1,5 мМ ЭДТА, добавляемого посредством перистальтического насоса. Во время разведения суспензию слегка помешивают, а переход в сферопласты контролируют с помощью фазово-контрастной микроскопии.

На образование протопластов и сферопластов отчетливо влияет ряд факторов, включая фазу роста, на которой собраны микроорганизмы, способы промывания клеток после отбора и тип культуральной среды. В свя-

зи с описанной выше методикой Осборн и Мунсон [8] отмечают, что клетки, выращенные на комплексной среде, лучше образуют сферопласты, а предварительная инкубация клеток в холодном буфере до перенесения их в раствор сахарозы сказывается отрицательно на образовании сферопластов. В целом для приготовления сферопластов или протопластов лучше всего использовать клетки, находящиеся в середине логарифмической фазы роста.

5.1.6. Осмотическое лизирование

Сферопласты или протопласты эффективно лизируются при быстром 10—20-кратном разведении разбавленным буфером или дистиллированной водой. Размер образующихся при этом везикул в определенной степени зависит от быстроты и кратности разведения. Часто применяют методику осаждения протопластов или сферопластов центрифугированием с последующим суспендированием их в лизирующем буфере. Такие осадки можно быстро и равномерно суспендировать при помощи шприца (в частности, пружинного шприца, снабженного оксфордским [Oxford Laboratories] шприцевым пипеттором с иглой большого диаметра или канюлей. Несколько энергичных движений поршнем шприца позволяет быстро и равномерно суспендировать смесь.

В интактных клетках бактерий дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) включена в структуру нуклеоида. Эта структура стабилизируется рибонуклеиновой кислотой (РНК), и поэтому присутствие следов рибонуклеазы приводит к разворачиванию нуклеоида во время лизиса и образованию очень вязкого раствора высвободившейся ДНК. Трудности, связанные с высокой вязкостью, можно преодолеть несколькими путями. Цепи молекул ДНК можно разрезать короткой обработкой ультразвуком или гомогенизацией суспензии лизированных клеток в ножевом микроизмельчителе. Можно также добавить в раствор дезоксирибонуклеазу, но для функционирования этого фермента необходим Mg^{2+} в концентрации не менее 0,1 мМ. Если сферопласты лизируются в присутствии ЭДТА, то требуется избыток Mg^{2+} по сравнению с содержанием ЭДТА.

5.1.7. Замораживание—оттаивание

Замораживание — оттаивание используют для того, чтобы сделать грамотрицательные клетки чувствительными к лизоциму или детергентам. Этот метод можно применять при выделении мембран или внутриклеточных органелл в больших количествах.

Для выделения больших количеств мембран из *E. coli* полезна следующая методика. Густую суспензию отмытых клеток (клетки составляют около 30% объема суспензии) в 0,02 М трис-буфере, рН 7,8, содержащем 5 мМ ЭДТА, 0,25 М сахарозы и 0,5 мг/мл лизоцима, помещают в колбу и замораживают в виде тонкого слоя, вращая колбу в ацетоновой бане с сухим льдом. Затем суспензию размораживают, погружая колбу в теплую воду, и, как только все растает, выливают содержимое в 20 объемов холодного буфера, имеющего состав: 0,02 М трис, 0,5 мМ $MgCl_2$, 0,1 мг/мл дезоксирибонуклеазы, рН 7,8. Смесь немедленно обрабатывают около 20 с в ножевом микроизмельчителе, чтобы измельчить ДНК и разрушить клетки. Неразрушившиеся клетки удаляют центрифугированием в течение 5 мин при 5000 g. Если осадка много, его вновь суспендируют в указанном выше растворе трис-ЭДТА-сахарозы и повторяют цикл замораживания — оттаивания с последующим разведением. Клеточные оболочки, состоящие из наружной и внутренней мембран, получают центрифугированием при 27 000 g в течение 20 мин.

5.2. МЕТОДЫ ФРАКЦИОНИРОВАНИЯ

5.2.1. Дифференциальное центрифугирование

Для получения клеточных фракций широко применяются различные виды центрифугирования: дифференциальное центрифугирование, зональное центрифугирование и равновесное центрифугирование в градиенте плотности. Теоретические и практические вопросы, связанные с центрифугированием, всесторонне разобраны в обзоре Сайкса [13].

В случае дифференциального центрифугирования образцы центрифугируют определенное время при задан-

ной скорости, после чего удаляют надосадочную жидкость. Этот метод полезен для разделения частиц, сильно различающихся по скорости седиментации. Например, центрифугирование в течение 5—10 мин при 3000—5000 g приводит к осаждению интактных бактериальных клеток, тогда как большинство клеточных фрагментов при этом остается в надосадочной жидкости. Фрагменты клеточной стенки и большие мембранные структуры можно осадить центрифугированием при 20 000—50 000 g в течение 20 мин, в то время как маленькие мембранные везикулы и рибосомы требуют для осаждения центрифугирования при 200 000 g в течение 1 ч.

5.2.2. Зональное центрифугирование

Зональное центрифугирование представляет собой эффективный способ разделения структур, имеющих сходную плавучую плотность, но различающихся по форме и массе частиц. В качестве примеров можно привести разделение субъединиц рибосом, различных классов полисом, а также молекул ДНК, имеющих различную форму. Центрифугирование осуществляют либо в бакет-роторах, либо в специально устроенных зональных роторах; для предотвращения конвекции при центрифугировании в стаканах бакет-ротора или в камере зонального ротора создают слабый градиент (обычно сахарозы). Пробу наносят в виде зоны или узкой полосы в самом верху градиентного столбика. Для субклеточных частиц обычно используется градиент сахарозы от 15 до 40% (вес/объем); большинство этих частиц в достаточной степени разделяется центрифугированием при 100 000 g в течение 1—4 ч.

5.2.3. Равновесное центрифугирование в градиенте плотности

При этом виде центрифугирования частицы разделяются по плавучей плотности, а не по скорости седиментации. Метод широко применяется для разделения различных фракций мембран, так как фрагменты мембран, относящиеся к одному и тому же типу, могут сильно

различаться по размеру (и, следовательно, скорости седиментации), но должны иметь одинаковую плавучую плотность. Исследуемые компоненты движутся при центрифугировании в градиенте плотности растворенного вещества (для мембран и органелл с плотностью ниже 1,3 г/мл обычно используются сахарозные градиенты, а для более плотных структур, таких, как вирусы, применяют соли винной кислоты и хлористый цезий) до тех пор, пока не будет достигнуто равновесное положение, при котором плотность каждой частицы равна плотности окружающего раствора. Поскольку растворы сахарозы относительно вязкие, градиенты, как правило, формируются заранее. У растворов хлористого цезия вязкость низкая, так что трудно заранее приготовить его градиентный раствор; в этом случае применяют технику изопикнического центрифугирования в градиенте плотности. Пробу смешивают с хлористым цезием в количестве, достаточном для создания плотности, равной средней плотности субклеточных частиц. Эту гомогенную смесь помещают в сосуд для центрифугирования, и в результате седиментации хлористого цезия в поле центробежных сил при центрифугировании формируется его градиент.

Поскольку скорость седиментации частицы постепенно снижается по мере достижения ею той области градиента, где она имеет плотность одинаковую с плотностью раствора, для достижения равновесия центрифугировать требуется очень долго. Это особенно важно для маленьких мембранных везикул, таких, как хроматофоры, или для фрагментов цитоплазматических мембран клеток, разрушенных на прессе Френча, так как скорость седиментации этих частиц низка даже в отсутствие градиента. Если применять центробежные ускорения порядка 100 000—200 000 g, для более или менее хорошего разделения требуется не меньше 24 ч, а для полного — 72 ч.

5.2.4. Градиенты сахарозы

Концентрация сахарозы в растворах для приготовления градиентов указывается в литературе по-разному: в единицах плотности, в молях сахарозы, в весовых про-

центах сахарозы (вес/вес), в процентах на единицу объема (вес/объем или г/100 мл). В стандартных химических справочниках есть таблицы для перевода концентраций водных растворов сахарозы из одних единиц в другие. Чаще всего используются весовые проценты сахарозы. При приготовлении сахарозных растворов плотность воды или разбавленных буферов принимают равной 1 г/мл. Следовательно, чтобы приготовить, например, раствор 54%-ной (вес/вес) сахарозы, нужно растворить 54 г сахарозы в 46 мл воды. При этом образуется 100 г раствора, а поскольку плотность 54%-ного (вес/вес) раствора сахарозы равна 1,2451, конечный объем будет 80,3 мл. Приготовление растворов таким путем устраняет необходимость доведения вязких растворов до фиксированных величин объема.

Для создания градиентов промышленностью выпускаются разнообразные устройства, но их применение не обязательно, так как удовлетворительные по качеству градиенты можно приготовить, наложив друг на друга в центрифужном стакане ряд сахарозных растворов и выдержав в течение ночи, чтобы за счет диффузии образовался непрерывный градиент. Нет необходимости выдерживать градиенты, которые будут центрифугироваться 24 ч и больше, так как за время центрифугирования благодаря диффузии сформируется непрерывный градиент. Мы обычно готовим градиенты из пяти-семи слоев. Когда используются смачиваемые центрифужные стаканы, например, из нитроцеллюлозы или поликарбоната, слои можно наносить, давая им стекать вниз по стенке стакана из пипетки, которую держат под углом к стенке. Если берут несмачиваемые стаканы, такие, как полиалломерные или полипропиленовые, то кончик пипетки при добавлении раствора должен находиться в контакте с мениском, чтобы не происходило перемешивания.

Самый простой метод отбора фракций из сахарозных градиентов заключается в их выкачивании с помощью перистальтического насоса. Центрифужный стакан зажимают в круглых лапках (мы применяем кусок прозрачного плекса с просверленным по диаметру стакана отверстием, который зажимаем в лапках), а над ним в круглых лапках закрепляют трубочку небольшого

диаметра из нержавеющей стали. Трубочку подсоединяют к насосу и опускают в стакан до соприкосновения с дном. Затем градиентный столбик с помощью насоса раскапывают по находящимся в коллекторе фракций мерным пробиркам.

5.2.5. Детергенты

Детергенты применяются при фракционировании клеток в трех случаях. Когда хотят получить немембранные органеллы, такие, как рибосомы, нуклеониды и т. д., детергенты обеспечивают мягкое лизирование клеток после нарушения целостности муреина (грамположительные бактерии) или наружной мембраны (грамотрицательные бактерии). Детергенты применяют также для того, чтобы избирательно перевести в раствор цитоплазматическую мембрану грамотрицательных бактерий, сохранив интактной наружную мембрану, или удалить мембранные загрязнения с рибосом, полисом и стенок грамположительных клеток.

Детергенты представляют собой амфипатические молекулы, т. е. молекулы, имеющие как гидрофильную, так и гидрофобную области; они умеренно растворяются в воде. В очень низких концентрациях детергенты образуют в воде истинный раствор. По мере возрастания концентрации молекулы детергента агрегируют с образованием мицелл, в каждой из которых гидрофильные области обращены к воде, а гидрофобные скрыты от воды внутри мицеллы. Концентрацию, при которой по мере добавления детергента к воде начинают образовываться мицеллы, называют критической концентрацией мицеллообразования (ККМ). Каждый детергент характеризуется своими ККМ, размерами и формой мицелл. Превосходный обзор Хелениуса и Симонса [3] суммирует свойства многих детергентов, применяемых для получения клеточных фракций.

Детергенты можно подразделить на три класса, различающиеся по свойствам мицелл, способности связываться с белками и способности взаимодействовать с другими растворенными веществами. К этим классам относятся ионные детергенты, неионные детергенты и со-

ли желчных кислот. С каждым детергентом связаны свои трудности и свои преимущества при фракционировании клеток.

Ионные детергенты

К самым распространенным ионным детергентам относятся додецилсульфат натрия (лаурилсульфат натрия, ДСН), N-лаурилсаркозинат натрия (саркозил), алкилбензосульфонаты (обычные, применяемые в домашнем хозяйстве детергенты) и соли четвертичных аминов, такие, как бромид цетилтриметиламмония (цетавлон). Ионные детергенты склонны образовывать небольшие мицеллы (с мол. массой $\sim 10\,000$) и имеют относительно высокую ККМ (для ДСН ККМ при комнатной температуре в разведенных буферах составляет примерно 0,2%). На ККМ и растворимость ионных детергентов сильно влияют ионная сила раствора и природа присутствующих в нем противоионов. К примеру, 10%-ный раствор ДСН теряет стабильность при температуре около 17°C , в то время как сходный раствор додецилсульфата в трисе стабилен при 0°C . Додецилсульфат калия растворим только при повышенных температурах, и поэтому при использовании этого детергента K^+ следует исключать из всех буферов.

Такие детергенты, как ДСН, которые имеют сильно ионизированную гидрофильную группу, не подвержены влиянию изменения реакции среды в широком диапазоне pH и не осаждаются 5%-ной трихлоруксусной кислотой. Ионные детергенты сильно связываются с белками, и в случае ДСН обычно происходит разворачивание и необратимая денатурация белковых молекул. Хотя ионные детергенты можно удалить диализом, как правило, этого не делают из-за значительного связывания их с белками.

Неионные детергенты

К неионным детергентам относятся тритон X-100, нонидет Р-40 (NP-40), твин 80 и октилглюкозид. Обычно мицеллы этих детергентов обладают большой молекулярной массой (50 000 и больше) и низкой ККМ

(0,1% и ниже), что ограничивает их применимость при гель-фильтрации или гель-электрофорезе. На свойства этих детергентов в растворе почти не влияют реакция среды и ионная сила, хотя они могут осаждаться 5%-ной трихлоруксусной кислотой. Неионные детергенты связываются только с гидрофобными белками и, как правило, не вызывают денатурации или потери биологической активности.

Соли желчных кислот

Соли желчных кислот представляют собой соли стероидных производных, например холат, дезоксихолат или таурохолат натрия. Из-за того что массивные стероидные ядра плохо упаковываются, эти детергенты образуют небольшие мицеллы (часто всего из нескольких молекул), а молекулярная масса последних в отличие от других детергентов является функцией концентрации детергента. Поскольку эти детергенты — соли очень плохо растворимых кислот со значениями pK_a в области 6,5—7,5, их следует использовать в щелочных диапазонах значений pH. Чтобы избежать трудностей с растворением, применяют концентрированные исходные растворы, которые готовят, растворяя в избытке NaOH соответствующую свободную кислоту. При работе с этими детергентами ионный состав, значение pH и общая концентрация детергента должны поддерживаться на постоянном уровне.

Проблемы, возникающие при использовании детергентов

Поскольку большинство детергентов используется в концентрациях, довольно сильно превосходящих ККМ, и поскольку действие детергентов обусловлено образованием смешанных мицелл с липидами или связыванием с белками, отношения детергент:белок или детергент:липид значительно важнее истинной концентрации детергента. Как правило, достаточный избыток детергента обеспечивается при соотношении 2—4 мг детергента к 1 мг белка. Например, если для солюбилизации мембран используется 2%-ный тритон X-100, концентрация белка в пробе должна быть не больше 5—10 мг/мл.

Тритон X-100, один из самых ценных неионных детергентов, создает трудности при измерениях количества белка, поскольку он содержит ароматический остаток, препятствующий измерению поглощения при 280 нм, а в пробах с участием химических реагентов образует мутный осадок. Мы обычно преодолеваем эту трудность с помощью мечения культуры небольшим количеством ^3H -лейцина. Если метка вводится в минимальную или синтетическую солевую среду, следует позаботиться о том, чтобы добавить туда достаточное количество немеченого лейцина, обеспечив тем самым постоянное в течение всего периода роста включение изотопа из расчета на 1 мг белка. Для *E. coli* достаточно добавить в качестве носителя 20—40 мкг немеченого лейцина, чтобы достичь равномерного включения метки. Когда ввести метку по каким-либо соображениям невозможно, содержание белка измеряют и в присутствии тритона X-100 модифицированным методом Лоури, описанным в работе [11], в соответствии с которым к пробе добавляют избыток ДСН. Последний образует стабильные смешанные мицеллы с тритоном, не мешающие измерениям.

Тритон X-100 и другие сходные с ним неионные детергенты растворяются в водно-спиртовых смесях, а белки из таких смесей можно выделить осаждением в этаноле. Пробу помещают на лед и к ней добавляют при перемешивании 2 объема охлажденного на льду абсолютного этанола. Смесь выдерживают в течение ночи в морозильнике и собирают осадок белка центрифугированием. Для эффективного осаждения требуется концентрация белка не меньше 0,2 мг/мл. Разбавленные растворы белка концентрируют в аппарате для ультрафильтрации фирмы Amicon с помощью фильтра РМ-30. Правда, следует иметь в виду, что при этом концентрируются также и мицеллы детергента.

ДСН удаляют из проб ацетоновым осаждением. Шесть объемов безводного ацетона добавляют к пробе при комнатной температуре, а выпавший осадок отделяют центрифугированием. Осадок промывают несколько раз водно-ацетоновой смесью (6·1). Так как осадок часто оказывается воскообразным и с ним трудно работать, мы обычно диспергируем его в воде гомогенизатором Поттера, а затем лиофилизуем.

5.2.6. Электрофорез в полиакриламидном геле

Электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии ДСН представляет собой самый простой и самый эффективный способ выявления набора полипептидов, присутствующих в субклеточных фракциях. Этот метод сейчас во многих случаях заменяет ферментативный и химический анализ при установлении чистоты и гомогенности субклеточных фракций.

Для электрофореза в полиакриламидном геле используются разнообразные выпускаемые промышленностью и самодельные приборы. Мы предпочитаем те приборы, которые позволяют проводить разделение в тонких пластинах геля, что обеспечивает оптимальное разрешение. Лучшее разрешение на пластинах обусловлено тем, что возникающее во время электрофореза тепло здесь легко рассеивается, а также тем, что гель после электрофореза можно быстро фиксировать. Последнее важно для того, чтобы свести к минимуму диффузию белка в полосах. Пластины позволяют одновременно сравнивать много проб, и их легко сохранять после высушивания на листах фильтровальной бумаги. Радиоактивность в пробах выявляют радиоавтографией и фотофлюорографией, а высушенные на фильтровальной бумаге гели можно легко нарезать ножницами или резком и после повторного насыщения водой вырезанных сухих полосок просчитывать на сцинтилляционном счетчике. Если не требуется большая разгонка в геле, электрофорез, фиксацию, окраску и высушивание успевают проводить за один день.

Для гель-электрофореза в присутствии ДСН имеется большой набор буферных систем. Лучшее разрешение дают концентрированные буферные системы, у которых верхний (электродный) буфер содержит ионы, обладающие большой подвижностью и движущиеся через гель в виде передней зоны, или фронта. К моменту вхождения в разделяющий гель белки сжимаются этим движущимся фронтом в узкую полосу, а войдя в него, задерживаются за счет того, что гель обладает свойствами «сита». Описанная ниже система представляет собой модификацию концентрирующей буферной системы, предложенной Лэмли [5]. См. также разд. 26.5.1.

Разделяющий, или разгоняющий, гель содержит 11,5% акриламида, 0,2% бисакриламида и 0,1% ДСН в 0,375 М трис-буфере, доведенном HCl до pH 8,8. Полимеризация инициируется удалением воздуха из раствора и добавлением тетраметилэтилендиамина (до 0,8%) и персульфата аммония (до 0,015%). Пока не произойдет полимеризация, разделяющий гель держат под слоем воды. Воду выливают и наслаивают концентрирующий гель, или гель для нанесения, содержащий 4,5% акриламида, 0,12% бисакриламида и 0,1% ДСН в 0,125 М трис-буфере, доведенном HCl до pH 6,8. Этот гель полимеризуется добавлением тетраметилэтилендиамина (до 0,125%) и персульфата аммония (до 0,05%). Перед полимеризацией, чтобы сформировать лунки для проб, в концентрирующий гель вставляют тефлоновую (фторопластовую) гребенку. После полимеризации образовавшиеся лунки промывают несколько раз электродным буфером, содержащим небольшое количество бромфенолового синего. При этом удаляется непрореагировавший персульфат, а границы лунок слегка окрашиваются, так что их можно видеть при нанесении проб. Верхний электродный буфер содержит 0,182 М глицин, 0,0255 М трис (конечное значение pH 8,3) и 0,1% ДСН. Нижний электродный буфер содержит те же компоненты, за исключением ДСН.

Пробы растворяют в буфере для концентрирующего геля, к которому добавлены 12,5% глицерина, 1,25% ДСН и 1,25% 2-меркаптоэтанола. До электрофореза их прогревают в течение 5 мин в кипящей водяной бане для того, чтобы прошла полная диссоциация и денатурация всех белков. В качестве красящей метки к пробам можно добавить бромфеноловый синий или феноловый красный. Окончательно приготовленные пробы должны содержать 1—5 мг/мл белка, причем в маленькие лунки ($3 \times 0,75$ мм) достаточно вносить 5—25 мкг белка. Так как проводимость геля меняется по мере прохождения через него концентрирующего буфера, следует поддерживать постоянными напряжение или мощность, а не ток.

Пока исследуемая смесь не вошла в разделяющий гель, устанавливается начальное напряжение, равное 50 В; затем напряжение повышают до 145 В на весь

остаток пути. Для наилучшего разрешения температура геля должна быть 25 °С.

Самый распространенный недостаток электрофореза в полиакриламиде состоит в искривлении полос вследствие неправильно проведенной полимеризации. Чтобы этого не было, гелевые растворы нужно тщательно дегазировать перед заливкой, а верхнюю кромку разделяющего геля после полимеризации несколько раз промывать, чтобы удалить все остатки незаполимеризовавшегося геля. Реактивы для электрофореза бывают разными по чистоте, и для того, чтобы время полимеризации было всегда постоянным, необходимо увеличивать или уменьшать количество персульфата аммония. Для разделяющего геля оптимальное время полимеризации составляет ~30 мин. При большей длительности гель становится мягким или не полностью полимеризуется, а при меньшей — полимеризация может пройти неравномерно, что приведет к появлению волнистых белковых полос. Персульфат аммония очень гигроскопичен и не отличается стабильностью. Рекомендуется готовить исходный концентрированный раствор персульфата аммония (50 мг/мл), который хранят в замороженном состоянии порциями по 1 мл. Такой раствор стабилен в морозильной камере в течение нескольких месяцев.

Полосы могут быть также размазанными из-за присутствующих в пробе липидов и гликолипидов (распространенный случай — присутствие липополисахаридов). Липиды связывают значительную часть ДСН, и фактически их присутствие может привести к истощению ДСН, доступного для связывания с белками, мигрирующими в геле. Эту трудность преодолевают, увеличивая количество ДСН в верхнем электродном буфере до 1% и выше.

Гели окрашивают по методу Фейербенкса и др. [2]. При слабом покачивании гели вымачивают по 1 ч в каждом из следующих растворов: 1) 525 мл 95%-ного изопропанола, 200 мл ледяной уксусной кислоты, 1,0 г кумасси ярко-синего и 1275 мл воды; 2) 210 мл 95%-ного изопропанола, 200 мл ледяной уксусной кислоты, 0,1 г кумасси ярко-синего и 1590 мл воды; 3) 200 мл ледяной уксусной кислоты, 0,05 г кумасси ярко-синего и 1800 мл воды и 4) 10%-ная уксусная кислота. После

полного обесцвечивания геля его вымачивают перед высушиванием в 10%-ной уксусной кислоте, содержащей 1% глицерина.

5.3. ПРИМЕР ФРАКЦИОНИРОВАНИЯ: *E. coli*

5.3.1. Полное фракционирование

Схему, показанную на рис. 5.1, можно использовать для определения внутриклеточной локализации какого-либо фермента или белка, принадлежащего *E. coli* или другим кишечным бактериям. Преимущество этой схемы заключается в том, что при низких концентрациях Mg^{2+} (в данном случае источником Mg^{2+} служат как сами клетки, так и буфер для разрушения) наружная мембрана нерастворима в тритоне X-100, в то время как цитоплазматическая мембрана полностью растворима.

При разрушении клеток силами сдвига некоторые цитоплазматические мембраны сильно дробятся (вероятно, до небольших, «открытых» мембранных фрагментов) и их нельзя уже осаждать ультрацентрифугированием. Поэтому первую надосадочную цитоплазматическую фракцию (надосадочная жидкость I на рис. 5.1) инкубируют при 21°C. При температуре выше температуры фазового перехода мембранных липидов крошечные фрагменты агрегируют, т. е. сливаются в мембранные фрагменты больших размеров, которые можно затем осадить [6]. В некоторых случаях неосаждаемая фракция мембран может составлять до 20—30% цитоплазматических мембран. Она образуется при разрушении клеток не только с помощью пресса Френча, но и при обработке их ультразвуком или даже при быстром лизисе протопластов или сферопластов.

При такой схеме фракционирования невозможно выяснить, откуда происходят растворимые белки — из цитоплазмы или из периплазмы. Для этого требуется отдельный эксперимент, в котором клетки подвергают осмотическому шоку по методике Неу и Хеппла [7] с высвобождением белков периплазмы.

Если окончательно получаемую фракцию цитоплазматических мембран (надосадочная жидкость III на рис. 5.1.) собираются анализировать гель-электрофоре-

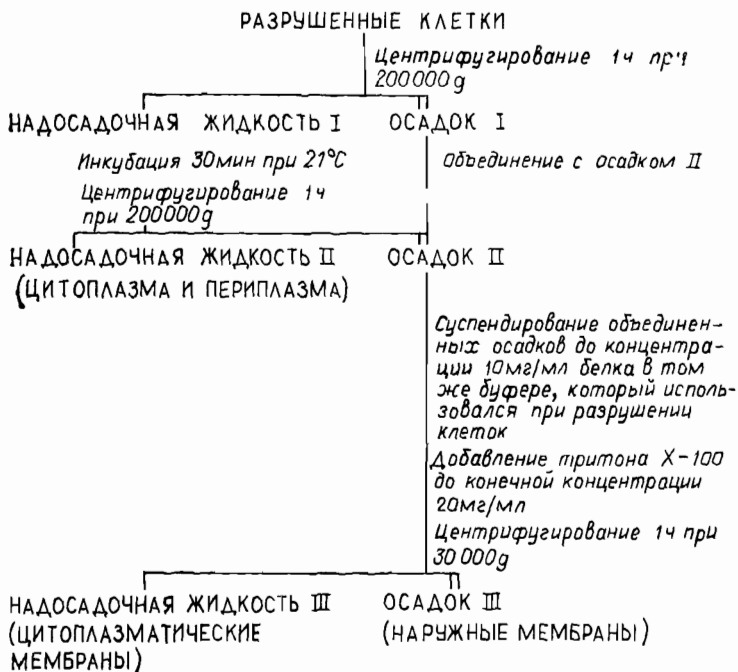


Рис. 5.1. Схема фракционирования клеток *E. coli*, используемая для обнаружения локализации какого-либо фермента или белка внутри клетки. Клетки разрушают на прессе Френча в HEPES -буфере; интактные клетки удаляются осаждением в течение 5 мин при 5000 g.

зом в присутствии ДСН, белки нужно отделить от тритона X-100 осаждением в этаноле, как описано ранее. В пробу и в верхний электродный буфер необходимо добавить большой избыток ДСН, в противном случае тритон X-100 будет образовывать с ДСН смешанные мицеллы и мешать разделению белков в гелях.

5.3.2. Внутренняя и наружная мембраны

Клетки разрушают на прессе Френча и отделяют клеточный экстракт от целых клеток центрифугированием при 5000 g в течение 5 мин, как описано ранее. Фракцию клеточных оболочек осаждают центрифугированием при 200 000 g в течение 1 ч, а осадок ресуспендируют в

0,01 М HEPES-буфере, pH 7,4, так чтобы получить концентрацию белка ~ 20 мг/мл.

Градиенты сахарозы готовят на этом же буфере. Для ротора Beckman SW 27 (объем стакана 37 мл) мы используем 5 слоев по 7 мл каждый, содержащих следующие количества сахарозы (вес/вес): 35, 40, 45, 50 и 55 %. 2 мл суспензии с оболочками наслаивают поверх градиента и центрифугируют при максимальной скорости (131 000 g) 36—48 ч. Небольшое количество осадка на дне стакана удаляют. Наружные мембраны содержатся либо в одиночной мутной полосе, либо в паре сходных полос в положении, соответствующем концентрации сахарозы примерно 52% (вес/вес). Фракция цитоплазматических мембран представляет собой прозрачную желтоватую полосу в том месте, где сахароза имеет концентрацию около 36% (вес/вес). Градиенты разливают с помощью насоса и измеряют поглощение фракций при 280 нм. Затем собирают и объединяют фракции, содержащие мембраны, объединенные фракции разводят в соотношении 1:3 тем же HEPES-буфером, который в данном случае содержит 1 мМ $MgCl_2$, и центрифугируют при 200 000 g в течение 2 ч для осаждения частиц мембран. Для выявления перекрестного загрязнения можно воспользоваться различными биохимическими маркерами. Цитохромы и сукцинатдегидрогеназа представляют собой подходящие маркеры для фракции цитоплазматических мембран. Белки наружной мембраны, называемые «главными» [1] и выявляемые в ДСН-полиакриламидных гелях, — полезные маркеры для наружной мембраны, так же как и специфические липополисахариды или фосфолипазы [8]. Наилучшие результаты мы получили на культурах, выращенных на минимальных средах с временем генерации ~ 1 ч и более. Мембраны клеток, выращенных на комплексных средах, по-видимому, труднее разделить, возможно, вследствие увеличения числа зон адгезии между наружной и цитоплазматической мембранами в быстрорастущих клетках.

5.4. ЛИТЕРАТУРА

1. Bassford P. J., Jr., Diedrich D. L., Schnaitman C. A., Reeves P. Outer membrane proteins of *Escherichia coli*. VI. Protein alteration in bacteriophage-resistant mutants. *J. Bacteriol.*, **131**, 608—622 (1977).
2. Fairbanks G., Steck T. L., Wallach D. F. Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry*, **10**, 2606—2617 (1971).
3. Helenius A., Simons K. Solubilization of membranes by detergents. *Biochim. Biophys. Acta*, **415**, 29—79 (1975).
4. Hughes D. E., Wimpenny J. W. T., Lloyd D. The disintegration of microorganisms, p. 1—54. In: J. R. Norris and D. W. Ribbons (ed.), *Methods in microbiology*, vol. 5B. Academic Press, Inc., New York, 1971.
5. Laemmli U. Cleavage of structural proteins during assembly of bacteriophage T4. *Nature (London)*, **222**, 293—298 (1970).
6. MacGregor C. H., Schnaitman C. Reconstitution of nitrate reductase activity and formation of membrane particles from cytoplasmic extracts of cholate-resistant mutants of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **114**, 1164—1176 (1973).
7. Neu H. C., Heppel L. A. The release of enzymes from *Escherichia coli* by osmotic shock and during the formation of spheroplasts. *J. Biol. Chem.*, **240**, 3685—3692 (1965).
8. Osborn M. J., Munson R. Separation of the inner (cytoplasmic) and outer membranes of gram negative bacteria. *Methods Enzymol.*, **31A**, 642—653 (1974).
9. Ross J. W. Continuous-flow mechanical cell disintegrator. *Appl. Microbiol.*, **11**, 33—35 (1963).
10. Salton M. R. Isolation of cell walls from gram positive bacteria. *Methods Enzymol.*, **31A**, 653—667 (1974).
11. Schaechter G. E., Pollack R. L. A simplified method for quantified assay of small amounts of protein in biological material. *Anal. Biochem.*, **51**, 654—655 (1973).
12. Steinberg W. Properties and developmental roles of the lysyl- and tryptophanyl-transfer ribonucleic acid synthetases of *Bacillus subtilis*: common genetic origin of the corresponding spore and vegetative enzymes. *J. Bacteriol.*, **118**, 70—82 (1974).
13. Sykes J. Centrifugal techniques for the isolation and characterization of sub-cellular components from bacteria, p. 55—207. In: J. R. Norris and D. W. Ribbons (ed.), *Methods in microbiology*, vol. 5B. Academic Press, Inc., New York, 1971.
14. Work E. Cell walls, p. 361—418. In: J. R. Norris and D. W. Ribbons (ed.), *Methods in microbiology*, vol. 5A. Academic Press, Inc., New York, 1971.

Часть II

РОСТ

ВВЕДЕНИЕ

Р. Костилоу

Начиная с изящной работы Роберта Коха, сделанной еще в середине XIX столетия, методы выращивания бактерий стали основной заботой бактериологов. Для выращивания различных видов и штаммов микроорганизмов в самых различных целях были предложены буквально тысячи методик и сред. Однако все эти методики базируются на определенных общих принципах.

Для размножения любой бактерии (независимо от целей) необходимо обеспечить подходящее биофизическое окружение и биохимические питательные компоненты. В гл. 6 приведены методы контроля таких биофизических факторов, как pH, температура, подача и удаление кислорода, и другие. В гл. 7 рассмотрены потребности в питательных веществах, состав синтетических и комплексных сред и количественные определения роста бактерий. Умелое обращение с биофизическими, биохимическими и биологическими факторами приобретает особую важность в получении накопительных культур и последующего выделения бактерий в виде чистой культуры (гл. 8).

Способы культивирования бактерий значительно различаются, причем это зависит не только от потребностей организма, но и от того, для чего будет использоваться культура. Для выделения чистых культур, определения числа жизнеспособных клеток в популяциях и для многих других целей широко используются твердые среды. Гелеобразующие вещества и специальные методы приготовления твердых и полужидких сред рассматриваются в гл. 9. В гл. 10 описываются различные системы для жидких культур: стационарная, или периодическая, проточная, диализная — и другие специальные системы, а также методы сбора, отмывки и учета урожая бактерий.

Ростом обычно называют постепенное увеличение всех биохимических компонентов индивидуума. Для бактерий наиболее характерным результатом роста является увеличение числа клеток, т. е. их размножение. В гл. 11 описаны различные методы измерения количества клеток и математические приемы, используемые при учете и статистической обработке результатов.

Современные методы хранения чистых культур обсуждаются в гл. 12. Можно было бы составить целый «Журнал невоспроизводимых результатов», в котором были бы собраны данные, свидетельствующие о неумении исследователей сохранять необходимые бактериальные штаммы. В некоторых журналах существует требование, согласно которому каждая использованная в опубликованной работе культура должна быть помещена в какую-либо известную коллекцию. К сожалению, это не всегда позволяет избежать неудач, поскольку при хранении бактерии мутируют и при частых пересевах культура обогащается мутантными формами.

Из многих методов выращивания бактерий авторы выбрали только те, которые, по их мнению, являются наиболее приемлемыми. Там, где это возможно, приведены очень ценные обобщения, главным образом в виде таблиц, включающих составы сред (гл. 7). В некоторых случаях авторы ограничиваются изложением общих принципов и примерами использования методов. Это относится, в частности, и к тем распространенным методам, описания которых в литературе страдают многословием и противоречивостью трактовок. Во всех главах, входящих в данную часть, рассмотрены также наиболее общие причины ошибок.

БИОФИЗИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Р. Костилоу

Выбор основных компонентов среды культивирования определяет в известной мере значения таких важных биофизических параметров, как рН, активность воды, осмотическое давление. Температура, аэрация и давление определяются условиями культивирования. Другой важный параметр — окислительно-восстановительный потенциал зависит как от состава ростовой среды, так и от условий культивирования. Все эти факторы влияют на скорость роста, выход биомассы, метаболизм и химический состав бактерий. Контроль щелочно-кислотных условий, температуры и аэрации является критическим для любой бактериальной культуры; контроль окислительно-восстановительного потенциала особенно важен при культивировании облигатно-анаэробных бактерий.

6.1. рН

рН служит показателем активности ионов водорода (H^+). В разбавленных растворах коэффициент активности очень близок к 1, и поэтому активность H^+ практически равна концентрации. В таком случае $pH \simeq -\lg[H^+]$. Шкала рН начинается от 0 ($[H^+] = 1 \text{ М}$) и заканчивается 14-ю ($[H^+] = 10^{-14} \text{ М}$). Хотя некоторые бактерии растут при рН 1,0, а другие при рН 11, многие виды растут в относительно узком интервале рН, а большинство из них — при значениях рН, близких к 7,0.

6.1.1. Измерение

Для точного определения рН пользуются рН-метром со стеклянным электродом. В разд 16.2.1 приведено описание водородного электрода, методов, используемых для калибровки рН-метров, и способов обращения с электродами. В работе Манро [9] можно найти детальное описание измерения и контроля рН. Когда необхо-

димо точное измерение рН, следует придерживаться следующих правил.

1. Доводить температуру буфера, используемого для калибровки рН-метра, до температуры измеряемой пробы, поскольку рН буфера зависит от температуры. Так, рН стандартного фосфатного буфера равен 6,98 при 0 °С, 6,88 при 20 °С и 6,84 при 37 °С. Значения рН стандартных буферов при различных температурах приведены в «Справочнике по химии и физике» [16].

2. Если проба во время измерения перемешивается на магнитной мешалке, то таким же путем нужно перемешивать стандартный буфер.

3. Определять рН сред после стерилизации. Автоклавирование сред часто приводит к заметным сдвигам рН. Значительный сдвиг рН может происходить даже после стерилизации фильтрованием.

4. Проверять рН среды перед использованием.

5. Поскольку некоторые рН-электроды дают неточные результаты при работе с трис-буфером, необходимо прежде всего убедиться в том, что электроды пригодны для работы с этим буфером.

В тех случаях, когда нет необходимости в высокой точности измерений, например при работе с обычными средами, рН определяют с помощью раствора индикаторного красителя или индикаторной бумаги. При пра-

Таблица 6.1. рН-индикаторы и диапазоны рН, в которых они используются

Индикатор ^а	Диапазон рН	Цвет	
		кислая среда	щелочная среда
Тимоловый голубой	8,0—9,6	Желтый	Голубой
Феноловый красный	6,8—8,4	»	Красный
Бромтимоловый синий	6,0—7,6	»	Голубой
Бромкрезоловый фиолетовый	5,2—6,8	»	Фиолетовый
Метиловый красный	4,4—6,0	»	Красный
Бромкрезоловый зеленый	3,8—5,4	»	Голубой
Бромфеноловый синий	3,0—4,6	»	»

^а Используют 0,04%-ный раствор, для этого 0,1 г индикатора растворяют в минимальном (10—30 мл) объеме 0,01 N NaOH и добавляют воды до 250 мл

вильном их подборе рН можно измерить с точностью до 0,2 единицы. Индикаторные растворы и бумаги, а также их соответствующие стандартные образцы определенного цвета для различных интервалов рН поставляются большинством фирм, производящих реактивы и научное оборудование. В табл. 6.1 приведены наиболее часто употребляемые рН-индикаторы и диапазоны рН, в которых они используются.

Некоторые рН-индикаторы часто добавляют к среде культивирования с целью выявить изменение рН в процессе роста бактерий. Для этого нужно подобрать соответствующий задаче рН-индикатор и убедиться, что он не подавляет рост микроорганизма. Все рН-индикаторы плохо растворимы в воде и используются в средах в очень низких концентрациях (менее 0,01%).

6.1.2. Буферы

Многие бактерии используют или приводят к накоплению в растворах значительных количеств кислых или щелочных ионов. Хотя образование кислоты и ее потребление сбалансированы, в процессе роста могут происходить значительные изменения рН среды. Грубо рН культуры поддерживают с помощью добавляемых к среде буферов, т. е. веществ, препятствующих сдвигам значений рН. Тонкий контроль за щелочно-кислотными условиями достигается при автоматической подаче в среду культивирования кислоты или щелочи.

Буферы обычно представляют собой смеси слабых кислот и оснований. В комплексных средах буферным действием обладают кислые и основные группы таких органических молекул, как белки, пептиды и аминокислоты. Из-за присутствия различных веществ среды могут обладать буферным действием в широком интервале рН. Однако буферная емкость при любом заданном значении рН широко варьирует в зависимости от типа присутствующих в растворе органических молекул и их концентрации.

Для культивирования многих бактерий необходимо применять забуференные среды. При выборе соответствующего буфера исходят из: 1) подходящего значения рН буфера, 2) возможного ингибирующего или токсич-

ческого действия буфера, 3) возможной утилизации компонентов буфера бактериальной культурой, 4) возможного связывания буфером двух- и трехвалентных металлов.

Буферы со слабыми кислотными и основными свойствами наиболее эффективны вблизи значений рН, при которых они диссоциируют на 50%. Эта величина рН соответствует pK_a (отрицательный логарифм константы диссоциации) кислоты или основания. Эффективный диапазон буфера отличается от величины pK_a не более чем на одну единицу рН. В табл. 6.2 приведен ряд соединений, которые используются в качестве буферов в ростовой среде, а также их наиболее пригодные значения pK_a при 25°C. Обратите внимание, что соли лимонной, фталевой и янтарной кислот обладают буферной емкостью в широком интервале значений рН, поскольку соответствующие им кислоты содержат более одного диссоциируемого иона водорода. Буферы, содержащие перечисленные в таблице вещества, обычно готовят согласно одной из следующих методик.

1. Сначала готовят раствор кислоты или основания в концентрации, вдвое превышающей необходимую, титруют его NaOH или HCl на рН-метре до необходимого значения рН и затем доводят раствор до конечного объема. Например, для приготовления 1 л 0,1 М трис-HCl-буфера с рН 7,6 титруют 500 мл 0,2 М раствора триса с помощью HCl до рН 7,6 и затем доводят раствор до 1 л. Разведение почти не влияет на конечную

Таблица 6.2. Значения pK_a соединений, используемых в буферах

Соединение	Пригодные значения pK_a при 25 °C		
Лимонная кислота	3,13	4,76	6,39
Фталевая кислота	2,89	5,51	
Барбитуровая кислота	4,01		
Щавелевая кислота	4,19		
Янтарная кислота	4,16	5,61	
Уксусная кислота	4,75		
Одноосновный фосфат	7,21		
Трис	8,08		
Борная кислота	9,24		
Глицин	9,87		

величину рН. Если же это влияние, хотя и очень незначительное, все-таки существует, проводят окончательную коррекцию рН перед добавлением последних нескольких миллилитров воды во время разведения раствора.

2. Готовят эквимоллярные концентрации кислых и основных компонентов системы и смешивают два раствора в соответствующих пропорциях, так чтобы установился необходимый рН. Один раствор титруют другим на рН-метре, используя магнитную мешалку. Если требуемое значение рН близко к pK , то соотношение между кислым и основным растворами равно примерно 1:1. Если рН на одну единицу выше pK , то это отношение составляет 1:10; при величине рН ниже pK на одну единицу оно равно 10:1. Например, для приготовления 100 мл 0,1 М натрийфосфатного буфера, рН 7,0, смешивают примерно в равных пропорциях растворы 0,1 М NaH_2PO_4 (одноосновного) и 0,1 М Na_2HPO_4 (двухосновного), а затем добавляют избыток одного из этих растворов и, контролируя процесс с помощью рН-метра, доводят рН до 7,0. Для приготовления приблизительно 100 мл фосфатного буфера, рН 6,0, титруют 95 мл одноосновного раствора двухосновным.

Для бактериальных ростовых сред наиболее широко используются фосфатный, трис-солянокислый, цитратный и ацетатный буферы. Эти четыре буферные системы охватывают практически весь интервал значений рН, в котором могут расти бактерии. В табл. 6,3 приведены смеси, используемые для приготовления буферов, а также соотношения компонентов для получения данного рН смеси. Как упоминалось выше, рН любого буфера зависит от температуры. Таблицы для приготовления других смесей, обладающих буферным действием при различных температурах, приведены во многих руководствах [2, 3, 9, 16].

При инкубации культур в атмосфере, обогащенной CO_2 , как правило, используют буфер, содержащий угольную кислоту и бикарбонат. Концентрация в среде угольной кислоты (H_2CO_3) прямо зависит от парциального давления CO_2 в атмосфере. Согласно уравнению Гендерсона — Хассельбаха для этой системы

$$\text{pH} = \text{pK}' + \lg \frac{\text{HCO}_3^-}{\text{CO}_2},$$

Таблица 6.3. Приготовление буферов, часто используемых в бактериологических средах^а

рН	Величина x , используемая в прописях буферов			
	ацетатный буфер ^б	цитрат-фос- фатный буфер ^в	фосфатный буфер ^г	трис-НСI- буфер ^д
4,0	41,0	30,7	—	—
4,2	36,8	29,4	—	—
4,4	30,5	27,8	—	—
4,6	25,5	26,7	—	—
4,8	20,0	25,2	—	—
5,0	14,8	24,3	—	—
5,2	10,5	23,3	—	—
5,4	8,8	22,2	—	—
5,6	4,8	21,0	—	—
5,8	—	19,7	46,0	—
6,0	—	17,9	43,85	—
6,2	—	16,9	40,75	—
6,4	—	15,4	36,75	—
6,6	—	13,6	31,25	—
6,8	—	9,1	25,5	—
7,0	—	6,5	19,5	—
7,2	—	—	14,0	44,2
7,4	—	—	9,5	41,4
7,6	—	—	6,5	38,4
7,8	—	—	4,25	32,5
8,0	—	—	2,65	26,8
8,2	—	—	—	21,9
8,4	—	—	—	16,5
8,6	—	—	—	12,2
8,8	—	—	—	8,1
9,0	—	—	—	5,1

^а Данные из работы [3]

^б x мл 0,2 М уксусной кислоты + (50— x) мл 0,2 М ацетата натрия, довести водой до 100 мл.

^в x мл 0,1 М лимонной кислоты + (50— x) мл 0,2 М Na_2HPO_4 , довести водой до 100 мл

^г x мл 0,2 М NaH_2PO_4 + (50— x) мл 0,2 М Na_2HPO_4 , довести водой до 100 мл.

^д 50 мл 0,2 М триса + x мл 0,2 М HCl, довести водой до 100 мл.

величина pK' при 20°C составляет около 6,4. Отсюда молярное соотношение между CO_2 и бикарбонатом (HCO_3^-) равно $\sim 1:1$ при этом значении рН, а CO_2 -бикарбонатный буфер эффективен в диапазоне рН 5,4—8,0. Если рН среды ниже 5,0, то в ней практически отсутст-

Таблица 6.4. Растворимость CO_2 в воде и величины pK' угольной кислоты при разных температурах^a

Температура, °C	Растворимость CO_2 б	pK'	Температура, °C	Растворимость CO_2 б	pK'
20	0,876	6,392	35	0,592	6,328
25	0,759	6,365	40	0,530	6,312
30	0,665	6,348			

^a Данные Умбрейта и др. [35].^б Миллилитры CO_2 на 1 мл воды при давлении 1 атм.

вует бикарбонат, и увеличение концентрации CO_2 в атмосфере будет приводить к снижению pH за счет образования угольной кислоты. При концентрации CO_2 в атмосфере от 50 до 100% среда должна быть очень щелочной для поддержания уровня pH, близкого к нейтральному. Однако следует помнить, что присутствие в среде солей в высоких концентрациях может оказаться токсичным для бактерий.

После соответствующего преобразования уравнение Гендерсона — Хассельбаха можно использовать для определения количества бикарбоната, добавляемого в среду в качестве буфера при данном значении pH и различном содержании CO_2 в атмосфере. Для расчетов используют уравнение

$$\lg(\text{HCO}_3^-) = \text{pH} - pK' + \lg P(\alpha) (\% \text{CO}_2) (5,87 \cdot 10^{-7}),$$

где P — атмосферное давление в мм рт. ст., α — растворимость CO_2 (в мл) в 1 мл воды, а $\% \text{CO}_2$ — процентное содержание CO_2 в атмосфере. Если атмосферное давление равно 720—760 мм рт. ст. (примерно 96,0—101,3 кПа), то его колебания оказывают незначительное влияние. Поэтому в большинстве случаев можно использовать следующее упрощенное уравнение:

$$\lg(\text{HCO}_3^-) = \text{pH} - pK' + \lg \alpha (\% \text{CO}_2) (4,35 \cdot 10^{-4}).$$

Величины α и pK' для различных температур приведены в табл. 6.4. Подробности использования карбонатных буферов можно найти в работе Умбрейта и др. [35].

Обычные буферы не могут стабилизировать значения pH сред, используемых для выращивания бактерий, об-

разующих большое количество кислоты (например, молочнокислых). В этом случае кислоту следует максимально быстро нейтрализовывать, добавляя к среде тщательно измельченный мел (CaCO_3). При добавлении порошкообразного мела (0,3%) к агару в чашках удобно наблюдать за образованием кислоты растущими колониями. Однако в этом случае необходимо убедиться, что мел был хорошо суспендирован в агаре при его разливе по чашкам. Колонии, образующие кислоту, формируют вокруг себя зоны просветления. Кислоту можно также удалить в системе культивирования с диализом (разд. 10.3.4).

6.1.3. Постоянный контроль

В тех случаях, когда pH культуры необходимо поддерживать в узком интервале, используют систему автоматического поддержания значений pH. Такая система должна включать pH-метр, стерилизуемые паром pH-электроды, устройство для поддержания заданного pH и насосы для добавления кислоты или щелочи. Большинство систем обычно оснащено самописцем, обеспечивающим постоянную регистрацию pH. Автоматические системы выпускает ряд фирм: New Brunswick Scientific Co., New Brunswick, N. J.; The Vir Tis Co., Inc., Gardiner, N. Y.; Cole-Palmer Instrument Co., Chicago, Ill.). Имеются в продаже также стерилизуемые паром pH-электроды в различных наборах (Beckman Instruments, Inc., Fullerton, Calif.; Ingold Electrodes, Lexington, Mass.; Leeds and Northrup, North Wales, Pa.).

Точность системы pH-контроля следует достаточно регулярно проверять с помощью отдельного pH-метра. При этом могут возникнуть следующие проблемы: 1) неправильное или недостаточное заземление системы; 2) старение стеклянных pH-электродов при их стерилизации паром; 3) загрязнение мембраны электрода сравнения компонентами среды и продуктами бактериального метаболизма в процессе длительной работы. Наиболее часто мембрана загрязняется белками и сульфидом серебра, который образуется в результате реакции хлористого серебра в электроде сравнения с содержащими серу компонентами среды. Белки удаляют выдержива-

нием электродов в растворе протеазы (например, проназы), а сульфид серебра — обработкой электродов кислым раствором тиомочевины.

6.2. АКТИВНОСТЬ ВОДЫ И ОСМОТИЧЕСКОЕ ДАВЛЕНИЕ

Вода необходима клеткам для их метаболизма и роста. Однако просто присутствие воды еще не означает, что она доступна для клетки. Доступность воды определяется ее активностью в среде (a_w). Величина a_w отражает лишь доступную часть всех молекул воды и численно равна отношению давления водяных паров над раствором к давлению паров над чистой водой (p/p_0). Это отношение, выраженное в долях единицы, численно равно относительной влажности атмосферы над средой в состоянии равновесия (выражаемой обычно в процентах) [10—12, 14]. Колебания температуры в пределах, обеспечивающих рост бактерий, влияют на величину a_w незначительно.

Величина a_w и истинная осмоляльность среды связаны соотношением

$$a_w = 55,51 / (vm\phi + 55,51),$$

где v — число ионов, образуемых на одну молекулу раствора, m — моляльность жидкости и ϕ — моляльный осмотический коэффициент. Один килограмм воды содержит 55,51 молей.

Осмотическое давление раствора (π), выраженное в атмосферах, зависит от концентрации раствора:

$$\pi = \frac{vn\phi RT}{V'},$$

где n — число молей, присутствующих в растворе, R — газовая постоянная ($0,0821 \text{ л} \cdot \text{атм} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{град}^{-1}$), T — абсолютная температура ($^{\circ}\text{C} + 273^{\circ}\text{C}$), V' — объем растворителя.

Соотношение между π и a_w имеет вид

$$\pi = -\frac{RT}{\bar{V}} \ln a_w,$$

где $\bar{V}$ — объем 1 моля воды. Подробности, касающиеся приведенных уравнений, можно найти в работах [10, 12, 14].

Минимальное значение a_w , при котором бактерии способны расти, значительно варьирует, однако для большинства видов оно превышает 0,99. Некоторые галофильные бактерии нуждаются в ионах натрия и лучше всего растут в присутствии высоких концентраций хлористого натрия ($a_w \approx 0,80$). Колебания величины a_w могут оказывать влияние на скорость роста бактерий, их состав и метаболическую активность. Многие растворенные вещества оказывают выраженное специфическое действие при концентрациях, ниже необходимых для лимитирования доступности воды. Поэтому определение лимитирующих значений a_w следует проводить в средах, содержащих по возможности различные связывающие воду вещества. Обзоры работ по влиянию a_w на рост бактерий можно найти в литературе [12, 14, 32].

Предложен ряд методов измерения активности воды с помощью специальных приборов: вибратора Брэди (Thunder Scientific Co., Albuquerque, N. M.), индикатора относительной влажности, модель 400 (General Easter Corp., Watertown, Mass.), гигрометра (Hygro Dynamics, Silver Spring, Md.) и синаскопа (Sina Ltd., Zurich, Switzerland). В США эти приборы продает фирма Beckman Instruments, Inc., Cedar Grove, N. J. Достоинства и недостатки приборов обсуждаются в работах [11, 14].

Данные сравнительного изучения [27] методов определения a_w свидетельствуют о значительной вариабельности результатов, получаемых с помощью различных методов, причем достоверность цифр после второго десятичного знака весьма сомнительна. Статистический анализ измерений, проведенных на электронном синаскопе (в пределах a_w 0,755—0,967), показал разброс меньше $\pm 0,01$ [34].

Наиболее широко используемые приборы для определения осмотического давления основаны на измерении снижения давления пара (Wescan Instruments, Santa Clara, Calif.) или точки замерзания (Advanced Instruments, Needham Height, Mass.). На других приборах измеряют осмотическое давление, возникающее по обе стороны от полупроницаемой мембраны (Schleicher and Schuell Co., Keene, N. H.). Несмотря на то что часть приборов уже откалибрована для прямой регистрации, следует одновременно с пробами использовать стандартные

растворы. Имеются приборы для измерения различных интервалов осмотического давления в пределах 0—4 осмолей (моляльность идеального раствора, характеризующего теми же величинами a_w и осмотического давления, что и исследуемая проба).

Лучший способ стандартизации a_w и осмотического давления бактериологических сред заключается в добавлении таких компонентов, как хлористый натрий, хлористый калий, сульфат натрия или смесей этих солей. Скотт [32] подробно описывает методы расчета a_w питательных сред и концентраций солей, необходимых для получения заданных значений a_w .

Связь между осмотическим давлением, проницаемостью и транспортными системами бактерий обсуждается в гл. 19.

6.3. ТЕМПЕРАТУРА

Температура инкубации значительно влияет на интенсивность роста бактерий, поскольку она воздействует на скорость всех клеточных реакций. Кроме того, температура может влиять на характер метаболизма клеток, их потребности в питательных веществах и состав.

У большинства бактерий зависимость скорости роста от температуры сходна с зависимостью, представленной на рис. 6.1, А. Полезная область температуры, близкая к оптимальной, обычно довольно узка, а максимальная температура роста нередко лишь на несколько градусов (от 3 до 5 °C) выше оптимальной. Вместе с тем минимальная температура роста может быть на 20—40 °C ниже оптимальной. Чтобы рост бактерий был заметен при минимальной температуре, их следует инкубировать довольно долго. Например, по данным Ингрэма [26], чтобы добиться удвоения клеток *E. coli* при температуре 8 °C, эти бактерии необходимо выращивать 41 ч, а при оптимальной температуре для этого достаточно 21 мин.

Ниже оптимума изменения скорости роста бактерий сравнимы с температурной зависимостью химических реакций только в небольшом интервале температур. Так, если мы отложим на графике (рис. 6.1, Б) логарифм скорости роста против обратных величин абсолют-

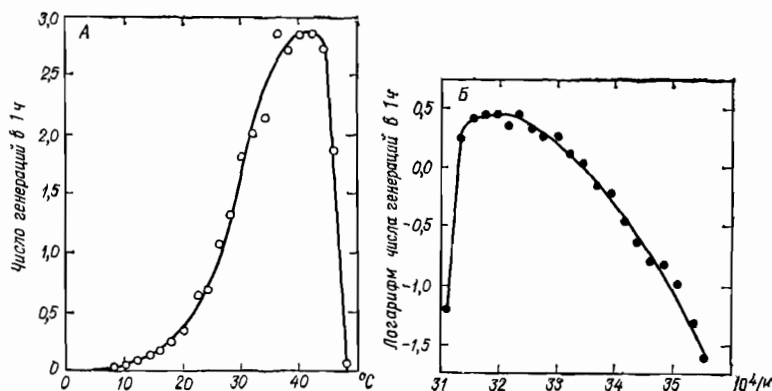


Рис. 6.1. Влияние температуры на скорость роста *E. coli* при линейной (А) и логарифмической (Б) шкале ординат (кривая Аррениуса) [26].

ной температуры (зависимость Аррениуса), то линейная зависимость наблюдается лишь в ограниченном интервале температур [10, 26, 31]. У большинства бактерий температурный коэффициент Q_{10} скорости роста в этом интервале близок к 2; иными словами, при увеличении температуры на 10°C скорость роста удваивается. В границах оптимальной температуры роста кривая Аррениуса для скорости роста почти горизонтальна, но при температурах, близких к максимальной и минимальной, она приобретает почти вертикальный наклон.

В целом при температурах роста несколько выше максимальных бактерии не только замедляют свой рост, но и быстро гибнут. Поэтому инкубация бактериальной культуры при температурах выше оптимальной требует точного температурного контроля. Для большей безопасности культуру лучше инкубировать ниже ее температурного оптимума, в пределах колебаний заданной температуры термостата.

В обычных воздушных термостатах конвекционного типа колебания температуры достигают нескольких градусов Цельсия и даже больше при частом открывании дверцы. Даже у термостатов с водяной рубашкой и, следовательно, с более постоянной температурой колебания

в 1°C не столь уж редки. Для точного температурного контроля пользуются перемешиванием воды в банях; в этом случае температурные колебания составляют сотые доли градуса. Для точного измерения влияния температуры на скорость роста бактерий необходима инкубация в таких банях.

При осуществлении температурного контроля на практике придерживаются следующих правил.

1. Во время инкубации измеряют температуру в различных частях термостата термометрами, помещенными в колбы или пробирки с водой.

2. Поскольку температура и влажность воздушных термостатов значительно варьируют, для усиления воздушных конвекционных токов пользуются феном. Культуру в термостате располагают таким образом, чтобы она ни в коем случае не попала в «мертвое» воздушное пространство. Термостат открывают только в случае крайней необходимости.

3. В ответственных экспериментах при изучении температурной зависимости следят за охлаждением поверхности среды при ее испарении и поэтому там, где это возможно, пользуются посудой с хорошо пригнанными пробками. Если необходима постоянная циркуляция воздуха, например для аэробных бактерий, пользуются термостатами, которые обеспечивают высокую относительную влажность. Это особенно важно при высоких температурах инкубации.

4. Для высокотемпературных термостатов пользуются в качестве рабочей жидкости 50%-ным полиэтиленгликолем или легким силиконовым маслом.

Для получения температурной зависимости роста бактерий измеряют скорости роста при нескольких тщательно контролируемых температурах и располагают данные, как показано на рис. 6.1. Если в целом форма кривой значительно отличается от нормального распределения, еще раз более тщательно проверяют экспериментальные точки.

Ряд термостатов с температурными градиентами описан в обзоре Пэтчинга и Роуза [31]. Эти термостаты позволяют контролировать рост бактерий в более широких температурных интервалах и содержат устройства для аэрации культур микроорганизмов с различными

потребностями в кислороде. Такие термостаты с температурными градиентами нужны при измерении некоторых параметров роста. Пока этих термостатов нет в продаже, но их можно легко изготовить в мастерских.

6.4. ДАВЛЕНИЕ

Высокое гидростатическое давление оказывает неблагоприятное влияние на рост и выживание бактерий. Хотя в интервале давлений 1—100 атм большинство видов бактерий малочувствительно к нему, при этом давлении не удастся выделить чистую культуру облигатно-барофильных бактерий [8]. Исследования культур в условиях высоких давлений весьма ограничены, и мы не будем здесь останавливаться на соответствующих методах. Маркиз [8] предложил некоторые методические приемы выращивания культуры при высоком давлении. Тэйлор и Янах [33] разрешили одну из основных проблем в данной области: они сконструировали аппарат, который позволяет в условиях высокого давления вносить в культуру добавки и отбирать пробы, не вызывая при этом перепадов давления.

6.5. КИСЛОРОД

Аэробные и факультативно-анаэробные бактерии утилизируют растворенный кислород, и поэтому их рост и метаболизм зависят от концентрации кислорода в растворе. Растворенный кислород является таким же питательным компонентом, как глюкоза или аммоний, однако в отличие от большинства подобных компонентов он довольно плохо растворим (<10 мг/л). Поэтому для бактерий, выращиваемых в жидких средах, кислород может быстро стать лимитирующим фактором, если не принимаются специальные меры, обеспечивающие его постоянную подачу и растворение в среде во время роста бактерий.

Отметим следующие основные факторы, на которые следует обратить внимание при аэрации жидкой культуры.

1. Доступность кислорода на границе раздела фаз питательная среда — газ. Сосуд с культурой следует за-

крывать пробкой или крышкой из пористого материала, так чтобы обеспечивался максимальный газообмен.

2. Поддержание большого отношения площади контакта газа с жидкой средой к объему последней. Со стационарными культурами это удается при использовании очень плоских сосудов. Благодаря встряхиванию колб на качалках площадь поверхности среды значительно увеличивается, причем этот эффект еще больше усиливается при создании турбулентных потоков среды за счет углублений в боковой части колб или при помещении в них изогнутой стальной пружины. С увеличением объема перемешиваемой культуры происходит быстрое падение ее насыщения кислородом.

При работе с большими объемами среды (0,5—1 л) обычно продувают через жидкость воздух. В таких культурах эффективность растворения кислорода зависит от числа и минимального размера воздушных пузырьков, а также от длительности контакта между пузырьками и жидкостью. При использовании газовых барботеров с малыми размерами пор получают мелкие пузырьки, однако при этом возникают условия, способствующие образованию пены. Длительность контакта между пузырьками и жидкостью можно увеличить, используя сосуды с большим отношением высоты к диаметру; этот же эффект достигается путем перемешивания культуры или с помощью перегородок в сосудах.

Системы аэрации при культивировании бактерий подробно обсуждаются в гл. 10, а также в работах Пирта [10] и Уэнга и др [15].

6.5.1. Растворенный кислород

Для измерения растворенного кислорода наиболее подходящим способом является полярография с помощью кислородного электрода, принципы и методические приемы которой описаны ниже (разд. 16.2.3). Подробности методов с использованием полярографа для измерения скоростей растворения кислорода в культурах можно найти у Пирта [10], Уэнга и др. [15] и Хитчмэна [4].

6.5.2. Скорость поглощения кислорода

Скорость поглощения кислорода (СПК) выражается в миллимолях на литр в минуту и легко определяется химически по скорости окисления сульфита в сульфат растворенным кислородом в присутствии медного катализатора. Этот метод дает информацию об эффективности системы аэрации, однако истинная СПК в бульонных культурах может значительно отличаться от СПК в водных растворах сульфита натрия. Существует ряд способов измерения СПК в средах как в присутствии биомассы, так и в ее отсутствие [1, 10, 15]. Ниже приводится простой метод измерения СПК по окислению сульфита [23].

1. Вместо ростовой среды используют соответствующий объем раствора сульфита натрия, содержащего 0,001 М сульфата меди, с той же степенью аэрации и при той же температуре, которые характерны для изучаемой среды. Концентрация сульфита натрия в каждом случае зависит от условий аэрации (см. ниже).

2. В различные интервалы времени после начала аэрации вносят дважды по 5 мл раствора сульфита в пробирки размером 2,5×25 см, содержащие небольшие кусочки сухого льда. Выделяющийся CO_2 перемешивает образец во время титрования и, покрывая его, препятствует дальнейшему окислению. Если образец замерзает, подогрейте его перед окончанием титрования.

3. Добавляют несколько капель крахмального раствора и титруют раствор сульфита до постоянного голубого окрашивания свежеприготовленным раствором иода, который калиброван по стандартному раствору тиосульфата натрия. Нормальность раствора иода должна составлять около $\frac{1}{5}$ нормальности раствора сульфита.

4. СПК рассчитывают следующим образом:

$$\text{СПК} = \frac{\text{Разность по результатам титрования (мл)} \times \text{Нормальность раствора иода}}{4} \times \frac{1000 \text{ мл}}{5 \text{ мл}} \cdot \frac{1}{\text{мин}}.$$

Следует отметить, что по этому уравнению можно рассчитать концентрации сульфита и иода, соответству-

ющие данной эффективности аэрации. Например, если СПК составляет около 3, то использование 0,15 н. раствора иода приводит к разности по результатам титрования около 4 мл за 10 мин. Начальная концентрация сульфита натрия должна быть в пять раз больше концентрации иода, т. е. 0,75 н.

6.6. АНАЭРОБИОЗ

Иногда трудно провести четкую границу между аэробными и анаэробными условиями. Существуют бактерии, растущие как в присутствии кислорода, так и в его отсутствие (факультативные формы) или предпочитающие среды с низким напряжением кислорода (микроаэрофилы). *Spirillum volutans* являются облигатными микроаэрофилами, поскольку для инициации роста они требуют присутствия кислорода в низких концентрациях ($\sim$ от 3 до 9% O_2). Методы культивирования микроаэрофильных бактерий приведены в разд. 9.3.1.

Хотя облигатными *анаэробами* обычно считают бактерии, рост которых невозможен в присутствии растворенного кислорода, на практике к анаэробным относят те бактерии, которые не растут на поверхности (или около нее) твердой или полужидкой среды на воздухе при атмосферном давлении. Аэротолерантные анаэробные бактерии хорошо растут на поверхности агара в чашках при низком, но ощутимом уровне кислорода в атмосфере [24], тогда как более строгие анаэробные бактерии почти немедленно гибнут в такой атмосфере. При удалении кислорода предварительным кипячением среды или его замещении инертным газом условия, необходимые для роста строгих анаэробов, не достигаются.

Окислительно-восстановительный (или редокс) потенциал (E_h) позволяет наиболее удобно измерять степень анаэробноза [6]. Иными словами, E_h — это мера способности раствора отдавать или принимать электроны, т. е. окисляться или восстанавливаться. E_h выражают в единицах разности электрического потенциала, т. е. в вольтах: чем более положительна эта величина, тем выше концентрация окислителя по отношению к восстановителю в растворе, и наоборот. Способность

среды противодействовать изменениям E_h аналогична буферным свойствам растворов.

Обычно в средах, используемых в лаборатории, за увеличение E_h в основном ответствен кислород; при высоких положительных значениях E_h , обусловленных присутствием растворенного кислорода, подавляется рост всех анаэробных бактерий. В то же время положительные значения E_h , обусловленные присутствием в среде других веществ, могут не препятствовать росту даже строгих анаэробов [30, 36]. Устойчивость к E_h разных анаэробных бактерий различна. Однако в стандартной среде рост большинства анаэробных бактерий подавляется при величинах E_h выше -100 мВ. Некоторые из них не растут при потенциале выше -330 мВ; теоретическая концентрация кислорода при этом значении E_h составляет $1,48 \cdot 10^{-56}$ молекул на 1 л [6]. Даже при потенциале -140 мВ концентрация кислорода составляет только $1,5 \cdot 10^{11}$ молекул на 1 л [10], т. е. менее 1 молекулы кислорода на клетку для многих бактериальных культур. Это показывает, что для выращивания строгих анаэробов важно создание более восстановительных условий, чем те, которые обеспечиваются простым удалением кислорода из культуральной среды.

6.6.1. Измерение E_h

E_h раствора наиболее точно можно измерить электрометрически. Подробно способы измерения и необходимые при этом предосторожности описаны в обзоре Джеккоба [7]. Рассмотренные в нем методики приемлемы для бактериологов общего профиля.

Чтобы найти E_h сред и культур, особенно для анаэробных бактерий, широко используют окислительно-восстановительные красители. Эти красители обратимо окисляются и восстанавливаются, причем в окисленном состоянии они окрашены, а в восстановленном — бесцветны. Разные красители восстанавливаются при различных значениях E_h . Величина E_h , при которой краситель окислен или восстановлен на 50% при рН 7,0, называется стандартным окислительно-восстановительным потенциалом (E_0').

6. БИОФИЗИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Таблица 6.5. Стандартные окислительно-восстановительные потенциалы красителей при pH 7,0 и 30 °C^a

Краситель	E'₀, мВ	Краситель	E'₀, мВ
Метиленовый синий	11	Индигодисульфонат	—125
Толуидиновый синий	—11	Индигомонаосульфонат	—160
Индиготетрасульфонат	—46	1,5-антрахинонсульфат	—200
Резорурфин ^б	—51	Феносафранин	—252
Индиготрисульфонат	—81	Бензилвиологен	—359

^a Данные из работы Джекоба [7], где можно найти более полный перечень красителей.

^б Продукт первого этапа восстановления ресазуррина.

В табл. 6.5 перечислены некоторые наиболее распространенные красители и их стандартные окислительно-восстановительные потенциалы. Весь диапазон Eh от полного окисления до полного восстановления, который охватывается окислительно-восстановительным красителем, составляет около 120 мВ при постоянном значении pH. К примеру, метиленовый синий ($E'_0 = 11$ мВ при pH 7,0) почти полностью окислен (окрашенный) при $E_h = 71$ мВ и почти полностью восстановлен (бесцветный) при $E_h = -49$ мВ [7].

Окислительно-восстановительный потенциал красителей зависит от pH. Например, метиленовый синий при значениях pH 5,0, 7,0 и 9,0 восстановлен на 50% при E_h , равном соответственно 101, 11 и —50 мВ [8]. Точная зависимость E'_0 от величины pH связана с видом красителя. Для большинства красителей E'_0 увеличивается от 30 до 60 мВ при падении pH на единицу, и наоборот.

Для определенных бактерий некоторые окислительно-восстановительные красители токсичны даже в очень низких концентрациях. За исключением случаев, когда известно, что данный краситель нетоксичен, при использовании красителей ставят соответствующие контроли. При этом краситель вносят в максимально низкой концентрации, так как он может изменить E_h той среды, в которой окислительно-восстановительный потенциал слабо забуферен [7].

Многие анаэробные бактерии могут быстро снижать E_h среды; их способность к росту в среде зависит от физиологического состояния и количества инокулята. Задержка роста после инокуляции наблюдается до тех пор, пока клетки не снизят потенциал до уровня, при котором они могут расти. За снижением потенциала лучше всего следить, включив в среду нетоксичный индикатор E_h . Для этой цели широко используется резазурин в концентрации от 0,1 до 0,2 мг на 100 мл. Индикатор вначале подвергается необратимому восстановлению в резорурфин, который окрашивается в розовый цвет при нейтральных значениях pH. E_0' резорурфина равен —51 мВ при pH 7,0; при E_h около —110 мВ резорурфин обесцвечивается [7].

Когда необходимы очень строгие анаэробные условия, в среду можно добавить феносафранин ($E_0' = -252$ мВ) после предварительной проверки его токсичности. Цитрат титана(III) является как восстановителем ($E_0' = -450$ мВ), так и индикатором E_h [37]. При полном окислении он обесцвечивается. Его использование будет описано ниже вместе с другими восстанавливающими агентами.

6.6.2. Восстанавливающие агенты

Восстанавливающие агенты добавляют в большинство сред, предназначенных для культивирования анаэробов, чтобы снизить окислительно-восстановительный потенциал и сбалансировать его на оптимальном уровне. Помимо того что эти вещества должны быть нетоксичными в используемых концентрациях, они должны приводить к такому снижению потенциала, которое было бы приемлемым для исследуемых организмов. Восстанавливающие агенты, особенно широко используемые при культивировании анаэробов, перечислены в табл. 6.6. Все приведенные в ней соединения имеют E_0' достаточно низкий, чтобы полностью восстановить резазурин, однако для выращивания строгих анаэробов следует использовать только те агенты, для которых $E_0' < -300$ мВ.

Восстанавливающий агент сохраняет максимальную эффективность, если основной раствор, лишенный кис-

Таблица 6.6. Восстанавливающие агенты, применяемые при культивировании анаэробов

Соединения	E_0' , мВ	Концентрация в среде
Тиогликолат натрия	< -100	0,05%
Цистеин·HCl ^a	-210 [22]	0,025%
Дитиотрейтол ^a	-330 [22]	0,05%
H ₂ + Хлористый палладий [18]	-420	
Титан(III)-цитрат ^b [37]	-480	0,5—2 мМ
Na ₂ S·9H ₂ O ^a (или H ₂ S)	-571 [6]	0,025%
Цистеин·HCl + Na ₂ S·9H ₂ O ^a		0,025% + 0,025%

^a Основные растворы автоклавируют и хранят в атмосфере, лишенной кислорода.

^b К 50 мл 0,2 М цитрата натрия добавляют 5 мл 15%-ного раствора трихлорида титана и нейтрализуют насыщенным раствором бикарбоната натрия. После стерилизации фильтрованием добавляют 30 мл этой смеси к 1 л стерильной среды, не содержащей кислорода. Комплекс титан(III)-цитрат при восстановлении окрашивается в светло-фиолетовый цвет, а при окислении обесцвечивается.

лорода, стерилизуют и хранят в атмосфере инертного газа (методы приготовления восстановленных сред приведены ниже). К среде восстанавливающий агент добавляют в необходимой концентрации непосредственно перед опытом.

Для снижения E_h среды при последующем культивировании анаэробных бактерий можно использовать также факультативно-аэробные бактерии. Так, выращивание в среде клеток *E. coli* перед инокуляцией анаэроба приводит к удалению всего остаточного кислорода и снижению E_h до уровня, который наблюдается в условиях полной защиты культуры от кислорода. Перед инокуляцией анаэроба клетки *E. coli* можно убить нагреванием. Это необходимо для того, чтобы была уверенность, что используемые факультативные микроорганизмы не влияют на рост анаэробов ни в результате конкуренции за питательные вещества, ни путем выделения токсичных продуктов.

6.6.3. Методы культивирования нестрогих анаэробов

Методы приготовления сред для культивирования и пересева нестрогих анаэробных бактерий, включая

большинство клостридиев, довольно просты [13]. Все операции можно проводить в обычной атмосфере при условии соблюдения некоторых предосторожностей для того, чтобы избежать длительного контакта бактерий и среды с кислородом. Для выращивания нестрогих анаэробов существуют следующие приемы.

1. Среду готовят в сосудах, где отношение поверхности среды к ее объему достаточно мало.

2. Для длительной инкубации анаэробов, не образующих газы, например фотосинтезирующих бактерий, наиболее подходящими являются бутылки и сосуды, доверху заполненные свежепрокипяченной средой и закрытые завинчивающимися крышками.

3. Готовят полужидкую среду, добавляя к жидкой среде 0,05—0,1% агара. Полужидкая среда способствует уменьшению конвекционных потоков.

4. На поверхность инокулированной среды наслаивают толстый слой вазпара (50% вазелина — 50% парафина).

5. Среду автоклавируют сразу же после смешивания компонентов с восстанавливающим агентом.

6. Среды долго не хранят. Их нельзя хранить в холодильнике, поскольку по мере понижения температуры растворимость кислорода растет.

7. Для контроля за степенью окисленности среды к ней добавляют ресазурин (0,1 мг на 100 мл). Если верхняя треть среды окрашивается непосредственно перед употреблением, ее кипятят и охлаждают перед инокуляцией.

8. Используют по возможности большие объемы инокулята.

9. Культуры разводят в пробирках с ростовой средой или в свежеевтоклавированном растворе, содержащем восстанавливающий агент.

10. Некоторые аэротолерантные анаэробы (например, *Clostridium perfringens*) можно развести в чашке Петри, нанести на поверхность свежей агаровой среды, содержащей восстанавливающий агент, и поместить чашку в камеру, лишенную кислорода. Однако клетки ряда других анаэробов чувствительны даже к кратковременному контакту с воздухом.

11. Чашки Петри со свежеприготовленными средами, инокулированными аэротолерантными анаэробами или спорами анаэробов, инкубируют в анаэробных условиях. Для этого можно использовать одну из следующих систем.

Вакуумный эксикатор. Его используют только для аэротолерантных анаэробов. Трижды откачивают воздух, пока давление не упадет до 500 мм рт. ст., и заполняют эксикатор инертным газом, например азотом, водородом или их смесью с примесью 5—10% CO_2 (некоторые анаэробы нуждаются в CO_2).

Сосуды для анаэробов (анаэростаты) с катализатором. Наиболее часто используют сосуд системы Torbal, модель А-3 (The Torsion Balance Co, Clayton, N. J.). Из него откачивают воздух, как описано выше, и трижды заполняют водородом или газовой смесью с большим содержанием водорода. Чтобы проверить, активен ли катализатор, его подставляют под струю H_2 : активный катализатор сильно разогревается уже через 1 мин. Реактивируют катализатор нагреванием до 160°C в течение 1 ч.

Пакеты или сосуды с генераторами $\text{H}_2 + \text{CO}_2$. Наиболее часто используют систему Gas Pak (BBL Microbiology Systems, Cockeysville, Md.), не требующую откачки воздуха. После активации газогенераторного элемента водой пакет быстро закрывают и следят в течение 30 мин за конденсацией воды. В прозрачные пакеты или сосуды можно поместить полоски индикатора (метиленовый синий) и наблюдать за их обесцвечиванием. Катализатор проверяют и реактивируют, как описано выше.

6.6.4. Метод Хангейта культивирования строгих анаэробов

Многие анаэробы, находящиеся в кишечнике, рубце или в других природных анаэробных условиях, растут только при очень низком окислительно-восстановительном потенциале. Поэтому необходимо защищать среды и клетки даже от кратковременного контакта с кислородом. Как это делают на практике, мы рассмотрим в данном и следующем разделах книги на двух примерах.

Для выделения и сохранения чистых культур строгих

анаэробов Хангейт [25] предложил метод вращающихся пробирок. Вскоре появилось много модификаций его метода. Основным преимуществом этого метода является то, что для работы требуется минимум специальной аппаратуры, а для культивирования специфических групп, например метанобразующих бактерий [17], может быть создана любая атмосфера. Подробное описание различных модификаций метода можно найти в ряде статей [6, 17, 28, 29]. В книге «Anaerobe laboratory manual» [15], опубликованной Виргинским политехническим институтом совместно с Университетом штата Виргиния, приведены модификации методов ускоренной работы с большим числом анаэробных культур. Практически все препараты и оборудование, необходимое для работы с анаэробной системой модели V. P. I., поставляет фирма Bellco Glass, Inc., Vineland, N. J.

Несмотря на очень подробное описание некоторых модификаций метода Хангейта, им довольно трудно овладеть. Лучше всего посетить для этого лабораторию, где этот метод применяется. Ниже приводятся только основные этапы и наиболее простые приемы, используемые в методе Хангейта.

Удаление кислорода из газов

Из газов, используемых для замещения воздуха, следует удалить кислород с помощью одного из следующих приемов.

1. Пропускают газ через колонку или сушильную печь, нагретую до 350 °С и содержащую медь [6]. Медь чернеет после ее полного окисления. Для регенерации меди в восстановленную форму ее выдерживают в атмосфере, содержащей не менее 3% H_2 . (*Предупреждение:* пока в колонке остается примесь O_2 , не пользуйтесь чистым H_2 , так как не исключена опасность взрыва.)

2. Газ с 3%-ным содержанием H_2 пропускают через очиститель модели Deoxo (Matheson Scientific, Inc., Ruthersford, N. J.).

3. Газ пропускают через специальную склянку с раствором титана(III)-цитрата (см. табл. 6.6). Когда раствор полностью окисляется, т. е. становится бесцветным, его заменяют.

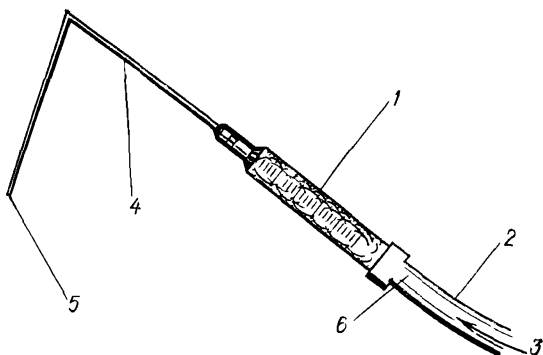


Рис. 6.2. Газовый зонд (канюля), применяемый по методике Хангейта. В эксперименте используют не менее двух зондов. После сборки зонды автоклавируют, чтобы простерилизовать вату, а затем в пламени горелки стерилизуют иглу. Скорость потока CO_2 или другого не содержащего кислород газа (не более 3% H_2) регулируют, направляя его на пламя бунзеновской горелки. Струя газа должна вызывать видимое отклонение пламени. Открытые пробирки или колбы необходимо постоянно продувать газом. 1 — заполненный ватой цилиндр шприца типа Luer-Loc емкостью 2 см³; 2 — резиновая трубка с внутренним диаметром 0,63 см; 3 — газ без примесей O_2 , поступающий из коллектора; 4 — 6-дюймовая игла № 18; 5 — спиленный острый конец иглы; 6 — фланец цилиндра шприца.

Приготовление предварительно восстановленных сред

В круглодонную колбу помещают устойчивые к нагреванию компоненты среды (за исключением восстанавливающего агента), добавляют предварительно простерилизованные кипячением кусочки стекла и осторожно кипятят раствор, пропуская над его поверхностью струю газа, лишенного кислорода. Газ продолжают пропускать и во время остывания среды, и при ее разливе. В зависимости от вида среды и культивируемого анаэроба используют двуокись углерода или аргон с добавленным к ним H_2 (3%). Применяют газовый зонд, показанный на рис. 6.2. Когда среду необходимо использовать вскоре после автоклавирования, к ней сразу же добавляют восстанавливающий агент, если он устойчив к нагреванию. Если же восстанавливающий

агент не обладает этим качеством, то его вносят в среду непосредственно перед инокуляцией. Среду разливают по пробиркам или флаконам, снабженным пробками из черной резины (лучше всего бутиловой), соблюдая следующие предосторожности.

1. Во время разлива среды над ее поверхностью постоянно пропускают струю бескислородного газа, причем пробирки или флаконы, в которые разливают среду, также следует предварительно продувать газом.

2. Предварительно заполняют газом пипетку, используемую для внесения среды. Эту пипетку оснащают грушей или резиновой выходной трубкой. Не следует набирать газ или жидкость в пипетку быстрее, чем газ поступает в сосуд.

3. После разлива среды пробирку или флакон закрывают пробкой таким образом, чтобы в них не попал воздух. Эта крайне важная операция требует определенного навыка. Для этого пробку держат у входного отверстия пробирки, продолжая пропускать газ еще в течение нескольких секунд, а затем быстро вынимают из пробирки газовый зонд и одновременно закрывают пробкой, фиксируя ее вращательными движениями.

Согласно другому способу, флакон со средой, лишенной кислорода, можно закрыть пробкой из бутиловой резины, как описано выше. Пробку закрепляют зажимом или проволокой, затем среду автоклавируют [21] и разливают по пробиркам с соблюдением правил асептики. Однако при использовании этого способа увеличивается опасность загрязнения стерильной среды и не исключается попадание в нее следов кислорода.

Для стерилизации пробки в пробирках или флаконах должны быть закреплены с помощью зажимов. Существует специальный пресс для удерживания в фиксированном положении целого набора культуральных пробирок с пробками, поставляемый фирмой Bellco Glass, Inc. Зажимы для отдельных пробирок можно изготовить самим из вешалки для одежды [17]. В специальных пробирках Хангейта, снабженных завинчивающимися крышками с отверстием диаметром 9 мм (Bellco Glass, Inc., № 2047), резиновые пробки с бортиками не нуждаются в зажимах. Используют также пробирки или сосуды с горлышком, как у флаконов для сывороток, осна-

щенные перегородчатыми пробками из бутиловой резины [29]. Пробки можно закреплять с помощью алюминиевых крышек (Wheaton Scientific, Millville, N. J.).

Инокуляция и пересев

При использовании пробирок Хангейта [6] или пробирок и бутылей с горлышком, как у флаконов для сывороток [29], инокуляцию культуры и ее пересев можно производить с помощью обычных шприцов для подкожных инъекций. Предварительно через шприц несколько раз пропускают газ, не содержащий кислорода. Среда в пробирках, оснащенных хорошо подогнанными резиновыми пробками, инокулируют следующим образом: быстрым движением немного вынимают пробку и в образовавшееся отверстие вставляют стерильную газовую канюлю, добавляют инокулят, вынимают канюлю и затем пробирку вновь закрывают пробкой. Образцы или культура, из которой отбирают инокулят, должны также обдуваться струей газа и находиться рядом с пробиркой, в которую переносят инокулят. Серологическую или пастеровскую пипетку, используемую для пересева, предварительно заполняют стерильным газом. Пересев производят также с помощью стальной или платиновой петли. Для быстрой инокуляции различных сред одной культурой очень удобна система для выращивания анаэробных культур V. P. I. (Bellco Glass, Inc.).

Вращающиеся пробирки

Для выделения отдельных колоний строгих анаэробов и для подсчета жизнеспособных клеток используют вращающиеся пробирки, которые удобнее, чем чашки Петри. Готовят агаровую среду, как описано выше, и разливают ее по пробиркам. Охлаждают расплавленный агар до 45°C в пробирках с пробками и зажимами. Если пробирки со средой приготовлены заранее, перед кипячением необходимо убедиться в том, что они снабжены зажимами. Неразведенные пробы и пробы, разведенные предварительно восстановленной средой (или раствором), переносят в пробирки, как описано выше, смешивают со средой (при этом следят за тем,

чтобы не образовалась пена) и затем вращают пробирку под струей холодной воды, пока агар не застынет. Стараются, чтобы агар равномерно покрыл стенки пробирки. Механическое устройство, облегчающее эту процедуру [5], поставляется фирмой Bellco Glass, Inc.

Вращающиеся пробирки можно засеивать штрихом с помощью специальной петли или шпателя, начиная со дна пробирки и затем постепенно продвигая петлю вверх, одновременно вращая пробирку и продувая ее газом с помощью газовой канюли (разд. 8.4.1). Фирма Bellco Glass, Inc. производит устройство для вращения пробирок во время посева культуры штрихом.

6.6.5. Анаэробные камеры для строгих анаэробов (анаэроостаты)

Аранка и др. [19] и Аранка и Фритер [18] описали изготовленную из гибкой пластмассы камеру, оснащенную специальным устройством с перчатками, в которой выращивают анаэробные бактерии столь же эффективно, как и во вращающихся пробирках. Эта камера, известная как «анаэробная камера Фритера», была испытана и используется во многих лабораториях. Она пригодна для работы даже с очень чувствительными метанобразующими бактериями [20]. Ряд подобных камер поставляется различными фирмами (например, Coy Laboratory Products, Inc., Ann Arbor, Mich.).

Среди главных преимуществ таких камер следует отметить то, что они позволяют использовать стандартные бактериологические методы, включая посев культуры в чашках, перенос колоний с помощью реплик и определение чувствительности к антибиотикам. Кроме того, они позволяют приготовить любую необходимую среду, а для работы с ними не требуется особого навыка. Однако для этих дорогостоящих камер нужно специальное помещение; кроме того, возникает ряд неудобств при работе в перчатках и с предварительно приготовленными средами.

Совместное использование метода Хангейта и хорошо функционирующей анаэробной камеры позволяет проводить практически все виды экспериментов с большинством строгих анаэробов. Ниже мы остановимся на

условиях работы с анаэробными камерами и укажем на основные предосторожности, о которых необходимо помнить.

1. Существуют камеры, которые можно использовать так же, как термостаты. При температуре в камере от 30 до 37 °C руки нагреваются и потеют, и бывает трудно снять с них перчатки. Поэтому при работе в камере даже при комнатной температуре в течение долгого времени лучше надеть вначале нейлоновые перчатки, а сверху резиновые. Во многих случаях предпочтительнее иметь небольшой термостат внутри камеры. Можно также чашки Петри с засеянной средой или другие емкости поместить в специальные сосуды, закрыть их и удалить из камеры для последующей инкубации.

2. Используемая в камере газовая смесь должна содержать 10% водорода. Наиболее часто используемые смеси содержат азот с 5% CO_2 —10% H_2 или азот с 10% H_2 . Если в процессе работы с бактериями необходим CO_2 , то следует обеспечить его бесперебойную подачу. Газовые смеси поставляются фирмой Matheson Scientific, но они довольно дороги. Эта же фирма производит газосмеситель, который очень полезен в работе.

3. Запрещается работать в камере с открытым пламенем. Лучше установить в ней электрический нагреватель, например типа Bacticinerator фирмы Scientific Products.

4. Рекомендуется установить в камере фильтр для газовых смесей типа фильтра, используемого для безмикробных камер (Standard Safety Equipment Co., Palatine, Ill.). Это поможет избежать загрязнения.

5. Следует часто менять палладиевый катализатор. Обычно это делают один или два раза в неделю. Вышедший из строя из-за токсического действия H_2S или высокой влажности катализатор можно регенерировать нагреванием при 160 °C в течение 2 ч. Сразу после регенерации катализатор помещают в камеру и периодически проверяют его активность в струе H_2 : при этом катализатор должен быстро нагреваться. (*Предупреждение*: никогда не подставляйте под струю H_2 горячий катализатор, так как он может воспламениться.)

6. Поскольку H_2S необратимо выводит из строя катализатор, стараются по возможности выращивать

культуры, образующие H_2S , в закрытых емкостях и открывать их вне камеры. Для удаления H_2S из атмосферы камеры в ней устанавливают поднос с активированным углем (8—12 меш), нанесенным на слой марли и помещают его под палладиевым катализатором. Такая обработка в течение 30 мин уменьшает уровень H_2S в камере со 100 до 1 мкл/л [20].

7. В камеру, где присутствует индикатор относительной влажности, ставят большой поднос с силикагелем. Когда влажность превысит 50%, силикагель необходимо заменить. Его регенерируют нагреванием до 160°C в течение 1 ч.

8. Для уменьшения испарения агаровые чашки хранят в полиэтиленовых мешках, а среду — в пузырьках или бутылках с завинчивающимися крышками.

9. В анаэробной камере поддерживают постоянное давление. Обычные пластмассы пропускают небольшое количество газа; более того, газ проходит даже через поликарбонатные пластмассы и резину. Если камера используется часто, то концентрация H_2 в ней остается относительно высокой в результате открывания вентиля для продувания газа. Для поддержания достаточно постоянного давления необходимо добавлять смесь газов два раза в месяц. Снижение давления довольно быстро происходит в эластичных пластмассовых камерах.

10. Постоянно следят за утечкой газа. Слишком быстрое падение давления и сохранение высокой влажности свидетельствуют об утечке. На это указывает и то, что такие индикаторы Eh, как ресазурин и феносафранин, начинают переходить в окрашенную окисленную форму. Чаще всего утечка происходит через резиновые перчатки. Это можно проверить, поместив в камеру большой стакан с водой и погрузив в него каждую перчатку. Если надутая перчатка не теряет своей формы, это означает, что сколько-нибудь заметной потери газа не происходит. Если утечка в пластмассе происходит через швы, то ее практически невозможно обнаружить визуальным осмотром. Для обнаружения утечки полезен электронный детектор утечки (Coy Laboratory Products, Inc.).

11. Среду, приготовленную стандартным способом вне камеры, необходимо сразу же после охлаждения по-

местить в камеру. Если не обеспечена строгая герметичность сосудов, горячая среда может испаряться из пробирок и флаконов из-за наличия вакуума в шлюзе.

12. Перед использованием приготовленную стандартным способом среду выдерживают в камере в течение 1—2 дней или до восстановления индикатора Eh. За день до работы стеклянную и пластмассовую посуду помещают в атмосферу инертного газа.

13. Предварительно восстановленную среду, приготовленную методом Хангейта, можно использовать сразу же после ее помещения в камеру. Она может оказаться необходимой для некоторых организмов, например метанобразующих бактерий.

14. После стерилизации следят за тем, чтобы горлышки пробирок и флаконов с культурой оставались чистыми, так как их нельзя обжигать на открытом пламени в камере.

6.7. ЛИТЕРАТУРА

6.7.1. Общая литература

1. *Brown D. E.* Aeration in the submerged culture of micro-organisms, p. 127—174. In: J. R. Norris and D. W. Ribbons (ed.), *Methods in microbiology*, vol. 2, Academic Press, Inc., New York, 1970.
2. *Datta S. P., Grzybowski A. K.* pH and acid-base equilibria, p. 19—58. In: C. Long, K. J. King and W. M. Speery (eds.), *Biochemists' handbook*, D. Van Nostrand Co., Inc., New York, 1961. Отличный обзор по pH, буферам, ионной силе и буферной емкости. Приведены обширные таблицы по составам буферов, константам диссоциации слабых кислот и оснований, а также pH-индикаторам.
3. *Gomori G.* Preparation of buffers for use in enzyme studies, *Methods Enzymol.*, 1, 138—146 (1955). Содержит таблицы различных буферных систем.
4. *Hitchman M. L.* Measurement of dissolved oxygen. (Chemical analysis, vol. 49), John Wiley and Sons, Inc., New York, 1978.
5. *Holdeman L. V., Cato E. P., Moore W. E. C.* Anaerobe laboratory manual, 4th ed., Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, 1977. Отличное описание и иллюстраций анаэробных методов.
6. *Hungate R. E.* A roll tube method for cultivation of strict anaerobes, p. 117—132. In: J. R. Norris and D. W. Ribbons (eds.), *Methods in microbiology*, vol. 3B, Academic Press, Inc., New York, 1969. Хорошее описание метода Хангейта.
7. *Jacob H.-E.* Redox potential, p. 92—123. In: J. R. Norris and D. W. Ribbons (eds.), *Methods in microbiology*, vol. 2, Academic Press, Inc., New York, 1970. Описано электродметрическое измере-

ние окислительно-восстановительного потенциала и влияние на него микроорганизмов.

8. *Marquis R. E.* High-pressure microbial physiology, *Adv. Microb. Physiol.*, **14**, 159—241 (1976). Хороший обзор данных о влиянии высоких давлений на микроорганизмы и их жизнедеятельность.
9. *Munro A. L. S.* Measurement and control of pH values, p. 39—89. In: J. R. Norris and D. W. Ribbons (eds.), *Methods in microbiology*, vol. 2, Academic Press, Inc., New York, 1970. Содержит несколько полезных таблиц по приготовлению буферов с различной ионной силой.
10. *Pirt S. J.* Principles of microbe and cell cultivation, John Wiley and Sons, Inc., New York, 1975. [Имеется перевод: Перт С. Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток. — М.: Мир, 1978.] Содержит главы, посвященные потребностям микроорганизмов в кислороде, способам его подачи, а также влиянию температуры, концентрации ионов водорода и активности воды.
11. *Prior B. A.* Measurement of water activity in foods: a review, *J. Food Protect.*, **42**, 668—674 (1979). Обзор и оценка методов измерения активности воды.
12. *Scott W. J.* Water relations of food spoilage microorganisms, *Adv. Food Res.*, **3**, 84—123 (1957). Основные представления об активности воды, ее отношении к осмоляльности, методах контроля a_w и ее влиянии на бактерии.
13. *Sutter V. L., Citron D. M., Finegold S. M.* Wadsworth anaerobic bacteriology manual, 3rd ed., C. V. Mosby Co., St. Louis, 1980. Отличное переработанное практическое руководство, предназначенное главным образом для клинических лабораторий. В полезном приложении содержится список возможных ошибок при работе с анаэробами.
14. *Troller J. A., Christian J. H. B.* Water activity and food, Academic Press, Inc., New York, 1978. Отличная, авторитетная и хорошо написанная новая монография с главами, посвященными основным концепциям, методам, ферментативным реакциям, росту и выживанию микроорганизмов.
15. *Wang D. J. C., Cooney C. L., Demain A. L., Dunnill P., Humphrey A. E., Lilly M. D.* Fermentation and enzyme technology, p. 157—193, John Wiley and Sons, Inc., New York, 1979. Освещены принципы и методы измерения переноса кислорода.
16. *Weast R. C. (ed.)*. Handbook of chemistry and physics, 57th ed., p. D-133 — D-137; D-147 — D-152, CRC Press, Cleveland, Ohio, 1976. Таблицы буферов, pH-стандартных буферов при различных температурах, кислотно-основных индикаторов и констант диссоциации кислот и оснований.
17. *Wolfe R. S.* Microbial formation of methane, *Adv. Microb. Physiol.*, **6**, 107—146 (1971). Иллюстрированное описание метода Хангейта.

6.7.2. Специальная литература

18. *Aranka A., Freter R.* *Am. J. Clin. Nutr.*, **25**, 1329—1334 (1972).
19. *Aranka A., Syed S. A., Kenney E. B., Freter R.* *Appl. Microbiol.*, **17**, 568—576 (1969).

6. БИОФИЗИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

20. *Balch W. E., Wolfe R. S.* Appl. Environ. Microbiol., **32**, 781—791 (1976).
21. *Bryant M. P., Brukey L. A.* J. Dairy Sci., **36**, 205—217 (1953).
22. *Cleland W. W.* Biochemistry, **3**, 480—482 (1964).
23. *Corman J., Tsuchiya H. M., Koepsell H. J., Benedict R. G., Kelley S. E., Feger V. H., Dworschak R. G., Jackson R. W.* Appl. Microbiol., **5**, 313—318 (1957).
24. *Gordon J., Holman R. A., McLeod J. W.* J. Pathol. Bacteriol., **66**, 527—537 (1953).
25. *Hungate R. E.* Bacteriol. Rev., **14**, 1—49 (1950).
26. *Ingraham J. L.* J. Bacteriol., **76**, 75—80 (1958).
27. *Labuza T. P., Acott K., Tatini S. R., Lee R. Y., Flink J., McCall W.* J. Food Sci., **41**, 910—917 (1976).
28. *Macy J. M., Snellen J. E., Hungate R. E.* Am. J. Clin. Nutr., **25**, 1318—1323 (1972).
29. *Müller T. L., Wolin W. J.* Appl. Microbiol., **27**, 985—987 (1974).
30. *Onderdonk A. B., Johnston J., Mayhew J. W., Gorbach S. L.* Appl. Environ. Microbiol., **31**, 168—172 (1976).
31. *Patching J. W., Rose A. H.* In: J. R. Norris and D. W. Ribbons (eds.), Methods in microbiology, vol. 2, p. 23—38, Academic Press, Inc, New York, 1970.
32. *Scott W. J.* Aust. J. Biol. Sci., **6**, 549—564 (1953).
33. *Taylor C. D., Jannasch H. W.* Appl. Environ. Microbiol., **32**, 355—359 (1976).
34. *Troller J. A.* J. Food Sci., **42**, 85—90 (1977).
35. *Umbreit W. W., Burris R. H., Stauffer J. F.* Manometric techniques, 4th ed., Burgess Publishing Co., Minneapolis, 1964.
36. *Walden W. C., Hentges D. J.* Appl. Microbiol., **30**, 781—785 (1975).
37. *Zehnder A. J. B., Wuhrmann K.* Science, **194**, 1165—1166 (1976).

БИОХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ¹

Б. Гирард, Э. Снелл

Подобно другим организмам, все бактерии для своего роста нуждаются в экзогенных источниках энергии и доступных веществах, поставляющих углерод, азот, серу и неорганические ионы в такой форме, в которой они могут быть использованы для синтеза клеточных компонентов. Однако отдельные виды бактерий сильно различаются по тому, какие вещества необходимы для их роста. Для *автотрофных бактерий* потребности в питательных веществах довольно просты: вода, двуокись углерода и соответствующие неорганические соли. Они используют энергию света либо получают энергию в результате окисления (одного или нескольких) неорганических соединений. В качестве примера можно привести бактерий рода *Nitrobacter*, которые ассимилируют CO_2 и получают энергию путем окисления нитритов в нитраты. *Гетеротрофные бактерии* получают энергию в результате окисления (диссимиляции) восстановленных углеродных соединений. При их выращивании к средам чаще всего добавляют глюкозу, однако некоторые гетеротрофные бактерии в качестве источника энергии используют практически все естественные и многие искусственные соединения углерода.

Гетеротрофные бактерии используют органические соединения в двух целях: 1) в качестве источника энергии; при этом органическое вещество окисляется или расщепляется с высвобождением энергии и образованием ряда конечных продуктов (CO_2 , иногда органических кислот и др.); 2) в качестве субстратов, ассимилируемых непосредственно с образованием клеточных компо-

¹ Здесь под биохимическими факторами подразумеваются различные вещества, обеспечивающие рост микроорганизмов, а не только витамины и другие соединения, называемые обычно «факторами роста», которые бактерии сами синтезировать не способны — *Прим ред.*

нентов или для их синтеза в реакциях, требующих затраты энергии. Некоторые вещества, например глюкоза, могут выполнять обе указанные функции. Так, *E. coli* может расти на простой среде, содержащей только глюкозу и неорганические соли. Другие бактерии, например молочнокислые, растут только на более сложных средах. Кроме неорганических солей и источника энергии (обычно глюкозы) к их ростовой среде добавляют ряд органических соединений (витамины, аминокислоты и др.), которые клетки не в состоянии синтезировать. Такие соединения называют *факторами роста*. Организмы, которые нуждаются в их добавлении к ростовой среде, называются *ауксотрофными* по соответствующим соединениям. Известны бактерии с разными градациями сложности в их потребности к определенным питательным веществам. У некоторых бактерий потребности в питательных веществах, необходимых для роста, еще не идентифицированы, и поэтому к средам приходится добавлять сложные природные вещества — дрожжевой экстракт, пептон, рубцовую жидкость и сыворотку крови. Существуют *сапрофитные бактерии*, способные расти самостоятельно, и облигатно *паразитические формы*, которые растут только в присутствии живых клеток: животных, растительных или других бактериальных, обеспечивающих паразитические формы неидентифицированными питательными веществами или недостающими метаболитами.

Количественно потребности гетеротрофных бактерий в специфических факторах роста в значительной мере зависят от состава среды. Так, потребность *Streptococcus faecalis* в витамине В₆ варьирует от 10 мкг/л (в отсутствие одной или нескольких аминокислот) до нуля (при полном наборе аминокислот в среде). Важную информацию о функциях факторов роста можно получить при изучении влияния взаимодействия компонентов среды на рост клеток.

Прежде чем привести список общих и специфических сред, используемых для культивирования различных бактерий, коротко обсудим их потребности в тех веществах, которые используются для синтеза клеточных компонентов, а также дадим некоторые практические рекомендации по использованию этих соединений для

приготовления ростовых сред [70, 191]. Дополнительную информацию о питании бактерий можно найти в книге Коузера [114] о потребности бактерий и дрожжей в витаминах, в руководстве «Методы микробиологии» [122] и в книге [172]. В «Каталоге штаммов Американской коллекции типовых культур» приведены прописи сред для выращивания различных штаммов [4].

7.1. ПОТРЕБНОСТИ В ПИТАТЕЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВАХ

7.1.1. Углерод, азот, сера

Выше уже обсуждались потребности бактерий в соединениях углерода. Большинство известных бактерий используют для синтеза азотсодержащих компонентов клетки аммиак. Однако некоторые бактерии нуждаются в азотсодержащих факторах роста, которые необходимо добавлять в среду. Многие бактерии образуют аммиак путем восстановления нитратов и нитритов или путем деградации органических азотистых соединений. Ряд бактерий (например, *Azotobacter*, *Rhizobium*, пурпурные серные бактерии) способны восстанавливать молекулярный азот в аммиак. Большинство бактерий могут синтезировать необходимые серосодержащие компоненты из сульфатов; в случае же бактерий, которые не способны это делать, необходимо добавлять в среду серу в виде H_2S , цистина или метионина.

7.1.2. Неорганические ионы

Потребность бактерий в неорганических ионах изучалась весьма подробно. Однако подобные исследования затруднены рядом факторов, к которым относятся: 1) постоянное присутствие в средах ионов металлов; 2) присутствие небольших количеств других элементов, необходимых для роста; 3) трудность удаления этих ионов из среды с целью продемонстрировать их необходимость для роста бактерий; 4) взаимозаменяемость ионов одного металла ионами другого; 5) антагонистические эффекты между некоторыми близкими ионами металлов; 6) присутствие ионов металлов во многих

биологических продуктах в виде хелатных комплексов с различной стабильностью, что влияет на их доступность для бактерий. Детально эти проблемы, а также необходимые в работе предосторожности и методические приемы рассматриваются в обзорах Хатнера и др. [91], Найта [112] и Снелла [205].

Потребности бактерий в неорганических ионах, как правило, удовлетворяются добавлением к синтетическим средам K^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} или Fe^{3+} , PO_4^{3-} и SO_4^{2-} . Часто бывает необходимо присутствие следовых количеств некоторых других ионов (Zn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Ca^{2+} , Cl^- , молибдата и др.), но обычно они присутствуют в достаточном количестве в качестве примесей в других компонентах среды или содержатся в водопроводной воде, используемой для приготовления сред. Сложные питательные среды, в которые входят пептон, дрожжевой экстракт, мясной экстракт (infusion) или сходные компоненты, содержат достаточное количество ионов металлов.

Приготовленные концентрированные (основные) растворы неорганических солей, добавляемые к синтетическим средам, следует хранить при низких значениях pH или в присутствии минимальных количеств нетоксичных хелатирующих агентов (например, этилендиаминтетрауксусной или нитрилотриуксусной кислоты), препятствующих выпадению солей в осадок. Присутствие хелатирующих веществ в готовой среде является важным фактором, определяющим доступность ионов металлов; поэтому, если необходимо добиться интенсивного роста бактерий, концентрация этих агентов должна быть тщательно сбалансирована с количеством микроэлементов [91]. Хелатирующими свойствами обладают также такие компоненты ростовых сред, как аминокислоты, цитрат, малат и др.

Функция необходимых бактериям ионов металлов заключается в том, что они служат активаторами или кофакторами многих ферментов [145]. Кроме того, неорганические ионы (в основном Na^+ и K^+) участвуют в транспорте веществ через клеточные мембраны [155] и в регуляции синтеза белка [131]. Они являются также компонентами белковых комплексов, играющих важную роль в метаболизме бактерий, например, железо входит

гемовую простетическую группу цитохромов — электронпереносящих белков.

7.1.3. Витамины

Витамины осуществляют свои каталитические функции в клетке обычно в качестве компонентов коферментов или как простетические группы ферментов. Готовые витамины необходимы для ряда бактерий; их взаимодействие с другими компонентами ростовых сред кратко обсуждается ниже.

n-Аминобензойная кислота

n-Аминобензойная кислота служит предшественником в биосинтезе фолиевой кислоты и поэтому оказывает воздействие на метаболизм тимина, метионина, серина, пуриновых оснований и витамина B₁₂. В свою очередь, присутствие этих компонентов в среде может оказывать влияние на увеличение или снижение потребности бактерий (вплоть до нулевой) в *n*-аминобензойной кислоте.

Группа фолиевой кислоты

Некоторые формы фолиевой кислоты, встречающиеся в природе, отличаются по своей усвояемости отдельными бактериями. Птероил-L-глутаминовая кислота и ее N¹⁰-формильное производное полностью усваиваются *Lactobacillus casei* и *S. faecalis*; птероилтриглутаминовая кислота обеспечивает хороший рост *L. casei*, но мало активна в случае *S. faecalis*, птероилгептаглутаминовая кислота вообще не стимулирует рост бактерий. N⁵-формилтетрагидроптероилглутаминовая кислота (лейковорин) активна в случае *L. casei*, *S. faecalis* и *Pediococcus cerevisiae*. Фолиевая кислота участвует как кофактор в синтезе тимина, пуринов, серина, метионина и пантотеновой кислоты. Если эти компоненты добавлены в среду, то потребность бактерий в фолиевой кислоте часто отпадает. Фолиевая кислота слабо растворима в воде, но ее аммонийная соль растворяется хорошо; она устойчива к автоклавированию.

Биотин

Биотин участвует в различных реакциях биосинтеза, требующих фиксации CO_2 , в том числе в синтезе оксалоацетата и жирных кислот. Биотин (N^ϵ -биотинилизин) является природным соединением; он так же, как и биотин, активен в случае *L. casei*, но не в случае *Lactobacillus arabinosus*. Биотин слабо растворим в воде, но его соли растворяются легко. Биотин можно автоклавировать, он устойчив к кислотам, но быстро окисляется до сульфоксида и сульфона. Эти продукты окисления также стимулируют рост некоторых бактерий при условии, если бактерии способны снова превратить их в биотин. Окисление биотина происходит только в очень разбавленном (< 1 мкг/мл биотина) растворе и в отсутствие других восстанавливающих агентов.

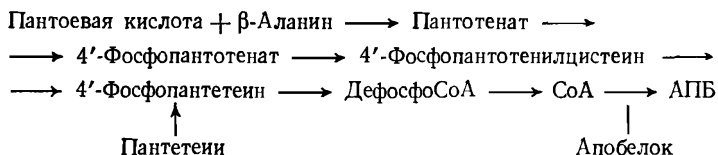
Никотиновая кислота и ее производные

Большинство ауксотрофов по никотиновой кислоте взаимозаменяемо используют эту кислоту и ее амид. Коферментные формы витамина — никотинамидадениндинуклеотид (NAD) и никотинамидадениндинуклеотидфосфат (NADP) — участвуют в окислительно-восстановительных реакциях клеточного метаболизма. Некоторые организмы, например *Haemophilus influenzae*, не способны синтезировать NAD из никотиновой кислоты и поэтому нуждаются в готовом коферменте. Кофермент разрушается кислотами, щелочами и при автоклавировании. Поэтому его стерилизуют фильтрованием через бактериальные фильтры и затем добавляют к автоклавированной среде. Никотиновая кислота и ее амид устойчивы к автоклавированию при pH 7,0, характерном для большинства ростовых сред.

Пантотеновая кислота и родственные ей соединения

Пантотеновая кислота является компонентом кофермента А (CoA) и ацилпереносящего белка (АПБ), которые служат переносчиками ацильной группы в про-

цессах метаболизма. Некоторые бактерии используют интактный кофермент как фактор роста, но для роста значительно большего числа бактерий необходимы пантотеновая кислота или пантетеин. Взаимоотношения между этими компонентами схематически можно изобразить следующим образом.



Потребность отдельных видов бактерий в том или другом из этих родственных соединений обусловлена способностью к их синтезу и транспорту.

Свободная пантотеновая кислота и многие из ее солей очень гигроскопичны; известна только одна малогигроскопичная соль — кальциевая, которая легко растворяется в воде и устойчива к автоклавированию. Подобно своим более сложным производным, пантотеновая кислота легко гидролизуется; поэтому ее стимулирующая рост активность подавляется (для всех бактерий, использующих интактный витамин) при кислотном или щелочном гидролизе.

Рибофлавин и его производные

Относительно немногие виды бактерий требуют готовый рибофлавин. Почти все бактерии, очевидно, содержат этот витамин, а некоторые виды синтезируют его в достаточно большом количестве, т. е. могут служить источником выделения рибофлавина в виде препарата.

Рибофлавин-5'-фосфат (флавиномононуклеотид, или ФМН) и флавинадениндинуклеотид (ФАД) являются главными коферментными формами рибофлавина, участвующими в окислительно-восстановительных реакциях. Все эти три вещества одинаково активно поддерживают рост рибофлавинового ауксотрофа *L. casei*.

Рибофлавин плохо растворим в холодной воде, но становится легкорастворимым при нагревании в кон-

центрации, рекомендованной для приготовления основного раствора витамина (разд. 7.3.1). Он разрушается видимым светом, особенно при нейтральных и щелочных условиях ($\text{pH} \geq 7$), поэтому водные растворы рибофлавина следует защищать от света. Разбавленный раствор (~ 100 мкг/мл) рибофлавина в 0,02 М уксусной кислоте можно использовать как основной раствор. Рибофлавин устойчив к автоклавированию.

Тиамин

Большое число бактерий являются ауксотрофными по тиамину, его предшественникам или коферментной форме — тиаминпирофосфату (ТПФ). ТПФ участвует в декарбоксилировании α -кетокислот и в транскетолазной реакции.

Поскольку во время автоклавирования в водных растворах при pH 5 и выше тиамин расщепляется на составные части, его следует стерилизовать фильтрованием или автоклавировать при $\text{pH} < 5$.

Витамин В₆

В группу витамина В₆ входят пиридоксин, пиридоксаль, пиридоксамин и их фосфорилированные производные. Различные виды ауксотрофных по витамину В₆ бактерий по-разному реагируют на его производные. Пиридоксаль, наиболее широко используемый как фактор роста, образуется в довольно большом количестве в процессе автоклавирования сред, содержащих пиридоксин. Для роста некоторых бактерий необходим пиридоксамин-5'-фосфат; однако для большинства ауксотрофов фосфорилированные формы витамина В₆ неактивны, так как клетки не имеют для них соответствующих транспортных систем. Пиридоксаль-5'-фосфат и пиридоксамин-5'-фосфат участвуют во многих реакциях синтеза и деградации природных α -аминокислот.

Все три формы витамина устойчивы к нагреванию, но пиридоксаль и пиридоксамин взаимодействуют со многими природными веществами. Поэтому, если требуются интактные формы витамина, их следует стерилизовать отдельно от других компонентов среды. Все

формы витамина В₆ чувствительны к свету, особенно при высоких значениях рН.

Витамин В₁₂ (кобаламин)

Витамин В₁₂ синтезируется в природе исключительно микроорганизмами, которые вместе с их побочными продуктами являются источником выделения витамина в виде препарата. Коферментная форма витамина В₁₂ (кобаламин, связанный с адениннуклеозидом) так же активно, как и витамин, стимулирует рост бактерий. Кофермент участвует во многих метаболических реакциях изомеризации, а также (прямо или косвенно) в биосинтезе дезоксирибонуклеозидов, метионина и, вероятно, других веществ.

Кофермент витамина В₁₂ неустойчив к свету; его следует стерилизовать фильтрованием. Напротив, сам витамин В₁₂ довольно устойчив и к свету, и к автоклавированию.

Липоевая кислота (тиоктовая кислота)

Липоевая кислота — необходимый фактор роста для различных молочнокислых бактерий и *Butyrubacterium rettgeri*. Участие этой кислоты в окислении пирувата и α-кетоглутарата подтверждается тем, что многим липотатным ауксотрофам не нужен такой фактор роста, если в среде содержится ацетат. Липоевая и дигидролипоевая кислоты, а также различные смешанные дисульфиды примерно одинаково стимулируют рост *S. faecalis*. Липоевая кислота устойчива к кислотам и к автоклавированию, но повреждается окисляющими агентами. Однако ее чувствительность к окислению не является проблемой при приготовлении питательных сред из-за присутствия в них более активных восстанавливающих агентов, например глюкозы.

Железопорфирины

Железопорфирины, феррихром и сходные Fe-содержащие соединения обнаружены у всех исследованных аэробных бактерий и являются компонентами электрон-

транспортных систем. Некоторые бактерии (например, *H. influenzae*), вероятно, не способны синтезировать порфирины и поэтому нуждаются в них.

Группа хелатирующих агентов, образующих комплекс с железом, известна под общим названием *сидерохромы*; некоторые из них, например феррихром и тег-егенс-фактор, необходимы для роста ряда бактериальных видов. Их можно заменить в среде значительно большим количеством гема. Предполагается, что сидерохромы выполняют каталитическую роль, являясь переносчиками железа.

Витамин К

Витамин К или родственные ему соединения необходимы для роста некоторых видов *Mycobacterium* и *Fusiformis*. Функция витамина К до конца не выяснена. Это жирорастворимое соединение разрушается светом, щелочами и восстанавливающими агентами. Его лучше всего добавлять в среду в форме менадиона (2-метил-1,4-нафтохинон; спиртовой раствор), который устойчив к автоклавированию, но чувствителен к свету и щелочам.

Холин

Показано, что холин используется только некоторыми пневмококками, по-видимому, как предшественник определенных клеточных липидов.

7.1.4. Аминокислоты, пептиды и белки

Очень часто бактерии нуждаются в одной, нескольких или многих природных α -аминокислотах. Хотя такая потребность объясняется неспособностью к синтезу этих аминокислот, она все же не абсолютная, а, скорее, условная. Так, аминокислота, необходимая бактериям в отсутствие витамина В₆, может быть синтезирована в его присутствии. Или аминокислота, необходимая в случае избытка другой аминокислоты, становится необязательной в ее отсутствие.

Даже у безусловных ауксотрофов добавление избытка одной аминокислоты может привести к возрастанию потребности в другой, что, вероятно, связано с их конкуренцией за общую транспортную систему. Таких антагонистических взаимоотношений можно избежать, добавив в среду соответствующий пептид лимитирующей аминокислоты, поскольку он транспортируется с помощью независимой транспортной системы. Это явление описано в нескольких работах, где сделан вывод о существовании специфических пептидных факторов роста. Однако вряд ли такие, уже сформированные пептиды являются обязательными для роста бактерий, хотя они обычно быстро используются и служат легко доступным источником необходимых аминокислот.

Отмеченная в ряде работ потребность некоторых бактерий в специфических белках требует дальнейшего изучения. Белки могут служить источником аминокислот или агентов, подавляющих токсическое действие некоторых веществ (эти агенты можно назвать детоксикантами); они способны выполнять также и другие функции.

Кроме глутамина, который стерилизуют фильтрованием, все аминокислоты и пептиды устойчивы к автоклавированию. Кроме триптофана, глутамина и аспарагина, все аминокислоты устойчивы в условиях кислотного гидролиза белков, однако цистеин при этом часто разрушается. Все естественные α -аминокислоты (кроме цистина) достаточно хорошо растворимы в теплой воде. Цистин можно растворить нагреванием в небольшом количестве соляной кислоты. Растворимость тирозина улучшается в присутствии других аминокислот.

7.1.5. Пурины и пиримидины

Многие бактерии не способны синтезировать пуриновые и пиримидиновые основания и поэтому нуждаются в них. О взаимосвязях метаболизма этих соединений с фолиевой кислотой и витамином В₁₂ уже упоминалось. Гуанин и ксантин растворяют нагреванием в минимальном количестве соляной кислоты. Другие основания растворимы в горячей воде.

7.1.6. Жирные кислоты и родственные им соединения

Необходимые жирные кислоты, особенно ненасыщенные, могут иногда проявлять токсическое действие даже в низких концентрациях, поддерживающих рост бактерий. Их часто добавляют в среду вместе с детоксикантами типа сывороточного альбумина, белков, твинов, лецитина и др. Потребность в жирных кислотах характеризуется не абсолютной, а скорее групповой специфичностью, т. е. любая из нескольких активных жирных кислот часто включается в неизменном виде в липидные вещества клеток.

Мевалоновая кислота, необходимая для роста некоторых видов *Lactobacillus*, выступает в роли предшественника изопrenoидных соединений — каротиноидов, стероидов, убихинона и др. В отличие от большинства бактерий, которые содержат мало стероидов или вообще их не содержат, микоплазмы нуждаются в них для своего роста (например, в холестерине).

Жирные кислоты и другие липиды в принципе устойчивы к автоклавированию, однако при их добавлении к водным средам возникают некоторые сложности. Эти вещества необходимо растворять в минимальных количествах этанола или эмульгировать в растворе твина.

7.1.7. Другие вещества

Существуют еще некоторые вещества, необходимые для роста ряда бактерий, которые могут быть или необходимыми, или стимулирующими факторами. К ним относятся полиамины (путресцин, спермин, спермидин), карнитин, а также вещества, образуемые при автоклавировании глюкозы с фосфатом или в присутствии аминокислот. Несколько факторов еще не идентифицировано в дрожжевом экстракте и сыворотке.

7.1.8. Определение потребностей питания

При использовании бактерий в качестве тест-организмов в микробиологических и других биологических исследованиях необходимо знать их потребности в питательных веществах, а также влияние на эти потребности других компонентов среды

При подборе условий выращивания новой выделенной бактерии вначале используют так называемую *комплексную среду*, состав которой точно определить невозможно, так как она содержит неочищенные компоненты. Обычно в нее входит ферментативный гидролизат белка, обеспечивающий потребность в таких источниках азота, как аминокислоты, сахар (обычно глюкоза) как источник энергии и углерода, различные соли для удовлетворения потребности бактерии в неорганических ионах и дрожжевой экстракт для обеспечения всех потребностей в витаминах. Когда потребности в питательных веществах бактерий приблизительно выявлены, можно использовать *полусинтетическую среду*. В такую среду вносят известные соединения как явно необходимые; в нее добавляют также небольшое количество дрожжевого экстракта для обеспечения пока еще неизвестных потребностей. В конце концов находят состав *синтетической среды*, т. е. среды определенного состава, которая полностью удовлетворяет всем потребностям в питательных веществах. Выбор нужной среды зависит от целей эксперимента. Сложные синтетические среды довольно дороги, поэтому чаще используются комплексные среды неопределенного состава.

Основные этапы определения потребностей гетеротрофных бактерий в питательных веществах заключаются в следующем.

1. Бактерии следует выращивать на такой среде (комплексной или синтетической), о которой известно, что она поддерживает их рост.

2. Если начинают выращивать бактерии на комплексной среде, то варьируют концентрации всех компонентов (от нуля до самой большой, при которой они находились в исходной среде), чтобы определить их оптимальные концентрации и необходимость для роста или его стимуляции.

3. Определив оптимальные концентрации, сначала заменяют основной сложный компонент среды, поставляющий азот (например, казеин), на полную смесь аминокислот в тех же концентрациях, которые использовали в средах для аналитического (*assay medium*) определения веществ (см. табл. 7.14).

4. Если эта смесь обеспечивает рост бактерий, поочередно варьируют концентрацию каждой аминокислоты от нуля до концентрации, превышающей ту, которая установлена в среде для аналитического определения. Таким образом определяют оптимальную концентрацию каждой аминокислоты в присутствии других. Если же наблюдается ингибирующий эффект, то соответствующую аминокислоту исключают из среды.

5. Заменяют сложный фактор роста, например дрожжевой экстракт, полным набором известных витаминов и затем варьируют отдельно уровень каждого компонента смеси, как и в случае аминокислот. Если в исходной среде в качестве источника аминокислот и витаминов используют дрожжевой экстракт, то стараются заменить его полной смесью аминокислот с полным набором известных витаминов и затем варьируют в среде уровень каждого компонента отдельно.

6. Если бактерии не растут на полученной таким путем среде, то это можно объяснить тем, что они нуждаются в неидентифицированном факторе, или тем, что нарушено соотношение известных факторов роста. Можно также предполагать потребность бактерий в известных факторах роста (пептидах, производных витаминов, жирных кислотах, нуклеотидах, неорганических ионах и др.), которые содержатся в неочищенных компонентах комплексной среды, но отсутствуют в смесях испытываемых синтетических веществ. В этом случае необходимо детально выяснить потребности бактерий в питательных веществах [70].

7. Если работу начинают с использования синтетической среды и не наблюдают хорошего роста бактерий на втором этапе (см. выше), то заменяют источник азота на 10%-ный гидролизат казеина. Если это способствует росту, поступают, как указано на этапе 4; если же интенсивность роста все еще недостаточна, добавляют к среде 1%-ный дрожжевой экстракт. В случае стимуляции роста поступают, как указано на этапе 5.

7.2. СОСТАВЛЕНИЕ СРЕД

Все среды, используемые для культивирования бактерий, перечислить невозможно, поэтому в приведенных ниже таблицах даны ссылки на среды, в которых выращивают чистые культуры большинства известных родов.

7.2.1. Ключ к средам, используемым для выращивания бактерий различных групп

В табл. 7.1 перечислены 192 вида бактерий, представляющих каждую из 19 групп, приведенных в 8-м издании «Определителя бактерий Берги» (Bergey's Manual of Determinative Bacteriology)¹. В ней даны также оптимальная температура роста каждого микроорганизма и буквенно-цифровой ключ, помогающий найти состав одной или нескольких известных в литературе сред, поддерживающих рост каждого вида. Строчные латинские буквы в верхних индексах названий бактерий указывают на сноски, в которых приведены подробности культивирования этих бактерий. В колонке буквенно-цифровых ключей приведены номера таблиц (с. 7.2 по 7.13), где даны составы сред. Ключевая буква А обозначает в табл. 7.2—7.7 богатую комплексную среду, буква В в табл. 7.2—7.7 — полусинтетическую среду (несколько сред с кодом В приведено в табл. 7.12 и 7.13), а буква С — синтетическую среду в табл. 7.8—7.13.

В табл. 7.1 перечислены только те бактерии, которые были выращены *in vitro* в чистой культуре. Большинство приведенных сред не являются минимальными, т. е. они часто содержат вещества, в которых нет специфической потребности, или вещества, содержание которых значительно выше минимальных потребностей бактерий. То, что данную бактерию культивируют именно на указанной среде, еще не означает, что эта среда оптимальна для нее, поскольку детальное изучение потребностей в питательных веществах было проведено далеко не у всех штаммов.

¹ Имеется перевод: Краткий определитель бактерий Берги. (Под ред. Дж. Хоулта. — М.: Мир. 1981.

Таблица 7.1. Ключ к средам и условия культивирования различных бактерий

Группа, род и виды ^a	Оптимальная температура роста, °C	Буквенно-цифровой ключ к среде ^b	Источник данных
I. Фототрофные бактерии:			
<i>Amoebobacter roseus</i> ^c	25—30	1C (табл. 7.8)	[158, 224]
<i>Chlorobium limicola</i> ^{c, d}	25—30	1B, 2C (табл. 7.2, 7.8)	[123, 124]
<i>Chlorobium thiosulfatophilum</i> ^{c, d}	25—30	1B, 2C (табл. 7.2, 7.8)	[123, 124]
<i>Chromatium okenii</i> ^{c, d}	25—30	3C (табл. 7.8)	[59]
<i>Rhodomicrobium vanielii</i> ^c	30	2A, 4C (табл. 7.2, 7.8)	[17, 52, 154]
<i>Rhodopseudomonas sphaeroides</i> ^{c, h}	25—30	2A, 4C (табл. 7.2, 7.8)	[17, 35, 154]
<i>Rhodospirillum rubrum</i> ^{c, f, g}	25	2A, 4C (табл. 7.2, 7.8)	[17, 154]
II. Скользящие бактерии:			
<i>Archangium gephyra</i> ⁱ	18—32	3A (табл. 7.2)	[80, 141]
<i>Beggiatoa alba</i> ⁱ	20	4A, 5C (табл. 7.2, 7.8)	[115, 189]
<i>Chondromyces crocatus</i> ^{i, l}	28—30	3A (табл. 7.2)	[140]
<i>Cystobacter fuscus</i> ⁱ	30	3A (табл. 7.2)	[142]
<i>Flexibacter flexilis</i> ⁱ	20—35	5A, 5B (табл. 7.2)	[130]
<i>Flexithrix dorotheae</i> ⁱ	35	5A, 6C (табл. 7.2, 7.8)	[129]
<i>Mycococcus xanthus</i> ⁱ	30	6B, 7C (табл. 7.2, 7.8)	[53, 80]
<i>Nannocystis exedens</i> ⁱ	30	6B (табл. 7.2)	[174]
<i>Saprospira grandis</i> ⁱ	30—37	5A, 5B (табл. 7.2)	[128, 130]
<i>Sporocytophaga myxococcoides</i> ⁱ	30	8C (табл. 7.8)	[194, 212]
<i>Stigmatella aurantiaca</i>	30	7B (табл. 7.2)	[175]
III. Хламидобактерии:			
<i>Leptothrix ochracea</i> ⁱ	20—25	8A, 9C (табл. 7.2, 7.8)	[150, 229]
<i>Sphaerotilus natans</i> ⁱ	30	9A, 10C (табл. 7.2, 7.8)	[50, 219, 229]
<i>Streptothrix hyalina</i> ^{i, k}	25—27	8A (табл. 7.2)	[151]

Продолжение табл. 7.1

Группа, род и виды ^a	Оптимальная температура роста, °C	Буквенно-цифровой ключ к среде ^b	Источник данных
IV. Почкующиеся и (или) стебельковые бактерии:			
<i>Ancalomicrobium adatum</i> ⁱ	30	10A, 11C (табл. 7.2, 7.8)	[211]
<i>Asticcacaulis excentricus</i>	25—30	11A, 12C (табл. 7.2, 7.8)	[162]
<i>Caulobacter henricii</i> ^{i, l}	30	11A, 12C (табл. 7.2, 7.8)	[162]
<i>Caulobacter halobacteroides</i> ^{i, m}	25	11A, 12C (табл. 7.2, 7.8)	[162]
<i>Caulobacter vibrioides</i> ^{i, n}	30	11A, 12C (табл. 7.2, 7.8)	[162]
<i>Gallionella ferruginea</i> ^{o, p}	25	13C (табл. 7.8)	[74, 150]
<i>Hyphomicrobium vulgare</i> ^{i, q}	25—30	13C (табл. 7.8)	[86]
<i>Hyphomonas polymorpha</i> ⁱ	37	12C (табл. 7.2)	[86, 183]
<i>Pedomicrobium ferrugineum</i> ^o		12C (табл. 7.8)	[5]
<i>Prosthecomicrobium pneumaticum</i> ^{i, r}	30	10A, 11C (табл. 7.2, 7.8)	[211]
V. Спирохеты:			
<i>Leptospira canicola</i> ⁱ	29	13B, 14C (табл. 7.3, 7.8)	[97, 127, 192]
<i>Leptospira pomona</i> ⁱ	29	13B, 14C (табл. 7.3, 7.8)	[97, 127, 192]
<i>Leptospira grippotyphosa</i> ⁱ	29	13B, 14C (табл. 7.3, 7.8)	[97, 127, 192]
Трепонема Рейтера ^{c, s}	37	14A, 15C (табл. 7.3, 7.9)	[27, 218]
<i>Spirochaeta stenostrepta</i> ^{c, t}	30—37	15A (табл. 7.3)	[85]
VI. Спиральные и изогнутые бактерии:			
<i>Campylobacter fetus</i> ^o	37	16A (табл. 7.3)	[127, 190]
<i>Spirillum volutans</i> ^{o, u}	30	17A (табл. 7.3)	[29, 117]

Группа, род и виды ^a	Оптимальная температура роста, °C	Буквенно-цифровой ключ к среде ^b	Источник данных
VII. Грамотрицательные аэробные палочки и кокки:			
<i>Acetobacter aceti</i>	30	18A (табл. 7.3)	[46, 93]
<i>Agrobacterium rhizogenes</i> ^v	25—28	18A, 16C (табл. 7.3, 7.9)	[46, 215]
<i>Azomonas agilis</i> ^w	20—30	17C (табл. 7.9)	[223]
<i>Azotobacter chroococcum</i> ^w	20—30	17C (табл. 7.9)	[12, 58]
<i>Beijerinckia indica</i> ^{w, x}	30	18C (табл. 7.9)	[12, 13]
<i>Bordetella pertussis</i> ^y	35—37	19A (табл. 7.3)	[127, 185]
<i>Brucella melitensis</i> ^z	34—37	16A, 19C (табл. 7.3, 7.9)	[65, 127, 178, 186]
<i>Derxia gummosa</i>	25	20C (табл. 7.9)	[96]
<i>Francisella tularensis</i> ^{aa}	37	20A (табл. 7.3)	[127]
<i>Gluconobacter oxydans</i>	25—30	18A (табл. 7.3)	[45]
<i>Halobacterium salinarum</i>	37	21A (табл. 7.3)	[103]
<i>Methylobacterium methanica</i> ^{bb}	30	22B (табл. 7.3)	[54]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	37	23A, 21C (табл. 7.3, 7.9)	[213]
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	25—30	23A, 21C (табл. 7.3, 7.9)	[213]
<i>Pseudomonas lemoignei</i> ^{cc}	30	23A, 21C (табл. 7.3, 7.9)	[213]
<i>Pseudomonas maltophilia</i> ^{dd}	35	23A, 21C (табл. 7.3, 7.9)	[213]
<i>Pseudomonas putida</i>	25—30	23A, 21C (табл. 7.3, 7.9)	[213]
<i>Pseudomonas tolosensis</i> ^{ee}	30	23A, 21C (табл. 7.3, 7.9)	[213]
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	20	24A, 22C (табл. 7.3, 7.9)	[153]
<i>Xanthomonas campestris</i> ^{ff}	28	18A, 16C (табл. 7.3, 7.9)	[214]
VIII. Грамотрицательные факультативно-анаэробные палочки:			
<i>Actinobacillus lignieresii</i>	37	25A (табл. 7.4)	[127, 159]

Продолжение табл. 7.1

Группа, род и виды ^a	Оптимальная температура роста, °C	Буквенно цифровой ключ к среде ^b	Источник данных
<i>Aeromonas hydrophila</i>	30	26A, 23C (табл. 7.4, 7.9)	[119, 188]
<i>Cardiobacterium hominis</i> ^{gg}	30—37	12A, 24C (табл. 7.2, 7.9)	[127, 144, 198, 199]
<i>Chromobacterium violaceum</i> ^{hh}	30—35	12A, 25C (табл. 7.2, 7.9)	[48, 127, 203]
<i>Citrobacter freundii</i>	30—37	26C (табл. 7.9)	[242]
<i>Edwardsiella tarda</i>	30—37	12A (табл. 7.2)	[109]
<i>Erwinia amylovora</i> ⁱⁱ	27—30	26A (табл. 7.4)	[234]
<i>Escherichia coli</i>	37	26A, 27C (табл. 7.4, 7.9)	[133, 230]
<i>Flavobacterium aquatile</i>	20—25	27A (табл. 7.4)	[147, 239]
<i>Haemophilus influenzae</i>	30	27A (табл. 7.4)	[243, 247]
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	37	27A, 28C (табл. 7.4, 7.10)	[84, 247]
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	35—37	28A, 27C (табл. 7.4, 7.9)	[104]
<i>Lucibacterium harveyi</i>	25—30	29A (табл. 7.4)	[82]
<i>Pasteurella multocida</i>	37	12A, 29C (табл. 7.2, 7.10)	[100]
<i>Proteus vulgaris</i>	34—37	28A, 30C (табл. 7.4, 7.10)	[98]
<i>Salmonella typhimurium</i>	37	30A, 27C (табл. 7.4, 7.9)	[187, 228]
<i>Serratia marcescens</i> ^{jj}	30—37	30A, 27C (табл. 7.4, 7.9)	[44]
<i>Shigella dysenteriae</i>	37	31A (табл. 7.4)	[156, 244]
<i>Streptobacillus moniliformis</i> ^{kk}	37	12A (табл. 7.2)	[79]
<i>Vibrio cholerae</i> ^{ll}	18—37	32A, 31C (табл. 7.4, 7.10)	[9, 26]
<i>Yersinia pestis</i>	30—37	33A, 32C (табл. 7.4, 7.10)	[56, 177]
<i>Zymomonas mobilis</i> ^{mm}	30	34A, 33C (табл. 7.4, 7.10)	[14]
IX. Грамотрицательные анаэробные бактерии:			
<i>Bacteroides fragilis</i>	37	35A (табл. 7.4)	[15]
<i>Bacteroides ruminicola</i> ⁿⁿ	30	36A, 34C (табл. 7.4, 7.10)	[161]
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> ⁿⁿ	30—37	36A, 34C (табл. 7.4, 7.10)	[20, 22]

Группа, род и виды ^a	Оптимальная температура роста, °C	Буквенно цифровой ключ к среде ^b	Источник данных
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	25—30	37A, 35C (табл. 7.4, 7.10)	[78, 163]
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	37	38A (табл. 7.5)	[6, 7]
<i>Lachnospira multiparus</i>	30—45	38A, 34C (табл. 7.5, 7.10)	[20, 23]
<i>Leptotrichia buccalis</i>	25—30	39A (табл. 7.5)	[19, 92]
<i>Selenomonas sputigena</i>	35—40	12A (табл. 7.2)	
<i>Succinimonas amyolytica</i>	30—37	40A, 34C (табл. 7.5, 7.10)	[20, 24]
<i>Succinivibrio dextrinosolvens</i>	30—37	40A (табл. 7.5)	[23]
X. Грамотрицательные кокки и коккобациллы:			
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> ^{1, oo}	30—32	24A, 21C (табл. 7.3, 7.9)	[11]
<i>Branhamella catarrhalis</i> ^{1, pp}	37	30A, 21C (табл. 7.4, 7.9)	[176]
<i>Lampropedia hyalina</i> ¹	30	30A, 36C (табл. 7.4, 7.10)	[167]
<i>Moraxella lacunata</i> ¹	30	41A (табл. 7.5)	[10]
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> ^{1, qq}	32—37	27A, 37C (табл. 7.4, 7.10)	[30, 49, 67, 68, 106, 120, 121]
<i>Neisseria meningitidis</i> ¹	37	42A, 38C (табл. 7.5, 7.10)	[31, 32]
XI. Грамотрицательные анаэробные кокки:			
<i>Acidaminococcus fermentans</i>	30—37	43B, 39C (табл. 7.5, 7.10)	[181]
<i>Megasphaera elsdenii</i>	35—38	44A (табл. 7.5)	[72, 182]
<i>Veillonella parvula</i>	37	45A, 40C (табл. 7.5, 7.10)	[179, 180]
XII. Грамотрицательные хемолитотрофные бактерии:			
<i>Nitrobacter winogradskyi</i> ¹	25—30	41C (табл. 7.11)	[246]
<i>Nitrococcus mobilis</i> ¹	25—30	42C (табл. 7.11)	[238]
<i>Nitrosococcus nitrosus</i> ^{1, e}	20—25	41C (табл. 7.11)	[245]

Группа, род и виды ^a	Оптимальная температура роста, °C	Буквенно-цифровой ключ к среде ^b	Источник данных
<i>Nitrosolobus multifor-</i> <i>mis</i> ^{i, rr}	25—30	43C (табл. 7.11)	[237]
<i>Nitrosomonas euro-</i> <i>paea</i> ^{i, rr}	25—30	43C (табл. 7.11)	[236]
<i>Nitrospira brien-</i> <i>sis</i> ^{i, rr}	25—30	43C (табл. 7.11)	[235]
<i>Nitrospina gracilis</i> ^{i, ss}	25—30	42C (табл. 7.11)	[238]
<i>Sulfolobus acidocalda-</i> <i>rius</i> ^{i, tt}	70	44C (табл. 7.11)	[193]
<i>Thiobacillus thiooxi-</i> <i>dans</i> ⁱ	28—30	44C (табл. 7.11)	[231]
<i>Thiobacillus thioparus</i> ⁱ	28	46C (табл. 7.11)	[75]
XIII. Метанобразующие бактерии:			
<i>Methanobacterium ru-</i> <i>minantium</i> ^c	39	46A (табл. 7.5)	[202]
<i>Methanococcus vannie-</i> <i>lij</i> ^{c, vv}	37—42	47C (табл. 7.11)	[99, 210]
<i>Methanosarcina me-</i> <i>thanica</i> ^{c, uu}	30—37	47C (табл. 7.11)	[209]
XIV. Грамположительные кокки:			
<i>Aerococcus viri-</i> <i>dans</i> ^{o, ww}	30	30A, 48C (табл. 7.4, 7.11)	[146]
<i>Leuconostoc mesente-</i> <i>roides</i> ^{xx}	30	47A, 49C (табл. 7.5, 7.11)	[62]
<i>Micrococcus luteus</i> ⁱ	35	30A, 50C (табл. 7.4, 7.11)	[1, 157]
<i>Pediococcus cerevi-</i> <i>siae</i> ^o	30	48A, 51C (табл. 7.5, 7.11)	[94, 134]
<i>Ruminococcus flavefa-</i> <i>ciens</i> ^c	35—45	49A, 52C (табл. 7.5, 7.11)	[2, 3]
<i>Sarcina ventriculi</i> ^c	30—37	50A, 53C (табл. 7.5, 7.11)	[28]
<i>Staphylococcus aure-</i> <i>us</i> ^{yy}	30—37	51B, 54C (табл. 7.6, 7.12)	[61, 136]
<i>Streptococcus equi-</i> <i>inus</i> ^{xx, zz}	37	48A, 55C (табл. 7.5, 7.12)	[216]
<i>Streptococcus faeca-</i> <i>lis</i> ^{xx}	37	48A, 56C (табл. 7.5, 7.12)	[168]
<i>Streptococcus pyoge-</i> <i>nes</i> ^{xx}	34	52A, 57C (табл. 7.6, 7.12)	[143]

Продолжение табл. 7.1

Группа, род и виды ^a	Оптимальная температура роста, °C	Буквенно-цифровой ключ к среде ^b	Источник данных
XV. Палочки и кокки, образующие споры:			
<i>Bacillus cereus</i> ^{xx}	30—37	30A, 58C (табл. 7.4, 7.12)	[111]
<i>Bacillus subtilis</i> ⁱ	37	30A, 59C (табл. 7.4, 7.12)	[111]
<i>Clostridium barkeri</i> ^c	30	12A, 53A (табл. 7.2, 7.6)	[208]
<i>Clostridium botulinum</i> ^c	30—40	30A, 60C (табл. 7.4, 7.12)	[108, 135]
<i>Clostridium tetani</i> ^c	37	42A, 61C (табл. 7.5, 7.12)	[105]
<i>Desulfotomaculum nigrificans</i> ^c	55	54A (табл. 7.6)	[27, 164]
<i>Sporolactobacillus inulinus</i> ^o	35	55A, 62C (табл. 7.6, 7.12)	[110, 110a]
<i>Sporosarcina ureae</i> ⁱ	30	56A (табл. 7.6)	[227]
XVI. Грамположительные палочковидные бактерии, не образующие спор:			
<i>Caryophanon latum</i> ⁱ	26	63C (табл. 7.12)	aaa
<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i> ⁱ	35	57A (табл. 7.6)	[90]
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ^{xx, bbb}	37	58A, 64B (табл. 7.6, 7.12)	[40, 51, 81]
<i>Lactobacillus bulgaricus</i> ^{xx, bbb}	37	58A, 64B (табл. 7.6, 7.12)	[40]
<i>Lactobacillus casei</i> ^{xx}	37	58A, 65C (табл. 7.6, 7.12)	[107]
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ^{xx, bbb ccc}	37	58A, 64B (табл. 7.6, 7.12)	[40, 168]
<i>Lactobacillus fermentum</i> ^{xx, ddd}	37	58A, 64B (табл. 7.6, 7.12)	[40, 168]
<i>Lactobacillus heterohiochii</i> ^{xx, bbb, eee}	37	58A, 64B (табл. 7.6, 7.12)	[195, 221, 222]
<i>Lactobacillus leichmannii</i> ^{xx, bbb}	37	58A, 64B (табл. 7.6, 7.12)	[40]
<i>Lactobacillus plantarum</i> ^{xx, ddd}	37	58A, 64B (табл. 7.6, 7.12)	[40]
<i>Lactobacillus</i> 30a ^{xx}	40	59A, 66C (табл. 7.6, 7.12)	[33 71]
<i>Listeria monocytogenes</i> ⁱ	37	12A, 67C (табл. 7.2, 7.13)	[57, 241]

Группа, род и виды ^a	Оптимальная температура роста, °C	Буквено-цифровой ключ к среде ^b	Источник данных
XVII. Актиномицеты и родственные им бактерии:			
<i>Actinobifida dichotomica</i> ⁱ	50—58	30A (табл. 7.4)	[41, 116]
<i>Actinomyces bovis</i> ^c	37	60A (табл. 7.6)	[64, 89, 160]
<i>Actinoplanes philippinensis</i> ⁱ	24—26	61A (табл. 7.6)	[37, 220]
<i>Amorphosporangium auranticolor</i> ⁱ	25—27	61A (табл. 7.6)	[42]
<i>Ampullariella regularis</i> ⁱ	18—35	61A (табл. 7.6)	[42, 184]
<i>Arachnia propionica</i> ^{xx}	37	60A (табл. 7.6)	[89, 160]
<i>Arthrobacter terregens</i> ⁱ	20	62A, 68C (табл. 7.6, 7.13)	[25, 173]
<i>Bacterionema matrichotii</i> ^{xx, iii}	37	63A, 56C (табл. 7.6, 7.12)	[102]
<i>Bifidobacterium bifidum</i> ^{c, ggg}	36—38	30A (табл. 7.4)	[197]
<i>Cellulomonas flavigena</i> ⁱ	30	64A (табл. 7.7)	[73]
<i>Corynebacterium bovis</i> ^{i, hhh}	37	30A, 69C (табл. 7.4, 7.13)	[196]
<i>Corynebacterium diphtheriae</i> ⁱ	37	12A, 70C (табл. 7.2, 7.13)	[149]
<i>Dactylosporangium aurantiacum</i> ⁱ	37	30A, 71C (табл. 7.4, 7.13)	[226]
<i>Dermatophilus congolensis</i> ^{i, xx}	37	65A (табл. 7.7)	[66]
<i>Eubacterium saburreum</i> ^{c, iii}	37	12A (табл. 7.2)	[87]
<i>Geodermatophilus obscurus</i> ⁱ	24—18	66A (табл. 7.7)	[132]
<i>Kitasatoa purpurea</i> ⁱ	27	61A, 72C (табл. 7.6, 7.13)	[138, 166]
<i>Kurthia zopfii</i> ⁱ	25	32A (табл. 7.4)	[60]
<i>Microbispora rosea</i> ⁱ		67A (табл. 7.7)	[42]
<i>Microellobosporia cinerea</i> ⁱ	26	69A, 73C (табл. 7.7, 7.13)	[125]
<i>Micromonospora chalicea</i> ⁱ	24—26	68A (табл. 7.7)	[95]
<i>Micropolyspora brevicatena</i> ⁱ	28—37	69A, 73C (табл. 7.7, 7.13)	[125]
<i>Mycobacterium phlei</i> ⁱ	28—45	70A, 74C (табл. 7.7, 7.13)	[155]

Продолжение табл. 7.1

Группа, род и виды ^a	Оптимальная температура роста, °C	Буквенно-цифровой ключ к среде ^b	Источник данных
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37 ^{i, iii}	37	75B (табл. 7.13)	[118, 137]
<i>Nocardia asteroides</i> ⁱ	37	30A, 76C (табл. 7.4, 7.13)	[34]
<i>Pilimelia terevasi</i> ⁱ	30	61A (табл. 7.6)	[101]
<i>Planobispora longispora</i> ⁱ	28—37	30A, 72C (табл. 7.4, 7.13)	[225]
<i>Propionibacterium acnes</i> ^{c, kkk}	35	12A, 71A (табл. 7.2, 7.7)	[147a, 148]
<i>Propionibacterium freudenreichii</i> ^c	30—37	30A, 77C (табл. 7.4, 7.13)	[147]
<i>Pseudonocardia thermophila</i> ⁱ	40—50	30A, 72A (табл. 7.4, 7.7)	[83]
<i>Rothia dentocariosa</i> ⁱ	35—37	52A (табл. 7.6)	[63]
<i>Spirillospora albida</i> ⁱ	25	61A (табл. 7.6)	[39]
<i>Sporichthya polymorpha</i> ^{xx}	28—37	70A (табл. 7.7)	[126]
<i>Streptomyces albolongus</i> ⁱ	25—35	70A, 72C (табл. 7.7, 7.13)	[228]
<i>Streptomyces aureofaciens</i> ^{i, iii}		61A, 30A (табл. 7.4, 7.6)	[232]
<i>Streptomyces erythraeus</i> ^{i, iii}	25	61A (табл. 7.6)	[232]
<i>Streptomyces griseus</i> ⁱ	25	30A (табл. 7.4)	[232]
<i>Streptomyces niveus</i> ^{i, iii}		61A (табл. 7.6)	[232]
<i>Streptomyces noursei</i> ⁱ		61A (табл. 7.6)	[232]
<i>Streptomyces venezuelae</i> ⁱ	25—28	30A, 72C (табл. 7.4, 7.13)	[55, 232, 234]
<i>Streptosporangium roseum</i> ⁱ	18—35	61A (табл. 7.6)	[38]
<i>Streptovercillium baldaccii</i> ⁱ	27	30A (табл. 7.4)	[8]
<i>Thermoactinomyces vulgaris</i>	57	30A (табл. 7.4)	[233]
<i>Thermomonospora curvata</i>	50	67A (табл. 7.7)	[83]
XVIII. Риккетсии: ^{mmm}			
<i>Bartonella bacilliformis</i> ^{i, nnn}	28	12A (табл. 7.2)	[240]
<i>Rickettsia quintana</i> ^{i, ooo}	37	12A (табл. 7.2)	[152]

Группа, род и виды ^a	Оптимальная температура роста, °C	Буквенно-цифровой ключ к среде ^b	Источник данных
XIX. Микоплазмы: ^{ppp}			
<i>Acholeplasma laidlawii</i> ^{xx, xxx}	37	33A, 78B (табл. 7.4, 7.13)	[170, 171]
<i>Mycoplasma mycoides</i> ^{xx, rrr}	33—37	73A, 79B (табл. 7.7, 7.13)	[77, 200]
<i>Spiroplasma citri</i> ^{xx}	32	74A (табл. 7.7)	[36]
<i>Thermoplasma acidophilum</i> ⁱ	59	75A (табл. 7.7)	[43, 201]

^a Бактерии сгруппированы согласно 8-му изданию «Определителя бактерий Берги».

^b Состав сред, обозначенных с помощью буквенно-цифрового ключа, приведен в табл. 7.2—7.13. Комплексные, или исочнищенные, среды обозначены буквой А, полусинтетические — буквой В и синтетические — буквой С.

^c Анаэробы. Анаэробные условия создаются с помощью одного из методов, приведенных в гл. 6.

^d Некоторым штаммам необходим витамин В₁₂ (2 мкг на 1 л среды).

^e Для этих видов используют модифицированную среду 41С (табл. 7.11), заменяя в ней нитриты на соли аммония; энергия поставляется при окислении NH₃ до NO₃⁻. Источником углерода является СО₂, содержащаяся в атмосфере.

^f Если вместо малата используются другие источники углерода (например, этанол или бутират), то может понадобиться СО₂.

^g *R. molischianum* и *R. tenue* растут также на среде 4С (Gibson, Tabita, Whitman, личное сообщение). Ни один из этих штаммов не нуждается в биотине.

^h Нуждаются также в тиамине и никотиновой кислоте (1 мг каждого витамина на 1 л среды). На этой среде растет также *R. capsulata* (чья потребность в витаминных удовлетворяется только за счет тиамина) и *R. palustris*. Последняя наряду с биотином нуждается в *n*-аминобензойной кислоте (0,1 мг/л среды) (Whitman, Gibson, Tabita, личное сообщение).

ⁱ Аэробы.

^j Для стимуляции и инциации роста необходим экстракт из бактериальных клеток.

^k *S. hyalina* [151] можно выращивать на синтетической среде с глюкозой, лактозой или сахарозой в качестве источника углерода, нитратами или солями аммония в качестве источника азота и в присутствии витаминов В₁ и В₁₂. Лучший рост достигается при использовании в качестве источника азота органических соединений, например глутамата или пептона.

^l Вместо биотина необходим витамин В₁₂ (40 мкг/л).

^m Ко всем средам для *C. halobacteroides* необходимо добавлять NaCl до концентрации 2%.

ⁿ Потребность *C. vibrioides* в витаминах удовлетворяется рибофлавином (100 мкг/л).

^o Микроаэрофилы.

^p Источником углерода служит СО₂. Перед разливом стерильного водного раствора агара, содержащего свежесажженное FeS, среду аэрируют с помощью СО₂ в течение 10—15 с. FeS готовят, смешивая в кипящей дистиллированной воде эквимолярные количества сульфата аммония и железа(II) и сульфида натрия. Осадок несколько раз промывают стерильной дистиллиро-

Продолжение табл. 7.1

ванной водой, декантируя ее. FeS можно вносить не в агар, а на дно культуральной пробирки.

^q Необходима CO₂; рост стимулируется гумусом или почвенным экстрактом.

^r Потребности в витаминах; кроме биотина необходимы тиамин (5 мг/л) и витамин B₁₂ (0,1 мг/л).

^s Непатогенная форма вирулентной *Treponema pallidum*; вирулентную форму *T. pallidum* не удалось культивировать *in vitro*.

^t Наибольший урожай клеток получают при забуферивании среды 0,033 M N-2-гидроксэтилпипразин-N'-2-этансульфоновой кислотой (HEPES), пиперазин-N, N'-бис (2-этанолсульфоновой кислотой) (PIPES) или N-трис(гидроксиметил)метил-2-аминотансульфоновой кислотой (TES) или периодическим добавлением NaHCO₃. Попытки вырастить микроорганизм на полностью синтетической среде не увенчались успехом. Концентрацию дрожжевого экстракта можно уменьшить до 0,05%, но исключать его совсем нельзя. Потребности в витаминах (биотине, рибофлавине и витамине B₁₂), вероятно, больше, чем было показано ранее, так как в используемой среде содержится 0,5%-ный дрожжевой экстракт — богатый источник витаминов. (HEPES и другие реактивы получены от фирмы Sigma или Calbiochem.)

^u Известна также синтетическая среда, поддерживающая рост этого микроорганизма в микроаэробных условиях [18].

^v Для *Agrobacterium rubi* необходимы также пантотенат (100 мкг/л) и никотиновая кислота (100 мкг/л). *A. tumefaciens* хорошо растет без этих добавок на синтетической среде с NH₄Cl и глюкозой.

^w В дефицитной по азоту среде эти микроорганизмы фиксируют молекулярный азот, для чего необходимы следы молибдата. *A. chroococcum* в качестве источника азота использует также аммиак, нитрат и аминокислоты.

^x Крайне устойчив к изменению pH (растет в диапазоне pH от 4 до 10).

Картофельную кожуру (125 г) кипятят в смеси глицерина с водой до того момента, когда она станет мягкой. Смесь фильтруют через марлю, выдерживают до тех пор, пока прошедший раствор не станет прозрачным и декантируют его. Затем добавляют соль и доливают водой до 1 л. Добавляют 15 г агара и нагревают до его полного растворения. Стерилизуют в 250-мл-литровых колбах; к каждому 250 мл основного агара добавляют с соблюдением правил асептики 50 мл дефибрированной овечьей крови и перемешивают. Для получения жидкой среды агар не добавляют.

^z Эта среда поддерживает также умеренный или слабый рост штаммов *B. suis* и *B. abortus*. Для культивирования этих видов подходит бульон для бруцелл [127].

^{aa} К автоклавированной и охлажденной среде добавляют с соблюдением правил асептики 25 мл эритроцитарной массы из крови человека или 50 мл дефибрированной кроличьей крови.

^{bb} Клетки растут в атмосфере, состоящей на 40% из метана и на 60% из воздуха; вторым известным источником углерода является метанол.

^{cc} Только 6 из 146 испытанных соединений служат источниками углерода. Это б-окснбутират, ацетат, бутират, валерат, пируват и сукцинат.

^{dd} Для роста требуется лишь несколько углеводов как источников углерода. Необходимая аминокислота — метионин.

^{ee} Углеводы (в том числе глюкоза) не используются в качестве источника углерода; однако таким источником служат многие органические вещества (например, насыщенные дикарбоновые кислоты, гликолат и тестостерон).

^{ff} Рост некоторых штаммов стимулируется метионином (0,02%) и глутаминовой кислотой (0,1%) (или они нуждаются в них), другим необходима никотиновая кислота (100 мкг/л). Потребность в биотине не обнаружена. Все другие потребности в питательных веществах сходны с потребностями *Agrobacterium rhizogenes* [46].

^{gg} Рост зависит от повышенной влажности атмосферы [198, 199]. Аденин, аденозин, рибофлавин и флавинаденинмононуклеотид обладают выраженным нитрирующим действием.

^{hh} Из аминокислот необходим только метионин, однако другие аминокислоты стимулируют рост. Потребность в метионине удовлетворяется его D- или

L-изомерами или частично витамином B₁₂. Рост на полностью синтетической среде хуже, чем на среде с дрожжевым экстрактом.

ii В питательный агар добавляют сахарозу (5%).

jj Клетки растут на цитратной среде Козера, которая содержит те же компоненты, что и синтетическая среда. Среда Козера производится фирмой Difco.

kk К питательному бульону, используемому для приготовления жидкой среды, добавляют 10%-ную сыворотку. Рост на твердой среде улучшается при повышенной влажности.

ll Аэроб, но некоторые штаммы растут и в анаэробных условиях.

mm Анаэробные условия достигаются пропусканием аргона. Выход биомассы и скорость роста на синтетической среде вдвое меньше, чем на комплексной. Добавление витаминов и других факторов не способствует улучшению роста на синтетической среде.

nn Основные культуры сохраняют на среде с агаром, содержащей 40% рубцовой жидкости, глюкозу, целлобиозу и крахмал.

oo Синтетическая среда отличается от вышеупомянутой тем, что в ней используют 0,02 М фосфатный буфер и иные, чем D-глюкоза, источники углерода. Источниками углерода служат ацетат, бутират, спирты, аминокислоты, пентозные сахара, углеводороды и соединения ароматического ряда.

pp Среда отличается от вышеупомянутой присутствием аминокислот (см. сноску w в табл. 7.10). Лактат и сукцинат являются основными источниками углерода и энергии для *B. catarrhalis*.

qq В отношении потребностей питания *N. gonorrhoeae* существуют самые различные данные. Известно много природных вариантов; кроме того, у этих бактерий легко возникают мутации. Частые пересевы в лабораторных условиях приводят к появлению менее требовательных к среде штаммов, которые отличаются генетически от исходных изолятов (Lankford, личное сообщение).

rr Окисляет аммиак до нитрита и фиксирует CO₂; не растет в морской воде.

ss Значительно ингибируется большинством органических веществ в концентрациях 10⁻³ М.

tt *S. acidocaldarius* является факультативным автотрофом; он растет быстрее на среде, содержащей минеральные соединения и 0,1%-ный дрожжевой экстракт, чем на среде, содержащей серу.

uu Исследования проводились на слегка загрязненной культуре; попытки дальнейшей очистки не предпринимались из-за очень низкой скорости развития *Methanosarcina*. [В настоящее время чистые культуры *Methanosarcina* получены в работе Balch et al., Microbiol. Rev., 43, 260, 1979). — Прим. ред.] Вероятно, авторы считали, что загрязнение не влияло на результаты экспериментов.

vv На 1 л основной среды добавляют 15 г формата натрия и (после автоклавирования) стерильный раствор, содержащий 0,5 г пирувата калия. Джоунс и Стэдмэн [99] рекомендуют добавлять к среде селенит (1 мкМ) и вольфрамат (100 мкМ).

ww Добавляют глюкозу до концентрации 0,5%.

xx Факультативный анаэроб.

yy Штаммы варьируют от факультативных анаэробов до аэробов.

zz Согласно неправильной классификации [139], ранее известен как *Leuconostoc mesenteroides* P-60.

aaa Kele, McCoy, Bacteriol. Proc., p. 66, 1970

bbb Для лучшего роста на 1 л среды 58А добавляют следующие компоненты: 300 мг аскорбиновой кислоты и 5 мл твинна 80.

ccc По крайней мере для одного штамма *L. delbrueckii* (а именно для *L. delbrueckii* 730) нужны также пиридоксаминфосфат (0,002 мг/л) и тимидин (4 мг/л).

ddd Вместо пантотенна добавляют 20 мкг пантотениата кальция.

Продолжение табл. 7.1

eee В отсутствие ацетата этот микроорганизм нуждается в факторе роста, названном мевалоновой кислотой (поставляется в форме лактона фирмой Sigma Chemical Co.). Его добавляют к среде в концентрации 1 мкг/л.

fff Гемин (0,2 мг/л), а также CO_2 стимулируют рост в анаэробных условиях.

ggg Для роста необходима CO_2 .

hhh Все штаммы *C. bovis* нуждаются в ненасыщенных жирных кислотах с длинной цепью, пальмитоолеиновой, рицинолевой или олеиновой. Эта потребность эффективно восполняется 0,1%-ным твином 80.

iii Для продолжительного поддержания культуры нужен кровяной агар. В качестве жидкой среды рекомендуется питательный бульон, обогащенный 0,3%-ным дрожжевым экстрактом, 0,1%-ным солянокислым цистеином, 1%-ной глюкозой и 5%-ной асцитической жидкостью человека. В случае другого штамма *Eubacterium* при добавлении субстратных количеств аргинина к основной среде с пептоном рост значительно стимулируется [207].

jjj Род включает в себя паразитов, сапрофитов и промежуточные формы. Сапрофитные штаммы растут на простых средах, а остальные — на более сложных или требуют добавок, например микобактина. Некоторые штаммы культивируются только на живых клетках. Все штаммы на любой среде растут медленно.

kkk Все жидкие среды кипятят в течение 10 мин и перед инокуляцией быстро охлаждают. Все культуры инкубируют в анаэробных условиях в атмосфере, состоящей из 80% N_2 , 10% H_2 и 10% CO_2 .

lll Бактерии растут на среде Чапека без пептона.

mmm Бактерии (кроме отдельных, которые отмечены) являются облигатными паразитами и жизнеспособны только в животных клетках. Их можно выращивать в эмбриональных желточных мешках цыпленка и в культурах тканей позвоночных.

nnn Культивируются *in vitro* на искусственных средах. Для роста необходима сыворотка и желателен гемоглобин. В некоторых случаях стимулирующий эффект оказывают глутатин и аскорбиновая кислота. Чаще всего их выращивают на полужидких средах с 1%-ным агаром, но они могут также расти на твердой среде типа кровяного агара. *B. bacilliformis* растет в культуре тканей первичных эксплантатов легких, костного мозга или селезенки крыс и морских свинок, а также на хорноаллантоисной и желточной жидкостях зародыша цыпленка. Оптимальное значение pH культуральной среды 7,8.

ooo К основному кровяному агару добавляют гемин (40 мкг/л) или гемоглобин (1 мг/л) и инкубируют в атмосфере, содержащей 95% воздуха и 5% CO_2 . Необходимо также присутствие детоксикантов типа бычьего альбумина (2 г/л), крахмала (2 г/л) или активированного угля (0,2 г/л).

ppp Более полная информация о питании этой группы бактерий дана в обзоре [169].

qqq Бульон из экстракта сердечной мышцы обогащен 20%-ной стерильной (нагретой до 56 °C в течение 30 мин) лошадиной сывороткой и 10%-ным свежим раствором дрожжевого экстракта (25 г дрожжевых клеток на 100 мл раствора).

rrr Для роста всех штаммов необходимы стероиды и жирные кислоты с длинной цепью.

Таблица 7.2. Состав комплексных (А) и полусинтетических (В) сред №1—12 для бактерий, перечисленных в табл. 7.1

Компоненты	Количество (в единицах, указанных в колонке 1) на 1 л среды												
	1В ^а	2А	3А	4А ^б	5А ^с	5В ^д	6В	7В	8А	9А	10А ^е	11А ^б	12А
Глюкоза ^г (г)					1,0	1,0		5,4	1,0	10	1,0		
Глицерин (г)													
(NH ₄) ₂ SO ₄ (г)	1,0											0,5	
KNO ₃ (г)					0,5	0,1							
Na ₂ HPO ₄ (г)											5,24	1,74	
KH ₂ PO ₄ (г)			1,13					1,4	0,04		2,77	1,06	
K ₂ HPO ₄ (г)	1,0		0,48	0,5			0,25		0,04				
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5		1,0	0,5		0,1	1,0	3,0	0,075			0,1	
NaCl (г)	0—30												
CaCl ₂ ·2H ₂ O (г)				0,2		0,1	1,0		0,05				
FeSO ₄ ·7H ₂ O (мг)	0,5												
Микроэлементы					Да ^г	Да ^г							
Витамины						Да ^h	Да ⁱ						
Мясной экстракт (г)				1,0									
Дрожжевой экстракт (г)		3,0		1,0	5,0					1,0		0,05	
Кислотный гидролизат казеина (казеиновые кислоты; г)						1,0							
Ферментативный гидролизат казеина (казитон; г)			20				0,5	10		5,0			
Пептон (г)		3,0		1,0					0,5		1,0	0,05	

Триптон (г)
Специальная
рН

среда

					5,0									
7,~	6,8	7,0	7,0	7,0	7,0	7,5	7,2	7,0—7,2	7,0 ^k	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0—7,4 ^{Дал}

^a NaHCO_3 (2 г/л) служит источником CO_2 , а $\text{N}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (1 г/л) используется как восстанавливающий агент и источник серы. Для обеспечения микроэлементами вместо дистиллированной воды пользуются водопроводной.

^b Вместо дистиллированной воды следует пользоваться водопроводной.

^c Для морских штаммов используют профильтрованную морскую воду; вместо нее можно применять имеющийся в продаже заменитель морской воды или смесь следующих солей (на 1 л): 25 г NaCl , 5 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 г $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ и 0,1 г KCl . Добавляют также глицерофосфат натрия (0,1 г/л) и трис-буфер (Sigma; 1 г/л).

^d Среду используют для пресноводных штаммов. К среде добавляют глицерофосфат натрия (0,1 г/л) и трис-буфер (Sigma; 1 г/л).

^e 20 мл основного раствора Хатнера, не содержащего витаминов. Этот раствор, модифицированный Кози-Базаер и др. [35], содержит следующие компоненты: 10 г нитритотриуксусной кислоты (растворенной и нейтрализованной с помощью KOH); 14,45 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 3,33 г $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 9,25 мг $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 24\text{H}_2\text{O}$; 99 мг $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 50 мл смеси металлов № 44 (см. ниже). Объем доводят дистиллированной водой до 1 л, рН среды устанавливают 6,6—6,8. Смесь № 44 содержит в 100 мл: 250 мг этилендиаминтетрауксусной кислоты; 1,095 мг $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 500 мг $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 154 мг $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 39,2 мг $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 24,8 мг $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

и 17,7 мг $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$. Чтобы не выпадал осадок, добавляют несколько капель 6 н. H_2SO_4 .

^f Для большинства сред рекомендуется глюкозу стерилизовать отдельно автоклавированием или фильтрованием через соответствующие мембраны и затем добавлять ее с соблюдением правил асептики к другим стерильным компонентам среды.

^g На 1 л среды добавляют 1 мл раствора, содержащего следующие микроэлементы: растворимые соли В, Fe, Mn (каждого элемента по 0,5 мг/л) и растворимые соли Co, Cu, Mo, Zn (каждого элемента по 0,01 мг/л).

^h Добавляют солянокислый тиамин (1 мг/л) и витамин B_{12} (1 мкг/л).

Добавляют витамин B_{12} (500 мкг/л).

^j Суспендируют 40 г кровяного агара (имеется в продаже) в 1 л дистиллированной воды, доводят до кипения, автоклавируют, охлаждают и к еще не застывшей смеси добавляют с соблюдением правил асептики 5%-ную стерильную дефибринированную кровь. Состав основного кровяного агара: 500 г экстракта сердечной мышцы крупного рогатого скота, 10 г триптозы (Difco), 5 г хлористого натрия и 15 г агара (Difco). К 1 л среды добавляют 10 г янтарной кислоты.

^k В процессе инкубации *Leptothrix ochracea* величину рН поддерживают около 7, добавляя к среде стерильный раствор 0,5 н. NaOH .

Таблица 7.3. Состав комплексных (А) и полусинтетических (В) сред № 13—24 для бактерий, перечисленных в табл. 7.1^а

Компоненты	Количество (в единицах, указанных в колонке 1) на 1 л среды											
	13В [*]	14А ^b	15А ^c	16А ^{*,d,e}	17А ^f	18А ^g	19А ^{*,p}	20А ^{*,h}	21А ⁱ	22В	23А ^j	24А
Глюкоза ^k (г)		5,0	5,0	1,0		100		25			1—3,0	10
Глицерин (г)	0,1						20					
(NH ₄) ₂ SO ₄ (г)	0,25				1,0						1,0	
KNO ₃ (г)									0,1	2,5		0,6
Na ₂ HPO ₄ (г)	1,0									0,21	5,24	0,45
KH ₂ PO ₄ (г)	0,3								0,05	0,09	2,77	
K ₂ HPO ₄ (г)									0,05			
MgSO ₄ ·7H ₂ O (г)					1,0				20	0,2		0,1
MnSO ₄ ·H ₂ O (г)									0,005			
NaCl (г)	1,0	2,5		5,0	0,002		5,6	5,0	120			
CaCl ₂ ·2H ₂ O (г)												0,2
FeSO ₄ ·7H ₂ O (мг)					2,0				5,0	1,0		10
Микроэлементы									Да ^l	Да ^m		
Витамины	Да ⁿ									Да ^o		
Дрожжевой экстракт (г)		5,0	2,0	2,0		2,0			5,0		5,0	3,0
Кислотный гидролизат казеина (казеиновые кислоты; г)									15		1,0	
Ферментативный гидролизат казеина (казитон; г)		15										
Пептон (г)			2,0		10							
pH	7,4	7,4	7,6	7,0		5,4—6,3	7,0	6,8	6,8—7,0	7,0	6,8	7,5

^a Готовые среды, имеющиеся в продаже, отмечены звездочкой.

^b Среда содержит также 0,75 г солянокислого цистеина и 0,5 г тногликолата натрия. К 9 мл стерильной основной среды добавляют 1 мл кроличьей сыворотки, простерилизованной фильтрованием.

^c На 1 л среды добавляют 0,5 г тногликолата натрия. Бактерии лучше всего растут при забуферивании среды 0,033 M N-2-гидроксиэтилпиперазин-N'-этанолсульфоновой кислотой (HEPES), N-трис(гидроксиметил)-метил-2-аминосульфоновой кислотой (TES), пиперазин-N,N-бис(2-этанолсульфоновой кислотой) (PIPES) или при периодическом добавлении NaHCO_3 . Буферы производят фирмы Calbiochem и Sigma.

^d Дополнительные компоненты: 0,1 г NaHSO_4 , 10 г пептического гидролизата животной ткани (USP*), 10 г панкреатического гидролизата казеина (USP*). Среда продается под названием «бульон для бруцелл».

^e Для выращивания *Campylobacter* к «бульону для бруцелл»* добавляют 0,16% агара для создания частично анаэробных условий.

^f Добавляют янтарную кислоту (10 г/л).

^g Добавляют CaCO_3 (30 г/л).

^h Объединяют перечисленные компоненты со следующими: солянокислым цистеином (1 г); панкреатическим гидролизатом сердечной мышцы* (3 г); папаниновым гидролизатом соевой муки* (10 г); солянокислым тиамином (0,05 мг). Объем доводят до 1 л.

ⁱ На 1 л среды добавляют 2 г сукцината натрия и 0,5 г цитрата натрия.

^j 20 мл безвитаминной минеральной среды Хатнера. Для модификации этой среды, согласно прописи Коэн-Базир и др. [35], добавляют следующие компоненты: 10 г нитрилтронаксусной кислоты (растворенной в нейтрализованной KOH); 14,45 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 3,33 г $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 9,25 мг $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 24\text{H}_2\text{O}$; 99 мг $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 50 мл смеси метал-

лов № 44 (см. ниже). Дистиллированной водой объем доводят до 1 л и устанавливают pH 6,6–6,8. Смесь металлов № 44 содержит (на 100 мл): 250 мг этилендиаминтетрауксусной кислоты; 1,095 мг $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 500 мг $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 154 мг $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 39,2 мг $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 24,8 мг $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 17,7 мг $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$. Чтобы предотвратить выпадение осадка, добавляют несколько капель 6 н. H_2SO_4 .

^k Для большинства сред рекомендуется стерилизовать глюкозу отдельно от других компонентов среды и затем добавлять ее с соблюдением правил асептики. Глюкозу стерилизуют автоклавированием или фильтрованием через соответствующие мембраны.

^l На 1 л среды добавляют: 0,05 мг $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,2 мг $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,2 мг ZnSO_4 ; 0,01 мг $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

^m На 1 л среды добавляют: 50 мкг Cu (в виде $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$); 10 мкг B (в виде H_3BO_3); 10 мкг Mn (в виде $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$); 70 мкг Zn (в виде $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$); 10 мкг Mo (в виде MoO_3).

ⁿ Добавляют 5 мг солянокислого тиамина. К 9 частям стерильной основной среды добавляют одну часть стерилизованной ультрафильтрацией смеси альбумина с жирными кислотами* следующего состава: 20 г фракции V бычьего альбумина, 0,01 г $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,01 г $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 8 мг $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,6 мг $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,1 г $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,4 мг витамина B_{12} , 2,5 мл твина 80. Дистиллированной водой объем доводят до 200 мл.

^o Добавляют кальциевую соль пантотеновой кислоты (0,2 г/л). Для роста необходимо также идентифицированное вещество, экстрагированное из агара (3 мл/л, 90 мг твердого субстрата). Витамин не нужен. На комплексных средах бактерии не растут.

^p Добавляют картофельный экстракт, приготовленный следующим образом. Картофель очищают от кожуры и нарезают ломтиками. Добавляют к нему глицерин с водой и варят до состояния мягкости; затем фильтруют, оставляют стоять на некоторое время и надосадочную жидкость декантируют.

Таблица 7.4. Состав комплексных сред (А) № 25—37 для бактерий, перечисленных в табл. 7.1^а

Компоненты	Количество (в единицах, указанных в колонке 1) на 1 л среды												
	25А ^б	26А	27А	28А	29А ^{с,д}	30А	31А*	32А	33А*	34А ^е	35А ^ф	36А ^г	37А ^h
Глюкоза ^и (г)				1,0			2,0			1,0	2,0	3,0	3,0
(NH ₄) ₂ SO ₄ (г)												0,45	4,0
Na ₂ HPO ₄ (г)							2,5						
KH ₂ PO ₄ (г)												0,9	2,7
MgSO ₄ ·7H ₂ O (г)												0,02	0,2
MnSO ₄ ·H ₂ O (г)												0,01	
NaCl (г)	5,0	5,0		10	30	5,0	5,0	5,0	5,0		1,0	0,9	
CaCl ₂ ·2H ₂ O (г)												0,02	
Дрожжевой экстракт (г)				5,0	3,0			3,0		2,0	5,0		
Пептон (г)	17							10	10	2			5,0
Триптон (г)		8,0		10			20						
Питательный бульон* (г)						8,0					16		
Специальные среды			Да ^ж						Да ^к				
pH	7,1	7,0		7,0	6—9	7,0	7,3	7,0—8,0	7,4	6,8	7,0	6,7	6,6—6,9

^a Готовые среды, имеющиеся в продаже, отмечены звездочкой.

^b На 1 л среды добавляют 10 г лактозы, 3 г протеозепптона, 1,5 г желчных солей.

^c Для морских штаммов пользуются профильтрованной морской водой или ее заменителем (имеется в продаже) или же смесью следующих солей (г/л): NaCl (25); $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (5); $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (1) и KCl (1). Добавляют также глицерофосфат натрия (0,1 г/л) и трис-буфер (Sigma, 1 г/л).

^d Протеозепптоин (5 г/л).

^e Растворяют 6,05 г триса и 5,8 г яблочной кислоты в воде и доводят pH до 6,8 с помощью NaOH.

^f Непосредственно перед экспериментом к другим компонентам среды добавляют отдельно стерилизованные растворы L-аскорбиновой кислоты (0,1 г) и L-цистина (0,1 г). L-аскорбиновую кислоту стерилизуют фильтрованием, а L-цистин — фильтрованием или автоклавированием.

^g К другим компонентам среды добавляют 200 мл осветленной рубцовой жидкости (см. ниже), 2 г триптиказы (BBL) и 1 мг геммина. Устанавливают pH 6,7, объем доводят водой до 1 л и автоклавировуют. Непосредственно перед экспериментом к автоклавированной среде добавляют стерильные растворы L-цистенина $\cdot HCl \cdot H_2O$ (0,5 г) и Na_2CO_3 (4 г).

Культуры инкубируют в атмосфере, содержащей CO_2 . Осветленную рубцовую жидкость готовят из свежесобранной рубцовой жидкости коровы, содержащейся на рационе из сена. Жидкость фильтруют через марлю и дают ей отстояться, после чего прозрачную надосадочную жидкость центрифугируют 20 мин при 14 000 об/мин [21].

^h К среде добавляют 17,8 г Na_2SO_4 .

ⁱ Для большинства сред рекомендуется стерилизовать глюкозу отдельно (автоклавированием или фильтрованием через соответствующие мембранные фильтры), а затем с соблюдением правил асептики добавлять ее к другим компонентам среды.

^j Для приготовления шоколадного агара к триптиказовому соевому бульону* добавляют 3% (вес/объем) дрожжевого экстракта и 1% агара. После стерилизации в бульон вносят дефибринированную овечью кровь (конечная концентрация 4%), инкубируют среду около 15 мин при 70 °C, охлаждают ее до 50 °C и добавляют IsoVitaleX* (5 мл/среды) и $CaCl_2$ (конечная концентрация 0,5 mM).

^k Агар готовят на экстракте из сердца крупного рогатого скота: 450 г сердечной мышцы, лишенной жира, измельчают и выдерживают в воде в течение ночи при 4–6 °C, добавляют пептон и NaCl, как указано выше, кипятят 30 мин, фильтруют, объединяют с растворенным агаром (2% в готовой среде), доводят pH до 7,4 и автоклавировуют.

Таблица 7.5. Состав комплексных (А) и полусинтетических (В) сред № 38—50 для бактерий, перечисленных в табл. 7.1

Компоненты	Количество (в единицах, указанных в колонке 1) на 1 л среды												
	38A ^a	39A ^b	40A ^c	41A ^d	42A ^e	43B ^f	44A ^g	45A ^h	46A ⁱ	47A ^j	48A ^k	49A	50A
Глюкоза ^l (г)	5,0	10	10			5,0				10	10		20
(NH ₄) ₂ SO ₄ (г)							0,5		2,89				
KNO ₃ (г)	1,0												
Na ₂ HPO ₄ (г)	5,0					2,25							
KH ₂ PO ₄ (г)						0,75	0,5		1,0				
K ₂ HPO ₄ (г)									1,0		2,5		
MgSO ₄ ·7H ₂ O (г)						0,096	0,3		0,1	0,2			
MnSO ₄ ·H ₂ O (г)						0,001				0,05			
NaCl (г)		5,0							2,0				
CaCl ₂ ·2H ₂ O (г)		15			0,074	0,002			0,1				
FeSO ₄ ·7H ₂ O (мг)						2,0							
Микроэлементы						Да ^m							
Аминокислоты						Да ⁿ							
Витамины						Да ^o							
Мясной экстракт (г)	3,0	1,0								10			
Дрожжевой экстракт (г)	1,0	5,0	2,0	5,0	3,0		4,0	5,0		5,0	10		2,0
Кислотный гидролизат казеина (казеиновые кислоты; г)						20							
Ферментативный гидролизат казеина (казитон; г)											10		
Пептон (г)										10			

Таблица 7.6. Состав комплексных (А) и полусинтетических (В) сред № 51—63 для бактерий, перечисленных в табл. 7.1

Компоненты	Количество (в единицах, указанных в колонке 1) на 1 л среды												
	51В ^a	52А	53А ^b	54А ^c	55А ^d	56А	57А ^e	58А ^f	59А ^g	60А ^h	61А ⁱ	62А ^j	63А
Глюкоза ^k (г)	10	18		10	10		12	2,5		5,0		1,0	
(NH ₄) ₂ SO ₄ (г)						12,7				1,0			
KNO ₃ (г)											3,0		
Na ₂ HPO ₄ (г)	7,0					4,5	30						
KH ₂ PO ₄ (г)	0,5	8,7	0,04			0,4	1,0		3,3	15			
K ₂ HPO ₄ (г)	5,5	8,7	0,04						3,3		1,0	2,0	
MgSO ₄ ·7H ₂ O (г)	0,1			1,5			0,2		0,4	0,2	0,5	0,2	
MnSO ₄ ·H ₂ O (г)			0,008				0,002		0,02	0,0015			
NaCl (г)	2,0		0,08						0,2		0,5		
CaCl ₂ ·2H ₂ O (г)			0,008							0,02			
FeSO ₄ ·7H ₂ O (мг)									20	40	10	10	
Микроэлементы	Да ^l												
Аминокислоты	Да ^m		Да ⁿ						Да ^o				
Витамины	Да ^p						Да ^q		Да ^r	Да ^s			
Мясной экстракт (г)						5,0							
Дрожжевой экстракт (г)			10		10		3,0	10	10	1,0		1,0	1,0—2,0
Кислотный гидролизат казеина (казеиновые кислоты; г)	3,0						4,0		7,5			2,0	
Ферментативный гидролизат казеина (казитон; г)										4,0			
Пептон (г)			20	5,0	10	5,0					20		

Специальные среды
рН

7,4

Дат
7,4

7,2

8,8

7,8—8,1

7,0

5,4

7,2

6,8

Дат

^a Другие компоненты, которые являются необходимыми или оказывают стимулирующее действие (мг/л): ацетат натрия (820); урацил (112); ксантин (152) и аденин (135).

^b На 1 л среды добавляют 400 мг NaHCO_3 .

^c На 1 л среды добавляют 1,5 г Na_2SO_4 . Воду берут не дистиллированную, а водопроводную. Глюкозу можно заменить лактатом натрия (3,5 г). Если в среде присутствует пируват (в качестве субстрата), то сульфат добавлять не нужно.

^d На 1 л среды добавляют 10 г ацетата натрия.

^e На 1 л среды добавляют 1 г цитрата натрия, 0,3 г тиогликолата натрия, 0,06 г олеата натрия и 3 г сапонина.

^f Большинство молочнокислых бактерий можно поддерживать путем ежемесячных пересевов в столбиках с 2%-ным агаром, приготовленным на данной среде. Все компоненты автоклавируются вместе. К жидкой культуре следует добавить неорганические соли, перечисленные в табл. 7.14. Обратите внимание, что количество солей приводится на 1 л среды с двойной концентрацией.

^g На 1 л среды добавляют следующие компоненты: 10 г сахарозы, 1,5 г ацетата калия и 0,5 г аскорбиновой кислоты. Среду используют для получения как посевного материала (инокулята), так и биомассы. Добавив к среде 1,5—2% агара, ее используют для поддержания роста микроорганизмов, пересевая каждые 2 нед в столбики. Все компоненты автоклавируют вместе.

^h На 1 л среды добавляют также 1 г цистеина·HCl, 1 г раскваримого очищенного крахмала, 1,5 мг $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, по 20 мг аденинсульфата урацила, ксантина и тимина, 100 мкг CoA и 1 мг олеиновой кислоты. На этой среде хорошо растут штаммы *Actinomyces israelii*, *A. bovis* и некоторые виды *Corynebacterium*, *Lactobacillus bifidus* и *Leptotrichia buccalis*. Крахмал суспендируют в небольшом количестве холодной воды, вносят суспензию в кипящую воду и затем добав-

ляют остальные компоненты среды, кроме глюкозы, которую автоклавируют отдельно. Эта среда пригодна также для поддержания культуры. Для столбиков используют 0,7%-ный агар.

ⁱ Добавляют 30 г сахарозы.

^j На 1 л среды добавляют также 1 г кислого цитрата аммония и 100 мкг terregens-фактора.

^k Для большинства сред рекомендуется стерилизовать глюкозу отдельно от других компонентов среды (автоклавированием или фильтрованием через соответствующие мембранные фильтры), а затем добавлять ее с соблюдением правил асептики.

^l На 1 л среды добавляют 1 мг цитрата железа.

^m На 1 л среды добавляют 100 мг L-цистеина·HCl и 50 мг DL-триптофана.

ⁿ На 1 л среды добавляют 0,5 г цистеина·HCl.

^o На 1 л среды добавляют 1 г гистидина·HCl·H₂O.

^p На 1 л среды добавляют 1 мг никотиновой кислоты, 1 мг солянокислого тиамина и 1 мкг биотина.

^q На 1 л среды добавляют 0,5 мг рибофлавина, 1 мг тиамин и 1 мг пантотената кальция.

^r На 1 л среды добавляют 16,5 мкг солянокислого пиридоксамина.

^s На 1 л среды добавляют: 2 мг тиамин·HCl, 1 мг пиридоксин·HCl, 0,5 мг пиридоксамина·2HCl, 0,5 мг пиридоксала·HCl, 2 мг пантотената кальция, 2 мг рибофлавина, 1 мг никотиновой кислоты, 1 мг никотинамида, 100 мкг L-аминобензойной кислоты, 50 мкг биотина и 50 мкг фолиевой кислоты.

^t Концентрат бульона из мозга и сердца, 37 г/л.

^u Концентрат бульона из мозга и сердца (18,5 г/л) (имеется в продаже) и гемин (250 мкг/л).

Таблица 7.7. Состав комплексных (А) сред № 64—75 для бактерий, перечисленных в табл. 7.1

Компоненты	Количество (в единицах, указанных в колонке 1) на 1 л среды											
	64А	65А ^a	66А ^b	67А	68А ^c	69А ^d	70А	71А ^e	72А ^f	73А	74А	75А ^g
Глюкоза ^g (г)	2,0—10	10	10		1,0		10	6,0	10		1,0	10
Глицерин (г)						88						
(NH ₄) ₂ SO ₄ (г)	0,3											0,2
Na ₂ HPO ₄ (г)	5,0											
KH ₂ PO ₄ (г)	1,0											3,0
K ₂ HPO ₄ (г)									0,2			
MgSO ₄ ·7H ₂ O (г)	0,1								0,3			0,5
NaCl (г)	4,0	5,0						2,5				
CaCl ₂ ·2H ₂ O (г)	0,1											0,25
FeSO ₄ ·7H ₂ O (мг)									5,0			
Аминокислоты								Да ^h				
Мясной экстракт (г)		3,0				1,0	1,0					
Дрожжевой экстракт (г)	0,1—1,0		5,0	3,0	1,0		1,0		0,1		10	1,0 ⁱ
Кислотный гидролизат казеина (казеиновые кислоты; г)									0,1			
Ферментативный гидролизат казеина (казитон; г)			5,0			5,0	2,0					
Пептон (г)		10										
Триптон (г)											10	
Специальные среды				Да ^j						Да ^k	Да ^l	
pH	7,0	7,0—7,2	7,4—7,5		6,8	6,5—7,0	7,3	7,4	7,0	7,6—7,8	7,8	1,0—2,0

часть II. РОСТ

^a Смешивают с 3 л лошадиной сыворотки, фильтруют и стерилизуют фильтрованием.

^b Добавляют растворимый крахмал (2%) и CaCO_3 (0,1%)

^c Добавляют растворимый крахмал (0,1%), CaCO_3 (0,1%) и агар (1,5%).

^d Вместо дистиллированной воды используют водопроводную.

^e На 1 л среды добавляют 0,1 г Na_2SO_4 , 0,5 г тиогликолата натрия, 3 г фитона (BBL) и 17 г триптиказы (BBL).

^f Добавляют 0,2 г CaCO_3 на 1 л среды.

^g Для большинства сред рекомендуется стерилизовать глюкозу отдельно от других компонентов среды (автоклавированием или фильтрованием через соответствующие мембранные фильтры) и затем добавлять ее с соблюдением правил асептики.

^h Добавляют 0,25 г L-цистина на 1 л среды.

ⁱ Активный компонент дрожжевого экстракта был выделен и охарактеризован как один или несколько пептидов с мол. массой ~1000 [201].

^j На водяной бане готовят овсяную кашу из 25–65 г плющеного овса и 1 л водопроводной воды. Смесь фильтруют через марлю и, пока она еще не остыла, доводят ее объем до 1 л. Затем добавляют 18–20 г агара и доводят pH до 7,2 с помощью NaOH [232].

^k Среда Хайфлика и Чэнока [77]: PPLO-бульон (Difco) — дегидратированная среда, которая содержит экстракт из сердца крупного рогатого скота с пептоном и NaCl (34 г/л); лошадиная сыворотка (200 мл); 25%-ный экстракт свежих пекарских дрожжей (100 мл); 1%-ный агар (предпочтительнее полумягкий). Желательна влажная атмосфера.

^l На 1 л среды добавляют: 21 г PPLC-бульона (Difco), 70 г сорбита, 1 г фруктозы, 10 г сахарозы и 200 мл лошадиной сыворотки. CO_2 (5%) в атмосфере N_2 стимулирует рост бактерий на твердых средах.

Таблица 7.8. Состав синтетических сред (С) № 1—14 для бактерий, перечисленных в табл. 7.1

Компоненты	Количество (в единицах, указанных в колонке 1) на 1 л среды													
	1C ^a	2C ^b	3C ^c	4C ^d	5C ^e	6C ^f	7C	8C	9C ^g	10C	11C ^h	12C ^h	13C	14C ⁱ
Глюкоза ⁱ (г)						2,0		1,0	1,0	1,0	0,2	2,0		
Глицерин (г)														0,2
NH ₄ Cl (г)	1,0	1,0	2,0	0,5— —2,0	0,08	1,0					0,25	0,5	1,0	
NaNO ₃ или KNO ₃ (г)								0,5						
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O (г)									0,04		5,24	1,74		0,53
K ₂ HPO ₄ (г)				0,9	0,01		0,48	1,0	0,027	0,08 ^k			0,5	0,07
KH ₂ PO ₄ (г)	0,33	1,0	1,0	0,6			1,13		0,04	0,08 ^k	2,77	1,06		
Трис-буфер (г)						2,0								
NaCl (г)		10	10			24								
KCl (г)	0,33					0,7		0,5						
MnCl ₂ ·4H ₂ O (мг)	0,03	0,005	0,005	22	0,01			2,0	5,0	100				
MgSO ₄ ·7H ₂ O (г)	0,62	1,29	2,6	0,25	0,01	8,0	1,0	0,5	0,075	0,2			0,2	0,15
CaCl ₂ ·2H ₂ O (г)	0,33	0,1	0,2	0,094	0,05	0,5		0,2	0,05	0,05	0,1		0,1	0,004

FeSO ₄ ·7H ₂ O (мг)	2,0	0,5	0,5	15	3,5			20	10 ^l				
Микроэлементы	Да ^m	Да ⁿ	Да ⁿ	Да ^o	Да ^p	Да ^q			Да ^r				Да ^s
Аминокислоты							Да ^t			Да ^u			
Витамины			Да ^v	Да ^w					Да ^x	Да ^y	Да ^z	Да ^{aa}	Да ^{bb}
Твин 60 (мг)													200
Твин 80 (мг)													50
pH	6,5— —7,5	7,3	6,5— —7,6	6,8	7,0	7—9	7,2— —7,8	7,2	6,0— —7,5	6—7	7,0	7,0	6,3— —6,6 7,4— —7,6

^a Дополнительные компоненты: 0,2 г яблочной кислоты и 0,005 г ЭДТА, pH 6,8. Растворы, содержащие 1,5 г NaHCO₃ и 1 г Na₂S·9H₂O, стерилизуют фильтрованием отдельно.

^b Отдельно фильтрованием стерилизуют растворы, содержащие 20 г NaHCO₃ и 1 г Na₂S·9H₂O, и добавляют их к стерильной среде.

^c Добавляют к другим компонентам среды 0,2 г ЭДТА и простерилизованные фильтрованием растворы, содержащие 12,76 г Na₂CO₃ и 0,1 г Na₂S·9H₂O.

^d Добавляют 0,025 г ЭДТА, а также 2—6 г яблочной кислоты в качестве источника углерода.

^e Урожай клеток увеличивается при добавлении на 1 л среды 0,5 г ацетата натрия, 2 г NaHCO₃, 42 г CaSO₄ и 0,001 г ЭДТА.

^f Для *Flexithrix dorotheae* глюкозу как источник углерода можно заменить галактозой или сахарозой (1 г/л), а хлористый аммоний в качестве источника азота — глутаматом натрия или NaNO₃ (10 г/л). На 1 л среды добавляют 0,1 г глицерофосфата натрия.

^g Источниками азота служат глутамат натрия (0,5 г/л) и аспарагиновая кислота (0,5 г/л).

^h 1 л среды содержит 20 мл безвитаминового минерального основного раствора Хатнера. В модификации Коэн-Базир и др. [35] этот раствор содержит следующие компоненты: 10 г нитрилтриуксусной кислоты (растворенной и нейтрализованной с помощью KOH); 14,45 г MgSO₄·7H₂O, 3,33 г CaCl₂·2H₂O, 9,25 мг (NH₄)₆Mo₇O₂₄·24H₂O, 99 мг FeSO₄·7H₂O, 50 мл смеси металлов № 44 (см. ниже) и дистиллированную воду — до 1 л. pH доводят до 6,6—6,8. Смесь металлов № 44 содержит в 100 мл 250 мг ЭДТА, 1,095 мг ZnSO₄·7H₂O, 500 мг FeSO₄·7H₂O, 154 мг MnSO₄·H₂O, 39,2 мг CuSO₄·5H₂O, 24,8 мг Co(NO₃)₂·6H₂O и 17,7 мг Na₂B₄O₇·10H₂O. Чтобы предотвратить выпадение осадка, следует добавить несколько капель 6 н. H₂SO₄.

ⁱ На 1 л среды добавляют 0,5 г аспарагина и 0,01 г ЭДТА.

^j Для большинства этих сред глюкозу стерилизуют отдельно (обычно автоклавированием) и затем с соблюдением правил асептики добавляют ее к стерильным растворам других компонентов.

^k Автоклавируют отдельно и затем с соблюдением правил асептики добавляют к другим компонентам.

^l Стерилизуют фильтрованием отдельно.

^m На 1 л среды добавляют: 0,1 мг $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,3 мг H_3BO_3 ; 0,2 мг $CoCl_2 \cdot 6H_2O$; 0,01 мг $CuCl_2 \cdot 2H_2O$; 0,02 мг $NiCl_2 \cdot 6H_2O$; 0,03 мг $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$.

ⁿ На 1 л среды добавляют: 0,1 мг $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,1 мг H_3BO_3 ; 0,05 мг $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ и 0,005 мг $CuCl_2 \cdot 2H_2O$.

^o На 1 л среды добавляют: 2,4 мг $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$; 28 мг H_3BO_3 ; 0,4 мг $CuCl_2 \cdot 6H_2O$ и 7,5 мг $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$.

^p На 1 л среды добавляют 0,05 мг $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,05 мг H_3BO_3 ; 0,005 мг $CoCl_2 \cdot 6H_2O$; 0,025 мг $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ и 0,005 мг $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$.

^q На 1 л среды добавляют 1 мл смеси следующих микроэлементов: растворимых солей В, Fe и Mn (по 0,5 мг/л) и Co, Cu, Mo и Zn (по 0,01 мг/л).

^r На 1 л среды добавляют: 0,1 мг $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,1 мг H_3BO_3 , 0,1 мг $CuCl_2 \cdot 2H_2O$, 0,05 мг $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$.

^s На 1 л среды добавляют: 6 мг $(NH_4)_2Fe(SO_4)_2$ и 4 мг $CaCO_3$.

^t Необходимы аминокислоты (г/л): фенилаланин (1); лейцин (1); изолейцин (0,5); валин (0,1) и метионин (0,05). Добавляют также аминокислоты, стимулирующие рост бактерий (г/л): глицин (0,05); пролин (0,5); аспарагин (0,44); аланин (1,0); лизин (0,25), треонин (0,1) и триптофан (1,0). Независимо от способности стимулировать рост бактерий к среде добавляют (г/л) гистидин (0,05), аргинин (0,1) и серин (0,1).

^u Источником азота служат (в концентрации 1 г/л) лейцин, пролин, аспарагин, аланин, триптофан, аргинин, аспарагиновая кислота и цистин. Смесь аминокислот в виде казаминовых кислот способствует более быстрому и интенсивному росту культур. При замене глюкозы на сахарозу, глицерин или сукцинат в качестве источника углерода, микроорганизм может использовать неорганические источники азота.

^v Необходимый для роста витамин B_{12} (кобаламин) добавляют в концентрации 0,005 мг/л.

^w Необходим биотин (15 мкг/л).

^x Необходим витамин B_{12} (0,005 мг/л); для некоторых штаммов нужен биотин (0,005 мг) и солянокислый тиамин (0,1 мг/л).

^y У некоторых штаммов *Sphaerotilus natans* обнаружена потребность в биотине (0,005 мг/л).

^z Ни один из выделенных штаммов не растет на среде без витаминов; для поддержания или стимуляции роста большинства штаммов необходимы биотин, тиамин и витамин B_{12} . Готовят раствор, в 1 л которого содержатся следующие витамины: 2 мг биотина, 2 мг фолиевой кислоты, 10 мг солянокислого пиридоксина, 5 мг рибофлавина, 5 мг солянокислого тиамина, 5 мг никотинамида, 5 мг пантотената кальция, 0,1 мг витамина B_{12} и 0,1 мг *л*-аминобензойной кислоты. 10 мл этого раствора, простерилизованного автоклавированием или ультрафильтрованием, добавляют на 1 л среды.

^{aa} Добавляют биотин (0,2 мкг/л).

^{ab} На 1 л стерильной среды добавляют 1 мг солянокислого тиамина и 0,003 мг витамина B_{12} , причем каждый из них стерилизуют отдельно ультрафильтрованием.

Таблица 7.9. Состав синтетических сред (С) № 15—27 для бактерий, перечисленных в табл. 7.1

Компоненты	Количество (в единицах, указанных в колонке 1) на 1 л среды												
	15С ^а	16С	17С	18С	19С	20С	21С	22С	23С	24С	25С ^б	26С	27С ^с
Глюкоза ^д (г)	10	5,0	15	20	25	20	1—3	10	10	5	11,7	3,0 ^е	4,0
Глицерин (г)													
NH ₄ Cl (г)	1,0	1,0					1,0		1,0	1,0		3,0	
NaNO ₃ или KNO ₃ (г)								0,6					
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O (г)	1,0						3,49	0,45					
K ₂ HPO ₄ (г)			1,0	0,8	1,74	1,0				7,0		3,0	500
KH ₂ PO ₄ (г)	0,25	2,0		0,2			2,77		2,0	3,0			
NaCl (г)									5				
MnCl ₂ ·4H ₂ O (мг)	10			0,005	16,9								
MgSO ₄ ·7H ₂ O (г)	0,01	0,2	0,5	0,5	0,62	0,2		0,1	5,0	0,01	0,09		10
CaCl ₂ ·2H ₂ O (г)								0,2					
FeSO ₄ ·7H ₂ O (мг)	10		50	50	13,9	5,0		10					
Микроэлементы		Да ^ф	Да ^г	Да ^h		Да ⁱ	Да ^j		Да ^k		0,45		
Аминокислоты	Да ^l				Да ^m					Да ⁿ	Да ^о		
Кислотный гидролизат казеина (г)		Да ^p											

Компоненты	Количество (в единицах, указанных в колонке 1) на 1 л среды												
	15C ^a	16C	17C	18C	19C	20C	21C	22C	23C	24C	25C ^b	26C	27C ^c
Пурины и пиримидины	Да ^q												
Витамины	Да ^r	Да ^s			Да ^t		Да ^u	Да ^v		Да ^w			
Твин 80 (мг)											6,00		
pH	7,4	6,8	7,2	6,9	6,6— —7,4	5,5— —9,0	6,8	7,2— —7,5	6,8	7,0— —7,2	7,2	7,0	7,0

^a В качестве детоксиканта добавляют кристаллический сывороточный альбумин (1%).

^b На 1 л среды добавляют 45 мг K₂SO₄.

^c В 670 мл теплой (45 °C) дистиллированной воды растворяют указанные в таблице компоненты, а затем добавляют к ним 100 г лимонной кислоты·H₂O и 175 г NaH₂NH₄PO₄·4H₂O. Отдельно простерилизованную глюкозу добавляют с соблюдением правил асептики к стерильной среде непосредственно перед посевом и затем разбавляют среду в 50 раз. Если добавить к среде 5 мл хлороформа, то ее можно хранить в закрытых сосудах при комнатной температуре.

^d Для большинства сред отдельно простерилизованную автоклавирующую глюкозу добавляют с соблюдением правил асептики к стерильному раствору, содержащему другие компоненты.

^e Хорошо усваиваются также другие углеводы, глицерин и лимонная кислота.

лизуют фильтрованием и добавляют к стерильной среде перед ее использованием.

^m На 1 л среды добавляют аминокислоты, необходимые для оптимального роста: 1,2 мг D-аланина, 0,77 мг L-аргинина·HCl, 0,1 мг L-цистеина, 3,9 мг L-глутаминовой кислоты, 0,77 мг L-лизина·HCl и 0,94 мг DL-метионина.

ⁿ Добавляют следующие аминокислоты (мг/л): треонин (276); пролин (100); лейцин (426); гистидин (126); глицин (176); аргинин (160); глутаминовая кислота (200); валин (185) и тирозин (35). Первые шесть аминокислот являются необходимыми, остальные стимулируют рост.

^o На 1 л среды добавляют: 1,4 г DL-аланина, 216 мг DL-триптофана и по 60 мг DL-треонина, L-лизина, DL-метионина, DL-гистидина, DL-фенилаланина, L-лейцина, DL-изолейцина, DL-валина и L-аргинина.

^p Рост стимулируется гидролизатом казеина (0,5%) или глутаминовой кислотой (0,1%).

^f Микроэлементы (мкг/л): В (H_3BO_3) (5); Са ($CaCO_3$) (100); Cu ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) (10); Fe [$FeSO_4(NH_4)_2SO_4 \cdot 6H_2O$] (100—500); I (KI) (1); Mn ($MnSO_4 \cdot H_2O$) (10—20); Mo (MoO_3) (10); Zn ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) (50).

^g Для фиксации молекулярного азота необходимы следы молибдата (0,005 г $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ на 1 л).

^h *Beijerinckia indica* молибдат необходим для фиксации молекулярного азота (см. выше сноску ^g), и его нельзя заменить ванадатом. Для некоторых штаммов, нуждающихся в Cu и Zn, к среде добавляют $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,005 г/л) и $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (0,004 г/л).

ⁱ Ca^{2+} добавляют в виде $CaSO_4$ (0,2 г/л). На 1 л среды добавляют также 0,5 мг $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$.

^j Безвитаминный минеральный основной раствор Хатнера, 20 мл/л (см. сноску ^h в табл. 7.8).

^k Все виды *Aeromonas* растут на минимальной среде, содержащей смесь L-аргинина, аспарагина, лейцина и метионина.

^l Для роста нужны аргинин, аспарагиновая кислота, цистеин, глутаминовая кислота, гистидин, лейцин, лизин, метионин, фенилаланин, треонин, триптофан и валин. Серин и тирозин оказывают стимулирующее действие, а аланин, оксипролин и глицин не влияют на рост. Все аминокислоты добавляют к среде в концентрации 0,001 М. Проллин может заменить глутаминовую кислоту. Глутамин (1,02 г/л) стерн-

^q Для роста необходимы цитозин или урацил в концентрации 10 мг/л. Аденин (10 мг/л) оказывает стимулирующее действие.

^r Потребность в витаминах не определена. Витамины добавляют в следующих концентрациях (на 1 л среды): 1 мг пантотената кальция, 10 мг *l*-аминобензойной кислоты, 10 мкг биотина, 50 мг холина, 100 мкг фолиевой кислоты, 5 мг инозита, 1 мг никотиновой кислоты, 5 мг пиридоксала, 5 мг пиридоксамина, 5 мг пиридоксина, 1 мг рибофлавина, 1 мг тиамина и 1,23 г аскорбиновой кислоты.

^s Добавляют биотин (1 мкг/л).

^t Добавляют никотиновую кислоту (2 мг/л) и тиамин·HCl (0,15 мг/л). Биотин необходим для *Brucella abortus*, 5% CO_2 в воздухе достаточно для роста большинства штаммов *B. abortus*.

^u На 1 л среды добавляют следующие витамины: 0,01 мг биотина, 1 мг никотиновой кислоты и 0,5 мг солянокислого тиамина.

^v Добавляют биотин (0,5 мкг/л) и солянокислый тиамин (100 мкг/л).

^w На 1 л среды добавляют: 10 мкг пантотената кальция, 1 мкг биотина, 10 мкг никотинамида, 10 мкг солянокислого тиамина и 20 мкг солянокислого пиридоксина. Пантотенат, никотинамид и тиамин необходимы для роста, а биотин и пиридоксин оказывают стимулирующее действие.

Таблица 7.10. Состав синтетических сред (С) № 28—40 для бактерий, перечисленных в табл. 7.1

Компоненты	Количество (в единицах, указанных в колонке 1) на 1 л среды												
	28C ^a	29C ^b	30C ^c	31C ^d	32C ^e	33C ^f	34C ^g	35C ^h	36C ⁱ	37C ^j	38C ^k	39C	40C ^l
Глюкоза ^m (г)	1,0	12,5		2,5	3,0	2,0	5,0			5,0 ⁿ	5,0	5,0 ⁿ	
Глицерин (г)										0,25	6,3		
Ацетат натрия (г)	6,0									3,4			
NH ₄ Cl (г)			0,5			1,0	0,9	4,0	3,0	2,2	0,4		
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O (г)											1,3	2,25	0,6
K ₂ HPO ₄ (г)	1,56			8,7					0,65	3,48			
KH ₂ PO ₄ (г)	0,14		5,0		6,8	0,01	0,9	2,7	0,35	2,72	0,17	0,75	0,2
Трис-буфер (г)						6,05							
NaCl (г)			5,3	2,5	0,02	0,05	0,9	o		5,8	5,8		0,1
KCl (г)						0,05					0,19		
MnCl ₂ ·4H ₂ O (мг)	0,36				20	4,2		1,0	25		1,5	1,0	7,6
MgSO ₄ ·7H ₂ O (г)	0,01	1,6	0,04		0,04	0,238	0,02	0,2	0,02	0,41	0,62	0,096	0,1
CaCl ₂ ·2H ₂ O (г)	0,006					0,001	0,02	0,01	0,01	0,37	0,074	0,002	
FeSO ₄ ·7H ₂ O (мг)	0,1				20	5,0	10	1,0	20	4,0	2,8	2,0	12,5
Микроэлементы	Да ^p	Да ^q	Да ^r	Да ^s		Да ^t	Да ^u					Да ^v	
Аминокислоты	Да ^w	Да ^x	Да ^y	Да ^z	Да ^{aa}	Да ^{bb}				Да ^{cc}	Да ^{dd}	Да ^{ee}	Да ^{ff}
Кислотный гидролизат казеина (г)													5,0 ^{gg}

Пурины и пирими- дины	Да ^{hh}									Да ⁱⁱ		Да ^{jj}	Да ^{kk}
Витамины	Да ^{ll}	Да ^{mm}	Да ⁿⁿ			Да ^{oo}	Да ^{pp}		Да ^{qq}	Да ^{rr}		Да ^{ss}	Да ^{tt}
Твин 80 (мл)										5			
pH	7,8 _{-0,1}	7,5	7,6	7,5	6,6— —6,9	6,8	6,7	6,8— —6,9	7,0	7,45	7,4± ±0,1	7,0	6,8 ^{uu}

^a После стерилизации к среде добавляют, соблюдая правила асептики, 500 мкг путресцина и 100 мкг стерилизованного фильтрованием NAD.

^b 50 мкг гематина и 10 мкг оленевой кислоты растворяют в 0,001 н. NaOH и автоклавируют. Гематин можно заменить любым веществом, разлагающим H₂O₂. Гематин не нужен для роста бактерий в анаэробных условиях. В раствор добавляют 10 г молочной кислоты (85%). Одна глюкоза подавляет рост бактерий в аэробных условиях, но в сочетании с другим источником углерода, например с молочной кислотой или сахарозой, она обеспечивает удовлетворительный рост.

^c На 1 л среды добавляют 4,4 г лактата натрия (70%).

^d Среду стерилизуют фильтрованием.

^e Добавление гематина и крови и инкубация при пониженном атмосферном давлении необходимы в том случае, когда используются твердой средой.

^f Добавляют 5,8 г яблочной кислоты и с помощью NaOH доводят pH среды до 6,8.

^g На 1 л среды добавляют 1 мг гемина и летучие жирные кислоты до конечной концентрации: 2,8·10⁻² М уксусной кислоты, 9·10⁻³ М пропионовой кислоты, 4,5·10⁻³ М *n*-масляной кислоты, 9·10⁻⁴ М изомасляной кислоты, 9·10⁻⁴ М *n*-валериановой кислоты, 9·10⁻⁴ М изовалериановой кислоты и 9·10⁻⁴ М DL-метилмасляной кислоты. Перед использованием добавляют 4 г Na₂CO₃ и 0,25 г цистина·HCl (оба компо-

нента отдельно стерилизуют фильтрованием). Культуры *Bacteroides ruminicola* инкубируют в бескислородной атмосфере, содержащей CO₂.

^h В качестве источника углерода в этой среде используется солянокислый холин (5 г/л). Другие источники углерода: лактат, малат и пируват. На 1 л среды добавляют 2,6 г Na₂SO₄ и 1 мг Na₂MoO₄. Для удаления кислорода из культуральной среды используется Na₂S·9H₂O (0,005%) или бисульфит натрия (0,0035%). CO₂ (включен в среду в виде 0,3—0,5% NaHCO₃) и дрожжевой экстракт (0,1—0,2%) являются стимуляторами роста.

ⁱ Источником углерода служит пируват натрия (3 г/л). Источниками углерода могут быть только компоненты цикла Кребса, а также их близкие производные.

^j На 1 л среды добавляют 250 мг лактата натрия, 200 мг щавелевоуксусной кислоты, 5 мг поливинилового спирта, 87 мг тетрагидрохлоридспермина, 1 мг гемина, 4% (объем/объем) 2,2',2''-нитрилтриэтанол, 2 мг NAD, 0,46 мг тиаминпирофосфатхлорида, 42 мг NaHCO₃ и 1 г K₂SO₄. Перед добавлением к среде щавелевоуксусной кислоты, NAD и тиаминпирофосфатхлорида их следует по отдельности простерилизовать фильтрованием.

^k На 1 л среды добавляют 5 г молочной кислоты, 0,42 г лимонной кислоты·H₂O и 0,004 г ЭДТА.

^l На 1 л среды добавляют 10 мл 85%-ной молочной кислоты, 0,75 г гликолата натрия и 4,5 мг путресцина. Используют только свежеприготовленная среда. Посевы делают немедленно после охлаждения среды.

т Для большинства этих сред глюкозу стерилизуют отдельно (обычно автоклавированием) и добавляют с соблюдением правил асептики к стерильному раствору, содержащему другие вещества.

п В этом случае глюкозу автоклавируют вместе с другими компонентами среды; производные глюкозы, автоклавируемой вместе со средой (но не сама глюкоза), являются стимуляторами или необходимы для роста.

о Для морских штаммов в среду добавляют 2,5% NaCl.

р На 1 л среды добавляют 0,44 мг $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,4 мг $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ и 0,27 мг $CuCl_2 \cdot 2H_2O$.

q Растворяют $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (количество указано в таблице) и 80 мг $FeSO_4(NH_4)_2SO_4 \cdot 6H_2O$ в $8,7 \cdot 10^{-6}$ М лимонной кислоте и автоклавируют.

г Растворяют 29 мг $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$ в 0,02 М HCl и стерилизуют фильтрованием.

с На 1 л среды добавляют 1 мл раствора, содержащего 5% $MgSO_4$, 0,5% $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 0,5% $FeCl_3$ и 0,4% нитрилотриуксусной кислоты.

т На 1 л среды добавляют 7,2 мг $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 1,4 мг $CuSO_4 \cdot H_2O$ и 1,4 мг $CoSO_4 \cdot 5H_2O$.

и На 1 л среды добавляют 1 мг $CoCl_2 \cdot 6H_2O$.

в На 1 л среды добавляют по 1 мг $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, $VSO_4 \cdot 7H_2O$, $ZnSO_4$ и $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$, 0,5 мг $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ и 20 мг нитрилотриуксусной кислоты.

ш На 1 л среды добавляют по 1000 мг DL-аланина, DL-аспарагиновой кислоты и L-глутаминовой кислоты; по 200 мг L-аргинина·HCl и L-лизина·HCl·H₂O и по 100 мг L-гистидина, L-лейцина, L-изолейцина, L-метионина, L-фенилаланина, L-пролина, L-треонина, L-тирозина, L-валина, L-триптофана, L-цистеина, L-серина и L-глицина.

сс На 1 л среды добавляют 500 мг аспарагиновой кислоты, 1300 мг L-глутаминовой кислоты, 150 мг L-аргинина·HCl, 25 мг глицина, 50 мг L-серина, 90 мг L-лейцина, 30 мг L-изолейцина, 60 мг L-валина, 70 мг тирозина, 100 мг L-аланина, 50 мг L-лизина·HCl, 50 мг L-пролина, 80 мг L-триптофана, 50 мг L-треонина, 25 мг L-фенилаланина, 25 мг L-аспарагина, 61,25 мг цистеина·HCl·H₂O (стерилизуют отдельно фильтрованием), 36 мг цистина, 50 мг L-глутамин (стерилизуют отдельно фильтрованием), 14,9 мг L-метионина, 46 мг глутатиона (восстановленного) и 16,5 мг гистидина.

dd На 1 л среды добавляют 0,1 г L-аргинина·HCl, 10 мг L-цистеина·HCl·H₂O, 150 мг глицина, 1,18 г глутаминовой кислоты и 21 мг серина.

ее На 1 л среды добавляют 120 мг DL-триптофана, 5000 мг глутамата натрия, 150 мг L-тирозина, 250 мг DL-фенилаланина, 400 мг L-аргинина·HCl, 300 мг L-гистидина·HCl·H₂O, 200 мг глицина, 400 мг DL-валина, 2000 мг DL-серина, 125 мг DL-изолейцина, 350 мг L-цистеина·HCl.

ff На 1 л среды добавляют 12,5 мг L-цистеина·HCl, 50 мг DL-триптофана, 20 мг L-тирозина, 10 мг L-пролина, 20 мг DL-фенилаланина и 10 мг DL-гистидина.

gg Хотя кислотный гидролизат казеина кроме аминокислот содержит несколько минорных компонентов и, следовательно, среда не является «синтетической» в строгом смысле, ее обозначают буквой «С», так как казеин очищают адсорбцией на активированном угле Norit A при двух различных концентрациях ионов H^+ и в среду добавляют **некоторые** известные связанные с казеином компоненты, например полиамины и витамины.

hh На 1 л среды добавляют по 10 мг гуанина, аденина и урацила.

ii На 1 л среды добавляют 3,2 мг гипоксантина и 8 мг урацила.

jj На 1 л среды добавляют по 10 мг гуанина, урацила и гипоксантина.

^x На 1 л среды добавляют 0,1 г глицина, 0,1 г DL-аланина, 0,15 г DL-валина, 0,15 г DL-лейцина, 0,1 г DL-изолейцина, 0,2 г DL-аспарагиновой кислоты, 0,2 г DL-глутаминовой кислоты, 0,2 г L-пролина, 0,1 г DL-фенилаланина, 0,1 г DL-тирозина, 0,04 г L-аргинина, 0,03 г DL-гистидина, 0,2 г DL-серина, 0,2 г DL-треонина, 0,2 г DL-метионина и 0,4 г L-цистина. Первые 12 аминокислот растворяют в 0,033 М фосфатном буфере и стерилизуют автоклавированием; серин, треонин и метионин растворяют в воде и стерилизуют фильтрованием; L-цистин растворяют в HCl и стерилизуют фильтрованием.

У Любая из следующих аминокислот в концентрации 0,62 или 0,36 М может служить источником углерода, азота или энергии: глутаминовая кислота, аспарагиновая кислота, серин, пролин, α-аланин, аспарагин, глутамин и треонин. Однако рост улучшается после добавления смеси аминокислот или равного количества казаминовых кислот. Источниками углерода могут служить также глюкоза, мальтоза и сахароза.

^z На 1 л среды добавляют 2,5 г L-аспарагина.

^{aa} На 1 л среды добавляют 37 мг DL-аланина, 120 мг DL-аспарагиновой кислоты, 90 мг L-аргинина·HCl, 13 мг L-цистеина·HCl (цистеин автоклавировать отдельно, и затем его добавлять к соединению правил асептики к стерильному раствору остальных компонентов), 642 мг L-глутаминовой кислоты, 10 мг глицина, 68 мг L-гистидина·HCl·H₂O, 94 мг DL-изолейцина, 100 мг DL-лейцина, 155 мг L-лизина·HCl, 65 мг DL-метионина, 78 мг DL-фенилаланина, 175 мг L-пролина, 100 мг DL-серина, 70 мг DL-треонина, 31 мг DL-триптофана, 110 мг L-тирозина и 160 мг DL-валина.

^{bb} На 1 л среды добавляют по 60 мг каждой из следующих аминокислот: аланина, аргинина, аспарагиновой кислоты, цистеина, глутаминовой кислоты, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, орнитина, оксипролина, фенилаланина, пролина, серина, треонина, триптофана, тирозина и валина. Замена этих кислот гидролизатом казеина не изменяет скорость роста и его интенсивность. Если не добавлять эти аминокислоты в среду, то концентрацию NH₄Cl следует увеличить до 2 г/л среды.

^{kk} На 1 л среды добавляют 30 мг гипоксантина и 2 мг урацила.

^{ll} На 1 л среды добавляют 20 мг ниозита, 10 мкг фолиевой кислоты, 1 мкг L-аминобензойной кислоты, 100 мкг рибофлавина, 1 мг пантотената кальция, 1 мкг биотина, 100 мкг солянокислого тиамина, 500 мкг никотиновой кислоты, 500 мкг никотинамида и 2 мг солянокислого пиридоксина.

^{mm} На 1 л среды добавляют 9,5 мг пантотената кальция, 2,4 мг никотинамида и 3,3 мг солянокислого тиамина (все эти компоненты стерилизуют фильтрованием).

ⁿⁿ На 1 л среды добавляют 2,4 мг никотиновой кислоты.

^{oo} На 1 л среды добавляют 50 мкг пантотената кальция.

^{pp} На 1 л среды добавляют 2 мг рибофлавина, 2 мг пантотената кальция, 0,05 мг биотина, 2 мг никотиновой кислоты, 2 мг солянокислого тиамина, 0,02 мг витамина B₁₂, 0,05 мг DL-липоевой кислоты, 2,0 мг пиридоксала, 0,1 мг L-аминобензойной кислоты и 0,05 мг фолиевой кислоты.

^{qq} На 1 л среды добавляют 1 мкг биотина и 1 мг солянокислого тиамина. Пантотенат значительно стимулирует рост.

^{rr} На 1 л среды добавляют 2 мг солянокислого тиамина, 2 мг пантотената кальция, 1,4 мг солянокислого холина, 3,6 мг миоинозита и 0,7 мг биотина.

^{ss} На 1 л среды добавляют по 1 мг солянокислого пиридоксала и пантотената кальция, по 50 мкг солянокислого тиамина, ниацина и рибофлавина, 10 мкг L-аминобензойной кислоты, 2 мкг биотина и по 1 мкг фолиевой кислоты и витамина B₁₂.

^{tt} На 1 л среды добавляют по 2 мг солянокислого пиридоксала и солянокислого тиамина, по 200 мкг пантотената кальция и ниацина, 50 мкг рибофлавина, по 1 мкг L-аминобензойной и фолиевой кислот и 10 мкг биотина.

^{uu} pH доводят до 6,8 с помощью твердого K₂CO₃.

Таблица 7.11. Состав синтетических сред (С) № 41—53 для бактерий, перечисленных в табл. 7.1

Компоненты	Количество (в единицах, указанных в колонке 1) на 1 л среды												
	41C ^a	42C ^b	43C	44C ^c	45C	46C ^d	47C ^e	48C	49C ^f	50C ^g	51C	52C ^h	53C ⁱ
Глюкоза ^j (г)								10	10		10		20
Ацетат натрия (г)									2,0		20	1,6	
NH ₄ Cl			0,8	0,52	0,3		0,5	1,0		0,5	2,0	0,4	
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O (г)						1,0							2,5
K ₂ HPO ₄ (г)		0,002	0,016	0,28		0,6	3,48	4,0	2,0		4,0		
KH ₂ PO ₄ (г)	0,15				3,0		2,7		2,0			0,9	2,5
NaCl (г)											0,04	0,9	
MnCl ₂ ·4H ₂ O (мг)		0,066	0,2				1,0	10	0,05	8,0	0,03	10	20
MgSO ₄ ·7H ₂ O (г)	0,15	0,1	0,2	0,25	0,5		0,01	0,2	0,2	2,0	0,16	0,01	0,4
CaCl ₂ ·2H ₂ O (г)		0,006	0,02	0,07	0,25		0,01			0,01		0,01	
FeSO ₄ ·7H ₂ O (мг)	30				10		2,0	10	50	4,0	8,0		10
Микроэлементы		Да ^k	Да ^l	Да ^m	Да ^m		Да ⁿ			Да ^o		Да ^p	
Аминокислоты								Да ^q	Да ^r		Да ^s		Да ^t

Кислотный гидролизат казеина (г)								5,0 ^а				2,0 ^в	
Пурины и пиримидины								Да ^w	Да ^x		Да ^y		
Витамины								Да ^z	Да ^{aa}	Да ^{bb}	Да ^{cc}	Да ^{dd}	Да ^{ee}
Твин 80 (мл)									1				
pH	7,5— —8,0	7,5— —8,0	7,5— —7,8	2,5— —3,2	4,8— —5,0	7,0— —7,2	6,8— —7,4	7,0— —7,2	6,7	7,0	5,5	6,5	1— —9,8

^a Источником углерода служит CO₂ атмосферы. Клетки снабжаются энергией благодаря окислению нитрита в нитрат. Кроме перечисленных солей 1 л среды содержит 2 г NaNO₃ и 0,5 г CaCO₃. Вместо дистиллированной используют водопроводную или морскую воду.

^b В пресной воде клетки не растут, даже при добавлении NaCl; оптимальный рост наблюдается в среде, содержащей от 70 до 100% морской воды, 1 mM NaNO₃ и перечисленные неорганические соли. Источником углерода служит атмосферная CO₂.

^c Среду периодически аэрируют воздухом, содержащим 5% CO₂.

^d Источником энергии, азота и углерода служат тиоцианат калия (0,2 г/л). *Thiobacillus thioparus* не растет на таких сложных средах, как среды, содержащие питательный бульон, пептон, дрожжевой экстракт или гидролизат казеина.

^e После стерилизации к среде добавляют с соблюдением правил асептики 200—400 мг Na₂S·9H₂O, 168 мг NaHCO₃ и 410 мг ацетата натрия или 320 мг метилового спирта (общий объем 1 л).

^f На 1 л среды добавляют 2 г цитрата аммония.

^g На 1 л среды добавляют 1 г глицерофосфата калия и 0,5 г ЭДТА. В качестве источников углерода используются L-глутамат, пировиноградная кислота, ацетат и лактат, но

наилучший рост наблюдается в присутствии смеси 5 г L-глутаминовой кислоты и 10 г DL-лактата (на 1 л среды).

^h На 1 л среды добавляют 3 г целлобозы, 20 ммоль ацетата, 1 ммоль изовалериата и 1 ммоль изобутирата. Отдельно в атмосфере N₂ автоклавируют растворы, содержащие 0,5 г Na₂S·9H₂O и 4 г Na₂CO₃, и затем добавляют их к среде непосредственно перед посевом.

ⁱ Для роста на этой среде необходимо довольно большое количество активного ниокулята.

^j Для большинства этих сред глюкозу стерилизуют отдельно (обычно автоклавированием) и добавляют с соблюдением правил асептики к стерильному раствору других компонентов.

^k На 1 л среды добавляют 1 мг хелатированного железа, 30 мкг Na₂MoO₄·2H₂O; 0,6 мкг CoCl₂·6H₂O, 6 мкг CuSO₄·5H₂O и 30 мкг ZnSO₄·7H₂O.

^l На 1 л среды добавляют 1 мг хелатированного железа, 100 мкг Na₂MoO₄·2H₂O, 2 мкг CoCl₂·6H₂O, 100 мкг ZnSO₄·7H₂O и 20 мкг CuSO₄·5H₂O.

^m На 1 л среды добавляют 1,56 г элементарной серы, простерилизованной отдельно автоклавированием.

ⁿ На 1 л среды добавляют 1 мг Na₂MoO₄·2H₂O.

^o На 1 л среды добавляют 0,8 мкг Мо (в виде молибдата аммония) 10 мг Zn (в виде $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$), 4 мг В (в виде H_3BO_3), 1 мг Cu (в виде $CuSO_4 \cdot 5H_2O$) и 1 мг Со (в виде $CoSO_4 \cdot 7H_2O$).

^p На 1 л среды добавляют 4 мг $CoCl_2 \cdot 6H_2O$.

^q На 1 л среды добавляют по 100 мг L-цистина и L-триптофана.

^r На 1 л среды добавляют 300 мг L-аланина, 400 мг L-аргинина, 750 мг L-аспарагиновой кислоты, 200 мг L-цистеина, 750 мг L-глутаминовой кислоты, 200 мг глицина, 500 мг L-гистидина, 200 мг DL-изолейцина, 200 мг L-лейцина, 800 мг L-лизина, 150 мг DL-метионина, 200 мг DL-фенилаланина, 500 мг L-пролина, 400 мг DL-серина, 200 мг DL-треонина, 200 мг L-триптофана, 100 мг L-тирозина и 300 мг L-валина.

^s На 1 л среды добавляют по 200 мг каждой из следующих аминокислот: L-триптофана, L-цистеина, DL-треонина, DL-метионина, DL-валина, DL-лейцина, DL-изолейцина, DL-лизина, DL-фенилаланина, L-тирозина, L-пролина, глицина, DL-аланина, D-аргинина, DL-серина, L-глутаминовой кислоты и L-аспарагиновой кислоты.

^t На 1 л среды добавляют по 0,2 г каждой из следующих аминокислот: DL-аргинина, DL-валина, L-глутаминовой кислоты, DL-серина, DL-гистидина, DL-изолейцина, DL-лейцина, L-тирозина, DL-метионина, DL-триптофана и DL-фенилаланина.

^u Замена гидролизата казеина восемнадцатью аминокислотами не влияет на интенсивность и скорость роста.

^v Исключение из среды гидролизата казеина не влияет на рост. Это доказывает, что соли аммония могут служить единственным источником азота.

^w На 1 л среды добавляют по 5 мг аденина, гуанина, ура-

Продолжение табл. 7.11

цила и ксантина. Гуанин или ксантин удовлетворяют потребности бактерий в пуринах. Для некоторых штаммов достаточно добавить аденин.

^x На 1 л среды добавляют по 5 мг гуанина, аденина, урацила и ксантина.

^y На 1 л среды добавляют по 5 мг ксантина, гуанина, аденина, тимина и урацила.

^z На 1 л среды добавляют 100 мкг биотина, 10 мкг фолиевой кислоты, 2 мг никотиновой кислоты, 1 мг пантотената кальция, 2 мг солянокислого пиридоксина, 1 мг рибофлавина и 1 мг солянокислого тиамина. Пантотенат, никотиновая кислота и биотин, необходимы для роста всех штаммов или значительно стимулируют его.

^{aa} На 1 л среды добавляют 5 мг пиридоксала, 1 мг никотиновой кислоты, 1 мг пантотената кальция, 1 мг рибофлавина, 1 мг тиамина, 1 мкг витамина B_{12} , 10 мкг биотина, 5 мкг л-аминобензойной кислоты и 10 мкг фолиевой кислоты.

^{bb} На 1 л среды добавляют 10 мкг биотина. Потребность в биотине можно удовлетворить за счет биоцитина или де-тиобиотина, а также 1000-кратного избытка твина 80 или олеата натрия.

^{cc} На 1 л среды добавляют 5 мг никотиновой кислоты, 1 мг пантотената кальция, 1 мг пиридоксина, 100 мкг биотина и 0,01 мг лейковорина. Некоторым штаммам *Pedococcus* необходимы мевалоиновая кислота и рибофлавин.

^{dd} На 1 л среды добавляют 2 мг тиамин- HCl , 2 мг пантотената кальция, 2 мг рибофлавина, 2 мг никотинамида, 1 мг пиридоксамин- $2HCl$, 1 мг пиридоксала- HCl , 1 мг пиридоксина- HCl , 0,1 мг л-аминобензойной кислоты, 0,05 мг биотина, 0,05 мг фолиевой кислоты и 0,005 мг кобаламина.

^{ee} На 1 л среды добавляют 2 мг никотиновой кислоты и 0,5 мг биотина.

Таблица 7.12. Состав синтетических (С) и полусинтетических (В) сред № 54—66 для бактерий, перечисленных в табл. 7.1

Компоненты	Количество (в единицах, указанных в колонке 1) на 1 л среды												
	54C ^a	55C ^b	56C ^c	57C ^d	58C ^e	59C ^f	60C ^g	61C ^h	62C	63C ⁱ	64B ^j	65C ^k	66C ^l
Глюкоза ^m (г)	10	25	10	10	30	30	2,5 ⁿ	10,4	2,0		10	10	10
Ацетат натрия (г)		20		10					10	5,0	10	6,0	1,67
NH ₄ Cl (г)	0,5	3,0								1,0			
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O (г)	3,3										1,75		
K ₂ HPO ₄ (г)		0,6	3,0	8,7	5,0	7,0 ^o	0,5	8,3	0,5	1,0		0,5	16,7
KH ₂ PO ₄ (г)	1,0	0,6	3,0	8,7		1,5	0,5	1,6	0,5			0,5	16,7
NaCl (г)	1,0	0,01	0,01	0,01	1,0		0,001		0,01		0,01	0,01	0,01
KCl (г)											3,0		
MnCl ₂ ·4H ₂ O (мг)		20	10	10	40	40	1,0		10		10	13	10
MgSO ₄ ·7H ₂ O (г)	0,7	0,2	0,2	0,2	0,5	0,5	0,02	0,02	0,2	0,3	0,2	0,2	0,5
CaCl ₂ ·2H ₂ O (г)					0,3	0,3				0,01			
FeSO ₄ ·7H ₂ O (мг)	10	10	10	10	2,5	2,5	1,0	10	10	10	10	10	10

Компоненты	Количество (в единицах, указанных в колонке 1) на 1 л среды												
	54C ^a	55C ^b	56C ^c	57C ^d	58C ^e	59C ^f	60C ^g	61C ^h	62C	63C ⁱ	64B ^j	65C ^k	66C ^l
Микроэлементы					Да ^p	Да ^p	Да ^q	Да ^r					
Аминокислоты	Да ^s	Да ^t	Да ^u	Да ^v	Да ^w		Да ^x	Да ^y	Да ^z	Да ^{aa}	Да ^{bb}	Да ^{cc}	Да ^{dd}
Кислотный гидролизат казеина (г)			5,0 ^{ee}								5,0 ^{ff}	5,0 ^{gg}	
Пурины и пиримидины		Да ^{hh}		Да ⁱⁱ				Да ^{jj}	Да ^{kk}		Да ^{ll}	Да ^{mm}	Да ⁿⁿ
Витамины	Да ^{oo}	Да ^{pp}	Да ^{qq}	Да ^{rr}	Да ^{ss}		Да ^{tt}	Да ^{uu}	Да ^{vv}	Да ^{ww}	Да ^{xx}	Да ^{yy}	Да ^{zz}
pH	7,1	6,8— —7,0	6,8	7,0	7,0	7,6	7,0— —7,4	7,4	6,8	7,8	6,5	7,0	6,0

^a Урожай клеток на синтетической и комплексной средах одинаков, но в первом случае количество образуемого энтеротоксина в 7 раз ниже, чем во втором. Для роста в анаэробных условиях необходимо добавлять к среде пурины и урацил или ацетат (10 мМ) или пируват. Ацетат можно заменить мевалонатом, взяв его в 10 раз меньше, чем ацетата.

^b Глюкозу автоклавляют с другими компонентами среды. В присутствии фолиновой кислоты (цитроворина) эта среда поддерживает хороший рост некоторых штаммов *Pediosoccus*.

^c Глюкозу автоклавляют с другими компонентами среды. На 1 л среды добавляют 20 г цитрата натрия.

^j Глюкозу автоклавляют вместе с другими компонентами среды. На 1 л среды добавляют 0,01 г олеиновой кислоты, 1 г твинна 40 (детоксикант олеиновой кислоты) и 25 мг ферментативного гидролизата казеина. Этот гидролизат можно частично заменить 10 мг глутамина, который отдельно стерилизуют фильтрованием.

^k Глюкозу автоклавляют вместе с другими компонентами среды. На 1 л среды добавляют 500 мг L-аскорбиновой кислоты, 300 мг L-глутаминна (отдельно стерилизуют фильтрованием) и 1 мг спермина·HCl.

^l Глюкозу автоклавляют вместе с другими компонентами

^d Добавляют 0,1 г L-аспарагина. Добавление к 1 л среды 0,1 г ацетата аммония и 1 г NaHCO_3 улучшает рост.

^e Для *Bacillus cereus* и *B. brevis* необходимы некоторые кислоты, перечисленные в среде 58C, но витамины для них не требуются. *B. alvei* нуждается в аминокислотах и тиамине, *B. circulans* и *B. coagulans* — в аминокислотах и обычно тиамине и биотине, *B. sphaericus* — в аминокислотах, тиамине и биотине, *B. pasteurii* — в аминокислотах, тиамине, биотине, никотиновой кислоте и аммонии (1% NH_4Cl). Оптимальный рост *B. pasteurii* наблюдается при pH 8,5 и температуре 28 °C. *B. anthracis* также растет на среде с аминокислотами. Для некоторых штаммов нужен тиамин, их рост стимулируется аденозином и (или) адениловой кислотой. Большинство видов этого рода являются аэробными, однако некоторые штаммы, например *B. cereus*, могут также расти в анаэробных условиях.

^f *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis* и *B. megaterium* не нуждаются в витаминах. *B. pumilus* и *B. polymyxa* в качестве источника азота используют соли NH_4^+ ; они нуждаются также в биотине. *B. macerans* растут на среде 59C при добавлении в нее биотина и тиамина.

^g В качестве восстанавливающих агентов к среде добавляют меркаптоацетат (0,05%) и цистеин (0,025%). Для быстрого и равномерного роста необходима CO_2 . Некоторые штаммы *Clostridium botulinum* растут на синтетической среде только после добавления ферментативного гидролизата казеина (5 г/л) или заменяющих его факторов: NaHCO_3 (200 мг/л), дрожжевого экстракта (5 г/л) или оксалацетата (5 г/л). Клетки *C. parabotulinum* (тип А и В) и *C. sporogel* хорошо растут на среде 60C, однако при этом титр токсина в 7 раз ниже, чем при росте на бульоне из экстракта сердца и мозга.

^h На 1 л среды добавляют 5 г тиагогликолата натрия. На среде 61C клетки растут хуже, чем на бульоне из экстракта сердца и мозга.

ⁱ На 1 л среды добавляют 0,15 г нитрилотруксусной кислоты и 0,01 г $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$. Нужное значение pH среды устанавливается с помощью титра.

среды. На 1 л среды добавляют 500 мг аскорбиновой кислоты, 1,67 г ацетата калия и 10 мл раствора твин-олеата, содержащего 2 г твина 40, 20 мг олеата натрия и воду до 20 мл.

^m Если нет специальных указаний, глюкозу стерилизуют отдельно автоклавированием, а затем добавляют ее с соблюдением правил асептики к стерильному раствору других компонентов.

ⁿ Стерилизуют отдельно фильтрованием.

^o Вместо K_2HPO_4 используют $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$.

^p На 1 л среды добавляют 2 мг молбдата аммония.

^q На 1 л среды добавляют 8 мг $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 4,5 мг $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 9 мг CoCl_2 , 6 мг $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 14 мг $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ и 2,5 мг $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$.

^r На 1 л среды добавляют 0,114 мг H_3BO_3 , 0,31 мг $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 2,8 мг $\text{Fe}(\text{NH}_4)(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,01 мг $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,12 мг $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,07 мг $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ и 1,6 мг $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

^s На 1 л среды добавляют по 25 мг глицина, валина, лейцина, треонина, фенилаланина, тирозина, цистеина, метионина, пролина, аргинина, гистидина и триптофана.

^t На 1 л среды добавляют 200 мг DL-α-аланина, 242 мг L-аргинина·HCl, 400 мг L-аспарагина, 100 мг аспарагиновой кислоты, 50 мг L-цистенина, 300 мг глутаминовой кислоты, 100 мг глицина, 62 мг L-гистидина·HCl, 250 мг DL-изолейцина, 250 мг DL-лейцина, 250 мг L-лизина·HCl, 100 мг DL-метионина, 100 мг DL-фенилаланина, 100 мг L-пролина, 50 мг DL-серина, 200 мг DL-треонина, 40 мг DL-триптофана, 100 мг L-тирозина и 250 мг DL-валина.

^u На 1 л среды добавляют 100 мг L-аспарагина, 400 мг L-цистенина, 50 мг L-триптофана и 200 мг глицина.

На 1 л среды добавляют по 0,1 г L-аланина, L-аргинина, L-аспарагиновой кислоты, L-аспарагина, L-оксипролина, L-изолейцина, L-лейцина, L-лизина·HCl, L-метионина, L-норлейцина, L-фенилаланина, L-пролина, L-серина, L-треонина, L-триптофана, L-тирозина, L-валина, а также 0,05 г L-цистеина·HCl, 0,05 г L-цистина, 0,5 г L-глутаминовой кислоты, 0,2 г глицина, 0,2 г L-гистидина·HCl и 0,02 г L-глутамин (стерилизуют отдельно фильтрованием).

ш На 1 л среды добавляют 80 мг DL-аланина, 100 мг DL-аспарагиновой кислоты, 160 мг L-аргинина, 500 мг L-глутаминовой кислоты, 80 мг глицина, 160 мг L-гистидина, 100 мг L-лейцина, 160 мг DL-метионина, 200 мг DL-фенилаланина, 80 мг DL-серина, 200 мг DL-триптофана, 140 мг L-тирозина, 250 мг L-цистеина и 320 мг DL-валина.

х На 1 л среды добавляют 3 г L-аргинина, 2 г DL-фенилаланина, 0,25 г L-тирозина, 2 г DL-валина, 1,5 г DL-лейцина, 0,5 г DL-норлейцина, 0,05 г L-триптофана, 1 г DL-треонина, 0,6 г DL-метионина, 0,45 г L-пролина, 0,1 г L-оксипролина, 0,2 г L-гистидина, 1 г DL-глутаминовой кислоты, 0,9 г DL-аспарагиновой кислоты, 1,2 г DL-лизина, 0,42 г DL-аланина, 1 г DL-серина, 0,25 г L-цистеина и 0,1 г глицина.

у На 1 л среды добавляют 100 мг L-триптофана, 325 мг глицина, 1,9 г DL-валина, 1 г L-лейцина, 1,45 г DL-изолейцина, 1 г DL-фенилаланина, 13 мг L-тирозина, 200 мг DL-серина, 1 г DL-треонина, 3,15 г L-глутаминовой кислоты, 540 мг DL-метионина, 475 мг L-аргинина, 350 мг L-гистидина, 2,2 г DL-лизина и 2 г DL-аспарагиновой кислоты.

з На 1 л среды добавляют 1 г DL-аланина, 1 г DL-аспарагиновой кислоты, 500 мг L-глутаминовой кислоты, 200 мг L-аргинина·HCl, 200 мг L-лизина·HCl, 200 мг L-гистидина·HCl, 400 мг DL-изолейцина, 200 мг L-лейцина, 400 мг DL-метионина, 200 мг L-фенилаланина, 200 мг L-пролина, 400 мг DL-треонина, 200 мг L-тирозина, 400 мг DL-валина, 400 мг DL-триптофана, 400 мг DL-серина, 200 мг глицина и 200 мг L-цистеина.

кк На 1 л среды добавляют по 10 мг аденинсульфата, солянокислого гуанина, урацила и ксантина.

и На 1 л среды добавляют по 0,01 г аденина и гуанина и 0,06 г урацила.

т На 1 л среды добавляют по 5 мг аденина, гуанина·HCl и ксантина, а также 50 мг гуаниловой кислоты и 15 мг урацила.

п На 1 л среды добавляют 33 мг гипоксантина, 16,7 мг урацила, 5 мг гуанина и 83,5 мг аденина.

о На 1 л среды добавляют 0,033 мг солянокислого тиамин, 1,2 мг никотиновой кислоты и 0,003 мг биотина.

р На 1 л среды добавляют 0,5 мг тиамин·HCl, 1 мг пиридоксин·HCl, 0,3 мг пиридоксамин·HCl, 0,3 мг пиридоксаль·HCl, 0,5 мг пантотената кальция, 0,5 мг рибофлавина, 1 мг никотиновой кислоты, 0,1 мг L-аминобензойной кислоты, 0,001 мг биотина и 0,01 мг фолиевой кислоты.

г На 1 л среды добавляют 200 мкг L-аминобензойной кислоты, 2 мкг биотина, 400 мкг пантотената кальция, 10 мкг фолиевой кислоты, по 400 мкг никотиновой кислоты и рибофлавина, 200 мкг солянокислого тиамин и по 10 мкг солянокислых пиридоксаль и пиридоксамин.

гг На 1 л среды добавляют 5 мкг фолиевой кислоты, 2,5 мкг биотина, 100 мкг L-аминобензойной кислоты, 500 мкг тиамин, 500 мкг рибофлавина, 1 мг пиридоксаль·HCl, 1 мг пиридоксамин, 500 мкг пантотената кальция и 1 мг никотиновой кислоты.

зз На 1 л среды добавляют 1 мкг биотина, 2 мкг фолиевой кислоты, 100 мкг рибофлавина и по 500 мкг тиамин, никотиновой кислоты, солянокислого пиридоксин и пантотената кальция.

aa На 1 л среды добавляют 1 г одиозамещенного глутамата натрия.

bb На 1 л среды добавляют 0,1 г L-аспарагина, 0,05 г L-триптофана, 0,1 г L-цистина и 0,1 г L-цистеина.

cc На 1 л среды добавляют 0,1 г L-цистина, 0,1 г L-триптофана, 0,4 г L-цистеина (стерилизуют отдельно фильтрованием), 0,1 г L-серина и 0,25 г L-аспарагина.

dd На 1 л среды добавляют 167 мг DL-аланина, 167 мг L-аргинина, 84 мг L-аспарагина, 83,5 мг L-цистеина·HCl, 167 мг L-глутаминовой кислоты, 167 мг глицина, 500 мг L-гистидина·HCl, по 167 мг DL-изолейцина, DL-лейцина, L-лизина·HCl, DL-метионина, DL-фенилаланина, L-пролина, DL-серина, DL-валина и DL-треонина а также 33 мг DL-триптофана и 83,5 мг D-тирозина.

ee Можно заменить без снижения урожая клеток смесью аминокислот в концентрациях, соответствующих их концентрациям в казение [16].

ff Обычно используют гидролизат, приготовленный по Свеллу и Райту [206], или имеющийся в продаже (кислотный гидролизат казениа NBC с низким содержанием солей и без витаминов). Гидролизат можно заменить смесью аминокислот [69].

gg Можно заменить отдельными аминокислотами [69].

hh На 1 л среды добавляют по 10 мг аденинсульфата·H₂O, гуанина·HCl·2H₂O, урацила и ксантина.

ii На 1 л среды добавляют по 0,01 г аденина, гуанина и урацила.

jj На 1 л среды добавляют по 10 мг урацила и аденина.

kk На 1 л среды добавляют 0,0005 мг биотина, 0,5 мг тиамина, 0,01 мг фолиевой кислоты, 2,5 мг холина, 1,0 мг пантотената кальция, 0,5 мг пиридоксина, 0,5 мг пиридоксамна, 0,5 мг пиридоксаль·HCl, 0,5 мг пиридоксаль-5'-фосфата, 1 мг никотиновой кислоты, 1 мг никотиламида, 0,5 мг рибофлавина, 40 мг инозита, 0,01 мг фолиевой кислоты, 0,01 мг L-аминобензойной кислоты и 0,05 мг витамина B₁₂.

ll На 1 л среды добавляют 10 мкг биотина, 1 мг тиамина, 2 мг пиридоксамна, 2 мг никотиновой кислоты, 1 мг пантотената кальция, 1 мг инозита и 6 мкг фолиевой кислоты.

mm На 1 л среды добавляют 1 мг тиамина, 1 мг рибофлавина, 10 мкг фолиевой кислоты, 2,5 мг никотиновой кислоты, 2,5 мг L-аминобензойной кислоты, 1 мг пантотената кальция, 250 мкг фолиевой кислоты и 5 мг пиридоксала.

nn На 1 л среды добавляют 50 мкг биотина и 200 мкг тиамина·HCl.

oo На 1 л среды добавляют по 0,4 мг пиридоксаль·HCl, солинокислого тиамина и L-аминобензойной кислоты, по 0,8 мг рибофлавина и никотиновой кислоты, 0,016 мг фолиевой кислоты, 0,002 мг биотина, 0,005 мг витамина B₁₂, 300 мг аскорбиновой кислоты и 0,03 мг пантотеина.

pp На 1 л среды добавляют по 400 мкг рибофлавина, никотиновой кислоты и пантотената кальция, по 200 мкг тиамина·HCl и L-аминобензойной кислоты, 10 мкг фолиевой кислоты и пиридоксаль·HCl и 2 мкг биотина.

qq На 1 л среды добавляют 200 мкг L-аминобензойной кислоты, 2 мкг биотина, 16,7 мкг фолиевой кислоты, 1670 мкг никотиновой кислоты, 400 мкг рибофлавина, 200 мкг тиамина, 800 мкг пантотената кальция и 16,7 мкг пиридоксаль·HCl.

Таблица 7.13. Состав синтетических (С) и полусинтетических (В) сред № 67—79 для бактерий, перечисленных в табл. 7.1

Компоненты	Количество (в единицах, указанных в колонке 1) на 1 л среды												
	67С	68С ^а	69С ^б	70С ^с	71С	72С	73С	74С ^д	75В	76С ^е	77С ^ф	78В ^г	79В ^h
Глюкоза ¹ (г)	10	1,0	5,0		5,0	10		20	1,0	10	10	7,5	
Глицерин (г)							88						
Ацетат натрия (г)										0,3	8,0		0,05
NH ₄ Cl (г)		10	0,4		1,4	1,06		1,0	1,0	1,0		2,8	
NaNO ₃ или KNO ₃ (г)		0,5											
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O (г)	8,2			30					6,5			0,1	0,14
K ₂ HPO ₄ (г)	3,28	1,0	0,1			5,65	1,0	5,0			4,0		
KH ₂ PO ₄ (г)					1,0	2,38			1,0	15			
Трис-буфер (г)			1,0									6,0	
NaCl (г)		0,1			0,1						4,0	6,8	6,6
KCl (г)			0,5	0,4								0,4	0,4
MnCl ₂ ·4H ₂ O (мг)				2,5	0,4	7,9		0,3		0,15	3,0		
MgSO ₄ ·7H ₂ O (г)	0,2	0,2	1,0	1,0	0,5	1,0	0,1	0,05	0,02	0,2	0,16	0,2	0,2

CaCl ₂ ·2H ₂ O (г)		0,1	0,11	0,2	0,1		0,01		0,005	0,02			0,2
FeSO ₄ ·7H ₂ O (мг)		10		5,0	0,4	1,1	10	5,0	0,5	4,0	8,0		0,50
Микроэлементы			Da ^j	Da ^k	Da ^l	Da ^m	Da ⁿ	Da ^o		Da ^p			Da ^q
Аминокислоты	Da ^r	Da ^s	Da ^t	Da ^u			Da ^v	Da ^w	Da ^x	Da ^y	Da ^z	Da ^{aa}	Da ^{bb}
Кислотный гидролизат казеина (г)											5,0 ^{cc}		
Пурины и пиримидины			Da ^{dd}							Da ^{ee}	Da ^{dd}	Da ^{ff}	Da ^{gg}
Витамины	Da ^{hh}	Da ⁱⁱ	Da ^{jj}	Da ^{kk}						Da ^{ll}	Da ^{mm}	Da ⁿⁿ	Da ^{oo}
Твин 80 (мг)			500					5000	200				
pH	7,2	6,8		6,0— —7,0	6,0— —7,0	6,8— —7,0	6,5— —7,0	7,2	6,4— —7,0	7,0— —7,2	6,8— —7,0	8,3	7,6— —7,8

^a На 1 л среды добавляют 100 мкг terregens-фактора.

^b На 1 л среды добавляют 200 мг нитрилотрункусной кислоты и 4 г β-глицерофосфата натрия.

^c На 1 л среды добавляют 0,15 мг пимеллиновой кислоты, 7 мл этилового спирта и 17,5 г D-молочной кислоты. Для *Corynebacterium diptheriae* потребности в пимеллиновой кислоте и β-аланине могут удовлетворяться соответственно биотином и пантотенатом кальция.

^d В процессе роста следует тщательно контролировать pH среды добавлением NaOH или молочной или фумаровой кислоты в концентрации 5 г/л.

^e На 1 л среды добавляют 0,2 мг гемина, 0,1 мг пимелиновой кислоты, 1 мг оленновой кислоты и 500 мг глутатиона.

^f На 1 л среды добавляют 0,1 г тногликолата натрия.

^g На 1 л среды добавляют 10 г фракции V бычьего сычужного альбумина (имеется в продаже). Все проверенные виды микоплазм, за исключением *M. laidlawii*, *M. granulatum* и *Mycoplasma* sp., штамм S-743, для роста нуждаются в холестерине [171]. Холестерин обычно добавляют в среду в концентрации от 1 до 20 мкг/л, разведя его в этианоле или твине 80.

^h На 1 л среды добавляют 500 мг липопротеидного фактора, 10 мг холестериллаурата и 5 мг лецитина

ⁱ Для большинства этих сред глюкозу стерилизуют отдельно (обычно автоклавированием) и добавляют ее с соблюдением правил асептики к стерильному раствору других компонентов

^j На 1 л среды добавляют 200 мг Fe [в виде $\text{FeSO}_4(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$], 100 мг Zn (в виде $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 120 мг Mn (в виде $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), 8 мг Cu (в виде $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), 10 мг Co (в виде $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 200 мг B (в виде H_3BO_3) и 5 мг Mo [в виде $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$]

^k На 1 л среды добавляют 5 мг $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ и 25 мг ZnCl_2

^l На 1 л среды добавляют 500 мкг борной кислоты, 40 мкг $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 100 мкг KI, 200 мкг $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ и 200 мкг $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

^m На 1 л среды добавляют 6,4 мг $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ и 15 мг $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

ⁿ На 1 л среды добавляют 10 мг ZnSO_4

^o На 1 л среды добавляют 1 мг $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ и 0,8 мг ZnSO_4

^p На 1 л среды добавляют 0,15 мг $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

^q Добавляют золу в количестве, эквивалентном 5 г пептона. Золу может частично заменить Sn

^r На 1 л среды добавляют по 100 мг L-цистеина HCl и L-лейцина, по 200 мг DL-изолейцина и DL-валина, 600 мг L-глутамина (стерилизуют отдельно фильтрованием), по

^y На 1 л среды добавляют по 100 мг глицина, L-аланина, DL-серина, L-треонина, L-лейцина, L-изолейцина, DL-валина, L-аспарагиновой кислоты, L-аспарагина, L-лизина, L-гистидина, L-аргинина, L-пролина, L-оксипролина, L-фенилаланина, L-тирозина, DL-метионина, L-цистеина HCl, а также 40 мг L-триптофана и 500 мг L-глутаминовой кислоты. Гидролизат казеина (4 г/л) можно заменить смесью аминокислот

^z На 1 л среды добавляют по 0,1 г L-цистина и L-триптофана

^{aa} Добавляют (мг/л) L-цистина (30), DL-изолейцина (600), L-глутамина (100), L-аспарагина (200), глицина (100), DL-аланина (200), DL-фенилаланина (400), L-тирозина (50), L-гистидина HCl (150), DL-лейцина (800), L-аргинина (200), DL-метионина (200) и DL-треонина (400)

^{bb} Добавляют (мг/л) L-аргинина (70), L-аспарагиновой кислоты (60), L-цистеина (1), L-глутаминовой кислоты (75), L-глутамина (100), DL-изолейцина (40), L-метионина (15), DL-фенилаланина (50) и DL-триптофана (20)

^{cc} Гидролизат казеина можно заменить аминокислотами. Хотя на среде с аминокислотами можно производить серийный пересев культур интенсивность роста некоторых штаммов при этом все же значительно ниже чем в присутствии гидролизата казеина

^{dd} Добавляют к среде аденин гуанин, урацил и ксантин до конечной концентрации 0,5 мг/100 мл

^{ee} На 1 л среды добавляют по 20 мг сернокислого аденина, гуанина HCl, урацила, ксантина и тимина

^{ff} На 1 л среды добавляют по 100 мг аденозина, гуанозина и цитидина

^{gg} На 1 л среды добавляют 1 мг аденозинтрифосфата, по

200 мг DL-метионина, L-гистидина·HCl, L-аргинина·HCl и DL-триптофана.

⁵ Добавляют смесь аминокислот, исходя из процентного соотношения аминокислот в казеине [76].

[†] Добавляют (г/л): DL-аланина (4); DL-аспарагиновой кислоты (1,6); L-глутаминовой кислоты (2); L-аргинина·HCl и L-лизина·HCl (по 0,8); L-гистидина (0,4); DL-изолейцина (0,8); L-лейцина (0,4); DL-метионина и DL-фенилаланина (по 0,8); L-пролина (0,4); DL-треонина (0,8); L-тирозина (0,4); DL-валина и DL-триптофана (по 0,8); L-цистина (0,4); DL-серина (0,8) и глицина (0,4). Вместо смеси аминокислот можно использовать кислотный гидролизат казеина. 10%-ный раствор казеиновых кислот обрабатывают активированным углем и добавляют к нему следующие аминокислоты (мг/л): L-триптофан (2000); L-фенилаланин и L-тирозин (по 400); L-пролин и DL-гистидин·HCl (по 200) и L-цистин (1000). Для конечной среды используют концентрацию 5 мг/100 мл.

^u На 1 л среды добавляют 0,7 г L-цистена, 2 г DL-валина, 0,6 г L-метионина, 0,5 г L-тирозина, 0,75 г L-пролина, 5 г L-аспарагиновой кислоты, 7,5 г L-глутаминовой кислоты и 2,3 мг β-аланина.

^v На 1 л среды добавляют 1,5 г L-глутаминовой кислоты и 1 г L-аргинина.

^w На 1 л среды добавляют по 0,5 г L-глутаминовой кислоты, L-аргинина, L-пролина и L-гистидина.

^x Рост культур стимулируется смесью следующих аминокислот (каждая в концентрации 0,7 г/л): L-глутаминовая кислота, L-аспарагин, DL-α-аланин, L-глутамин, L-гистидин и DL-аспарагиновая кислота. Раствор фракции V бывшего альбумина после стерилизации фильтрованием инактивируют нагреванием до 56 °C и затем добавляют к стерильной среде до конечной концентрации 0,01%.

0,3 мг гуанина и гипоксантина и по 5 мг РНК и ДНК.

^{hh} Добавляют (мкг/л): рибофлавина (1000); биотина (100); тиамин·HCl (1000) и DL-липовой кислоты (1).

^{ll} Добавляют (мкг/л): тиамин (80); пиридоксаль (40); пиридоксамин (4); пиридоксин (4); L-аминобензойной кислоты (40); фолиевой кислоты (4); холина (80); инозита (2000); биотина (0,1); витамина B₁₂ (0,4) и пантотената кальция (80).

^{jj} Добавляют (мкг/л): тиамин·HCl (1000); L-аминобензойной кислоты (500); никотиновой кислоты (1000); холин·хлорида и инозита (по 10 000); пиридоксин (500); пиридоксаль·HCl и пантотената кальция (по 1000); биотина (20); фолиевой кислоты и витамина B₁₂ (по 10) и рибофлавина (500). Витамины не являются необходимыми для всех видов, кроме одного штамма, который в отсутствие аминокислот нуждается в никотиновой кислоте.

^{kk} На 1 л среды добавляют 2,3 мг никотиновой кислоты.

^{ll} На 1 л среды добавляют 1 мкг витамина B₁₂, 0,5 мг фолиевой кислоты, по 2 мг L-аминобензойной кислоты, тиамин·HCl и рибофлавина, по 1 мг никотиновой кислоты, никотинамида, пиридоксаль·HCl и пиридоксамин·2HCl, по 2 мг пантотената кальция и инозита и по 0,1 мг DL-липовой кислоты и биотина. Биотин, инозит, никотиновая кислота, пиридоксаль и рибофлавин необходимы для роста бактерий.

^{mm} На 1 л среды добавляют 1 мкг биотина и по 1 мг пантотената кальция, тиамин и L-аминобензойной кислоты.

ⁿⁿ Добавляют (мг/л): никотиновой кислоты, рибофлавина, пиридоксин·HCl, пиридоксаль·HCl и тиамин (по 2,5); фолиевой кислоты (1,0).

^{oo} Добавляют (мг/л): холин (0,5); биотин, фолиевой кислоты, тиамин и пантотената кальция (по 0,01); пиридоксин (0,05).

7.2.2. Комплексные и полусинтетические среды

В табл. 7.2—7.7 приведен состав комплексных (кодированная буква А) и полусинтетических (кодированная буква В) сред для бактерий, перечисленных в табл. 7.1. Имеющиеся в продаже готовые среды помечены звездочкой. Для получения твердой среды к бульонной среде добавляются 1,5—2% агара. Дополнительные компоненты сред и детальные пояснения даны в сносках, обозначенных строчными латинскими буквами.

7.2.3. Синтетические среды

В табл. 7.8—7.13 приведен состав синтетических сред (кодированная буква С) и несколько полусинтетических сред (кодированная буква В) для бактерий, перечисленных в табл. 7.1. Дополнительные компоненты сред и детальные пояснения даны в сносках, обозначенных строчными латинскими буквами.

7.3. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВЕЩЕСТВ ПО РОСТУ КУЛЬТУР

Бактерии широко используются для количественного анализа большого числа веществ, которые способствуют их росту или ингибируют его: витаминов, аминокислот, микроэлементов, пиримидиновых оснований, полиаминов, дезоксирибонуклеозидов, дезоксирибонуклеотидов, лекарственных препаратов, антибиотиков и других химиотерапевтических агентов [70, 105a]. Хотя инструментальные методы (например, анализ аминокислот с помощью аминокислотного анализатора) частично заменили некоторые из бактериологических методов, последние еще используются довольно часто. В некоторых случаях (например, при определении витамина В₆) наблюдается различная чувствительность к разным формам витамина, поэтому такой анализ нелегко заменить другими методами. До тех пор пока не удастся выделить и охарактеризовать фактор роста, его влияние на рост соответствующего организма часто служит единственным показателем при последующем выделении этого фактора из природного материала.

Бактериологические анализы в принципе основаны на линейной зависимости интенсивности (но не скорости) роста микроорганизмов при увеличении количества лимитирующего питательного вещества в ограниченном диапазоне.

Разброс результатов при бактериологическом анализе обычно составляет $\pm 10\%$, однако в тщательно контролируемых условиях он может уменьшаться до $\pm 3\%$. В целом количественный анализ необходимого питательного вещества можно провести с более высокой степенью точности, чем количественный анализ стимулирующего фактора.

Для количественного анализа витаминов и аминокислот наиболее пригодны штаммы родов *Lactobacillus*, *Streptococcus* и *Pediococcus*, поскольку для их роста требуются сложные питательные смеси, т. е. в их ростовую среду необходимо добавлять большое число компонентов. Эти микроорганизмы можно использовать для количественного анализа нескольких витаминов и аминокислот. Например, метод анализа с использованием *Streptococcus equinus* ATCC 8042 (ранее известного как *Leuconostoc mesenteroides* P-60) позволяет определить все аминокислоты, кроме аланина [216]. Аланин можно определить с помощью этой же среды, если к ней добавить фолиновую кислоту (см. сноску *b* в табл. 7.12) и в качестве тест-бактерии использовать *P. cerevisiae* 8081.

Детали метода бактериологического анализа можно проиллюстрировать на примере работы Стила и др. [216], в которой для определения аргинина используется *S. equinus*.

7.3.1. Аминокислоты (аргинин)

Аргинин — одна из семнадцати аминокислот, определяемых с помощью *S. equinus*. Для других аминокислот и витаминов приемы определения сходны. Ссылки на специфические методы, используемые для определения других факторов роста, даны в обзоре Гирарда и Снелла [70]. Для изучения путей синтеза и распада витаминов и аминокислот успешно используют мутанты бактерий — ауксотрофы по одному или нескольким веществам.

Организм

S. equinus ATCC 8042 получен из Американской коллекции типовых культур (12301 Parklawn Drive Rockville, MD 20852). Основную культуру бактерий поддерживают в столбиках со средой, состоящей из 1,5% агара, 1% глюкозы и 1% дрожжевого экстракта. Один раз в месяц культуру пересевают на свежую среду. Столбики инкубируют 24 ч при 37 °C. Посев делают в 2 пробирки. Одну из них оставляют на хранение и используют только при последующем пересеве через месяц. Другую используют для приготовления инокулята, применяемого при анализах.

Полная основная среда

Состав основной среды приведен в табл. 7.14. Поскольку это сложная среда, ее можно приготовить несколькими способами, причем каждый исследователь может выбрать любой из предложенных здесь вариантов. Удобнее всего смешать различные вещества (например, аминокислоты, минеральные соли, пуриновые и пиримидиновые основания, витамины), которые можно хранить либо в твердой форме, либо в виде основных растворов. Затем к этой смеси добавляют необходимые компоненты в нужном количестве и готовят соответствующее количество среды, концентрация которой вдвое выше требуемой (так называемая среда с двойной концентрацией). В аналитических целях отдельные вещества, подлежащие определению, следует исключить из таких смесей. Смеси готовят следующим образом.

Аминокислоты. Делают навески аминокислот в количествах, указанных в табл. 7.14. Аминокислоты, предназначенные для определения, исключают из смеси. Приготовленные навески смешивают, растирают в ступке и хранят в хорошо закупоренной банке в темном месте. Смеси всех аминокислот, предназначенных для аналитических целей, готовят и хранят таким же способом.

Известно, что активны только L-изомеры аминокислот. Из соображений удобства иногда используют DL-

7. БИОХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Таблица 7.14. Состав полной синтетической среды для *Streptococcus equinus*

Компонент	Количество на 1 л среды с двойной кон- центрацией
Аминокислоты:	
DL- α -Алаин	400 мг
L-Аргинин·HCl	484 мг
L-Аспарагин	800 мг
L-Аспарагиновая кислота	200 мг
L-Цистеин	100 мг
L-Глутаминовая кислота	600 мг
Глицин	200 мг
L-Гистидин·HCl	124 мг
DL-Изолейцин	500 мг
DL-Лейцин	500 мг
DL-Лизин·HCl	500 мг
DL-Метионин	200 мг
DL-Фенилаланин	200 мг
L-Пролин	200 мг
DL-Серин	100 мг
DL-Треонин	400 мг
DL-Триптофан	80 мг
L-Тирозин	200 мг
DL-Валин	500 мг
Глюкоза	50 г
Ацетат натрия	40 г
Хлористый аммоний	6 г
Неорганические соли:	
KH_2PO_4	1,2 г
K_2HPO_4	1,2 г
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	400 мг
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	20 мг
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	40 мг
NaCl	20 мг
Пуриновые и пиримидиновые основания:	
Аденинсульфат· H_2O	20 мг
Гуанин·HCl· H_2O	20 мг
Урацил	20 мг
Ксантин	20 мг
Витамины:	
Тиамин·HCl	1 мг
Пиридоксин·HCl	2 мг
Пиридоксамин·HCl	0,6 мг
Пиридоксаль·HCl	0,6 мг

Продолжение табл. 7 14

Компонент	Количество на 1 л среды с двойной концентрацией
DL-Пантотенат кальция	1 мг
Рибофлавин	1 мг
Никотиновая кислота	2 мг
<i>n</i> -Аминобензойная кислота	0,2 мг
Биотин	0,002 мг
Фолиевая кислота	0,02 мг
Дистиллированная вода	До 1000 мл

изомеры. Если, например, L-изомер отсутствует, а есть DL-изомер, то последнего берут в 2 раза больше.

Минеральные соли. Солевой раствор А получают следующим образом: 25 г KH_2PO_4 и 25 г K_2HPO_4 растворяют в дистиллированной воде и доводят объем до 250 мл. Остальные соли объединяют в следующих количествах: 10 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 г $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,8 г $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ и 0,5 г NaCl . Смесь растворяют в дистиллированной воде, доводят объем до 250 мл и добавляют 1 каплю концентрированной HCl , чтобы предотвратить образование осадка (солевой раствор В). Оба раствора устойчивы при комнатной температуре, но лучше хранить их в холодильнике, чтобы предупредить рост плесени в растворе А и окисление Fe^{2+} в растворе В.

Пуриновые и пиримидиновые основания. Ксантин и гуанин растворяют при нагревании в разбавленной HCl ; аденин и урацил растворяют в теплой воде. Смешивают эти растворы и добавляют к ним столько воды, чтобы концентрация каждого основания в смеси была 1 мг/мл. Раствор устойчив при хранении в холодильнике.

Витамины. Смешивают все витамины, за исключением биотина и фолиевой кислоты, причем количество каждого из них должно быть в 10 раз больше, чем указано в табл. 7.14. Исходные растворы биотина и фолиевой кислоты каждый с концентрацией 1 мг/мл готовят отдельно. Биотин солибилизируется при нагревании; для лучшего растворения фолиевой кислоты добавляют небольшое количество NH_4OH . После того как в смесь

витаминов внесли 0,02 мл раствора биотина и 0,2 мл раствора фолиевой кислоты, объем доводят дистиллированной водой до 60 мл и смесь нагревают до растворения всех компонентов. Хранят этот раствор при 5 °C и меняют каждые две недели.

Глюкоза, ацетат натрия и хлористый аммоний. Сначала делают навески глюкозы, ацетата натрия и хлористого аммония. Для приготовления 500 мл основной среды с двойной концентрацией взвешивают 3,1 г смеси аминокислот (не учитывая вес исключенных из нее аминокислот) и растворяют ее нагреванием примерно в 400 мл воды. Добавляют последовательно 25 г глюкозы, 20 г ацетата натрия, 3 г NH_4Cl , 6 мл солевого раствора А, 5 мл солевого раствора В, 10 мл основного раствора пуриновых и пиримидиновых оснований и 3 мл раствора витаминов. Объем доводят дистиллированной водой до 500 мл, а рН среды устанавливают 6,8. (Описанная и сходные с ней среды продаются, например фирмой Difco Laboratories)

Приготовление образцов

Для получения правильных результатов в анализируемых пробах необходимо, чтобы факторы роста в них были в той же химической форме, что и вещество, используемое в качестве стандарта. Так, белки следует тщательно высушить перед взвешиванием и полностью гидролизовать (Многие пептиды могут поступать в клетки и гидролизаться, поставляя тем самым лимитирующие аминокислоты; однако количественный ответ на входящую в состав пептида аминокислоту может не соответствовать ответу на свободную аминокислоту.) Можно пользоваться любой методикой для полного гидролиза, гарантирующей незначительное разрушение аминокислот.

Для определения аргинина образцы белка высушивают нагреванием в течение 3 ч при температуре 60 °C под давлением 20 мм рт. ст. (2,7 кПа). Тщательно взвешивают около 200 мг образца, помещают его в пробирку из пирексового стекла размером 25×200 мм, добавляют 10 мл 4 н. HCl . Пробирку закрывают и автоклавируют 8 ч под давлением 103 421 Па. После охлаж-

дения пробирку открывают, нейтрализуют ее содержимое (рН 6,8) и доводят его до нужного объема. Некоторые аминокислоты (частично триптофан и тирозин и в меньшей степени некоторые другие аминокислоты) разрушаются при кислотном гидролизе. В этом случае следует использовать другие методы.

Аминокислоты, которые используются в качестве стандартов (в данном случае аргинин), также высушивают в течение 2 ч при 60 °С при давлении 20 мм рт. ст., тщательно взвешивают и растворяют в воде.

Методика определения

Инокулят готовят следующим образом. В пробирки вносят полную среду С с двойной концентрацией (табл. 7.14), содержащую 0,2% дрожжевого экстракта, разбавляют равным объемом дистиллированной воды, отбирают аликвоты объемом по 10 мл в культуральные пробирки, закрывают пробками и стерилизуют автоклавированием. Некоторые пробирки с инокулятом можно приготовить заранее и хранить при 5 °С. За день до определения с помощью инокулирующей иглы переносят часть бактерий с соблюдением правил асептики с агарового косячка в другую пробирку со средой и инкубируют ее при 37 °С в течение 15—18 ч. Непосредственно перед экспериментом клетки собирают центрифугированием. Надосадочную жидкость декантируют, а клетки суспендируют в 10 мл стерильной воды. Вновь центрифугируют и суспендируют клеточный осадок в 10 мл стерильной воды, получая таким образом отмытую суспензию бактерий для последующей инокуляции.

Определение проводят в пробирках размером 18×150 мм без бортиков, помещенных в металлический штатив. Если о росте судят по образованию кислот, то, как рекомендуют Стил и др. [216], общий объем среды должен быть не менее 2 и не более 10 мл. Для турбидиметрических измерений общий объем должен составлять 10 мл, что и выполняется в описываемом ниже эксперименте.

Стандартную кривую получают путем разведения 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 160 и 200 мкг L-аргинина·HCl в 10 мл общего объема. В пробирки вносят пробы в ко-

личествах, соответствующих концентрациям аргинина от 10 до 100 мкг на 10 мл. Дисгиллированной водой доводят объем в каждой пробирке до 5 мл и затем добавляют по 5 мл среды с двойной концентрацией. Пробирки закрывают, стерилизуют автоклавированием в течение 10 мин под давлением 103 421 Па, охлаждают и инокулируют отмытой клеточной суспензией, полученной, как описано выше. Количество инокулята не является важным фактором при определении аминокислот, если в каждой пробирке оно одно и то же (достаточно одной капли).

При турбидиметрических измерениях роста бактерий пробирки с культурой инкубируют в течение 20 ч при 37 °С. За ростом клеток следят фотометрически при длине волны >600 нм, где снижена до минимума интерференция, вызываемая окраской среды (можно использовать, например, колориметр Bausch and Lomb, модель 20). При использовании образцов объемом 2 мл время инкубации удлиняется до 72 ч, а рост культуры измеряют с помощью титрования образуемой кислоты 0,2 н. NaOH.

Строят стандартную кривую для аргинина на графике, по одной оси которого откладывают интенсивность роста (плотность клеток после 20 ч роста) или данные титрования, а по другой — количество добавленного стандартного раствора аргинина. Для каждого результата, полученного с известным количеством образца, по стандартной кривой находят то количество аргинина, которое вызывает соответствующую стимуляцию роста. Используют начальную (восходящую) часть кривой, где наблюдается линейная зависимость между интенсивностью роста бактерий и концентрацией аргинина. В этот отрезок кривой должно уложиться несколько точек из разных разведений исследуемой пробы, причем расхождения должны быть незначительными. Полученные результаты выражают в миллиграммах аргинина на 1 г пробы или в других удобных величинах.

7.3.2. Витамины

Витамины определяют методами, сходными с методами, используемыми для аминокислот. Вместо смеси ами-

нокислот в ростовую среду можно вносить лишенный витаминов гидролизат казеина с добавками аминокислот, которые были разрушены при кислотном гидролизе или присутствуют в казеине в субоптимальных концентрациях. Обычно витамины нужны в значительно более низких концентрациях, чем аминокислоты. Так, для типичной тест-бактерии *Lactobacillus plantarum* оптимальная потребность в биотине составляет 1 нг/10 мл культуры. В связи с этим необходимо всегда работать с очень тщательно вымытой стеклянной посудой, особенно пробирками. Для мытья посуды нельзя использовать растворы кислоты, содержащие хроматы, поскольку несмываемые с помощью многократного споласкивания хроматы даже в минимальных (следовых) количествах подавляют рост бактерий. Вполне пригодна следующая обработка: культуральные пробирки заполняют дистиллированной водой, автоклавируют 10 мин, воду сливают и пробирки высушивают. Поскольку пробки также могут служить источником химического загрязнения, их следует перед каждым опытом промывать.

Так как витамины весьма различаются между собою по устойчивости и по химическому строению, не существует универсальной процедуры высвобождения связанных витаминов. Как правило, широко используют следующие способы обработки проб [204]: 1) гидролиз разбавленной кислотой, нейтрализация, доведение водой до нужного объема и фильтрование или 2) обработка смесью ферментов, автоклавирование для остановки действия ферментов, доведение до нужного объема и фильтрование.

7.4. ЛИТЕРАТУРА

1. Aaronson S. J. Bacteriol., **69**, 67—69 (1955).
2. Allison M. J., Bryant M. P., Doetsch R. N. Science, **128**, 474—475 (1958).
3. Allison M. J., Bryant M. P., Doetsch R. N. J. Bacteriol., **83**, 523—532 (1962).
4. American Type Culture Collection. Catalogue of strains I, 13th ed., American Type Culture Collection, Rockville, Md., 1978.
5. Аристовская Т. В. ДАН СССР, **136**, 954—957 (1961).
6. Baird-Parker A. C. Nature (London), **180**, 1056—1057 (1957).
7. Baird-Parker A. C. J. Gen. Microbiol., **22**, 458—469 (1960).

8. *Baldacci E., Locci R.* In: R. E. Buchanan and N. E. Gibbons (eds.), *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 8th ed., p. 829—831, The Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1974.
9. *Baron L. S., Carey W. F., Spilman W. M.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **45**, 976—984 (1959).
10. *Baumann P., Doudoroff M., Stanier R. Y. J.* *Bacteriol.*, **95**, 58—73 (1968).
11. *Baumann P., Doudoroff M., Stanier R. Y. J.* *Bacteriol.*, **95**, 1520—1541 (1968).
12. *Becking H. J.* *Plant Soil*, **14**, 49—81; 297—322 (1961).
13. *Becking H. J.* In: R. E. Buchanan and N. E. Gibbons (eds.), *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 8th ed., p. 258—259, The Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1974.
14. *Belaich J. P., Senez J. P. J.* *Bacteriol.*, **89**, 1195—1200 (1965).
15. *Bergan T., Hovig B.* *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, **74**, 421—430 (1968).
16. *Block R. J., Bolling D.* The amino acid composition of proteins and foods, p. 485—492, Charles C. Thomas, Publisher, Springfield, Ill., 1945.
17. *Bose S. K.* In: H. Gest, A. San Pietro and L. P. Vernon (eds.), *Bacterial photosynthesis*, p. 501—510, The Antioch Press, Yellow Springs, Ohio, 1963.
18. *Bowdre J. H., Krieg N. B., Noffman P. S., Smibert R. M.* *Appl. Environ. Microbiol.*, **31**, 127—133 (1976).
19. *Brewer J. H.* *Science*, **95**, 587 (1942).
20. *Bryant M. P., Robinson I. M. J.* *Bacteriol.*, **84**, 605—614 (1962).
21. *Bryant M. P., Robinson I. M., Chu H. J.* *Dairy Sci.*, **42**, 1831—1847 (1959).
22. *Bryant M. P., Small N. J.* *Bacteriol.*, **72**, 16—21 (1956).
23. *Bryant M. P., Small N. J.* *Bacteriol.*, **72**, 22—26 (1956).
24. *Bryant M. P., Small N., Bouma C., Chu H. J.* *Bacteriol.*, **76**, 15—23 (1958).
25. *Burton M. O., Lockhead A. G.* *Can. J. Bot.*, **31**, 145—151 (1953).
26. *Callaham L. T., III, Richardson S. H.* *Infect. Immun.*, **7**, 567—572 (1973).
27. *Campbell L. L., Jr., Frank H. A., Hall E. R. J.* *Bacteriol.*, **73**, 516—521 (1957).
28. *Canale-Parola E., Wolfe R. S. J.* *Bacteriol.*, **79**, 857—859; 860—862 (1969).
29. *Caraway B. H., Krieg N. R.* *Can. J. Microbiol.*, **18**, 1749—1759 (1972).
30. *Catlin B. W. J.* *Infect. Dis.*, **128**, 178—194 (1973).
31. *Catlin W. J.* *Bacteriol.*, **79**, 579—590 (1960).
32. *Catlin W. J.* *Bacteriol.*, **83**, 470—474 (1962).
33. *Chang G. W., Snell E. E.* *Biochemistry*, **7**, 2005—2012 (1968).
34. *Christie A. O., Porteous J. W. J.* *Gen. Microbiol.*, **28**, 443—460.
35. *Cohen-Bazire G., Sistrom W. R., Stanier R. Y. J.* *Cell Comp. Physiol.*, **49**, 25—68 (1957).
36. *Cole R. M., Tully J. G., Popkin T. J., Bove J. M. J.* *Bacteriol.*, **115**, 367—386 (1973).
37. *Couch J. N. J.* *Elisha Mitchell Sci. Soc.*, **66**, 87—92 (1950).
38. *Couch J. N. J.* *Elisha Mitchell Sci. Soc.*, **71**, 148—155 (1955).

39. *Couch J. N. J.* Elisha Mitchell Sci. Soc., **79**, 53—70 (1963).
40. *Craig J. A., Snell E. E. J.* Bacteriol., **61**, 283—291 (1951).
41. *Cross T. J.* Appl. Bacteriol., **31**, 36—53 (1968).
42. *Cross T.* In: R. E. Buchanan and N. E. Gibbons (eds.), *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 8th ed., p. 859, The Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1974.
43. *Darland G., Brock T. D., Samsonoff W., Conti S. F.* Science, **170**, 1416—1418 (1970).
44. *Davis B. R., Woodward J. M.* Can. J. Microbiol., **3**, 591—597 (1957).
45. *DeLey J. J.* Gen. Microbiol., **24**, 31—50 (1961).
46. *DeLey J., Frateur J.* In: R. E. Buchanan and N. E. Gibbons (eds.), *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 8th ed., p. 277, The Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1974.
47. *Delwiche E. A. J.* Bacteriol., **58**, 395—398 (1949).
48. *DeMoss R. O., Happel M. E. J.* Bacteriol., **77**, 137—141 (1959).
49. *Difco.* Difco manual, 9th ed., p. 116, 121, 271, 276, Difco Laboratories, Detroit, 1962.
50. *Dondero N. C., Phillips R. A., Heukelekian H.* Appl. Microbiol., **9**, 219—227 (1961).
51. *Dreizen S., Mosny J. J., Gilley E. J., Spies T. D. J.* Dent. Res., **33**, 339—345 (1954).
52. *Duchow E., Douglas H. C. J.* Bacteriol., **58**, 409—416 (1949).
53. *Dworkin M. J.* Bacteriol., **84**, 250—257 (1962).
54. *Dworkin M., Foster J. W. J.* Bacteriol., **72**, 646—659 (1956).
55. *Ehrlich J., Gottlieb D., Burkholder P. R., Anderson L. E., Pridham T. G. J.* Bacteriol., **56**, 467—477 (1948).
56. *Englesberg E., Levy J. B. J.* Bacteriol., **67**, 438—449 (1954).
57. *Friedman M. E., Roessler W. G. J.* Bacteriol., **83**, 528—533 (1961).
58. *Frobisher M.* Fundamentals of microbiology, p. 538, The W. B. Saunders Co., Philadelphia, 1968.
59. *Fuller R. C.* In: H. Gest, A. San Pietro and L. P. Vernon (eds.), *Bacterial photosynthesis*, p. 507—509, The Antioch Press, Yellow Springs, Ohio, 1963.
60. *Gardner G. A. J.* Appl. Bacteriol., **32**, 371—380 (1969).
61. *Gardner J. F., Lascelles J. J.* Gen. Microbiol., **29**, 157—164 (1962).
62. *Garvie E. T. J.* Gen. Microbiol., **48**, 439—447 (1967).
63. *Georg L. K., Brown J. M.* Int. J. Syst. Bacteriol., **17**, 79—88 (1967).
64. *Georg L. K., Roberstad G. W., Brinkman S. A. J.* Bacteriol., **88**, 477—490 (1964).
65. *Gerhardt P.* Bacteriol. Rev., **22**, 81—98 (1958).
66. *Gordon M. A., Edwards M. R. J.* Bacteriol., **86**, 1101—1115 (1963).
67. *Gould R. G. J.* Biol. Chem., **153**, 143—150 (1944).
68. *Griffin P. J., Racker E. J.* Bacteriol., **71**, 717—721 (1956).
69. *Guirard B. M.* In: G. D. Fasman (ed.), *Handbook of biochemistry and molecular biology*, 3rd ed., vol. 2, p. 629, CRC Press, Cleveland, 1976.
70. *Guirard B. M., Snell E. E.* In: I. C. Gunsalus and R. Y. Stanier

- (eds.), *The bacteria*, vol. 4, p. 33—93, Academic Press, Inc., New York, 1962.
71. *Guirard B. M., Snell E. E. J. Bacteriol.*, **87**, 370—376 (1964).
 72. *Gutierrez J., Davis R. E., Lindahl I. L., Warwick E. J. Appl. Microbiol.*, **7**, 16—21 (1959).
 73. *Hammerstrom R. A., Claus K. D., Coghlan J. W., McBee R. H. Arch. Biochem. Biophys.*, **56**, 123—129 (1955).
 74. *Hanert H. Arch. Mikrobiol.*, **60**, 348—376 (1968).
 75. *Happold F. C., Johnstone K. I., Rogers H. J., Yovatt J. B. J. Gen. Microbiol.*, **10**, 261—266 (1954).
 76. *Hawk P. B., Oser B. L., Summerson W. H. Practical physiological chemistry*, 12th ed., p. 109, The Blakiston Co., New York, 1951.
 77. *Hayflick L., Chanock R. M. Bacteriol. Rev.*, **29**, 185—221 (1965).
 78. *Haywood H. R., Stadtman T. C. J. Bacteriol.*, **78**, 567—561 (1959).
 79. *Heitman F. R. J. Infect. Dis.*, **69**, 32—51 (1941).
 80. *Hemphill H. E., Zahler S. A. J. Bacteriol.*, **95**, 1011—1017 (1968).
 81. *Henderson L. M., Snell E. E. J. Biol. Chem.*, **172**, 15—29 (1948).
 82. *Hendrie M. S., Hodgkiss W., Shewan J. W. J. Gen. Microbiol.*, **64**, 151—169 (1970).
 83. *Henssen A. Arch. Mikrobiol.*, **26**, 373—414 (1957).
 84. *Herbst E. J., Snell E. E. J. Biol. Chem.*, **176**, 989—990 (1948).
 85. *Hespell R. B., Canale-Parola E. J. Bacteriol.*, **103**, 216—226 (1970).
 86. *Hirsch P. In: R. E. Buchanan and N. E. Gibbons (eds.), Bergey's manual of determinative bacteriology*, 8th ed., p. 149—151, The Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1974.
 87. *Hofstad T. Acta. Pathol. Microbiol. Scand.*, **69**, 543—548 (1967).
 88. *Holt S. C., Conti S. F., Fuller R. C. J. Bacteriol.*, **91**, 311—323 (1966).
 89. *Howell A., Pine L. J. Bacteriol.*, **71**, 47—53 (1956).
 90. *Hutner S. H. J. Bacteriol.*, **43**, 629—640 (1942).
 91. *Hutner S. H., Provasoli L., Schatz A., Haskins C. P. Proc. Am. Philos. Soc.*, **94**, 152—170 (1950).
 92. *Jackins H. C., Barker H. A. J. Bacteriol.*, **61**, 101—114 (1951).
 93. *Janke A. Arch. Microbiol.*, **15**, 116—118 (1950).
 94. *Jensen E. M., Seeley H. W. J. Bacteriol.*, **67**, 484—488 (1954).
 95. *Jensen H. L. Proc. Linn. Soc. N. S. W.*, **57**, 173—180 (1932).
 96. *Jensen H. L., Peterson E. J., De P. K., Bhattacharya R. Arch. Mikrobiol.*, **36**, 182—195 (1960).
 97. *Johnson R. C., Wilson J. B. J. Bacteriol.*, **80**, 406—411 (1960).
 98. *Jones H. E., Park R. W. A. J. Gen. Microbiol.*, **47**, 369—378 (1967).
 99. *Jones J. B., Stadtman T. C. J. Bacteriol.*, **130**, 1404—1406 (1977).
 100. *Jordan R. M. M. Br. J. Exp. Pathol.*, **33**, 27—54 (1952).
 101. *Kane W. D. J. Elisha Mitchell Sci. Soc.*, **82**, 220—230 (1966).
 102. *Kasai G. J. J. Dent. Res.*, **44**, 1015—1022 (1965).
 103. *Katznelson H., Lockhead A. G. J. Bacteriol.*, **64**, 97—103 (1952).
 104. *Kauffmann F. The bacteriology of Enterobacteriaceae*, p. 311—332, The Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1966.
 105. *Kaufman L., Humphries J. C. Appl. Microbiol.*, **6**, 311—315 (1958).

- 105a. *Kavanaugh F.* Analytical microbiology, vol. 1 and 2, Academic Press, Inc., New York, 1963, 1972.
106. *Kellogg D. S., Peacock W. L., Jr., Deacon W. E., Brown L., Pirkle C. I. J.* Bacteriol., **85**, 1274—1279 (1963).
107. *Kihara H., Snell E. E. J.* Biol. Chem., **235**, 1409—1414 (1960).
108. *Kindler S. H., Mager J., Grossowicz N. J.* Gen. Microbiol., **15**, 386—393 (1956).
109. *King B. M., Alder D. L.* Am. J. Clin. Pathol., **41**, 230—232 (1964).
110. *Kitahara K., Lai C. L. J.* Gen. Appl. Microbiol., **13**, 197—203 (1967).
- 110a. *Kitahara K., Suzuki J. J.* Gen. Appl. Microbiol., **9**, 59—71 (1963).
111. *Knight B. C. J. G., Proom H. J.* Gen. Microbiol., **4**, 508—538 (1950).
112. *Knight S. G.* In: C. H. Werkman and P. W. Wilson (eds.), Bacterial metabolism, p. 500—516, Academic Press, Inc., New York, 1951.
113. *Кондратьева Е. Н., Красильникова Е. Н., Новикова Л. М.* Микробиология, **37**, 417—427 (1968).
114. *Koser S.* Vitamin requirements of yeast and bacteria, Charles C. Thomas, Publisher, Springfield, Ill., 1968.
115. *Kowallik U., Pringsheim E. G.* Am. J. Bot., **53**, 801—806 (1966).
116. *Красильников Н. А., Агре Н. С.* Микробиология, **33**, 829—835 (1964).
117. *Krieg N. R.* In: R. E. Buchanan and N. E. Gibbons (eds.), Bergey's manual of determinative bacteriology, 8th ed., p. 198—200, The Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1974.
118. *Kubica G.-P., Kim T. H., Dunbar F. P.* Int. J. Syst. Bacteriol., **22**, 99—106 (1972).
119. *Kulp W. L., Borden D. G. J.* Bacteriol., **44**, 673—685 (1942).
120. *Lankford C. E., Skaggs P. K.* Arch. Biochem., **9**, 265—283 (1946).
121. *Lankford C. E., Snell E. E. J.* Bacteriol., **45**, 410—411 (1943).
122. *La Page S. P., Shelton J. E., Mitchell T. G.* In: J. R. Norris and D. W. Ribbons (eds.), Methods in microbiology, vol. 3A, p. 1—133, Academic Press, Inc., New York, 1970.
123. *Larsen H. J.* Bacteriol., **64**, 187—196 (1952).
124. *Larsen H.* In: H. Gest, A. San Pietro and L. P. Vernon (eds.), Bacterial photosynthesis, p. 509, The Antioch Press, Yellow Springs, Ohio, 1963.
125. *Lechevalier H. A., Solotorovsky M., McDurmont C. I. J.* Gen. Microbiol., **26**, 11—18 (1961).
126. *Lechevalier M. P., Lechevalier H. H., Holbert P. E.* Ann. Inst. Pasteur Paris, **114**, 277—285 (1968).
127. *Lennette E. H., Balows A., Hausler W. J., Jr., Truant J. P. (eds.).* Manual of clinical microbiology, 3rd ed., p. 965—999, American Society for Microbiology, Washington, D. C., 1980.
128. *Lewin R. A.* Can. J. Microbiol., **8**, 555—563 (1962).
129. *Lewin R. A.* Can. J. Microbiol., **16**, 511—515 (1970).
130. *Lewin R. A., Lounsberry D. M. J.* Gen. Microbiol., **58**, 145—157 (1969).
131. *Lubin M.* In: J. H. Hoffman (ed.). The cellular function of

- membrane transport, p. 193—209, Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, N. J., 1964.
132. Luedemann G. M. J. Bacteriol., **96**, 1848—1858 (1968).
 133. Luria S. E., Burrows J. W. J. Bacteriol., **74**, 461 (1957).
 134. MacLeod R. A., Snell E. E. J. Bacteriol., **59**, 783—792 (1950).
 135. Mager J., Kindler S. H., Grossowicz N. J. Gen. Microbiol., **10**, 130—141 (1954).
 136. Mah R. A., Fung D. Y. C., Morse S. A. Appl. Microbiol., **15**, 866—870 (1967).
 137. Marshak A. J. Bacteriol., **61**, 1—16 (1951).
 138. Matsumae A. M., Obtani M., Takeshima H., Hata T. J. Antibiot., **21**, 616—625 (1968).
 139. McCleskey C. S. J. Bacteriol., **64**, 140—141 (1952).
 140. McCurdy H. D. Can. J. Microbiol., **10**, 935—936 (1964).
 141. McCurdy H. D. Can. J. Microbiol., **15**, 1453—1461 (1969).
 142. McCurdy H. D. In: R. E. Buchanan and N. E. Gibbons (eds.), *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 8th ed., p. 87—88, The Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1974.
 143. Mickelson M. N. J. Bacteriol., **88**, 158—164 (1964).
 144. Midgley J., Lapage S. P., Jenkins B. A. G., Barrow G. I., Roberts M. E., Buck A. G. J. Med. Microbiol., **3**, 91—98 (1970).
 145. Mildvan A. S. In: P. D. Boyer (ed.), *The enzymes*, student edition, vol. 2, p. 445—536, Academic Press, Inc., New York, 1970.
 146. Miller T. L., Evans J. B. J. Gen. Microbiol., **61**, 131—135 (1970).
 147. Mitchell T. G., Hendrie M. S., Shewan J. M. J. Appl. Bacteriol., **32**, 40—50 (1969).
 - 147a. Moss C. W., Dowell V. R., Jr., Farshchi D., Ranier L. J., Cherry W. B. J. Bacteriol., **97**, 561—570 (1969).
 148. Moss C. W., Dowell V. R. Jr., Lewis W. J., Schekter M. A. J. Bacteriol., **94**, 1300—1305 (1967).
 149. Mueller J. H. J. Bacteriol., **36**, 499—515 (1938).
 150. Mulder E. G. J. Appl. Bacteriol., **27**, 151—173 (1964).
 151. Mulder E. G., van Leen W. L. In: R. E. Buchanan and N. E. Gibbons (eds.), *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 8th ed., p. 133, The Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1974.
 152. Myers W. F., Cutler L. D., Wisseman C. L., J. Bacteriol., **97**, 663—666 (1969).
 153. Norris D. O. Nature (London), **182**, 734—735 (1958).
 154. Ormerod J. G., Ormerod K. S., Gest H. Arch. Biochem. Biophys., **94**, 449—463 (1961).
 155. Oxender D. L. Annu. Rev. Biochem., **41**, 777—814 (1972).
 156. Pan S. F., Yee R., Gezon H. M. J. Bacteriol., **73**, 402—409 (1957).
 157. Perry J. J., Evans J. B. J. Bacteriol., **91**, 33—38 (1966).
 158. Pfennig N., Lippert K. D. Arch. Mikrobiol., **55**, 245—256 (1966).
 159. Phillips J. E. In: R. E. Buchanan and N. E. Gibbons (eds.), *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 8th ed., p. 373—374, The Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1974.
 160. Pine L., Watson S. J. J. Lab. Clin. Med., **54**, 107—114 (1959).
 161. Pittman K. A., Bryant M. P. J. Bacteriol., **88**, 401—410 (1964).
 162. Poindexter J. S. Bacteriol. Rev., **28**, 231—295 (1964).

163. *Postgate J. R. J. Gen. Microbiol.*, **14**, 545—572 (1956).
164. *Postgate J. R., Campbell L. L. J. Bacteriol.*, **86**, 274—279 (1963).
165. *Pratt D. J. Bacteriol.*, **64**, 651—665 (1952).
166. *Pridham T. G., Gottlieb D. J. Bacteriol.*, **56**, 107—114 (1948).
167. *Puttlitz D. H., Seeley H. W., Jr. J. Bacteriol.*, **96**, 931—938 (1968).
168. *Rabinowitz J. C., Snell E. E. J. Biol. Chem.*, **169**, 631—642 (1947).
169. *Razin S. Microbiol. Rev.*, **42**, 414—470 (1978).
170. *Razin S., Cohen A. J. Gen. Microbiol.*, **30**, 141—154 (1963).
171. *Razin S., Tully J. G. J. Bacteriol.*, **102**, 306—310 (1970).
172. *Reichigl M., Jr. (ed.). CRC handbook series in nutrition and food*, sect. G, vol. 3, p. 83—281, CRC Press, Cleveland, 1978.
173. *Reich C. V., Hanks J. H. J. Bacteriol.*, **87**, 1317—1320 (1964).
174. *Reichenback H. Arch. Mikrobiol.*, **70**, 119—138 (1970).
175. *Reichenback H., Dworkin M. J. Gen. Microbiol.*, **58**, 3—14 (1969).
176. *Reyn A. In: R. E. Buchanan and N. E. Gibbons (eds.), Bergey's manual of determinative bacteriology*, 8th ed., p. 432—433, The Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1974.
177. *Rockenmacker M., James H. A., Elberg S. S. J. Bacteriol.*, **63**, 785—794 (1952).
178. *Rode L. J., Ogelsby G., Schuhardt V. T. J. Bacteriol.*, **60**, 661—668 (1950).
179. *Rogosa M. J. Bacteriol.*, **87**, 162—170 (1964).
180. *Rogosa M. J. Bacteriol.*, **87**, 574—587 (1964).
181. *Rogosa M. J. Bacteriol.*, **98**, 756—766 (1969).
182. *Rogosa M. Int. Syst. Bacteriol.*, **21**, 187—189; 231—233 (1971).
183. *Roth J. R. Methods Enzymol.*, **17A**, 6 (1970).
184. *Rothwell F. M. Mycologia*, **49**, 68—72 (1957).
185. *Rowatt E. J. Gen. Microbiol.*, **17**, 297—326 (1957).
186. *Sanders T. H., Higuchi K., Brewer C. R. J. Bacteriol.*, **66**, 294—299 (1953).
187. *Sanderson K. E. Bacteriol. Rev.*, **31**, 354—372 (1967).
188. *Schubert R. H. W. In: R. E. Buchanan and N. E. Gibbons (eds.), Bergey's manual of determinative bacteriology*, 8th ed., p. 345—346, The Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1974.
189. *Scotten H. L., Stokes J. L. Arch. Microbiol.*, **42**, 353—368 (1962).
190. *Sebald M., Vernon M. Ann. Inst. Pasteur Paris*, **105**, 897—910 (1963).
191. *Sebrell W. H., Harris R. S. (eds.). The vitamins*, 2nd ed., vol. 2, 4, 5, 7, Academic Press, Inc., New York, 1954—1972.
192. *Shenberg E. J. Bacteriol.*, **93**, 1598—1606 (1967).
193. *Shivers D. W., Brock T. D. J. Bacteriol.*, **114**, 706—710 (1973).
194. *Sijpesteijn A. K., Fahraeus G. J. Gen. Microbiol.*, **3**, 224—234 (1949).
195. *Skeggs H. R., Wright L. D., Gresson E. L., NacRae G. D. E., Hoffman C. H., Wolf D. E., Folkers K. J. Bacteriol.*, **72**, 519—524 (1956).
196. *Skerman T. M., Jayne-Williams D. J. J. Appl. Bacteriol.*, **29**, 167—178 (1966).
197. *Slack J. M. In: R. E. Buchanan and N. E. Gibbons (eds.), Bergey's manual of determinative bacteriology*, 8th ed., p. 671—673, The Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1974.

198. *Slotnick I. J., Dougherty M.* *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol.*, **30**, 261—272 (1964).
199. *Slotnick I. J., Dougherty M.* *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol.*, **31**, 355—360 (1965).
200. *Smith C. F.* *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **88**, 628—631 (1955).
201. *Smith P. F., Langworthy T. A., Smith M. R.* *J. Bacteriol.*, **124**, 884—892 (1975).
202. *Smith P. H., Hungate R. E.* *J. Bacteriol.*, **75**, 713—718 (1958).
203. *Sneath P. H. A.* *Iowa State J. Sci.*, **34**, 243—500 (1960).
204. *Snell E. E.* In: *P. Gyorgy (ed.), Vitamin methods*, vol. 1, p. 327—505, Academic Press, Inc., New York, 1950.
205. *Snell E. E.* In: *J. H. Yoe and H. J. Koch, Jr. (eds.), Trace analysis*, p. 547—574, John Wiley and Sons, Inc., New York, 1957.
206. *Snell E. E., Wright L. D.* *J. Biol. Chem.*, **139**, 675—686 (1941).
207. *Sperry J. F., Wilkins T. D.* *J. Bacteriol.*, **127**, 780—784 (1976).
208. *Stadtman E. R., Stadtman T. C., Pastan I., Smith L. D.* *S. J. Bacteriol.*, **110**, 758—760 (1972).
209. *Stadtman T. C., Barker H. A.* *J. Bacteriol.*, **61**, 67—80 (1951).
210. *Stadtman T. C., Barker H. A.* *J. Bacteriol.*, **62**, 269—280 (1951).
211. *Staley J. T.* *J. Bacteriol.*, **95**, 1921—1942 (1968).
212. *Stanier R. Y.* *Bacteriol. Rev.*, **6**, 143—196 (1942).
213. *Stanier R. Y., Palleroni N. J., Doudoroff M. J.* *Gen. Microbiol.*, **43**, 159—271 (1966).
214. *Starr M. P.* *J. Bacteriol.*, **51**, 131—143 (1946).
215. *Starr M. P.* *J. Bacteriol.*, **52**, 187—194 (1946).
216. *Steele B. F., Sauberlich H. E., Reynolds M. S., Baumann C. A.* *J. Biol. Chem.*, **177**, 533—551 (1949).
217. *Steinman H. G., Eagle H., Oyama V. I.* *J. Bacteriol.*, **64**, 265—269 (1952).
218. *Steinman H. G., Eagle H., Oyama V. I.* *J. Biol. Chem.*, **200**, 775—785 (1953).
219. *Stekes J. L.* *J. Bacteriol.*, **67**, 278—291 (1954).
220. *Szaniszlo P. J.* *J. Elisha Mitchell Sci. Soc.*, **84**, 24—26 (1968).
221. *Tamura G. J.* *Gen. Appl. Microbiol.*, **2**, 431—434 (1956).
222. *Tamura G.* *Bull. Agric. Chem. Soc. Jpn.*, **21**, 202 (1957).
223. *Tehan Y. T.* *Proc. Linn. Soc., N. S. W.*, **78**, 85—89 (1953).
224. *Thiele H. H.* *Arch. Mikrobiol.*, **60**, 124—138 (1968).
225. *Thiemann J. E., Beretta G.* *Arch. Mikrobiol.*, **62**, 157—166 (1968).
226. *Thiemann J. E., Pagani H., Beretta G.* *Arch. Mikrobiol.*, **58**, 42—52 (1967).
227. *Thompson R. S., Leadbetter E. R.* *Arch. Mikrobiol.*, **45**, 27—39 (1963).
228. *Tsukiura H., Okanishi M., Koshiyama H., Ohmori T., Miyaki T., Kawaguchi H.* *J. Antibiot. Ser. A*, **17**, 223—229 (1964).
229. *Van Veen W. L., Mulder E. G., Deinema M. H.* *Microbiol. Rev.*, **42**, 329—356 (1978).
230. *Vogel H. J., Bonner D. M.* *J. Biol. Chem.*, **218**, 97 (1956).
231. *Vogler K. G., Umbreit W. W.* *Soil Sci.*, **51**, 331—337 (1941).
232. *Waksman S. A.* *The Actinomycetes*, vol. 2, p. 328—334, The Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1961.
233. *Waksman S. A., Umbreit W. W., Cordon T. C.* *Soil Sci.*, **47**, 37—61 (1939).

234. *Waldie E. L.* Iowa State Coll. J. Sci., **19**, 435—484 (1945).
235. *Watson S. W.* Arch. Mikrobiol., **75**, 179—188 (1971).
236. *Watson S. W.* Int. J. Syst. Bacteriol., **21**, 254—270 (1971).
237. *Watson S. W., Graham L. B., Remsen C. C., Valois F. W.* Arch. Mikrobiol., **76**, 183—203 (1971).
238. *Watson S. W., Waterbury J. B.* Arch. Mikrobiol., **77**, 203—230 (1971).
239. *Weeks O. B.* J. Appl. Bacteriol., **32**, 13—18 (1969).
240. *Weinman D.* In: D. Weinman and M. Ristic (eds.), Infectious blood diseases of man and animals, vol. 2, p. 3—24, Academic Press, Inc., New York, 1968.
241. *Welshimer H. J.* J. Bacteriol., **85**, 1156—1159 (1963).
242. *Werkman C. H., Gillen G. F.* J. Bacteriol., **23**, 167—182 (1932).
243. *White D. C., Leidy G., Jamison J. D., Shope R. E.* J. Exp. Med., **120**, 1—12 (1964).
244. *Wilson G. S., Miles A. A.* Topley and Wilson's principles of bacteriology and immunology, 5th ed., vol. 1, p. 849—865, The Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1964.
245. *Winogradsky H.* In: R. E. Buchanan and N. E. Gibbons (eds.), Bergey's manual of determinative bacteriology, 8th ed., p. 454—455, The Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1974.
246. *Zavarzin G., Legunkova R. J.* Gen. Microbiol., **21**, 186—190 (1959).
247. *Zimmerman K., Rogers K. B., Frazer J., Boyce J. M.* J. Pathol. Bacteriol., **96**, 413—419 (1968).

ПОЛУЧЕНИЕ НАКОПИТЕЛЬНЫХ И ЧИСТЫХ КУЛЬТУР

Н. Криг

В условиях естественного обитания чистые бактериальные культуры встречаются довольно редко. Тем не менее основная часть современных представлений о свойствах бактерий, а также их взаимоотношениях получена при изучении чистых культур. Поэтому часто возникает необходимость выделить в виде чистых культур различные виды бактерий, которые сосуществуют в естественных условиях. Накопление представляет собой основной этап процесса, который позволяет получить чистые культуры. Оно также дает возможность оценить различные воздействия факторов окружающей среды на смешанную микробную популяцию, благодаря которым может происходить отбор микроорганизмов, способных взаимодействовать со специфическими субстратами (или расщеплять их) или способных хорошо расти в необычных условиях.

Выделение чистой культуры данного микроорганизма будет успешным, если он присутствует в смешанной популяции в достаточно высокой пропорции. Микроорганизм легко выделить, если он количественно преобладает в смешанной популяции. Разработанные методы накопления имеют целью добиться увеличения относительного количества данного организма благодаря созданию лучших условий для его роста и выживания по сравнению с другими или путем пространственного отделения его от других членов популяции. *К физическим методам*, которые могут быть использованы в данном случае, следует отнести регуляцию роста температурой, тепловую обработку, ультразвуковую обработку и ультрафиолетовое облучение, приводящие к гибели или подавлению роста других организмов, присутствующих в популяции. Можно также использовать преимущества в некоторых физических свойствах изучаемого микроорганизма, таких, как его размеры и подвижность; это

позволяет в значительной мере отделить данный организм от других в популяции. В химических методах используют токсичные вещества, которые убивают или подавляют рост оставшейся части популяции, не влияя на выделяемый микроорганизм. Кроме того, эти вещества могут быть источниками питания, используемыми преимущественно отдельными бактериями в смешанной популяции. Биологические методы включают использование специфических хозяев для выделяемого организма, а также преимуществ некоторых патогенных свойств микроорганизма (например, его инвазивность), которыми не обладают другие представители популяции. Во многих случаях для получения максимального эффекта накопления сочетают физические, химические и биологические методы.

Как правило, накопительные культуры получают в закрытых системах, т. е. микроорганизмы выращивают в обычных периодических (стационарных) условиях в колбах или пробирках, где концентрация питательных веществ и продуктов метаболизма постоянно изменяется в процессе их роста. Для получения накопительных культур используются также открытые системы. Например, с помощью хемостата можно обеспечить постоянство окружающей среды для бактерий, непрерывно подавая питательные вещества в концентрации, лимитирующей рост, и удаляя продукты метаболизма. Изменяя скорость разбавления среды в хемостате, можно контролировать концентрацию питательных веществ, лимитирующих рост. В свою очередь это может избирательно влиять на скорость роста различных организмов в смешанной бактериальной культуре, в результате чего один или другой организм смешанной популяции начинает количественно преобладать.

Из накопительных культур бактерии обычно выделяют путем их пространственного отделения от других форм на твердой среде, где они растут в виде колоний. Для микроорганизмов, не растущих на твердых средах, можно использовать метод предельного разведения, последовательно перенося клетки в отдельные пробирки с жидкой средой. Поскольку обычные методы выделения не дают абсолютной гарантии чистоты получаемых культур, некоторые исследователи применяют более

сложные приемы, с помощью которых отдельную бактериальную клетку выделяют из смешанной популяции, используя для получения клона микроскопический контроль.

В этой главе мы приведем специфические примеры огромного многообразия и нередко изощренности методов накопления, используемых в бактериологии. Во многих случаях для получения накопительной культуры определенной бактерии используют несколько различных подходов. Основное внимание в этой главе будет уделено практическим аспектам получения накопительных культур и выделения бактерий, однако в конце главы приведены ссылки на общие обзоры [1—4], в которых можно найти подробную информацию об используемых при этом принципах. Получение накопительных культур и выделение мутантных штаммов рассматриваются в разд. 13.4—13.6.

8.1. БИОФИЗИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

8.1.1. Инкубация при низкой температуре для получения культур психрофилов и психротрофов [52]

Поскольку низкая температура способствует задержке роста многих бактерий, но не влияет на рост психрофилов и психротрофов, прежде чем начать выделение бактерий, культуры инкубируют при температуре 0—5°C. Так, Ину [31] удалось изолировать психрофильные бактерии из почвы Антарктиды, внося разведенную суспензию бактерий в чашки с агаром, содержащим глюкозу, дрожжевой экстракт и пептон. Чашки инкубировали при температуре ниже 5°C в течение 14—24 дней. Таким методом были получены девять штаммов бактерий с оптимальной температурой для роста около 20°C, т. е. это были облигатные психрофилы [32].

8.1.2. Инкубация при низкой температуре для получения культур *Listeria monocytogenes* [39]

Клетки *Listeria* с трудом поддаются выделению из клинического материала, содержащего большое количе-

ство других бактерий (это материал из шейки матки, влагалища, мекония, фекалий, носоглотки или тканей). Весьма полезной для получения накопительной культуры этой бактерии оказалась предлагаемая ниже процедура. Мазки помещают в пробирки с 5 мл бульона для листерий (разд. 8.2.25) и закрывают их завинчивающимися крышками. В случае проб из фекалий и тканей готовят 10%-ную (объем/объем) суспензию в бульоне для листерий. Бульон можно хранить при 4°C до 3 мес. Поэтому целесообразно проводить выделение в первые 4 нед с недельными интервалами и затем делать месячный перерыв. При хранении на холоду бульон обогащается *Listeria*. Это обусловлено лучшим по сравнению с другими бактериями выживанием листерий при 4°C [84], их способностью размножаться при 4°C [67] и выходом микроорганизма из клеток ткани [15]. После такого обогащения на холоду 0,2 мл суспензии переносят в пробирку с 5 мл бульона для листерий, содержащего KCNS (до стерилизации бульона к нему добавляют 3,75% тиоцианата калия), и инкубируют 48 ч при 25°C. Для получения отдельных колоний петлю вводят непосредственно под поверхность среды и переносят ее на поверхность чашек с агаром Мак-Брайда для листерий (разд. 8.5.29).

8.1.3. Инкубация при высокой температуре для получения культур термофилов [6]

В отличие от термофилов рост остальных микроорганизмов при высокой температуре подавляется. Поэтому для обогащения термофилами смешанную культуру инкубируют при достаточно высокой температуре. Например, в случае молочнокислых термофилов серийные разведения молока пересевают в чашки со стандартной агаровой средой (разд. 8.5.48) и инкубируют их при 55°C.

8.1.4. Инкубация при высокой температуре для получения культур *Thermus aquaticus* [11]

T. aquaticus имеет оптимальную температуру роста 70—72°C; эта бактерия не растет при температуре ниже 40°C и выше 79°C. Ее можно выделить из горячей

водопроводной воды, микробных матов, из горячих источников или рек, загрязненных горячими сточными водами. С этой целью исследуемые пробы добавляют к 10 мл основной солевой среды (разд. 8.5.7), содержащей 0,1% панкреатического гидролизата казеина и 0,1% дрожжевого экстракта. Инкубируют без встряхивания при 70—75 °C и следят за изменением мутности в течение 1—2 дней. Если мутность увеличивается, микробная масса обычно приобретает желтый или оранжевый цвет. Суспензию исследуют под микроскопом с целью обнаружения коротких и длинных нитей или сферопластов. Чистую культуру выделяют путем посева на чашки с той же средой, содержащей 3% агара. На чашках ищут компактные разрастающиеся желтые колонии, состоящие из нитевидных микроорганизмов.

8.1.5. Нагревание для получения культур термоустойчивых микроорганизмов [6]

Пробы сырого молока пастеризуют нагреванием до 62,8 °C и выдерживают их при этой температуре в течение 30 мин, затем их охлаждают, разводят, переносят на стандартную агаровую среду (разд. 8.5.48) и инкубируют чашки при 32 °C.

8.1.6. Нагревание для получения культур мезофильных спорообразующих бактерий

Пробы воды или взвеси почвы нагревают до 80 °C, выдерживают 10 мин и затем наносят штрихом на поверхность твердой среды в чашках. Для штаммов *Bacillus* обычно используют питательный агар; штаммы *Clostridium* засевают по стенке вращающейся пробирки с восстановленным мясным агаром (разд. 20.3.10) или на поверхности свежеприготовленной агаровой среды и инкубируют в анаэробе.

Если в пробах есть небольшое количество спор, то их число можно увеличить, внеся пробы в подходящую для споруляции среду и инкубируя культуру в течение 2—21 дней перед тепловой обработкой. Для большинства видов *Bacillus* средой, на которой происходит образование спор, является питательный бульон (разд.

20.3.25), содержащий 0,5% дрожжевого экстракта, $7 \cdot 10^{-4}$ М CaCl_2 , $1 \cdot 10^{-3}$ М MgCl_2 и $5 \cdot 10^{-5}$ М MnCl_2 . Для большинства видов *Clostridium* не существует оптимальной среды для образования спор, однако известно, что их споруляцию можно вызвать инкубацией в мясной среде (разд. 20.3.10) как в присутствии глюкозы, так и в ее отсутствие [27].

Еще один способ получения накопительных культур заключается в добавлении проб, содержащих споры, к соответствующей среде, которую затем прогревают 10 мин при 80 °С и инкубируют около 1 сут. Выросшую культуру высевают на твердые среды. Для видов *Bacillus* наиболее подходящей средой является питательный бульон с 0,5% дрожжевого экстракта, а для *Clostridium* — восстановленный крахмальный бульон (бульон РУ+1% растворимого крахмала; разд. 20.3.28).

Для некоторых спорообразующих бактерий иногда приходится изменять режим тепловой обработки, поскольку эндоспоры разных штаммов могут различаться по термоустойчивости. Поэтому, если не удастся получить удовлетворительных результатов при стандартной температуре 80 °С, ее следует снизить до 75 или 70 °С.

8.1.7. Нагревание для получения культур термофильных спорообразующих бактерий [6]

Термофильные спорообразующие бактерии встречаются в различных сладких веществах, используемых при изготовлении мороженого. Обычно готовят 20%-ную пробу исследуемого объекта (свекловичный или тростниковый сахар, лактоза, церелоза, искусственный, кукурузный или кленовый сироп, кукурузный или жидкий сахар, мед), выдерживают ее 5 мин при 100 °С и затем доводят стерильной водой до конечной концентрации 13,3%.

Получение культур термофильных аэробных слабоацидофильных микроорганизмов

2 мл прокипяченного раствора сахара наносят на поверхность глюкозо-триптонового агар в чашках Петри (разд. 8.5.20) и инкубируют 48 ч во влажной камере

при 55 °С. Характерные колонии круглой формы (2—5 мм в диаметре) с темной центральной частью, окруженные желтым ореолом, растут на поверхности агара. Колонии, растущие под поверхностью агара, более компактны и имеют размеры булавочной головки. Их следует пересеять на глюкозо-триптовый агар.

Получение культур термофильных анаэробов, образующих сероводород

Пробы прокипяченного раствора сахара вносят в глубокие пробирки, содержащие сульфитный агар (1% триптона или триптиказы, 0,1% сульфита натрия и 2% агара). Перед инокуляцией агар в пробирках должен быть расплавлен и охлажден до 55 °С. Содержимому пробирок дают застыть и затем инкубируют при 55 °С в течение 72 ч. Бактерии, выделяющие сероводород, образуют в среде темные сферические зоны.

8.1.8. Нагревание для получения культур *Bacillus fastidiosus* [41]

0,2 г почвы добавляют к 50 мл среды, содержащей 1% мочевой кислоты и 0,1% K_2HPO_4 в дистиллированной воде. Пробу инкубируют с встряхиванием в течение 48 ч, нагревают до 80 °С и выдерживают 15 мин при этой температуре, а затем переносят в чашку с агаром, приготовленным на этой же среде. В этом методе учитывается не только термоустойчивость *B. fastidiosus*, но также и то, что данная бактерия способна использовать источники углерода и энергии, недоступные другим микроорганизмам.

8.1.9. Нагревание для получения культур *Bacillus pasteurii* [82]

Споры разлагающей мочевины бактерии *B. pasteurii* обладают высокой термоустойчивостью и способны расти на средах с таким значением pH, при котором большинство других видов не растет. Последнее свойство используется в описываемом ниже методе. Для роста *B. pasteurii* значение pH должно быть выше 8. После

нагревания суспензии почвы (для сохранения исключительно спор) пробы инкубируют при 30 °С в щелочной накопительной среде (1% дрожжевого экстракта и 5% мочевины), простерилизованной фильтрованием. После завершения роста культуру пересевают на твердую щелочную среду Уилли и Стокса (разд. 8.5.58) для получения отдельных колоний.

8.1.10. Использование роения клеток

Clostridium tetani для получения их культур [71]

Пробы из почвы, испражнений животных и клинического материала инокулируют в небольшой участок свежеприготовленного кровяного агара (разд. 20.3.7). Чашки инкубируют при 37 °С в анаэроостате в течение 1 дня и затем внимательно исследуют поверхность агара на наличие так называемой зоны роящихся клеток (швармеров), которые в виде тонкой пленки распространяются за пределы зоны инокуляции. Для того чтобы убедиться в существовании процесса роения, иногда полезно поскрести иглой поверхность агара. Отбирают пробы с края зоны роения и переносят их в бульон, а затем засевают по поверхности твердой среды (5% агара) для получения отдельных колоний.

8.1.11. Использование подвижности трепонем для получения их культур [24—26, 61—63]

В центре соответствующей агаровой среды (разд. 8.5.42), находящейся в чашке Петри или в мензурке, вырезают углубление не менее 7 мм глубиной и 2—10 мм в диаметре (углубление не должно достигать дна). В это углубление вносят пробы, полученные из ротовой полости, кишечного содержимого или каловых масс. Крупные углубления (диаметр 10 мм) инокулируют 0,2 мл образца, а в небольшие углубления (диаметр 2 мм) пробу вносят косым уколом в их стенку. Важно не допускать попадания проб на поверхность агара. Сразу же после внесения проб чашки помещают в анаэроостат (разд. 6.6.3) и инкубируют их от 4 до 7 дней при 37 °С. В отличие от большинства других бактерий трепонемы могут мигрировать через агаровую среду.

Там, где они растут, на некотором расстоянии от углублений наблюдается помутнение среды. Из периферической зоны помутневшей области отбирают часть выросшей культуры и переносят ее в соответствующую предварительно восстановленную полужидкую среду (например, бульон, содержащий 0,15% агара). Поскольку можно ожидать присутствия нескольких видов трепонем, субкультуру рассеивают по стенке вращающейся пробирки с предварительно восстановленной средой для получения отдельных колоний. Колонии образуют в среде мутные белесые плотные зоны.

8.1.12. Использование подвижности клеток

Spirillum volutans для получения их культур [30, 60]

Для получения накопительной культуры гигантских микроаэрофильных бактерий *S. volutans* готовят настой сена на стоячей прудовой воде. После появления на поверхности настоя пены из-под нее отбирают пробы и исследуют их. Ищут очень крупные спирали (1,4—1,7 мкм в диаметре и до 60 мкм в длину) с биполярно расположенными пучками жгутиков, которые хорошо видны при микроскопии в темном поле. Для получения накопительной культуры немного сенного настоя вносят в почвенную среду Прингсхейма (разд. 8.5.41) и инкубируют при комнатной температуре. Однако даже при такой процедуре накопления другие бактерии явно количественно превосходят *S. volutans*. *S. volutans* выделяют также с помощью метода капиллярной трубки, впервые предложенного Гезбергером [60]. Размягчают на огне центральную часть стерильной стеклянной трубки (диаметр 5 мм), заткнутой ватными пробками. На размягченном участке трубку зажимают пинцетом с квадратными концами так, чтобы она почти полностью была пережата. Вновь нагревают уплощенную часть трубки и быстро вытягивают ее, чтобы образовался длинный (15—30 см) капилляр шириной 0,1—0,3 мм, имеющий овальное поперечное сечение. Концы капилляра запаивают на огне, а затем с помощью стерильного пинцета ломают капилляр у одного конца и втягивают в него на длину от 10 до 20 см стерильную почвенную среду Прингсхейма (супернатант). После этого капил-

ляр погружают в накопительную культуру и набирают в него еще 2—4 см этой культуры, убедившись, что между стерильной средой и культурой нет воздушного пространства. Кончик капилляра запаивают, оставляя небольшое воздушное пространство, и помещают капилляр на предметный столик микроскопа (100X). В накопительной культуре *S. volutans* часто способны двигаться быстрее, чем другие бактерии, и, следовательно, они быстрее достигают отдаленного конца капилляра. Как только спириллы достигнут этого конца, капилляр за ними ломают, переносят их в пробирку с полужидкой средой CHSS (разд. 8.5.15) и инкубируют при 30 °C. Чистоту выделенной культуры проверяют с помощью фазово-контрастной микроскопии.

8.1.13. Использование скользящей подвижности *Cytophaga* и *Flexibacter* для получения их культур

Разведенные пробы (из почвы, воды или помета животных, контактировавшего с почвой) рассеивают на поверхности агаровой среды с низкой концентрацией питательных веществ, например с 0,1% тритона или триптиказы, либо с разведенным в 10 раз питательным агаром. В другом варианте пробы, представляющие собой измельченные листья наземных растений, водорослей или морских растений, размазывают по поверхности обедненного агара. *Cytophaga* и *Flexibacter* обладают способностью мигрировать по поверхности твердой среды. Их можно обнаружить по появлению тонких и часто почти полупрозрачных колоний с пальцевидными выступами, которые разрастаются далеко за зону нанесения исходного материала. Из этих колоний получают субкультуру. Для подавления роста других бактерий часто оказывается полезным включение в агаровую среду пенициллина G (15 ед/мл) и хлорамфеникола (5 мкг/мл) [79].

8.1.14. Использование скользящей подвижности *Beggiatoa* для получения их культур [19, 64]

Beggiatoa образует нити, состоящие из бесцветных клеток. Такие нити способны скользить по поверхности. *Beggiatoa* встречается в аэробных условиях в пресной

или морской воде, богатой H_2S , причем она способна окислять сульфид в элементную серу, которая накапливается в клетках.

Для получения накопительных культур сначала готовят экстрагированное сено. Для этого сено измельчают и кипятят в больших объемах воды. В процессе экстракции воду трижды меняют. Вода в последней порции должна быть янтарного цвета. Сено подсушивают и помещают на поднос в термостат ($37^\circ C$) для окончательного высушивания.

Среду для получения накопительных культур, состоящую из 0,8%-ной суспензии высушенного экстрагированного сена в 70 мл водопроводной воды, вносят в 125-миллилитровые колбы Эрленмейера и закрывают ватными пробками. Затем ее стерилизуют автоклавированием, добавляю к ней 5 мл суспензии ила из пруда, озера или ручья, содержащей гниющий растительный материал, и инкубируют при $25^\circ C$ в течение 10 дней.

О процессе накопления бактерий свидетельствует появление резкого запаха H_2S и образование белой пленки на поверхности среды и на стенках колб. Пленку исследуют на наличие характерных нитей *Beggiatoa*. Часть пленки смывают несколькими порциями стерильной водопроводной воды и затем наносят смывы на поверхность стерильной агаровой среды, содержащей 1% агара и 0,2% мясного экстракта. Пробы инкубируют при температуре $28^\circ C$ до тех пор, пока нити *Beggiatoa* не начнут мигрировать к периферии агара на достаточное расстояние от других микроорганизмов. Агаровые блоки, содержащие единичные изолированные нити, вырезают и помещают на поверхность свежей агаровой среды. После инкубации вновь выделяют отдельные нити. Процедуру селекции повторяют до тех пор, пока культура не станет свободной от других бактерий. Проверка чистоты культур проводится путем посева в различные среды

8.1.15. Использование фильтруемости трепонем для получения их культур [27, 70]

На поверхность агара в чашке Петри с соответствующей средой (разд. 8.5.42) помещают мембранный ультрафильтр с размером пор 0,15 мкм. На фильтр кладут

кольцо диаметром 25—30 мм, слегка смазанное вакуумной смазкой. Затем на центральную часть мембранного фильтра наносят несколько капель разведенной пробы и инкубируют чашку в анаэроостате при 37 °С в течение 1—2 нед. Трепонема достаточно малы; они способны мигрировать через поры фильтра и проникать в расположенный под ним агар, где вызывают помутнение. Кольцо и мембранный фильтр снимают с поверхности агара, с помощью пастеровской липетки удаляют поверхностный слой агара в области помутнения и микроскопируют его в темном поле для выявления трепонем и контаминирующих форм. Методы субкультивирования и очистки культуры описаны в разд. 8.1.11. Подавлению роста сопутствующих бактерий часто способствует добавление в агаровую среду полимиксина В (800 ед./мл) и налидиксовой кислоты (800 ед./мл).

8.1.16. Использование фильтруемости *Campylobacter fetus* для получения их культур [68, 69]

5 г фекальных масс или содержимого из кишечника крупного рогатого скота, овец, свиней или птиц разводят в 50 мл питательного бульона и фильтруют через несколько слоев марли, чтобы удалить крупные частицы. Используя в качестве предварительного фильтра рыхлую стеклянную вату, пропускают фильтрат через мембранный ультрафильтр с размером пор 0,65 мкм. Обмакивают стерильный ватный тампон в фильтрат и густо засевают его в чашках с агаром для бруцелл (разд. 8.5.14). Чашки инкубируют при 37 °С в течение 4—5 дней в микроаэробных условиях (5% O₂, 10% CO₂ и 85% N₂). Подавлению роста других микроорганизмов способствует добавление в среду антибиотиков бацитрацина (2 ед./мл) и новобиоцина (2 мкг/мл).

8.1.17. Использование фильтруемости *Aquaspirillum gracile* для получения их культур [12]

На поверхность агара со средой для выделения (разд. 8.5.1) помещают мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм и наносят в центр этого фильтра 0,05 мл болотной или речной воды. Чашки инкубируют 1,5—2 ч при комнатной температуре, затем снимают фильтр

и продолжают инкубировать не менее 3 дней. Клетки *A. gracile* имеют диаметр 0,2—0,3 мкм, т. е. они достаточно малы и способны проникать через поры ультрафильтра в агар. В агаре находят полупрозрачные области роста и делают из них пересев. Другие бактерии, имеющие малые размеры (мелкие вибрионы, кокки или короткие палочки), также способны проходить через ультрафильтры и образовывать колонии на поверхности среды, но их легко отличить от находящихся под поверхностью агара типичных полупрозрачных колоний *A. gracile*.

8.1.18. Освещение при получении культур одноклеточных цианобактерий [59, 73]

Для выделения пресноводных цианобактерий (сине-зеленых водорослей) пробы из прудов, ручьев или водных резервуаров вносят в пробирки со средой BG-11 (разд. 8.5.8). Для выделения морских цианобактерий используют среду MN (разд. 8.5.32); если некоторые из них плохо растут на этой среде, то предпочтительнее пользоваться средой ASN-III (разд. 8.5.2). Всю стеклянную посуду следует вручную и хорошо прополаскивать водопроводной водой, концентрированной азотной кислотой и затем деионизованной водой. Накопительную культуру инкубируют в водяной бане на свету при 35 °С; при этой температуре подавляется рост большинства водорослей. Пользуются флуоресцентной лампой или лампой накаливания с освещенностью 2000—3000 лк. Для некоторых цианобактерий освещенность следует снизить до 500 лк или ниже. Накопление культуры периодически контролируют до тех пор, пока не убеждаются, что начался рост цианобактерий. Тогда их высевают на поверхность среды, содержащей 2% агара бактериологической степени очистки. Чашки инкубируют в условиях постоянной освещенности (<500 лк) при 25 °С на воздухе или в атмосфере, слегка обогащенной CO₂; для предотвращения испарения в качестве камер следует использовать прозрачные пластмассовые коробки, например из-под овощей. С помощью препаровальной лупы выявляют компактные, сильно пигментированные колонии неподвижных циано

бактерий. Для того чтобы избежать контаминации другими бактериями, может быть необходим многократный рассев культуры. При работе с подвижными цианобактериями небольшую порцию культуры помещают на одну сторону чашки Петри с агаровой средой. Если освещать чашку с противоположной стороны, то цианобактерии начнут перемещаться по поверхности агара в область с большей интенсивностью света. После того как часть микроорганизмов достигнет противоположной стороны чашки Петри, делают пересев в новые чашки столько раз, сколько это необходимо для того, чтобы избавиться от посторонних бактерий. Этот метод был также успешно использован для выделения некоторых нитчатых цианобактерий [73].

Для медленнорастущих цианобактерий, таких, как некоторые штаммы *Pleurocapsales*, исходную культуру можно получить прямым выращиванием колоний на твердой среде, что предпочтительнее, чем предварительное культивирование в жидкой среде [80]. Во время транспортировки обломков камней, раковин, моллюсков или обрывков крупных водорослей из зоны прилива в лабораторию образцы сохраняют в закрытых бутылках или пробирках, содержащих кусочек влажной фильтровальной бумаги. Образцы не следует погружать в морскую воду, так как это способствует развитию посторонних микроорганизмов. В лабораторных условиях делают соскобы с природных субстратов и суспендируют их в стерильной жидкой среде, а также рассеивают в несколько чашек. Если в суспензии содержится много посторонних микроорганизмов, необходимо снизить их количество, прежде чем рассеивать по чашкам. Для этого суспензию промывают несколько раз стерильной средой путем центрифугирования с низкой скоростью.

Для проверки чистоты культур цианобактерий пользуются микроскопом, а также инкубируют культуры на комплексных средах в темноте при 30°C.

8.1.19. Освещение при получении культур *Rhodospirillaceae* [76]

Несмотря на то что представителей сем. *Rhodospirillaceae* относят к пурпурным несерным бактериям, ряд видов этого семейства может использовать в качестве

донора электронов сульфид. Однако это происходит лишь в том случае, когда концентрация сульфида поддерживается на низком, нетоксичном уровне. Поэтому данные микроорганизмы обычно выращивают на средах с органическими донорами электронов. Используя различные источники углерода и витаминов, можно получить культуры тех или иных видов пурпурных бактерий. Как правило, в среду добавляют такие субстраты, которые не могут сбраживаться нефототрофными микроорганизмами.

Виды *Rhodospirillaceae* довольно легко выделяют из пресной воды и морских осадков; труднее изолировать их из почвы полей, газонов и садов. Для получения накопительных культур используют основную среду (разд. 8.5.4) с добавками, указанными в табл. 8.1. 0,1 г образца вносят в пробирку с завинчивающейся крышкой и полностью заполняют ее средой, так чтобы между средой и крышкой не было воздушного пространства. Инкубируют при 25 °С и при постоянном освещении лампой накаливания (50—75 Вт) с расстояния 40—60 см. Необходимо убедиться, что пробирка при этом не нагревается. В течение 3—7 дней наблюдают за увеличением мутности культуры, имеющей коричневую, желтую или розовую окраску. Затем переносят каплю культуры в другую пробирку со средой (табл. 8.1) для вторичного накопления. Для очистки культуры используют твердую среду, содержащую 1% дрожжевого экстракта или пептона, 0,2% малата натрия и 1,5% агара. Засеянную среду разливают по чашкам Петри или в пробирки (разд. 8.4.2). Инкубацию проводят в анаэроstate с постоянным освещением. Многие виды *Rhodospirillaceae* способны также расти в темноте в атмосфере воздуха или в микроаэробных условиях, однако в этих случаях колонии менее пигментированы, чем при их росте на свету в анаэробных условиях.

8.1.20. Освещение при получении культур *Chromatiaceae* и *Chlorobiaceae*

Фототрофные серобактерии, принадлежащие к сем. *Chromatiaceae* и *Chlorobiaceae*, культивировать значительно труднее, чем пурпурные несерные бактерии, хотя

Таблица 8.1. Субстраты и витамины, добавляемые к основной среде¹ для получения накопительных культур *Rhodospirillaceae* [76]

Виды	Субстрат		Витамины
	первичная накопительная культура	вторичная накопительная культура	
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	Этанол или ацетат (2 г/л)	L-Аланин (3 г/л)	Биотин (20 мкг/л)
<i>Rhodopseudomonas capsulata</i>	Пропионат (2 г/л)	Пропионат (2 г/л)	Тиамин (1 мг/л); для некоторых штаммов нужны также биотин и ниацин
<i>Rhodopseudomonas gelatinosa</i>	Изопропанол (2 г/л)	Изопропанол (2 г/л)	Биотин (20 мкг/л); тиамин (1 мг/л); для некоторых штаммов нужен также пантотенат
<i>Rhodopseudomonas spheroides</i>	Этанол или ацетат (2 г/л)	Тартрат (3 г/л)	Биотин (20 мкг/л); тиамин (1 мг/л); ниацин (1 мг/л)
<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	Бензоат (0,5 г/л)	Тиосульфат (2 г/л)	<i>n</i> -Аминобензойная кислота (200 мкг/л); для некоторых штаммов нужен также биотин
<i>Rhodospirillum fulvum</i>	То же	Пеларгонат (0,3 г/л)	<i>n</i> -Аминобензойная кислота (200 мкг/л)
<i>Rhodopseudomonas acidophila</i>	Сукцинат (2 г/л); pH среды довести до 5,1	Сукцинат (2 г/л); pH среды довести до 5,1	Не нужны
<i>Rhodospirillum tenue</i>	Пеларгонат (0,3 г/л)	Пеларгонат (0,3 г/л)	

¹ Состав основной среды для накопления см. в разд. 8.5.4

их массовое развитие («цветение») довольно часто можно наблюдать невооруженным глазом, особенно в морской или солоноватой воде. Однако, если «цветения» не наблюдается, полезно для получения накопительных культур использовать колонку Виноградского. При этом обеспечиваются анаэробные условия и длительное снабжение H_2S , что приводит к обильному росту фототрофных серобактерий, впрочем как и многих других микроорганизмов.

Для приготовления колонки Виноградского используют ил из пресных, солоноватых или морских водоемов, например из береговой части прудов, ручьев, озер или соленых болот. Смешивают 3 части этого ила с одной частью $CaSO_4 \cdot H_2O$ и добавляют немного нерастворимых органических веществ в виде фильтровальной бумаги или корней водных растений. Если используют фильтровальную бумагу, то добавляют также небольшое количество NH_4MgPO_4 . Смесь переливают в высокий стеклянный цилиндр диаметром не менее 5 см и высотой не менее 15 см и перемешивают ее так, чтобы не образовывались воздушные полости. Заполняют цилиндр водой (для выделения морских микроорганизмов используют морскую воду) и проводят инкубацию в темноте в течение 2—3 дней, чтобы свести к минимуму развитие фототрофных микроорганизмов, выделяющих кислород. Цилиндр оставляют при 18—25 °C под лампой накаливания или при естественном освещении в течение всего периода инкубации. Анаэробный распад органического материала в колонке, сопровождающийся образованием CO_2 , спиртов, жирных кислот, оксикислот и других органических кислот и аминов, а также образованием H_2S из $CaSO_4$, обеспечивает рост многих микроорганизмов. При этом фототрофные серобактерии образуют характерные пурпурные, красные или зеленые пятна на стенках цилиндра либо слой или полосы в колонке над границей раздела фаз осадка и воды. При сборе бактерий со стеклянной поверхности или из отдельных слоев для микроскопирования, выделения или дальнейшего накопления в жидких культурах пользуются пастеровскими пипетками. Можно также последовательно снимать порции осадка ложечкой или шпателем. Накопительные культуры можно также получать, ис-

пользуя синтетические жидкие среды. Среда для отдельных видов фототрофных серобактерий подбирают, варьируя условия их культивирования, длину волны света, его интенсивность, температуру инкубации, а также донор электронов и его концентрацию. Более детальное обсуждение возникающих при этом проблем можно найти в очень полезной работе ван Нила [76].

8.1.21. Ультрафиолетовое облучение при получении культур цианобактерий

Очень часто трудно получить культуры цианобактерий, свободные от посторонних микроорганизмов, которые нередко проникают в слизистые чехлы, окружающие клетки и нити цианобактерий. Герлоффу и др. [22] удалось очистить культуры цианобактерий от сопутствующих форм следующим способом. Разведенную суспензию цианобактерий помещали в кварцевую камеру и облучали ультрафиолетовым светом (275 нм), излучаемым покрытой кварцевой рубашкой ртутной лампой. Во время облучения суспензию постоянно перемешивали. При правильно выбранном времени экспозиции сопутствующие микроорганизмы погибали, тогда как цианобактерии оставались жизнеспособными. В процессе облучения периодически отбирали пробы и готовили из них большое количество разведений. Разведенные культуры, в которых выявлялся рост цианобактерий, проверяли на присутствие посторонних форм, микроскопируя пробы, а также высевая их в разные среды.

Одним из недостатков этого метода является то, что в чистой культуре могут содержаться цианобактерии, у которых в результате ультрафиолетового облучения возникли мутации.

8.1.22. Ультразвуковая обработка при получении культур *Sporocytophaga myxococcoides*

Накопительные культуры образующей микроцисты и целлюлолитической бактерии *S. myxococcoides* можно получить, исходя из наличия в жизненном цикле этого организма форм, устойчивых к ультразвуку (Leadbetter, Bacteriol. Proc., p. 42, 1963). 100 мл среды для *Spo-*

rosytophaga (разд. 8.5.47) помещают в 500-миллилитровую колбу Эрленмейера и вносят в нее примерно 0,1 г почвы, ила или растительного материала. После инкубации в течение 7—10 дней при 30°C с периодическим перемешиванием отбирают 5 мл культуры, обрабатывают ее ультразвуком в течение 15—30 с и затем высевают в другую колбу с такой же средой. Через 5—7 дней среда приобретает характерный желтый оттенок. С помощью фазово-контрастной микроскопии находят микроцисты и вегетативные клетки на волокнах целлюлозы и вокруг них. Часть этой культуры вновь обрабатывают ультразвуком и затем для получения отдельных колоний используют метод посева разливом в чашки, как описано в разд. 8.2.25.

8.1.23. Использование антисывороточной агглютинации при получении культур бактерий

Использование антисыворотки может обогатить минорную фракцию в популяции, состоящей из двух видов микроорганизмов. При исследовании смешанной культуры, в которой присутствуют два вида морской спираиллы — крупные и мелкие, Линн и Криг [45] обнаружили, что мелких спираилл значительно больше. Это делало невозможным получение отдельных колоний крупных спираилл методом посева в чашки. Более того, для этих целей не подходил ни один из многочисленных методов селекции. Для получения накопительных культур крупной спираиллы авторы выделили мелкую спираиллу и использовали ее для иммунизации кролика. Когда полученную антисыворотку добавили к смешанной культуре, мелкие спираиллы агглютинировали и осели на дно пробирки. Для получения отдельных колоний методом посева в чашки использовали надосадочную жидкость, содержащую теперь много крупных спираилл.

8.2. БИОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

8.2.1. Щелочные условия инкубации при получении культур *Mycobacterium tuberculosis* [20]

В центрифужную стерильную пробирку (емкостью 50 мл) с завинчивающейся крышкой, содержащую 10 мл

раствора N-ацетил-L-цистеина в NaOH (разд. 8.5.36), добавляют 10 мл исследуемой мокроты. Крышку заворачивают, хорошо перемешивают содержимое в миксере Vortex в течение 5—20 с и оставляют пробирку на 15 мин при комнатной температуре. N-ацетил-L-цистеин является муколитическим веществом, превращающим вязкую мокроту в жидкую, водянистую массу. Гидроксид натрия разрушает многие примеси, присутствующие в мокроте, тогда как клетки *M. tuberculosis* относительно устойчивы к воздействию щелочи. Для нейтрализации гидроксида натрия в пробирку добавляют стерильный 0,067 М фосфатный буфер, не доливая до края 1,3 см, а затем центрифугируют 15 мин при 1800—2400 g, чтобы сконцентрировать микобактерии, и удаляют надосадочную жидкость. К осадку добавляют 1 мл стерильного 0,2%-ного бычьего сывороточного альбумина и осторожно перемешивают. Эту суспензию используют для инокуляции соответствующих культуральных сред (разд. 8.5.26).

8.2.2. Щелочные условия инкубации для получения культур вибрионов [37]

Для получения накопительных культур *Vibrio cholerae* и *V. parahaemolyticus* клинический материал (жидкий стул или соскобы из прямой кишки) сеют легким штрихом на поверхность неселективной агаровой среды, например питательного агара (разд. 20.3.25), и густо засевают по селективной среде типа агара TCBS (разд. 8.5.50). Материал, полученный из мазков жидкого кала, инокулируют также в питательный бульон (1% пептона, pH 8,4—8,5). В случае выделения *V. parahaemolyticus* к этому пептонному бульону добавляют 3% NaCl. При высоких значениях pH агара TCBS и питательного бульона рост большинства посторонних бактерий подавляется. В случае *V. cholerae* инкубация в бульоне продолжается от 6 до 8 ч при 35 °C, после чего делают пересев штрихом на неселективную и селективную агаровые среды. Для *V. parahaemolyticus* инкубация в бульоне продолжается ночь, после чего делают пересев на агар TCBS. Колонии *V. cholerae* в чашках имеют желтый цвет (сбраживают сахарозу) и

оксидазоположительны. Колонии *V. parahaemolyticus* имеют голубовато-зеленый цвет и также оксидазоположительны.

8.2.3. Кислые условия инкубации для получения культур лактобацилл [46]

Для выделения лактобацилл из сыров типа Чеддер делают посев штрихом из разведений на модифицированную среду Рогозы (разд. 8.5.33). Эта среда за счет ацетатной буферной системы имеет pH 5,35. При этих значениях pH такие лактобациллы, как *L. casei* и *L. plantarum*, способны образовывать колонии, тогда как обычная молочнокислая бактерия *Streptococcus lactis* не растет.

8.2.4. Кислые условия инкубации для получения культур *Thiobacillus thiooxidans* [78]

Пробы почвы, ила или воды (лучший источник — морской ил) вносят в среду для *T. thiooxidans* (разд. 8.5.53). После 3—4 дней инкубации pH должен снизиться до 2,0, при котором растут преимущественно эти кислотоустойчивые микроорганизмы. Очистку культур производят путем посева штрихом на твердую среду.

8.2.5. Ингибирование теллуридом для получения культур коринебактерий и некоторых стрептококков

В соответствующих концентрациях теллурид калия подавляет рост грамотрицательных бактерий и большинства грамположительных бактерий. Для селекции таких коринебактерий как *C. diphtheriae*, к кровяному агару с цистином добавляют калиевую соль теллурида в концентрации 0,0375% (разд. 8.5.16). В результате восстановления теллурида колонии коринебактерий при обретают серый или черный цвет. Для селекции некоторых стрептококков (*S. mitis*, *S. salivarius* и энтерококков) используют калиевую соль теллурида в концентрации 0,001%, которую добавляют к специальной среде с агаром (разд. 8.5.31). *S. mitis* образуют очень мелкие синие колонии, *S. salivarius* — более крупные синие ко-

лонии типа «приклеенной капли», а энтерококки — небольшие черно-синие колонии.

8.2.6. Ингибирование таллием для получения культур микоплазм и энтерококков [10, 38]

Для выделения микоплазм из дыхательных путей к Е-агару (разд. 8.5.17) и Е-бульону (разд. 8.5.18) добавляют ацетат таллия в концентрации 0,032%. Экстракты проб тампоном переносят в жидкую среду (2 мл), содержащую соевую муку и гидролизат казеина (разд. 8.5.45) и 0,5% бычьего сывороточного альбумина. 0,1 мл суспензии инокулируют в двухфазную среду Е (разд. 8.5.17), а также в чашки с агаром, приготовленным на среде Е. Культуру выращивают в аэробных условиях при 37°C, поместив чашки в закрытые контейнеры. В течение 30 дней с помощью препаровальной лупы ($\times 20-60$) следят за появлением мелких колоний (10—100 мкм в диаметре), напоминающих яичницу-глазунью. В случае двухфазной культуры наблюдают в микроскоп через боковую стенку пробирки, стараясь обнаружить так называемые «сферулы», т. е. колонии в жидкой среде. Контролируют также подкисление среды, сопровождающееся пожелтением индикаторного красителя фенолового красного. Для получения отдельных колоний содержимое двухфазной среды инокулируют в чашки с агаром Е.

Энтерококки выделяют на агаровой среде (разд. 8.5.51) с добавлением ацетата таллия (0,1%).

8.2.7. Ингибирование селенитом для получения культур салмонелл

К F-бульону (разд. 8.5.44) добавляют кислый селенит натрия в концентрации 0,4%. В этих условиях временно прекращается рост колиподобных бактерий, но салмонеллы продолжают расти. Пробы из кала засевают штрихом на селективные и неселективные агаровые среды, а также вносят большое количество пробы в F-бульон (1 г или 1 мл на 8—10 мл бульона). Инкубацию проводят при 35—37°C в течение 12—16 ч, а затем делают пересев в чашки с агаром.

8.2.8. Ингибирование фенилэтанолом для получения культур стрептококков и стафилококков

При добавлении в агаровую среду (разд. 8.5.40) фенилэтанола в концентрации 0,25% подавляется рост грамотрицательных бактерий, главным образом *Proteus*, тогда как на грамположительные кокки фенилэтанол не действует. Эта среда пригодна, например, для выделения из проб кала коагулазоположительных стафилококков.

8.2.9. Ингибирование трифенилметановым красителем для получения культур граммотрицательных бактерий и микобактерий

Обычно для подавления роста грамположительных бактерий достаточно добавления трифенилметановых красителей (кристаллический фиолетовый, основной фуксин, бриллиантовая зелень и малахитовый зеленый) в более низкой концентрации, чем для подавления роста грамотрицательных. Например, при концентрации в среде 1 : 4 000 000 малахитовый зеленый подавляет рост *Bacillus subtilis*, а в концентрации 1 : 1 000 000 — рост стафилококков. Однако для подавления роста *Escherichia coli* или *Salmonella typhi* необходима концентрация этого красителя ~ 1.30 000—1 : 40 000 [21]. Бриллиантовая зелень используется для выявления колиподобных бактерий [в составе бульона с желчью и лактозой (разд. 8.5.13)] и в нескольких селективных средах для *Enterobacteriaceae*, таких, как агар для салмонелл и шигелл (разд. 8.5.43) и агар с бриллиантовой зеленью (разд. 8.5.12). Кристаллический фиолетовый также используют для селекции *Enterobacteriaceae*, например в составе агара с желчью и фиолетовым красным (разд. 8.5.56) и агара Мак-Конки (разд. 8.5.27). Микобактерии очень устойчивы к этим красителям. Поэтому малахитовый зеленый часто включают в среды, используемые для выделения *Mycobacterium tuberculosis* (например, в среду Лёвенштейна — Йенсена; разд. 8.5.26), в целях подавления роста других бактерий.

8.2.10. Ингибирование солями для получения культур стафилококков

Для выделения стафилококков в среду добавляют 7,5% NaCl (см. солевой агар с маннитом; разд. 8.5.28). При этой концентрации NaCl рост других бактерий подавляется.

8.2.11. Ингибирование солями для получения культур галобактерий [23]

Красные галофильные палочковидные бактерии *Halobacterium* и кокки *Halococcus* можно обнаружить в очень соленых белковых продуктах, например на соленой рыбе. Они обитают в солеварнях, в морской воде (Мертвого моря) и в водоемах с очень высоким содержанием солей. Для оптимального роста этих экстремальных галофилов необходима концентрация NaCl ~25%. Они обычно не растут при концентрации NaCl ниже 15% и даже после кратковременной экспозиции в таких растворах гибнут. Поскольку при концентрации NaCl 20% и выше растут только галофилы, их селекция из природного материала осуществляется довольно просто. Подходящая среда для получения накопительных культур таких бактерий приведена в разд. 8.5.21. После внесения проб колбы инкубируют при 37 °C на качалке и затем получают отдельные колонии путем посева культуры в чашки с этой же средой, содержащей 2% агара. Чашки инкубируют при 37 °C в течение 3—14 дней в пластмассовых коробках или мешках, предохраняющих среду от высыхания.

8.2.12. Ингибирование желчью для получения культур энтеробактерий

Желчь или ее соли часто добавляют в культуральные среды для селекции энтеробактерий. Однако на средах с такими добавками способны расти не только кишечные бактерии, например, на чистой желчи может расти *Yersinia pestis* [53]. Тем не менее до сих пор желчь используют в качестве важного селектирующего фактора при выделении грамотрицательных палочковид-

ных энтеробактерий и энтерококков. Для селекции представителей сем. *Enterobacteriaceae* желчь или ее соли добавляют к таким средам, как агар Мак-Конки (разд. 8.5.27), агар для салмонелл и шигелл (разд. 8.5.43), агар с желчью и фиолетовым красным (разд. 8.5.56) и многим другим. Для получения накопительных культур энтерококков [20] хорошей селективной средой оказался питательный агар с желчью (разд. 8.5.9).

8.2.13. Ингибирование пенициллином для получения культур микоплазм

Поскольку микоплазмы лишены клеточной стенки, они устойчивы к высоким концентрациям пенициллина, который подавляет рост многих бактерий, имеющих клеточную стенку. Антибиотик используют в концентрации 194 ед./мл, добавляя его, например, к таким средам, как агар Е (разд. 8.5.17).

8.2.14. Ингибирование пенициллином для получения культур *Bordetella pertussis*

Полученные с помощью тампонов пробы из носоглотки суспендируют в бульоне и затем рассеивают в чашки с агаром Борде—Жангу (разд. 8.5.11), содержащим пенициллин (0,5 ед./мл). Пенициллин способствует подавлению роста обычно содержащихся в таких пробах микроорганизмов, но не мешает *B. pertussis* образовывать (в течение 4 дней) характерные жемчужно-серые (типа «ртутной капли») колонии.

8.2.15. Набор антибиотиков для получения культур *Campylobacter fetus* [68, 69]

Добавление бацитрацина (2 ед./мл) и новобицина (2 мкг/мл) к среде с агаром для бруцелл (разд. 8.5.14) позволяет выделять *C. fetus* из испражнений и кишечного содержимого крупного рогатого скота, овец, свиней и птиц. Этот метод можно использовать вместе с методом фильтрации, описанным ранее для получения накопительных культур *C. fetus* (разд. 8.1.16).

8.2.16. Набор антибиотиков для получения культур *Neisseriae*

Добавление к агару Тэйера — Мартина (разд. 8.5.52) ванкомицина, колистина и нистатина позволяет выделить *Neisseria meningitidis* из слизи носоглотки или *N. gonorrhoeae* из отделяемого уретры и шейки матки, так как эти антибиотики способствуют подавлению роста остальной микрофлоры.

8.2.17. Обработка формальдегидом для получения культур *Gallionella ferruginea* [54]

Микроаэрофильный хемолитотроф *G. ferruginea* встречается в холодных железистых водах, где он образует характерные изогнутые стебельки, покрытые окисью железа. В прямоугольную молочную бутылочку с завинчивающейся крышкой емкостью 150 мл, содержащую 10 мл агара с сульфидом железа и 100 мл жидкой среды, например модифицированной среды Вольфа (разд. 8.5.34), вносят 0,5 мл формалина (40%-ный раствор). Пробы, содержащие *Gallionella* из природных источников, центрифугируют 3 мин при 3000 g. 1—5 мл осадка вносят в сосуд со средой и инкубируют 1—2 дня при 25 °C. Формалин убивает сопутствующие бактерии, но не влияет на рост *Gallionella*. 1 мл обработанной формалином культуры переносят в сосуд со свежей средой, но без формалина и инкубируют при 25 °C, пересевая каждые 2—3 нед. Выделяемые бактерии образуют пушистые участки на поверхности агара, содержащего сульфид железа. Пробы из этих участков используют для получения субкультур. Чистоту культуры проверяют с помощью микроскопии и путем ее высева на другие среды, на которых *Gallionella* не растет.

8.2.18. Разбавленная среда для получения культур каулобактеров [57]

Каулобактеры представляют собой стебельковые бактерии, способные расти на средах с таким малым содержанием питательных веществ, которые не обеспечивают рост большинства других микроорганизмов. Про-

бы воды из прудов, ручьев, озер или даже водопроводной воды вносят в колбы или бутылки и добавляют к ним 0,01% пептона. Культуральные сосуды неплотно закрывают бумагой или алюминиевой фольгой и инкубируют при 20—25 °С. Ежедневно с помощью фазово-контрастной микроскопии рассматривают поверхностную пленку. После появления (обычно на 4-й день) стебельковых бактерий (1 на 10—20 клеток) делают посев из поверхностной пленки в чашки с агаровой средой, приготовленной на водопроводной воде с 0,05% пептона, и затем инкубируют их при 30 °С. В условиях низкого содержания пептона обеспечивается рост мелких колоний каулобактеров, но ингибируется рост других бактерий. Примерно через 4 дня (или более) исследованные с помощью препаровальной лупы кусочки среды с микроколониями каулобактера переносят в чашки со средой, содержащей 0,2% пептона, 0,1% дрожжевого экстракта, 0,02% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ и 1% агара. После двухдневной инкубации готовят на стеклах влажные препараты каулобактеров. Отдельные колонии пересевают с агара в чашки со свежей средой.

В случае морских каулобактеров к пробам морской воды добавляют 0,01% пептона и инкубируют их около 7 дней при 13 °С. Когда с помощью микроскопа обнаруживают достаточно большое число стебельковых бактерий, делают пересев из поверхностной пленки в чашки с агаром, приготовленным на морской воде с 0,05% пептона, и инкубируют их при 25 °С. Часть выросших микроколоний переносят в чашки со свежей средой и очищают их путем пересева.

8.2.19. Разбавленная среда для получения культур водных спирилл [83]

При росте в разбавленных средах аэробные хемогетеротрофные спириллы (родов *Aquaspirillum* и *Oceanospirillum*) часто успешно конкурируют с другими бактериями за необходимые питательные вещества. Для выделения спирилл из пресных вод к пробам воды (например, из стоячих водоемов) добавляют 1% пептона или дрожжевого автолизата и инкубируют их при комнатной температуре около 7 дней или до появления зна-

чительного количества спирилл. Часть исходной культуры добавляют к равному объему воды из того же водоема и смесь стерилизуют автоклавированием. В эту смесь вносят пробу из нестерилизованной порции исходной культуры. После инкубации и появления колоний спирилл часть вторичной культуры разводят водой из того же источника, смесь стерилизуют и инокулируют ее культурой из нестерилизованной порции. Продолжают такое разведение питательных веществ в среде до тех пор, пока в культуре не будут преобладать спириллы. Отдельные колонии спирилл получают путем посева культур в чашки с агаром MPSS (разд. 8.5.35).

Другой подход к выделению спирилл основан на использовании низкого содержания в среде источников азота [83]. При его применении к пробам воды добавляют малат или лактат кальция (1%) и инкубируют их при комнатной температуре около 1 нед. Затем производят серию пересевов в стерильную воду, содержащую 1% источника азота, и снова инкубируют смесь. Процедуру пересева повторяют 3—4 раза до тех пор, пока в культуре не будут преобладать спириллы. Важно не добавлять в среду такие источники азота, как NH_4Cl , чтобы не допустить преимущественного роста сопутствующих бактерий.

В случае морских спирилл пробы морской воды смешивают с равными объемами основной среды Гизбергера (разд. 8.5.19), содержащей 1% лактата кальция [83]. После инкубации отбирают часть культуры и смешивают ее с равным объемом среды Гизбергера, содержащей лактат, но лишенной NH_4Cl . Стерилизуют эту смесь автоклавированием, вносят в нее нестерильную исходную культуру и инкубируют. Истощение среды по азоту проводят до тех пор, пока в культуре не будут преобладать спириллы. Отдельные колонии получают путем посева на агар MPSS (разд. 8.5.35).

Для получения накопительных культур спирилл используется также проточное (непрерывное) культивирование, при котором обеспечивается низкий уровень питательных веществ. Яннах [34] показал, что в условиях хеостата скорость роста морских спирилл выше скорости роста псевдомонад в смеси этих бактерий, если скорость разведения снижается до такой величины,

при которой содержание лимитирующего источника углерода и энергии (лактата) становится ниже 10 мг/л. В других экспериментах скорость роста спирилл превышала скорость роста *Escherichia coli*, если концентрация лактата падала ниже 5 мг/л [35]. В подобных экспериментах с пресноводными спириллами и псевдомонадами Мэтин и Велдкамп [49] обнаружили, что при концентрации лактата ниже 0,09 мг/л псевдомонады исчезают из хемостата, так как они не растут. Эффективное использование спириллами лактата из среды может быть связано с более низким K_m и более высокой V_{max} их транспортной системы для данного субстрата по сравнению с другими микроорганизмами, а также с более высоким отношением у клеток этих бактерий поверхности к объему [49].

Оказалось, что в условиях голодания спириллы выживают лучше [48]. Вероятно, это связано с их способностью накапливать в клетках в качестве запасного вещества поли- β -оксибутират, если их предварительно выращивать на среде при лимитировании источниками углерода и энергии. Значение запаса поли- β -оксибутирата для выживания клеток показано и для других бактерий [16]. Поэтому истощение среды можно рассматривать как путь для выделения бактерий, образующих этот полимер.

8.2.20. Разбавленная среда для получения культур *Sphaerotilus* [8]

Бактерии рода *Sphaerotilus*, образующие чехлы, встречаются в ручьях, загрязненных сточными водами или органическими веществами; они формируют слизистые «пряди», прикрепленные к погруженным в воду предметам. Эти микроорганизмы можно также выделить из рек, открытых водостоков или канав, в которых нет явных признаков их присутствия. Процедура получения накопительных культур *Sphaerotilus* основана на их способности расти при низком содержании питательных веществ. К 50 мл среды для *Sphaerotilus* (разд. 8.5.46), налитой в квадратные буглы Френча добавляют 25 мл пробы воды или по 1, 5 и 10 мл отстоя сточных вод или отстоя жидкостей, полученных на раз-

личных стадиях обработки сточных вод. Смесь инкубируют 5 дней при 22—25 °С. Через 2 дня после начала инкубации ежедневно с помощью микроскопа следят за появлением нитей. Для получения чистой культуры собирают нити из накопительной культуры и рассеивают их штрихом в чашках с твердой средой (0,05% мясного экстракта и 1,5% агара). Инкубируют чашки 24 ч при 25 °С и с помощью препаровальной лупы находят типичные извитые нити *Sphaerotilus*. Переносят их в триптиказо-глицериновый бульон [5 г триптиказы (BBL Microbiology Systems, Cockeysville, Md.), 5 г глицерина и 1000 мл дистиллированной воды, pH 7,0—7,2] и инкубируют в нем до 2 нед. Через 2—3 дня *Sphaerotilus* образуют толстую поверхностную пленку, бульон же под ней остается прозрачным. Если в бульоне появляется помутнение, следовательно, он содержит другие микроорганизмы, но, даже если помутнения среды не происходит, для гарантирования чистоты следует вновь выделить *Sphaerotilus* из поверхностной пленки путем посева штрихом на агар, приготовленный на мясном экстракте.

Если хотят убедиться в том, что выделенные микроорганизмы имеют чехлы, помещают небольшой кусочек образующейся слизи на предметное стекло в каплю воды, накрывают покровным стеклом и прижимают покровное стекло промокательной бумагой. На край покровного стекла помещают маленькую каплю 1%-ного кристаллического фиолетового, чтобы он просачивался в препарат по капиллярному принципу. Через 30 с промокают препарат бумагой, чтобы удалить избыток краски, и рассматривают его в микроскоп, используя иммерсионный объектив. Клетки и чехлы должны быть хорошо видны.

8.2.21. Триптофан как субстрат для псевдомонад [44]

Для получения накопительных культур псевдомонад, способных использовать триптофан как единственный источник углерода и азота, в 250-миллилитровую колбу Эрленмейера, содержащую 40 мл триптофановой среды (разд. 8.5.54), вносят около 0,1 г почвы. Смесь инкуби-

руют на качалке в течение 5—7 дней при 25 °С. 0,1 мл культуры переносят в другую колбу со средой и инкубируют 2—3 дня. После следующего серийного пересева полученную чистую культуру рассеивают штрихом на триптофановую среду с агаром (15 г/л). После 1—3 дней инкубации делают посев из отдельных колоний на агаровые косяки.

8.2.22. N₂ как субстрат для *Azospirillum* и *Azotobacter*

Azospirillum — это микроаэрофильный азотфиксатор, ассоциированный с корнями различных растений; его находят также в почве [17, 18]. Отмытые кусочки корней длиной 5—8 мм, размягченные с помощью пинцета, помещают в безазотную полужидкую среду (среда Nfb; разд. 8.5.37). Среду можно также инокулировать почвой. Не перемешивая, инкубируют 40 ч при 32 °С и затем проверяют способность накопительной культуры восстанавливать ацетилен (тест на способность к азотфиксации; разд. 20.2.7). Стараются не повредить плотную пленку под поверхностью среды, поскольку это может снизить активность нитрогеназы. Если культура восстанавливает ацетилен, то продолжают проводить ее накопление с помощью пересевов на свежую среду Nfb. С помощью микроскопа находят толстые, извитые, подвижные палочки шириной около 1 мкм, заполненные гранулами поли-β-оксибутирата, и рассеивают их штрихом в чашки со средой Nfb, содержащей 1,5% агара и 20 мг дрожжевого экстракта на 1 л. Через неделю находят маленькие, белые, плотные колонии и переносят их на полужидкую среду Nfb. Для окончательной очистки культуру из среды Nfb наносят штрихом на агар BMS (разд. 8.5.10), где следят за образованием типичных розовых, часто складчатых колоний.

В отличие от *Azospirillum*, который в условиях фиксации азота является облигатным аэрофилом, у *Azotobacter* имеются механизмы защиты кислородочувствительной нитрогеназы от кислорода. Поэтому *Azotobacter* может фиксировать молекулярный азот в аэробных условиях. 0,1 г почвы вносят в однолитровую колбу со 100 мл лишенной азота среды для *Azotobacter* (разд.

8.5.3) и инкубируют с перемешиванием при 30 °С. Периодически культуру микроскопируют, чтобы выявить большие яйцеобразные клетки диаметром 2 мкм или более. Получают вторичную накопительную культуру и очищают ее, делая пересев отдельных колоний на агаровую среду, лишенную соединений азота (среда для *Azotobacter* с 1,5% агара).

8.2.23. Метанол как субстрат для гифомикробов [9]

Представители рода *Hyphomicrobium* способны использовать в качестве единственного источника углерода и энергии такие одноуглеродные соединения, как метанол и метиламин. К 5 мл воды из пруда или канавы либо 0,3 г ила или почвы (предпочтительно с низким содержанием органических веществ) в закрывающихся сосудах емкостью 75—125 мл добавляют нестерильную среду для *Hyphomicrobium* (разд. 8.5.22), через которую продувается молекулярный азот для создания анаэробных условий. Сосуды доливают средой доверху и инкубируют в темноте при 30 °С. Следят, чтобы сосуды оставались заполненными, добавляя в случае необходимости свежую среду. Обычно развитие гифомикробов происходит примерно в течение 8 дней. С помощью фазово-контрастной микроскопии находят палочкообразные клетки с заостренными концами овальной, яйцевидной или бобовидной формы, которые образуют нитчатые выросты (гифы) различной длины, способные ветвиться. Для вторичной накопительной культуры используют свежую стерильную среду. Чтобы выделить отдельные колонии, клетки штрихом высевают на твердую среду (разд. 8.5.22) и инкубируют в аэробных условиях.

8.2.24. Н₂ как субстрат для *Aquaspirillum autotrophicum* [7]

Воду из эвтрофного озера фильтруют через мембранные фильтры, которые помещают на минеральную агаровую среду (разд. 8.5.30) в чашках, и инкубируют ее при 30 °С в атмосфере следующего состава: 60% Н₂, 30% воздуха и 10% СО₂. Чистые культуры получают

повторным рассевом штрихом культур в чашки с минеральной агаровой средой. Находят спирали шириной 0,6—0,8 мкм со жгутиками на обоих концах клетки. Автотрофность в отношении водорода подтверждается тем, что в отсутствие органических веществ для роста культуры необходимо присутствие H_2 и CO_2 .

8.2.25. Целлюлоза как субстрат для цитофаг

Для получения накопительных культур цитофаг, разлагающих целлюлозу, на поверхность основного минерального агара (разд. 8.5.6) помещают кусочки фильтровальной бумаги Ватман № 1. На фильтровальную бумагу кладут частицы почвы или растительного материала и инкубируют чашки при комнатной температуре. Следят за образованием вокруг частиц желтой, оранжевой или розовой окраски, а также за процессом лизиса целлюлозы (бумаги). С помощью фазово-контрастной микроскопии можно обнаружить небольшие подвижные клетки цитофаг. Для выделения цитофаг, которые разлагают не только целлюлозу, культуру рассевают штрихом на агар с триптоном. Отдельные колонии цитофаг, разлагающих только целлюлозу, получают в чашках, заполненных минеральной агаровой средой, содержащей густую суспензию тщательно измельченной целлюлозы (разд. 20.1.13). Для предотвращения движения бактерий, имеющих жгутики, следует использовать достаточно твердую среду (0,85—1% агара), но не настолько, чтобы в ней нарушалась характерная для цитофаг скользящая подвижность. Иногда полезно тонким слоем агара с целлюлозой покрывать основную минеральную среду в чашках; при этом лучше видны зоны просветления, образующиеся в результате лизиса целлюлозы.

8.2.26. Агар как субстрат для *Cytophaga fermentans* и *C. salmonicolor* [77]

Морские микроорганизмы *C. fermentans* и *C. salmonicolor*, являющиеся факультативными анаэробами, способны гидролизовать и сбраживать агар. Эту особенность используют для получения их накопительных

культур. Бутыли со стеклянными пробками или пробирки с завинчивающимися крышками наполняют доверху нестерильной средой Велдкампа (разд. 8.5.55). Среду инокулируют илом, взятым на морском берегу в местах, где гниют водоросли, бутылки закрывают и инкубируют их в темноте при 30 °С. В течение 3—7 дней следят за появлением мутности, образованием газа и падением рН. Отдельные колонии получают с помощью встряхивания пробирок со стерильной средой Велдкампа, содержащей 2% агара. Следят за образованием колоний, в которых при микроскопировании обнаруживаются подвижные изогнутые формы, что характерно для цитофаг. Способность бактерий из этих колоний размягчать или разжижать агар проверяют пересевом их на среды, содержащие 1% агара и 1% дрожжевого экстракта.

8.2.27. Лактат как субстрат для пропионовокислых бактерий

Основой для селекции пропионовокислых бактерий является их способность сбраживать лактат. Пробирку с завинчивающейся крышкой (емкостью 25 мл) заполняют свежепрокипяченной и охлажденной средой, содержащей 4% лактата натрия и 1% дрожжевого экстракта. Добавляют около 0,2 г CaCO_3 и среду инокулируют маленьким кусочком швейцарского сыра. Завинчивают крышку пробирки и инкубируют ее при 30 °С. Следят за образованием красно-коричневого помутнения, которое появляется примерно через 5—7 дней. Отдельные колонии получают рассевом культуры штрихом на стерильный агар с лактатом и дрожжевым экстрактом с последующей инкубацией в анаэробных условиях в атмосфере, обогащенной CO_2 , которая создается с помощью GasPak (BBL).

8.2.28. Аммоний или нитрит как субстраты для нитрифицирующих бактерий [50, 58]

Используют основную среду, описанную в разд. 8.5.38. Для бактерий, окисляющих аммоний до нитрита, в среду добавляют $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,5 г/л); для бактерий, окис-

ляющих нитрит в нитрат, используют среду, содержащую NaNO_2 (0,5 г/л). Готовят разведения почвы 1:10 и в каждую колбу со средой вносят по 1 мл разведенной суспензии. Инкубацию проводят при 28°C и каждую неделю отбирают пробы из накопительных культур в специальные чашки, наблюдая за исчезновением из среды аммония или нитрита. Для выявления аммония в чашки добавляют 3 капли раствора Несслера (разд. 20.4.10). Если среда окрашивается в оранжевый или желтый цвет, это указывает на наличие в ней аммония. Для выявления нитрита к пробам (0,5 мл) добавляют по 3 капли растворов А и В (разд. 20.4.12). В этом случае красный цвет указывает на присутствие нитрита. Сравнивают интенсивности полученной окраски и окраски разведенных стандартных растворов аммония или нитрита и восполняют использованный в накопительной культуре субстрат добавлением в нее свежего стерильного основного раствора. Если в накопительной культуре совсем нет нитрита, то нитрат выявляют, добавляя к пробе небольшое количество цинкового порошка. Это следует делать после внесения реактивов для определения нитритов. Цинк восстанавливает присутствующий в среде нитрат до нитрита, который затем окрашивается в красный цвет. Продолжают инкубировать накопительную культуру и еженедельно вносят в нее аммоний или нитрит, до тех пор пока популяция нитрифицирующих бактерий не будет выявляться при микроскопировании.

Выделить чистую культуру нитрифицирующих бактерий чрезвычайно трудно. Для этого необходимо использовать среды, полностью лишенные органических веществ, причем колонии, образуемые этими бактериями, крайне малы (примерно 100 мкм в диаметре). Более того, нитрифицирующие бактерии растут очень медленно, и поэтому их культуры часто загрязняются другими микроорганизмами. Используя в качестве разбавляющего раствора стерильную среду для накопительных культур, готовят серию десятикратных разведений. По 1 мл из каждого разведения вносят в чашки Петри и затем добавляют силикагель, приготовленный на среде для накопительных культур в двойной концентрации, как описано в разд. 9.1.3. Быстро смешивают

разведенные культуры со средой и дают ей застыть. Чашки инкубируют во влажной атмосфере при 28 °С, периодически проверяя с помощью микроскопа образование крошечных колоний. Хорошо заметные колонии отбирают пастеровской пипеткой с вытянутым на пламени тонким кончиком и переносят их в стерильную среду. Способность субкультур использовать аммоний или нитрит, а также наличие посторонних микроорганизмов определяют, делая посев штрихом на такие органические среды, как питательный агар (при этом роста не должно быть). Любые, даже кажущиеся чистыми культуры проводят через силикагелевую среду несколько раз, отбирая хорошо видимые под микроскопом колонии и проверяя способность субкультур использовать аммоний или нитрит, а также наличие посторонних микроорганизмов.

8.2.29. Нитрат и органические кислоты как субстраты для псевдомонад

Некоторые виды *Pseudomonas*, относящиеся к аэробам, можно получить в виде накопительных и чистых культур, используя их способность расти на среде с нитратом как источником азота, а также с солями различных органических кислот в качестве источников углерода и энергии [74]. Для этого к 3 мл сукцинат-солевой среды (разд. 8.5.49) добавляют 0,1 г почвы или ила либо 0,1 мл прудовой или речной воды. Для получения накопительных культур псевдомонад, способных к флуоресценции, таких, как *P. putida*, *P. fluorescens* или *P. aeruginosa*, среду инкубируют при 30 °С. Для выделения *P. aeruginosa* инкубацию проводят при 41 °С (*P. putida* и *P. fluorescens* не растут при этой температуре). Накопительные культуры *P. acidovorans* получают, заменяя в среде гликолат, муконат или норлейцин на сукцинат и инкубируя ее при 30 °С.

Некоторые псевдомонады используют в качестве терминального акцептора электронов не только кислород, но и нитрат. Поэтому их выделение проводят, увеличивая в среде концентрацию нитрата до 1% и заполняя доверху средой пробирки с завинчивающимися

крышками, поскольку лимитирование по кислороду способствует нитратному дыханию.

После получения вторичных накопительных культур псевдомонад делают посев штрихом в чашки с агаром (используют соответствующую среду с содержанием агара 15 г/л), где вырастают отдельные колонии. Чашки инкубируют в аэробных условиях при 30 °С.

8.2.30. Сульфат и органические кислоты как субстраты для сульфатредуцирующих бактерий

Представители анаэробного рода *Desulfovibrio* и большая часть видов *Desulfotomaculum* окисляют лактат в присутствии сульфата, который при этом восстанавливается до H_2S . Пробы почвы, ила, воды или фекального материала вносят в пробирки с заворачивающимися крышками или в сосуды с закрывающимися пробками, наливают в них доверху лактагную среду (разд. 8.5.24) и инкубируют при 30 °С. Почернение среды указывает на восстановление сульфата. Перед высевом на твердую среду проводят вторичное накопление. Спорообразующие бактерии, относящиеся к роду *Desulfotomaculum*, можно выделить, нагревая накопительную культуру перед высевом на твердые среды до 70 °С в течение 10 мин. Для получения отдельных колоний сульфатредуцирующих бактерий делают посев штрихом в чашки со средой Иверсона (разд. 8.5.23) и выдерживают их 7—10 дней в атмосфере водорода при 30 °С.

Для получения накопительных культур *Desulfotomaculum acetoxidans* [81], которая использует не лактат, а ацетат, применяют среду Виддла и Пфеннига (разд. 8.5.57), содержащую ацетат С помощью фазово-контрастной микроскопии следят за появлением подвижных прямых или слегка изогнутых палочек толщиной 1—1,5 мкм и длиной 3,5—9 мкм, которые имеют споры, а также яркие преломляющие участки. Для получения отдельных колоний используют метод встряхивания пробирок. После 3 нед инкубации колонии отбирают и нагревают 10 мин при 70 °С; такая тепловая обработка помогает выделению *D. acetoxidans*, который является спорообразующим микроорганизмом.

8.2.31. Сера как субстрат для *Desulfuromonas acetoxidans* [56]

D. acetoxidans получает энергию для своего роста в результате анаэробного дыхания, используя в качестве источников углерода и энергии ацетат, этанол или пропанол, а как акцептор электронов — серу. Пробы анаэробных вод, содержащих сульфид, или ила из пресного или морского водоема вносят в стерильные сосуды с завинчивающимися крышками, которые заполняют средой Пфеннига и Библа (разд. 8.5.39), оставляя небольшое воздушное пространство. После завинчивания крышек сосуды инкубируют 1 нед при 28 °С с перемешиванием (например, на круговых качалках со скоростью 150 об/мин). Наличие стеклянных бусинок в среде обеспечивает постепенное размельчение серы в очень тонкую суспензию. Рост бактерий определяют по сильному запаху H_2S . После двух пересевов на среду Пфеннига и Библа с добавлением раствора витаминов (разд. 8.5.57) сере дают осесть и проверяют, действительно ли наличием клеток объясняется легкая мутность надосадочной жидкости. В микроскоп должны быть видны небольшие палочки размером $0,4\text{--}0,7 \times 1\text{--}4$ мкм, причем некоторые из них могут двигаться. Отдельные колонии получают методом глубинного посева в пробирки с последующим встряхиванием. Для хорошего однородного распределения серы в пробирках с агаром к 50 мл агаровой среды добавляют 3 капли автоклавированного раствора полисульфида (10 г $Na_2S \cdot 9H_2O$ и 3 г порошка серы, растворенного в 15 мл дистиллированной воды). В процессе роста бактерий следят за изменением окраски колоний от розового до цвета охры.

Поскольку сульфид, образуемый *D. acetoxidans*, ингибирует рост данной бактерии (предельная концентрация H_2S , которую она выдерживает, составляет 0,1%), был предложен альтернативный метод получения ее накопительной культуры, при котором среду, содержащую серу, инокулируют не только пробами ила и воды, но также чистой культурой зеленых серных бактерий из сем. *Chlorobiaceae*. Эти бактерии постоянно потребляют выделяемый в процессе роста *D. acetoxidans* H_2S и окисляют его с образованием элементной серы, которая

используется быстро растущей накопительной культурой *D. acetoxidans*. Такой метод можно применять и для выделения чистых культур *D. acetoxidans* [56].

8.2.32. Толуол как субстрат для окисляющих его бактерий [14]

Для получения накопительных культур бактерий, окисляющих толуол, используют основную неорганическую среду А или В (разд. 8.5.5) в закрытых ватными пробками колбах. Среду инокулируют небольшим количеством влажной почвы, предварительно обработанной в течение нескольких дней парами толуола, или свежей почвой. Колбы инкубируют 1—3 нед при 25—30 °С в закрытой камере, содержащей стакан с водой, насыщенной толуолом. Отдельные колонии получают, делая посев выросшей культуры штрихом на твердую среду и инкубируя чашки при 25—30 °С в атмосфере, содержащей толуол.

8.2.33. Бактериальные клетки как субстрат для миксококков

Виды *Мухососсис* способны с помощью литических ферментов лизировать клетки других бактерий и использовать высвобождающиеся при этом вещества для своего роста. Можно воспользоваться этой особенностью при выделении миксококков из проб почвы, воды или растительного материала [47, 55, 66]. Бактериальные клетки, используемые в качестве субстрата (пригодны *Enterobacter aerogenes*), получают, либо снимая целую колонию диаметром 4 мм с поверхности агаровой среды, либо центрифугируя бактерии, выросшие в жидкой среде и отмывая их несколько раз. На поверхность водно-агаровой среды (1,5% агара в дистиллированной воде) миксококки высевают полоской или мазком около 1 см шириной и 4 см длиной. Мазок должен быть достаточно толстым, чтобы его можно было видеть невооруженным глазом. На один конец мазка помещают две или три частицы почвы или кусочки растительного материала, например коры или листьев. Через 2—3 дня и затем с однодневными интервалами исследуют чашки с помощью препаровальной лупы, чтобы убедиться в рас-

творении бактериального мазка вокруг добавленных частиц. Следят также за появлением на мазке и по его краям плодовых тел обычно желтого, оранжевого или розового цвета. Плодовые тела, обнаруженные на наибольшем расстоянии от мазка, переносят на агаровую среду, содержащую 0,2% триптона или казитола (Difco Laboratories, Detroit, Mich.) и 1,5% агара. Перед посевом для высвобождения микоспор каждое плодовое тело раздавливают в капле стерильной воды между двумя предметными стеклами.

Добавление циклогексимида (25 мкг/мл) в непитательную агаровую среду и в последующие среды задерживает рост грибов, способствуя таким образом выделению миксококков [55].

8.3. БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

8.3.1. Бактериальный паразитизм бделловибрионов [75]

Крошечные вибрионы, названные бделловибрионами, способны прикрепляться к различным грамотрицательным бактериям, проникать через их клеточную стенку и размножаться в периплазматическом пространстве с последующим лизисом бактерии-хозяина. Метод выделения бделловибрионов во многих отношениях напоминает метод, используемый для бактериофагов.

500 г почвы суспендируют в 500 мл водопроводной воды и энергично встряхивают в течение 1 ч. Суспензию центрифугируют 5 мин при 500 g для осаждения больших частиц. Надосадочную жидкость пропускают через мембранные ультрафильтры, постепенно уменьшая размер пор в следующем порядке: 3; 1,2; 0,8; 0,65 и 0,45 мкм. 0,5 мл полученного фильтрата смешивают с 0,5 мл суспензии ($\sim 5 \cdot 10^{10}$ клеток в 1 мл) бактерий-хозяев (*Enterobacter aerogenes* или *Pseudomonas fluorescens*). Эту смесь добавляют к 4 мл расплавленной полужидкой среды YP (разд. 8.5.60), перемешивают и наливают на поверхность твердой YP-среды в чашки. После инкубирования в течение ночи проверяют появление на среде бляшек (областей лизиса). Если они образуются в течение 24 ч, то это более характерно для

бактериофагов, чем для бделловибрионов, которые обнаруживаются не ранее чем через 2 сут. Бляшки, в которых предполагают присутствие бделловибрионов, срезают и суспендируют в УР-среде. Затем готовят серию разведений для наслаивания на газоны бактерий-хозяев с целью получения изолированных бляшек. Одну из бляшек исследуют фазово-контрастной микроскопией с целью найти очень подвижные крошечные вибрионы шириной около 0,3 мкм. Материал, полученный из бляшек, суспендируют в УР-бульоне, суспензию пропускают через ультрафильтр с диаметром пор 0,45 мкм, фильтрат разводят и наносят его на газоны бактерий-хозяев. После трех последовательных выделений из бляшек можно считать, что полученные штаммы бделловибриона вырастают из одной клетки.

8.3.2. Симбиоз растений с ризобиями [5]

Клубеньки, образуемые на корнях бобовых растений, представляют собой природную накопительную систему симбиотических азотфиксирующих бактерий рода *Rhizobium*. Корни люцерны или красного клевера, содержащие клубеньки, отмывают от земли. Отделяют клубеньки от корня так, чтобы небольшая часть корня оставалась с клубеньком. С помощью волосяной щетки промывают клубеньки водопроводной водой, удаляя остатки земли, и погружают их в раствор HgCl_2 (1:1000) на 3—6 мин, время от времени переворачивая стерильным пинцетом. Переносят клубеньки в 75%-ный этанол и несколько минут встряхивают. Затем помещают их в стерильную воду и взбалтывают смесь еще несколько минут. Наливают по 1 мл стерильной воды в шесть стерильных чашек Петри. В первую чашку кладут клубенек, раздавливают его стерильным пинцетом и добавляют к нему воду. Переносят 1—2 петли полученной суспензии во вторую чашку со стерильной водой и перемешивают. Проводят суспензию таким же образом через оставшиеся чашки. К каждому разведению добавляют расплавленный и остуженный до 45°C агар с дрожжевым экстрактом и маннитом (разд. 8.5.59). Инкубируют чашки с затвердевшей средой при комнатной температуре и получают затем субкультуры из отдельных колоний.

8.3.3. Заражение животных для получения культур *Streptococcus pneumoniae* [20]

Патогенный микроорганизм можно выделить, инокулируя животное-хозяина смешанной культурой, в которой он находится. В инфицированном животном патогенный микроб преобладает и часто обнаруживается в виде чистой культуры в крови и тканях. При этом в результате действия защитных механизмов животного рост непатогенных сопутствующих микроорганизмов ингибируется или они гибнут.

Например, чистую культуру пневмококков можно получить через 4—6 ч после внутрибрюшинного введения мыши 1 мл эмульгированной мокроты, содержащей *S. pneumoniae* и другие бактерии. Пробы перитонеальной жидкости берут из брюшинной полости животного с помощью стерильной остроконечной капиллярной пипетки.

8.3.4. Инфицирование животного возбудителем чумы *Yersinia pestis*

Выделение из разлагающихся трупов животных *Yersinia pestis* затруднено из-за присутствия большого количества бактерий, вызывающих гниение. Для получения накопительных культур *Y. pestis* разлагающийся материал втирают в выбритую кожу живота морской свинки. Благодаря малым размерам клетки *Y. pestis* быстро проникают через микроскопические царапины на бритой коже и инфицируют животное, тогда как большинство сопутствующих бактерий имеют размеры, не позволяющие им проникать через кожу. Чистые культуры *Y. pestis* можно получить, вырастив материал, полученный из бубонов и селезенки животных.

8.4. ПОЛУЧЕНИЕ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР

Для выделения бактерий в виде чистых культур известно сравнительно мало методов. Чаще всего это делают путем изолирования отдельных клеток на твердой питательной среде, используя метод посева штрихом или разлива по чашкам небольшого количества жидкой культуры. Однако получение отдельной колонии не всегда гарантирует чистоту культуры, поскольку колонии

могут вырасти не только из отдельных клеток, но из их скоплений. Если микроорганизмы образуют слизь, то к ней часто прикрепляются посторонние формы. В случае выделения штаммов *Bacillus* или актиномицетов контаминирующие микроорганизмы могут быть опутаны цепочками клеток или соответственно гифами этих бактерий. Для очистки предпочтительнее использовать неселективную среду, поскольку на ней лучше растут контаминирующие микроорганизмы и их легче обнаружить. Но даже на неселективной среде не следует очень быстро отбирать колонии, поскольку за данный отрезок времени могут еще не вырасти медленно растущие контаминирующие бактерии.

Из чистой культуры обычно вырастают одинаковые колонии и при микроскопировании выявляются похожие клетки, в частности по размеру и окраске по Граму. Однако возможны исключения, например, колонии, вырастающие из чистой культуры, могут быть гладкие (S) и шероховатые (R). Кроме того, в чистых культурах различных микроорганизмов могут появиться кокковидные клетки, цисты и споры. Наконец, некоторые микроорганизмы проявляют грамвариабельность. Тем не менее указанные критерии широко используются при определении чистоты культур.

8.4.1. Посев штрихом или разливом на твердую среду

Существует много методов посева штрихом в чашки с твердыми средами («штрихованные чашки»), но лишь один из них (рис. 8.1) почти всегда дает хорошо изолированные колонии даже при отсутствии навыков у экспериментатора. Кроме того, можно наливать разведенные растворы смешанной культуры на поверхность твердых сред в чашках (подробности метода приведены в разд. 11.2.1). При работе с анаэробами «штрихованные чашки» или чашки с внесенной в них жидкой культурой в атмосфере воздуха инкубируют затем в анаэроостате. Для анаэробов необходимы свежеприготовленные среды, и посев штрихом следует проводить в течение первых 4 ч после их автоклавирования, чтобы избежать накопления растворенного кислорода.

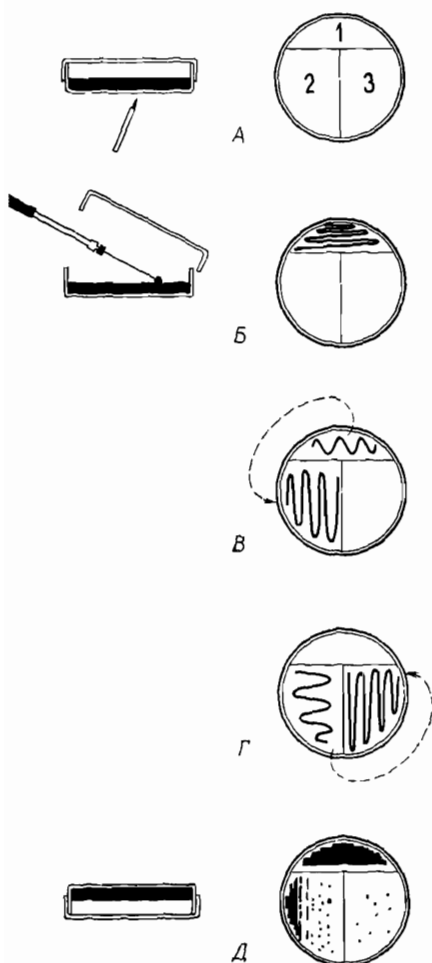


Рис. 8.1. Удобный метод посева штрихом в чашки для получения отдельных колоний. А. Для маркировки на обратной стороне чашки Петри карандашом наносят букву Т, разделяющую дно на 3 сектора. Б. Петлей с культурой зигзагом наносят штрихи на поверхности агара в секторе 1, как показано на рисунке. Для этого крышку чашки сначала приподнимают, а после нанесения штриха сразу закрывают. Петлю стерилизуют в пламени и дают ей остыть (15 с). В. Проводят петлей по поверхности среды в секторе 1, как показано на рисунке, и затем немедленно наносят ею зигзагом штрихи на поверхности среды в секторе 2. Прогревают петлю в пламени и дают ей остыть. Г. Проводят петлей по поверхности среды в секторе 2, как показано, и затем наносят ею зигзагом штрихи на поверхности среды в секторе 3. Д. Инкубируют опрокинутые вверх дном чашки, как показано на рисунке, для того чтобы конденсирующаяся вода с крышки не попала на поверхность агара. В секторе 1 вырастает большое число колоний, тогда как в секторах 2 и 3 появляются отдельные хорошо изолированные колонии.

Даже в таком случае необходимо какое-то время, чтобы удалить из сосуда кислород и создать там анаэробные условия. Однако если применяют метод вращающихся пробирок, содержащих предварительно восстановленные среды, то это не требуется [27—29]. Пробирки с предварительно восстановленной расплавленной средой вращают таким образом, что агар затвердевает

тонким слоем на их стенках. Метод посева штрихом во вращающуюся пробирку иллюстрирует рис. 8.2. Среду в такой пробирке инокулируют разведенной суспензией клеток и затем вращают пробирку для распределения клеток по поверхности агара (см. также разд. 6.6.4).

8.4.2. Последовательные разведения в твердой среде

Самый простой способ посева с помощью разлива по чашкам заключается в том, что после инокуляции испытуемой пробы в пробирку со стерильным расплавленным агаром (охлажденным до 45—50 °C) среду перемешивают, выливают в чашку Петри и дают ей застыть. Однако, чтобы получить хорошо изолированные колонии, часто возникает необходимость разведения проб. Наилучшие результаты получают при использовании последовательных десятикратных разведений исходных проб. По 1 мл каждого разведения вносят в чашки Петри, добавляют 15—20 мл расплавленной агаровой среды, смешивают, покачивая чашки несколько раз, и дают среде затвердеть. При выделении анаэробов разведения смешивают с расплавленной, охлажденной и предварительно восстановленной средой во вращающихся пробирках непосредственно перед покрытием ею стенок пробирок.

Недостатком разведения в расплавленной агаровой среде является то, что отдельные колонии оказываются погруженными в агар и поэтому извлечь их можно только механически — стерильным инструментом или отсасыванием с помощью пастеровской пипетки. Плохо также то, что бактерии некоторое время находятся в среде при температуре расплавленного агара (45—50 °C).

Для выделения анаэробов, особенно фототрофов и сульфатредуцирующих бактерий, часто используют метод глубинного посева со встряхиванием пробирок [76]. Для этого готовят серию стерильных пробирок, помещают их в водяную баню при 45 °C и наполняют до половины расплавленной агаровой средой той же температуры. Инокулируют первую из пробирок несколькими каплями смешанной культуры и осторожно размешивают со средой. Затем 1/10 объема среды переносят во вторую пробирку. В это время нижнюю часть первой

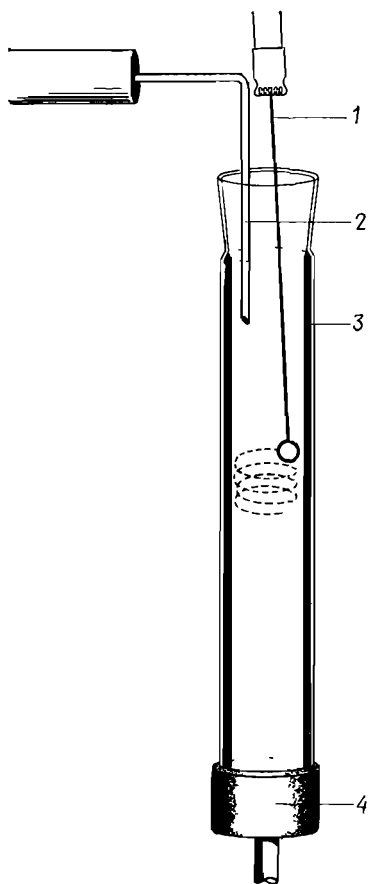


Рис. 8.2. Посев во вращающиеся пробирки в анаэробных условиях [27]. 1 — проволочная петля из платины или нержавеющей стали (нихром может вызывать окисление среды); 2 — газовая канюля для постоянного продувания через пробирку газа, не содержащего кислород, 3 — предварительно восстановленная агаровая среда, покрывающая внутреннюю поверхность пробирки; 4 — соединяющийся с мотором держатель для вращения пробирки во время нанесения штриха. Петлю в инокуляторе опускают на дно пробирки, прижимают плоскость петли к поверхности агара и поднимают ее вверх. После нанесения на агар штриха таким образом в нижней четверти пробирки плоскость петли ставят перпендикулярно поверхности агара (как показано на рисунке) и продолжают наносить штрих до верхней части пробирки. Удаляют газовую канюлю, закрывают пробирку резиновой пробкой и инкубируют в вертикальном положении.

пробирки погружают в вертикальном положении в холодную воду для затвердения агара. Размешивают содержимое второй пробирки и переносят $1/10$ объема ее среды в третью пробирку, а вторую пробирку охлаждают. Таким же образом поступают с оставшимися пробирками. После этого в каждую пробирку с затвердевшим агаром наносят сантиметровый слой расплавленной стерильной смеси (1:1) парафина и вазелинового масла, благодаря чему среда предохраняется от контакта с воздухом. В процессе затвердения парафиновый

слой может сжиматься, и тогда он перестает выполнять свою защитную функцию. В этом случае следует применить слабое локальное нагревание, а также проколом удалить воздушные пузырьки из-под парафинового покрытия. Когда бактерии вырастают, выбирают пробирку с хорошо изолированными колониями и удаляют из нее столбик агара. Для этого вначале расплавляют и снимают парафиновый слой, а затем вводят между стенкой пробирки и агаром стерильную капиллярную пипетку. Кончик пипетки опускают до дна пробирки и вдуванием воздуха выталкивают агаровый столбик из пробирки в стерильную чашку. Чтобы получить колонии, агар разрезают на кусочки.

8.4.3. Последовательное разведение в жидкой среде

Этот метод применяют в том случае, если выделяемый микроорганизм не растет на твердой среде. При этом данный микроорганизм должен количественно преобладать в смешанной популяции. Готовят раствор смешанной культуры таким образом, чтобы при добавлении аликвот в большое число пробирок с питательной средой среднее число инокулированных бактерий было бы менее 0,05 на пробирку. Это достигается, например, при инокуляции 1-миллилитровых аликвот в 100 пробирок из 100 мл раствора, содержащего всего 5 бактерий. При инкубации в большинстве пробирок роста бактерий не происходит, но в те несколько пробирок, где наблюдается рост, вероятно, попала лишь одна бактерия ($P=0,975$). Чем меньше среднее число бактерий, инокулированных в пробирку, тем больше вероятность того, что культура выросла из единственной бактериальной клетки. Следовательно, в большинстве инокулированных пробирок роста быть не должно, тогда в тех нескольких пробирках, где рост наблюдается, вероятность инокулирования среды единственной клеткой очень высока. Обсуждение теоретических аспектов этого метода приводится в работе [51].

8.4.4. Выделение отдельных клеток

Обзор различных методов выделения отдельных клеток можно найти в работе [36]. При необходимости ре-

гулярного многократного выделения рекомендуется применять микроманипулятор. Для эпизодических выделений используют следующий метод, описанный Ледербергом [42].

На нижней стороне чистого предметного стекла тушью чертят сетку квадратов со стороной 5 мм. Верхнюю сторону стекла стерилизуют над пламенем горелки. После охлаждения стекла его покрывают слоем вазелинового масла толщиной 0,5 мм (стерилизовать масло нет необходимости). Нагревают стеклянную трубку диаметром 4 мм в пламени и вытягивают один ее конец так, чтобы получился капилляр диаметром около 0,1 мм. На другой ее конец надевают резиновую трубку. Разводят культуру до плотности 10^6 — 10^7 клеток бактерий в 1 мл среды и, сжимая резиновую трубку, насасывают суспензию в капилляр. Помещают в центр каждого квадрата каплю суспензии из капилляра под масло. Капли прилипают к стеклу и расплющиваются до диаметра 0,1—0,2 мм. Сканируют стекло с помощью фазово-контрастной или темнопольной микроскопии и определяют, в какой из капель содержится только одна клетка выделяемого микроорганизма. Часто такую единичную клетку извлекают путем многократного набирания и выпуска капли капиллярной пипеткой, содержащей стерильную среду.

По другой методике к капле добавляют примерно 10 мкл стерильной среды и инкубируют на предметном стекле в закрытой камере до появления клона бактерий, а затем извлекают несколько клеток капиллярной пипеткой. Поскольку рост клона происходит в полуанаэробных условиях, эта методика неприменима для строгих аэробов.

8.5. СРЕДЫ И РЕАКТИВЫ

8.5.1. Среда для выделения *Aquaspirillum gracile* [12]

Пептон	5 г	K_2HPO_4	0,1 г
Дрожжевой экстр-акт	0,5 г	Агар	10 г
Твин 80	0,02 г	Дистиллированная вода	1000 мл

8. ПОЛУЧЕНИЕ НАКОПИТЕЛЬНЫХ И ЧИСТЫХ КУЛЬТУР

Доводят рН до 7,2. Нагревают среду до кипения для растворения агара. Стерилизуют 15 мин при 121 °С.

8.5.2. Среда ASN-III [59]

NaCl	25 г
MgCl ₂ ·6H ₂ O	2 г
KCl	0,5 г
NaNO ₃	0,75 г
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	0,02 г
MgSO ₄ ·7H ₂ O	3,5 г
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,5 г
Лимонная кислота	0,003 г
Железоаммонийцитрат	0,003 г
ЭДТА, двунариевая магниевая соль	0,0005 г
Na ₂ CO ₃	0,02 г
Смесь микроэлементов А5 (см. среду BG-11, разд. 8.5.8)	1 мл
Деионизованная вода	1000 мл

После автоклавирования и охлаждения рН среды должен быть 7,5.

8.5.3. Среда для *Azotobacter*

Маннит	2 г	FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,1 г
K ₂ HPO ₄	0,5 г	Дистиллированная	1000 мл
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2 г	вода	

Доводят рН до 7,3—7,6. Стерилизуют 15 мин при 121 °С.

8.5.4. Основная среда для получения накопительных культур *Rhodospirillaceae* [76]

Раствор А:

NaHCO ₃	2 г
Дистиллированная вода	25 мл

Стерилизуют фильтрованием (положительное давление).

Раствор В:

NH ₄ Cl	1 г
KH ₂ PO ₄	0,5 г
MgCl ₂	0,5 г
NaCl (для организмов из солоноватой или морской воды)	(20—30 г)
Раствор микроэлементов (см. ниже)	1 мл
Дистиллированная вода	975 мл

Стерилизуют в течение 15 мин при 121 °С.

Раствор С:

$\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$

Дистиллированная вода

3 г

200 мл

Стерилизуют в колбе с магнитной мешалкой в течение 15 мин при 121 °С. После охлаждения добавляют, помешивая, 1,5 мл стерильной 2 М H_2SO_4 .

Для приготовления среды растворы А и В объединяют. Доводят рН до 7 с помощью стерильных растворов Na_2CO_3 и H_3PO_4 . При инокуляции первичных накопительных культур на 100 мл среды добавляют 1 мл раствора С. При последующих пересевах начавшей расти культуры *Rhodospirillaceae* исключают из среды Na_2S и заменяют MgSO_4 на MgCl_2 .

Раствор микроэлементов:

ЭДТА, двунариевая соль	500 мг	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	20 мг
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	200 мг	$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1 мг
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10 мг	$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2 мг
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	3 мг	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	3 мг
H_3BO_3	30 мг	Деионизованная вода	1000 мл

ЭДТА растворяют в порции воды. Отдельно растворяют в воде другие ингредиенты и добавляют их к раствору ЭДТА. Доводят рН раствора приблизительно до 3, а объем до 1 л.

8.5.5. Основные неорганические среды А и В [14]

Среда А

Раствор 1:

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,2 г
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,1 г
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,1 г
Цитрат железа	0,002 г
Дистиллированная вода	1000 мл

Стерилизуют 15 мин при 121 °С

Раствор 2:

K_2HPO_4	0,2 г
KH_2PO_4	0,1 г
Дистиллированная вода	200 мл

Стерилизуют 15 мин при 121 °С

Для приготовления среды растворы 1 и 2 объединяют с соблюдением правил асептики. Для получения твердой среды добавляют 20 г агара на 1 л.

8. ПОЛУЧЕНИЕ НАКОПИТЕЛЬНЫХ И ЧИСТЫХ КУЛЬТУР

Среда В

K_2HPO_4	0,8 г	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,01 г
KH_2PO_4	0,2 г	$(NH_4)_2SO_4$	1 г
$CaSO_4 \cdot 2H_2O$	0,05 г	Дистиллиро-	1000 мл
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5 г	ванная вода	

Стерилизуют 15 мин при 121 °С. Для получения твердой среды добавляют 20 г агара на 1 л.

8.5.6. Основная минеральная агаровая среда для целлюлолитических цитофаг [72]

$(NH_4)_2SO_4$	или	1 г	$CaCl_2$	0,1 г
KNO_3			$FeCl_3$	0,02 г
K_2HPO_4		1 г	Агар	10 г
$MgSO_4$		0,2 г	Водопроводная вода	1000 мл

Доводят рН до 7,0—7,5, кипятят до растворения агара и стерилизуют 15 мин при 121 °С.

8.5.7. Основная солевая среда для *Thermus* [11]

Нитрилотриук- сусная кис- лота	100 мкг	$FeCl_3$	2800 нг
$CaSO_4 \cdot 2H_2O$	60 мкг	$MnSO_4 \cdot H_2O$	22 мкг
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	100 мкг	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	5 мкг
$NaCl$	8 мкг	H_3BO_3	5 мкг
KNO_3	103 мкг	$CuSO_4$	160 нг
$NaNO_3$	689 мкг	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	250 нг
Na_2HPO_4	111 мкг	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	460 нг
		Деионизован- ная вода	1000 мл

Доводят рН до 8,2 с помощью NaOH.

8.5.8. Среда BG-11 [59]

$NaNO_3$	1,5 г	ЭДТА, двунариевая магниева соль	0,001 г
$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	0,04 г	Na_2CO_3	0,02 г
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,075 г	Смесь микроэлемен- тов А5 (см. ниже)	1,0 мл
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0,036 г	Деионизованная вода	1000 мл
Лимонная кис- лота	0,006 г		
Железоаммо- нийцитрат	0,006 г		

После автоклавирования и охлаждения рН среды должен быть 7,4.

Смесь микроэлементов А5:

H_3BO_3	2,86 мг/мл	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,39 мг/мл
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1,81 мг/мл	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,079 мг/мл
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,222 мг/мл	$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,0494 мг/мл

8.5.9. Желчно-эскулиновый агар (BBL или Difco)

Раствор А:

Мясной экстракт	3 г
Пептон	5 г
Агар	15 г
Дистиллированная вода	400 мл

Раствор В:

Бычья желчь	40 г
Дистиллированная вода	400 мл

Раствор С:

Цитрат железа	0,5 г
Дистиллированная вода	100 мл

Смешивают три раствора и смесь нагревают 10 мин при 100 °С. Стерилизуют 15 мин при 121 °С и охлаждают до 50 °С. С соблюдением правил асептики добавляют 100 мл 1%-ного раствора эскулина, стерилизованного фильтрованием, и смесь разливают в стерильные пробирки для получения косячков.

8.5.10. Агар BMS, или картофельный агар [17]

Отмытый, очищенный картофель, нарезанный ломтиками	200 г
Л-яблочная кислота	2,5 г
КОН	2 г
Нерафинированный тростниковый сахар	2,5 г
Раствор витаминов (разд. 8.5.37)	1,0 мл
Бромтимоловый синий (0,5%-ный спиртовой раствор)	2 капли
Агар	15 г
Дистиллированная вода	1000 мл

Картофель в марлевом мешке кипятят 30 мин в 1 л воды. Полученный экстракт фильтруют через вату и фильтрат сохраняют. Яблочную кислоту растворяют в 50 мл воды и добавляют 2 капли бромтимолового синего и КОН, пока раствор яблочной кислоты не станет зеленым (рН 7,0). Этот раствор, а также тростниковый сахар, витамины и агар добавляют к картофельному фильтрату. Дистиллированной водой доводят объем раствора до 1 л, кипятят до растворения агара и стерилизуют 15 мин при 121 °С.

8.5.11. Модифицированный агар Борде — Жангу [3]

125 г отмытого, очищенного и нарезанного ломтиками картофеля в марлевом мешке погружают в смесь, состоящую из 10 мл глицерина и 500 мл воды. Варят картофель до мягкости и затем выжимают его через марлю в смесь воды с глицерином. Дают жидкости отстояться в высоком цилиндре до относительного просветления. Надосадочную жидкость декантируют и доводят ее объем до 1 л дистиллированной водой. Добавляют 5,6 г NaCl с нагреванием, а затем 22,5 г агара, который растворяют кипячением с постоянным перемешиванием. Смесь стерилизуют 15 мин при 121 °С и охлаждают до 45 °С. С соблюдением правил асептики добавляют 200 мл дефибрированной овечьей крови (разд. 20.3.7), перемешивают и разливают в чашки Петри. Основной агар Борде-Жангу производится фирмами BBL и Difco.

8.5.12. Агар с бриллиантовой зеленью (BBL или Difco)

Панкреатический гидролизат казеина USP	5 г
Пептический гидролизат животных тканей USP	5 г
Дрожжевой экстракт	3 г
NaCl	5 г
Лактоза	10 г
Сахароза	10 г
Феноловый красный	0,08 г
Бриллиантовая зелень	0,0125 г
Агар	20 г
Дистиллированная вода	1000 мл

Доводят рН до 6,9. Кипятят до растворения агара и стерилизуют 15 мин при 121 °С.

8.5.13. Бульон с желчью, лактозой и бриллиантовой зеленью

<i>Раствор А:</i>		<i>Раствор В:</i>	
Лактоза	10 г	Бычья желчь	20 г
Пептон	10 г	Дистиллированная	200 мл
Дистиллированная	500 мл	вода	
вода			

Смешивают растворы А и В и доводят дистиллированной водой до 975 мл. Устанавливают рН 7,4, добавля-

ют 13,3 мл 0,1%-ного водного раствора бриллиантовой зелени и дистиллированной водой доводят объем до 1 л. Смесь разливают в пробирки, содержащие перевернутые поплавки, и стерилизуют 15 мин при 121 °С.

8.5.14. Агар для бруцелл (BBL или Difco)

Панкреатический гидролизат казеина	10 г
Пептический гидролизат животных тканей	10 г
Глюкоза	1 г
Дрожжевой автолизат	2 г
NaCl	5 г
Бисульфит натрия	0,1 г
Агар	15 г
Дистиллированная вода	1000 мл

Доводят рН до 7,0, кипятят до растворения агара и стерилизуют 15 мин при 121 °С.

8.5.15. Среда CHSS для *Spirillum volutans*

Кислотный гидролизат казеина, без витаминов и солей (ICN Nutritional Biochem Cleveland, Ohio)	2,5 г
Янтарная кислота	1 г
(NH ₄) ₂ SO ₄	1 г
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1 г
NaCl	0,1 г
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0,002 г
MnSO ₄ ·H ₂ O	0,002 г
Дистиллированная вода	1000 мл

Доводят рН до 7,0 с помощью 2 н. КОН. Для получения полужидких сред добавляют 1,5 г агара и кипятят до его растворения. Стерилизуют 20 мин при 121 °С.

8.5.16. Кровяной агар с цистином и теллуридом [3]

Агар с экстрактом сердечной мышцы (основной кровя- ной агар, разд. 20.3.31)	500 мл
Агар	2,5 г

Доводят рН до 7,4, кипятят до растворения агара, стерилизуют 15 мин при 121 °С и охлаждают до 56 °С.

С соблюдением правил асептики добавляют следующие ингредиенты:

Дефибрированная кроличья или овечья кровь (разд. 20.3.7)	25 мл
0,3%-ный раствор теллурида калия, стерилизованный автоклавированием	75 мл
L-Цистин	22 мг

Во время разлива в чашки Петри смесь помешивают, чтобы цистин оставался в суспендированном состоянии.

8.5.17. Агар Е [3]

Папайновый гидролизат соевой муки USP	20 г
NaCl	5 г
Агар	10 г
Деионизованная вода	1000 мл

Смесь нагревают до растворения ингредиентов, охлаждают и с помощью NaOH доводят pH до 7,4. Разливают и стерилизуют 15 мин при 121 °С, а затем охлаждают до 50 °С. К 65 мл раствора добавляют с соблюдением правил асептики 10 мл дрожжевого диализата (см. ниже), 25 мл лошадиной сыворотки, 2 мл пенициллина (10000 ед./мл) и 1 мл 3,3%-ного ацетата таллия (стерилизованного фильтрованием). Среду разливают по 5 мл в чашки Петри (10×35 мм) и перед использованием инкубируют в течение ночи при комнатной температуре.

Дрожжевой диализат:

450 г активных сухих дрожжей суспендируют в 1250 мл дистиллированной воды при 40 °С. Нагревают 5 мин при 121 °С и диализуют против 1 л дистиллированной воды в течение 2 дней при 4 °С. Диализный мешок вместе с содержимым удаляют, а диализат стерилизуют 15 мин при 121 °С и хранят в морозильной камере.

Двухфазная среда

Для получения двухфазной среды в стерильные пробирки (16×25 мм) с завинчивающимися крышками с соблюдением правил асептики разливают по 3 мл Е-агара. После затвердения на среду наслаивают 3 мл Е-бульона (разд. 8.5.18) и хранят пробирки при комнатной температуре.

8.5.18. Е-бульон [3]

Папайновый гидролизат соевой муки USP	20 г
NaCl	5 г
Глюкоза	10 г
Феноловый красный, 2%-ный водный раствор	2 мл
Деионизованная вода	1000 мл

Доводят pH до 7,6, разливают и стерилизуют 15 мин при 121 °С. После охлаждения к бульону добавляют те же компоненты, что и в случае Е-агара (разд. 8.5.17).

8.5.19. Основная среда Гизбергера [83]

NH ₄ Cl	1 г
K ₂ HPO ₄	0,5 г
MgSO ₄	0,5 г
Дистиллированная вода (см. примечание)	1000 мл

Доводят pH до 7 и стерилизуют 15 мин при 121 °С. (Примечание: для морских микроорганизмов вместо дистиллированной воды используют морскую.)

8.5.20. Глюкозо-триптоновый агар [6]

Триптон (Difco) или триптиказа	10 г
Глюкоза	5 г
Агар	15 г
Бромкрезоловый фиолетовый	0,04 г
Дистиллированная вода	1000 мл

Доводят pH до 6,7, кипятят до растворения агара и стерилизуют 15 мин при 121 °С.

8.5.21. Среда для галофилов [65]

Казаминовые кислоты	7,5 г	KCl	2 г
Дрожжевой экстракт	10 г	MgSO ₄ ·7H ₂ O	20 г
Тринатрий-цитрат	3 г	FeCl ₂	0,023 г
		NaCl	250 г
		Дистиллированная вода	1000 мл

Перечисленные ингредиенты растворяют в 800 мл дистиллированной воды и доводят рН до 7,5—7,8 с помощью 1 н. КОН. Автоклавируют среду 5 мин при 120 °С и затем фильтруют для удаления осадка. Доводят рН до 7,4 с помощью 1 н. HCl, а объем среды — до 1000 мл и стерилизуют автоклавированием. Если необходима твердая среда, то добавляют 20 г агара на 1 л, кипятят до его растворения, а затем автоклавируют. Среду разливают в чашки Петри при 60—70 °С, чтобы предотвратить ее преждевременное отверждение.

8.5.22. Среда для *Hyphomicrobium* [9]

K_2HPO_4	1,74 г
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	1,38 г
$(NH_4)_2SO_4$	0,5 г
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2 г
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0,025 мг
$FeCl_2 \cdot 4H_2O$	3,5 мг
Метанол	5 мл
KNO_3	5 г
Раствор микроэлементов (см. ниже)	0,5 мл
Деионизованная вода	1000 мл

Доводят рН до 7,0 с помощью NaOH. Среду, используемую для получения накопительных культур, не стерилизуют. Среду, используемую для выделения чистых культур, стерилизуют 15 мин при 121 °С перед добавлением метанола. Для приготовления твердой среды, используемой при выделении бактерий, добавляют 15 г агара на 1 л и исключают из смеси KNO_3 . Перед добавлением метанола среду стерилизуют 15 мин при 121 °С. Для удаления кислорода из всех жидких сред перед использованием через них продувают азот. В анаэробных условиях KNO_3 в этих средах служит акцептором электронов.

Раствор микроэлементов:

$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	50 мг
$MgCl_2 \cdot 4H_2O$	400 мг
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	1 мг
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,4 мг
H_3BO_3	2000 мг
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	500 мг
Деионизованная вода	1000 мл

8.5.23. Среда Иверсона [33]

Триптиказо-соевый агар (обезвоженный, BBL)	40 г
Агар	5 г
Лактат натрия, 0,4%-ный раствор	600 мл
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	2 г
Железоаммонийсульфат	0,5 г
Дистиллированная вода	400 мл

Доводят рН до 7,2—7,4, кипятят до растворения агара и стерилизуют 15 мин при 121 °С.

8.5.24. Лактатная среда

Дрожжевой экстракт	1 г
Лактат натрия	4 г
NH_4Cl	0,5 г
K_2HPO_4	1 г
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2 г
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0,1 г
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,1 г
Na_2SO_4	0,5 г
NaCl (для морских организмов)	(20—30 г)

Стерилизуют 15 мин при 121 °С.

8.5.25. Бульон для листерий [3]

Пептон, триптоза (Difco) или биосейт (BBL)	20 г
Глюкоза (декстроза)	2 г
NaCl	5 г
Na_2HPO_4	2,5 г
Дистиллированная вода	1000 мл

Доводят рН до 7,3 и стерилизуют 15 мин при 121 °С.

8.5.26. Среда Лёвенштейна — Иенсена (BBL или Difco)

KH_2PO_4	2,4 г
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,24 г
Цитрат магния	0,60 г
Аспарагин	3,6 г
Картофельная мука	30 г
Глицерин	12 мл
Дистиллированная вода	600 мл
Гомогенизированные яйца	1000 мл
Малахитовый зеленый 2- % ный водный раствор	200 мл

Соли и аспарагин растворяют в воде, добавляют к ним глицерин и картофельную муку и автоклавируют 30 мин при 121 °С. Скорлупу свежих (хранящихся не более недели) яиц тщательно моют в 5%-ном мыльном растворе. Оставляют яйца в этом растворе на 30 мин, а затем скорлупу вновь тщательно моют в проточной холодной воде. На 15 мин погружают яйца в 70%-ный этанол, затем вынимают их и разбивают в стерильную колбу. Гомогенизируют яйца встряхиванием со стеклянными бусами, гомогенат фильтруют через четыре слоя стерильной марли и 1 л отфильтрованного яичного гомогената вливают в колбу с охлажденной картофельно-солевой смесью. Добавляют малахитовый зеленый, хорошо перемешивают и разливают по 6—8 мл в стерильные пробирки (20×150 мм) с закручивающимися крышками. Наклоняют пробирки и выдерживают их в течение 50 мин при 85 °С для сгущения содержимого. Стерильность пробирок проверяют инкубацией в течение 48 ч при 37 °С. Хранят пробирки с плотно закрученными крышками в холодильнике.

8.5.27. Агар Мак-Конки (BBL или Difco)

Пептон (Difco) или джелизат (BBL)	17 г
Протеозопептон (Difco) или полипептон (BBL)	3 г
Лактоза	10 г
Смесь желчных солей	1,5 г
NaCl	5 г
Нейтральный красный	0,03 г
Кристаллический фиолетовый	0,001 г
Агар	13,5 г
Дистиллированная вода	1000 мл

Доводят pH до 7,1, кипятят до растворения агара и стерилизуют 15 мин при 121 °С.

8.5.28. Солевой агар с маннитом (BBL или Difco)

Мясной экстракт	1 г
Пептон (Difco) или полипептон (BBL)	10 г
NaCl	75 г
Маннит	10 г
Феноловый красный	0,025 г
Агар	15 г
Дистиллированная вода	1000 мл

Доводят рН до 7,4, кипятят до растворения агара, стерилизуют 15 мин при 121 °С, охлаждают до 55 °С и разливают по чашкам Петри.

8.5.29. Среда Мак-Брайда для листерий [3] (Difco)

Пептон, триптоза (Difco) или биосейт (BBL)	10 г
Мясной экстракт	3 г
NaCl	5 г
Ангидрид глицина	10 г
LiCl	0,5 г
Фенилэтанол	2,5 г
Агар	15 г
Дистиллированная вода	1000 мл

Доводят рН до 7,3, кипятят до растворения агара и стерилизуют 15 мин при 121 °С. Среду охлаждают до 45—50 °С и добавляют к ней стерильную дефибрированную овечью кровь до конечной концентрации 5%.

8.5.30. Минеральный агар [7]

$\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	9 г
KH_2PO_4	1,5 г
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2 г
NH_4Cl	1 г
Железоаммонийцитрат	0,005 г
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,010 г
Раствор микроэлементов (см. ниже)	3 мл
Бидистиллированная вода	1000 мл

Доводят рН до 7,1 и стерилизуют 15 мин при 121 °С. Для получения твердой среды добавляют 17 г агара на 1 л, смесь кипятят до его растворения и стерилизуют автоклавированием. После охлаждения среды до 45—50 °С добавляют нужное количество раствора NaHCO_3 (стерилизованного фильтрованием) до конечной концентрации 0,5 г/л.

Раствор микроэлементов:

$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10 мг
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	3 мг
H_3BO_3	30 мг
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	20 мг
$\text{CuCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,79 мг
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2 мг
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	3 мг
Бидистиллированная вода	1000 мл

8.5.31. Агар для *Streptococcus mitis* и *S. salivarius* [13] (Difco)

Триптон (Difco)	10 г
Протеозопептон № 3 (Difco)	5 г
Протеозопептон (Difco)	5 г
Глюкоза	1 г
Сахароза	50 г
K_2HPO_4	4 г
Трипановый синий	0,075 г
Кристаллический фиолетовый	0,0008 г
Агар	15 г
Дистиллированная вода	1000 мл

Доводят pH, кипятят до растворения агара, стерилизуют 15 мин при 121 °C и затем охлаждают до 50—55 °C. Добавляют 1 мл 0,1%-ного теллурита калия (стерилизованного фильтрованием), перемешивают и разливают в чашки Петри.

8.5.32. Среда MN [59]

$NaNO_3$	0,75 г
$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	0,02 г
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,038 г
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0,018 г
Лимонная кислота	0,003 г
Железоаммонийцитрат	0,003 г
ЭДТА, двунариевая магниевая соль	0,0005 г
Na_2CO_3	0,02 г
Смесь микроэлементов А5 (см. среду BG-11 в разд 8 5 8)	1 мл
Морская вода	750 мл
Денонизованная вода	250 мл

После автоклавирования и охлаждения pH среды должен быть 8,3.

8.5.33. Модифицированная среда Рогозы [46]

Раствор А:

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	11,5 г
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	2,8 г
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,08 г
Дистиллированная вода	100 мл

Раствор В:

Дрожжевой экстракт	6 г
Кислый аммонийцитрат	2,4 г
KH_2PO_4	7,2 г
Глюкоза	124 г
Твин 80	1,2 г
Дистиллированная вода	100 мл

Раствор С:

К 100 мл раствора В добавляют 6 мл раствора А. Слабо нагревают до растворения ингредиентов, а затем добавляют 60 мл 4 М ацетатного буфера, рН 5,37, и доводят дистиллированной водой объем раствора до 200 мл. Конечный рН среды равен 5,0.

Раствор D:

Снятое сырое молоко (рН доведен до 8,5)	1000 мл
Трипсин	5 г
Хлороформ	10 мл

Инкубируют 24 ч при 37 °С, стерилизуют паром 20 мин, фильтруют горячий раствор и доводят рН до 6,65 ледяной уксусной кислотой (около 0,5 мл на 1 л).

Для приготовления полной среды добавляют к 700 мл раствора D 19 г агара, который растворяется во время автоклавирования при 121 °С в течение 20 мин. К этому горячему раствору добавляют 185 мл раствора С, предварительно нагретого до 50 °С, и доводят объем до 1 л горячим раствором D. Проба из полученной среды, разведенная в 3 раза теплой водой, должна при 30 °С иметь рН $5,35 \pm 0,05$. Среду разливают по 10 мл в пробирки и без стерилизации хранят в холодильнике. При разливе среды по чашкам ее расплавляют слабым нагреванием, стараясь избежать потемнения среды и образования осадка.

8.5.34. Модифицированная среда Вольфа [40, 54]

Приготовление железосульфидного агара

Равные количества железоаммонийсульфата и сульфида натрия вливают в кипящую дистиллированную воду, заполняют этой смесью мерную колбу и закрывают ее. Осадку дают возможность осесть, а надосадочную жидкость сливают. К осадку вновь добавляют кипящей дистиллированной воды и несколько раз переворачивают колбу, ресуспендируя осадок. Дают осадку осесть, надосадочную жидкость сливают, а к осадку опять добавляют кипящую дистиллированную воду и т. д. Таким способом отмывают сульфид железа четыре раза. Осадок хранят в мерной колбе, наполненной водой и закрытой пробкой. Сульфид железа достают со дна колбы пипеткой.

8. ПОЛУЧЕНИЕ НАКОПИТЕЛЬНЫХ И ЧИСТЫХ КУЛЬТУР

К 100 мл осадка сульфида железа добавляют 15 г очищенного агара, кипятят среду до расплавления агара и стерилизуют 20 мин при 121 °С. Смесь разливают пипеткой по 10 мл в стерильные прямоугольные 150-миллитровые молочные бутылки с завинчивающимися крышками и дают агару застыть.

Приготовление жидкого поверхностного слоя

В каждой бутылке на агар наносят 50 мл (100 мл в случае получения накопительной культуры с формалином) среды следующего состава:

NH_4Cl	1 г
K_2HPO_4	0,5 г
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2 г
CaCl_2	0,1 г
Бромтимоловый синий	0,016 г
Бромкрезоловый фиолетовый	0,004 г
Дистиллированная вода	1000 мл

Стерилизуют 20 мин при 121 °С. После охлаждения среду вносят с соблюдением правил асептики в сосуды с железосульфидным агаром. Через жидкий слой в течение 15 с или до снижения pH до 6,0 продувают CO_2 .

8.5.35. Агар MPSS

Пептон (Difco)	5 г
Янтарная кислота	1 г
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1 г
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1 г
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,002 г
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,002 г
Агар	15 г
Дистиллированная вода (см. примечание)	1000 мл

Доводят pH до 7,0 с помощью KOH, кипятят до растворения агара и стерилизуют 15 мин при 121 °С. (*Примечание:* для морских микроорганизмов вместо дистиллированной воды используют морскую.)

8.5.36. Реактив, содержащий N-ацетил-L-цистеин и гидроксид натрия [20]

Объединяют равные объемы 4 %-ного NaOH и 2,94 %-ного цитрата натрия $\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ и разводят в этом растворе

порошок N-ацетил-L-цистеина (0,5%). Приготовленный раствор годен в течение суток.

8.5.37. Среда Nfb [17]

L-Яблочная кислота	5 г
K_2HPO_4	0,5 г
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2 г
NaCl	0,1 г
$CaCl_2$	0,02 г
Раствор микроэлементов (см. ниже)	2 мл
Бромтимоловый синий (5%-ный спиртовой раствор)	2 мл
Fe-ЭДТА (1,64%-ный раствор)	4 мл
Раствор витаминов (см. ниже)	1 мл
KOH	4 г
Агар	1,75 г
Дистиллированная вода	1000 мл

Доводят рН до 6,8, кипятят до растворения агара и стерилизуют 15 мин при 121 °С. Среду охлаждают до 40—50 °С и разливают по 4 мл в 6-миллилитровые сывороточные пузырьки с резиновыми прокладками.

Раствор микроэлементов:

$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,2 г
$MnSO_4 \cdot H_2O$	0,235 г
H_3BO_3	0,28 г
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,008 г
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,024 г
Дистиллированная вода	200 мл

Раствор витаминов:

Биотин	10 мг
Пиридоксин	20 мг
Дистиллированная вода	100 мл

8.5.38. Среда для нитрификаторов [58]

Na_2HPO_4	13,5 г
KH_2PO_4	0,7 г
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,1 г
$NaHCO_3$	0,5 г
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,014 г
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0,18 г
Дистиллированная вода	1000 мл

Разливают среду по 75 мл в 250-миллилитровые колбы Эрленмейера и стерилизуют 15 мин при 121 °С. В случае бактерий, окисляющих нитрит, перед стерилизацией

в среду добавляют 0,5 г NaNO_2 на 1 л. Для бактерий, окисляющих аммоний, стерилизуют отдельно раствор $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и добавляют его с соблюдением правил асептики до конечной концентрации 0,5 г/л.

8.5.39. Среда Пфеннига и Библа для серуокисляющих бактерий [56]

KH_2PO_4	1 г
NH_4Cl	0,3 г
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1 г
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2 г
NaCl (для морских организмов)	(20 г)
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,1 г
Раствор микроэлементов (см. ниже)	10 мл
Раствор 2 М H_2SO_4	2 мл
Дистиллированная вода	1000 мл

Стерилизуют автоклавированием и после охлаждения добавляют следующие компоненты основного раствора:

Ацетат натрия	0,5 г
NaHCO_3 (простерилизован фильтрованием при положительном давлении)	4 г
$\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	0,3 г
Биотин	20 мкг

Доводят рН до 7,8. Растирают высокоочищенный серный цвет с дистиллированной водой в ступке и стерилизуют его 30 мин при 112—115 °С; избыток воды декантируют. К каждой порции среды (50 мл) добавляют кусочек серы размером с горошину. Кроме того, в каждую бутылку со средой добавляют стерильные стеклянные бусы.

Раствор микроэлементов:

ЭДТА, двунариевая соль	500 мг
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	200 мг
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10 мг
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	3 мг
H_3BO_3	30 мг
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	20 мг
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1 мг
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2 мг
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	3 мг
Деионизованная вода	1000 мл

8.5.40. Фенилэтаноловый агар (BBL или Difco)

Паикреатический гидролизат казеина USP	15 г
Папаиновый гидролизат соевой муки USP	5 г
NaCl	5 г
Фенилэтанол	2,5 г
Агар	15 г
Дистиллированная вода	1000 мл

Доводят pH до 7,3, кипятят до растворения агара и стерилизуют 15 мин при 118 °C.

8.5.41. Почвенная среда Прингсхейма [60]

Зерно пшеницы или ячменя вносят в большую пробирку и покрывают его садовой почвой толщиной 3—4 см. Пробирку заполняют водопроводной водой почти доверху. Стерилизуют среду 30 мин при 121 °C.

8.5.42. Среда RGCA-SC [27]

Глюкоза	0,0248 г
Целлобиоза	0,0248 г
Растворимый крахмал	0,05 г
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,1 г
Раствор ресазурина (0,025%)	0,4 мл
Дистиллированная вода	20 мл
Раствор солей (разд. 20.3.28)	50 мл
Рубцовая жидкость (Randolph Biologicals, Houston, Tex.)	30 мл
Солянокислый цистеин	0,05 г
Раствор гемина (разд. 20.3.28)	1 мл
Раствор витамина K ₁ (разд. 20.3.28)	0,02 мл

Среду готовят способом, описанным для бульона PY (разд. 20.3.28), разливают по 10 мл в пробирки, содержащие 0,2 г агара, и автоклавируют. Для приготовления конечной среды в двух пробирках агар расплавляют и охлаждают до 50 °C. В каждую пробирку добавляют с соблюдением правил асептики:

Стерильную инактивированную сыворотку кролика, нагревавшуюся в течение 4 ч при 60 °C	1,5 мл
Раствор кокарбоксилазы (тиаминпирофосфата; 0,025%), стерилизованный фильтрованием	0,2 мл
Стерильный предварительно восстановленный бульон PY (разд. 20.3.28)	2,0 мл

8. ПОЛУЧЕНИЕ НАКОПИТЕЛЬНЫХ И ЧИСТЫХ КУЛЬТУР

Смешивают и переливают содержимое двух пробирок в чашку Петри, где среда застывает. Среду либо используют немедленно, либо хранят в анаэроостате.

8.5.43. Агар для салмонелл и шигелл (BBL или Difco)

Мясной экстракт	5 г
Пептон	5 г
Лактоза	10 г
Смесь желчных солей	8,5 г
Цитрат натрия	8,5 г
Тиосульфат натрия	8,5 г
Цитрат железа	1 г
Бриллиантовая зелень	0,33 г
Нейтральный красный	0,025 г
Агар	13,5 г
Дистиллированная вода	1000 мл

Доводят рН до 7,0 и нагревают до кипения, чтобы растворить агар. Автоклавирования не проводят. Охлаждают до 42—45 °С и разливают в чашки Петри.

8.5.44. Бульон с селенитом F [43] (BBL или Difco)

Полипептон (BBL) или триптон (Difco)	5 г
Лактоза	4 г
Na_2HPO_4	10 г
Кислый селенит натрия	4 г
Дистиллированная вода	1000 мл

Доводят рН до 7,0. Среду используют сразу же без стерилизации или хранят пробирки после их стерилизации с текущим паром в течение 30 мин.

8.5.45. Бульон гидролизата казеина и соевой муки

[известен также, как триптиказо-соевый бульон (BBL) или триптический соевый бульон (Difco)]

Панкреатический гидролизат казеина	17 г
USP	
Папаиновый гидролизат соевой муки	3 г
USP	
NaCl	5 г
K_2HPO_4	2,5 г
Глюкоза	2,5 г
Дистиллированная вода	1000 мл

Доводят рН до 7,3 и стерилизуют 15 мин при 118—121 °С.

8.5.46. Среда для *Sphaerotilus* [8]

Лактат натрия	100 мг
NH ₄ Cl	1,7 мг
KH ₂ PO ₄	8,5 мг
K ₂ HPO ₄	21,5 мг
Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	34,4 мг
MgSO ₄ ·7H ₂ O	22,5 мг
CaCl ₂	27,5 мг
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0,25 мг
Дистиллированная вода	1000 мл

При необходимости доводят рН до 7,1—7,2. Разливают порции по 50 мл в квадратные бутылки Френча и стерилизуют 15 мин при 116 °С.

8.5.47. Среда для *Sporocytophaga*

Бумага Whatman Chro-media 11	10 г
KNO ₃	0,5 г
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2 г
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,1 г
FeCl ₃	0,02 г
Дистиллированная вода	1000 мл

8.5.48. Агар для стандартных методов [6] (BBL или Difco)

Панкреатический гидролизат казеина USP	5 г
Дрожжевой экстракт	2,5 г
Глюкоза	1 г
Агар	15 г
Дистиллированная вода	1000 мл

Доводят рН до 7,0, кипятят до растворения агара и стерилизуют 15 мин при 121 °С.

8.5.49. Среда с сукцинатом и солями

Сукцинат натрия	4 г	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2
KNO ₃	0,5 г	CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,1
K ₂ HPO ₄	0,5 г	FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,2

Доводят рН до 7,0 и стерилизуют 15 мин при 121 °С.

8.5.50. Агар TCBS [3] (BBL)

Тиосульфат натрия	10 г
Цитрат натрия	10 г
Бычья желчь	5 г
Холат натрия	3 г
Сахароза	20 г
Панкреатический гидролизат казеина USP	5 г
Пептический гидролизат животных тканей USP	5 г
Дрожжевой экстракт	5 г
NaCl	10 г
Цитрат железа	1 г
Тимоловый синий	0,04 г
Бромтимоловый синий	0,04 г
Агар	14 г
Дистиллированная вода	1000 мл

Нагревают, помешивая, и кипятят 1 мин. Среду охлаждают до 45—50 °С и разливают в чашки. Автоклавирования не проводят. Конечный pH должен быть 8,6.

8.5.51. Агар с ацетатом таллия

Ацетат таллия	1 г
Пептон	10 г
Дрожжевой экстракт	10 г
Глюкоза	10 г
Агар	13 г
Дистиллированная вода	1000 мл

Доводят pH до 6,0, кипятят до растворения агара и стерилизуют 15 мин при 118 °С. Смесь охлаждают до 45—50 °С, добавляют к ней с соблюдением правил асептики 10 мл солянокислого трифенилтетразолия (1 %-ный водный раствор, стерилизованный фильтрованием) и разливают в чашки Петри.

8.5.52. Агар Тейера и Мартина

Эту среду чаще всего готовят из имеющихся в продаже концентратов и растворов или используют готовую (BBL или Difco).

Раствор А (основной агар GC двойной концентрации):

Панкреатический гидролизат казеина USP	15 г
Пептический гидролизат животной ткани USP	15 г

ЧАСТЬ II. РОСТ

Кукурузный крахмал	2 г
K_2HPO_4	8 г
KH_2PO_4	2 г
NaCl	10 г
Агар (см. примечание)	20 г
Дистиллированная вода	1000 мл

Кипятят до растворения агара и стерилизуют 15 мин при 121 °С, после чего охлаждают до 50 °С. (Примечание: Файнголд и др. [20] рекомендуют увеличить количество агара до 30 г.)

Раствор В:

Гемоглобин	20 г
Дистиллированная вода	1000 мл

К небольшому количеству воды постепенно добавляют порошок гемоглобина, чтобы получить однородную пасту; затем постепенно добавляют остальную воду. Стерилизуют 15 мин при 121 °С.

Раствор С:

Витамины B_{12}	0,010 г
L-Глутамин	10 г
Аденин	1 г
Солянокислый гуанин	0,03 г
<i>п</i> -Аминобензойная кислота	0,013 г
L-Цистин	1,1 г
Глюкоза	100 г
Никотинамидадениндинуклеотид	0,25 г
Тиаминпирофосфат (кокарбоксилаза)	0,1 г
Нитрат железа	0,02 г
Солянокислый тиамин	0,003 г
Солянокислый цистеин	25,9 г
Дистиллированная вода	1000 мл

Стерилизуют фильтрованием.

Раствор D:

Ванкомицин	30 мг
Колистин	75 мг
Нистатин	125 000 ед.
Дистиллированная вода	100 мл

Стерилизуют фильтрованием.

С соблюдением правил асептики объединяют по 1000 мл растворов А и В и по 20 мл растворов С и D. Среду разливают в чашки Петри.

8.5.53. Среда для *Thiobacillus thiooxidans* [78]

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	10 г
KH_2PO_4	4 г
K_2HPO_4	4 г
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,8 г
NH_4Cl	0,4 г
Раствор микроэлементов (см. ниже)	10 мл
Деионизованная вода	1000 мл

Стерилизуют 15 мин при 121 °С. Доводят рН до 3,5—4,0 стерильной H_2SO_4 . Для получения твердой среды перед доведением рН добавляют 15 г агара на 1 л. Кипятят до растворения агара, стерилизуют автоклавированием и охлаждают до 45—50 °С. Доводят рН до 3,5—4,0 стерильной H_2SO_4 .

Раствор микроэлементов:

ЭДТА	50 г
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	22 г
CaCl_2	5,54 г
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	5,06 г
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	4,99 г
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1,1 г
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1,57 г
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,61 г
Дистиллированная вода	1000 мл

Доводят рН до 6,0 с помощью КОН.

8.5.54. Среда с триптофаном [44]

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2 г
K_2HPO_4	1 г
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,002 г
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,05 г
CaCl_2	0,02 г
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,001 г
L-Триптофан	1 г
Дистиллированная вода	1000 мл

Доводят рН до 6,8—7,0 и стерилизуют автоклавированием.

8.5.55. Среда Велдкамп [77]

NaCl	30 г
KH_2PO_4	1 г
NH_4Cl	1 г
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,5 г

CaCl ₂	0,04 г
NaHCO ₃	5 г
Na ₂ S·9H ₂ O	0,1 г
Цитрат железа, 0,004 М раствор	5 мл
Раствор микроэлементов (см. ниже)	2 мл
Агар, порошок	5 г
Дрожжевой экстракт	0,3 г
Дистиллированная вода	1000 мл

Доводят рН до 7,0. Для получения первичной накопительной культуры среду используют без стерилизации. Чтобы получить среду, используемую для посева разливом в чашки, готовят среду двойной концентрации, но без агара, доводят ее рН до указанного значения и стерилизуют фильтрованием (положительное давление). Отдельно готовят 4%-ный раствор агара в свежедистиллированной прокипяченной воде и стерилизуют его кратковременным автоклавированием. Температуру среды двойной концентрации и расплавленного агара доводят до 45—50 °С и с соблюдением правил асептики смешивают их в равных объемах.

Раствор микроэлементов:

H ₃ BO ₃	2,8 г
MnSO ₄ ·H ₂ O	2,1 г
Cu(NO ₃) ₂ ·3H ₂ O	0,2 г
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,75 г.
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,2 г
Zn(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0,25 г
Деионизованная вода	1000 мл

8.5.56. Агар с желчью и фиолетовым красным [6]

Дрожжевой экстракт	3 г
Пептон (Difco) или джеллизат (BBL)	7 г
Смесь желчных солей	1,5 г
Лактоза	10 г
NaCl	5 г
Нейтральный красный	0,03 г
Кристаллический фиолетовый	0,002 г
Агар	15 г
Дистиллированная вода	1000 мл

Доводят рН до 7,4, кипятят до растворения агара, охлаждают примерно до 45 °С и используют для заполнения чашек. После застывания среды ее покрывают дополнительным слоем среды, чтобы предотвратить поверхностный рост и распространение колоний.

8.5.57. Среда Виддла и Пфеннига [81]

Ацетат натрия	1,23 г
Na_2SO_4	2,84 г
KH_2PO_4	0,68 г
MgCl_2	0,19 г
NH_4Cl	0,32 г
CaCl_2	0,07 г
Раствор микроэлементов (см. ниже)	10 мл
Дистиллированная вода	1000 мл

Стерилизуют 15 мин при 121 °С. Затем добавляют следующие ингредиенты из стерильных основных растворов:

FeCl_2 (из подкисленного основного раствора)	0,00025 г
NaHCO_3 (стерилизован фильтрованием при положительном давлении)	1,68 г
Na_2S (стерилизован фильтрованием)	0,117 г
Раствор витаминов (стерилизован фильтрованием, см. ниже)	5 мл
Витамин B_{12} (стерилизован фильтрованием)	20 мкг

Доводят рН среды до 7,1 стерильным раствором H_3PO_4 . После инокуляции к среде добавляют 0,0315 г $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ на 1 л (из свежеприготовленного основного раствора, стерилизованного фильтрованием). Для морских микроорганизмов добавляют 20 г NaCl и 1,14 г MgCl_2 на 1 л среды.

Раствор микроэлементов:

$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10 мг
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	3 мг
H_3BO_3	30 мг
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	20 мг
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1 мг
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2 мг
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	3 мг
Деионизованная вода	1000 мл

Раствор витаминов:

Биотин	0,2 мг
Ниацин	2 мг
Тиамин	1 мг
<i>n</i> -Аминобензойная кислота	1 мг
Пантотеновая кислота	0,5 мг
Пиридоксамин · HCl	5 мг
Дистиллированная вода	100 мл

Растворяют ингредиенты, стерилизуют их фильтрованием и хранят при 4 °С.

8.5.58. Щелочная среда Вили и Стокса [82]

Дрожжевой экстракт	20 г
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	10 г
Трис	15,7 г
Дистиллированная вода	1000 мл

Основные растворы каждого ингредиента готовят отдельно и стерилизуют их автоклавированием (рН-трис-буфера должен быть 9,0). Смешивают ингредиенты с соблюдением правил асептики и проверяют конечный рН, который должен быть 8,7. Для получения твердой среды добавляют 15 г агара на 1 л среды.

8.5.59. Агар с дрожжевым экстрактом и маннитом

Маннит	10 г
K_2HPO_4	0,5 г
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2 г
NaCl	0,1 г
CaCO_3	3 г
Дрожжевой экстракт	0,2 г
Агар	15 г
Дистиллированная вода	1000 мл

Кипятят до растворения агара и стерилизуют 15 мин при 121 °С.

8.5.60 Среда YP [75]

Дрожжевой экстракт	3 г
Пептон	0,6 г
Дистиллированная вода	1000 мл

Доводят рН до 7,2 и стерилизуют 15 мин при 121 °С. Для полужидкой среды YP, используемой как покрытие, добавляют 6 г агара на 1 л; для получения твердой среды добавляют 19 г агара на 1 л. Кипятят до растворения агара и стерилизуют автоклавированием.

8.6. ЛИТЕРАТУРА

8.6.1. Общая литература

1. *Aaronson S.* Experimental microbial ecology, Academic Press, Inc., New York, 1970. Содержит очень много подробных методов получения накопительных культур и выделения большого числа бактерий.

2. Collins V. G. Isolation, cultivation and maintenance of autotrophs, p. 1—52. In: J. R. Norris and D. W. Ribbons (eds.), *Methods in microbiology*, vol. 3B, Academic Press, Inc., New York (1969). Обстоятельный обзор принципов и методов получения накопительных культур и выделения фото- и хемоавтотрофов.
3. Lennette E. H., Balows A., Hausler W. J., Jr., Truant J. P. (eds.). *Manual of clinical microbiology*, 3rd ed., American Society for Microbiology, Washington, D. C., 1980. Принципы и методология получения накопительных культур и выделения патогенных бактерий, риккетсий, вирусов и грибов.
4. Veldkamp H. Enrichment cultures of prokaryotic organisms, p. 305—361. In: J. R. Norris and D. W. Ribbons (eds.), *Methods in microbiology*, vol. 3A, Academic Press, Inc., New York, 1970. Основное внимание уделено теоретическим аспектам получения накопительных культур; описаны методы накопления специфических микроорганизмов.

8.6.2. Специальная литература

5. Allen O. A. *Experiments in soil bacteriology*, 3rd ed., Burgess Publishing Co., Minneapolis, 1957.
6. American Public Health Association. *Standard methods for the examination of dairy products*, 11th ed., American Public Health Association, New York, 1960.
7. Aragno M., Schlegel H. G. *Aquaspirillum autotrophicum*, a new species of hydrogen-oxidizing, facultatively autotrophic bacteria, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **28**, 112—116 (1978).
8. Armbruster E. H. Improved technique for isolation and identification of *Sphaerotilus*, *Appl. Microbiol.*, **17**, 320—321 (1969).
9. Attwood M. M., Harder W. A rapid and specific enrichment procedure for *Hyphomicrobium* spp. *Antonie van Leeuwenhoek, J. Microbiol. Serol.*, **38**, 369—378 (1962).
10. Barnes E. M. Methods for the isolation of faecal streptococci (Lancefield Group D) from bacon factories, *J. Appl. Bacteriol.*, **19**, 193—203 (1956).
11. Brock T. D., Freeze H. *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., non-sporulating extreme thermophile, *J. Bacteriol.*, **98**, 289—297 (1969).
12. Canale-Parola E., Rosenthal S. L., Kupfer D. G. Morphological and physiological characteristics of *Spirillum gracile* sp. n. *Antonie van Leeuwenhoek, J. Microbiol. Serol.*, **32**, 113—124 (1966).
13. Chapman G. H. The isolation of streptococci from mixed cultures, *J. Bacteriol.*, **48**, 113—114 (1944).
14. Claus D., Walker N. The decomposition of toluene by soil bacteria, *J. Gen. Microbiol.*, **36**, 107—122 (1964).
15. Davis B. D., Dulbecco R., Eisen H. N., Ginsberg H. S., Wood W. B., McCarty M. *Microbiology*, 2nd ed., Harper and Row, Hagerstown, Md., 1973.
16. Dawes E. A., Senior P. J. The role and regulation of energy reserve polymers in micro-organisms, *Adv. Microb. Physiol.*, **10**, 135—266 (1973).
17. Döbereiner J., Baldani V. L. D. Selective infection of maize roots

- by streptomycin-resistant *Azospirillum lipoferum* and other bacteria, Can. J. Microbiol., **25**, 1264—1269 (1979).
18. Döbereiner J., Marriel I. E., Nery M. Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck, Can. J. Microbiol., **22**, 1464—1473 (1976).
19. Faust L., Wolfe R. S. Enrichment and cultivation of *Beggiatoa alba*, J. Bacteriol., **81**, 99—106 (1961).
20. Finegold S. M., Martin W. J., Scott E. G. Bailey and Scott's diagnostic microbiology, 5th ed., C. V. Mosby Co., St. Louis, 1978.
21. Freeman B. A. Burrow's textbook of microbiology, 21st ed., The W. B. Saunders Co., Philadelphia, 1977.
22. Gerloff G. C., Fitzgerald G. P., Skoog F. The isolation, purification and culture of blue-green algae, Am. J. Bot., **37**, 216—218 (1950).
23. Gibbons N. E. Isolation, growth and requirements of halophilic bacteria, p. 169—183. In: J. R. Norris and D. W. Ribbons (eds.), Methods in microbiology, vol. 3B, Academic Press, Inc., New York, 1969.
24. Hampf E. G. Isolation and identification of spirochaetes obtained from unexposed canals of pulp-involved teeth, Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol., **10**, 1100—1104 (1957).
25. Hanson A. W. Isolation of spirochaetes from primates and other mammalian species, Br. J. Vener. Dis., **46**, 303—306 (1970).
26. Hanson A. W., Cannefax G. R. Isolation of *Borrelia refringens* in pure culture from patients with condylomata acuminata, J. Bacteriol., **88**, 111—113 (1964).
27. Holdeman L. V., Cato E. P., Moore W. E. C. (eds.). Anaerobe laboratory manual, 4th ed., Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, 1977.
28. Hungate R. E. The anaerobic cellulolytic bacteria, Bacteriol. Rev., **14**, 1—49 (1950).
29. Hungate R. E. A roll tube method for cultivation of strict anaerobes, p. 117—132. In: J. R. Norris and D. W. Ribbons (eds.), Methods in microbiology, vol. 3B, Academic Press, Inc., New York, 1969.
30. Hylemon P. B., Wells J. S., Jr., Bowdre J. H., MacAdoo T. O., Krieg N. R. Designation of *Spirillum volutans* Ehrenberg 1832 as type species of the genus *Spirillum* Ehrenberg 1832 and designation of the neotype strain of *S. volutans*, Int. J. Syst. Bacteriol., **23**, 20—27 (1973).
31. Inoue K. Quantitative ecology of microorganisms of Syowa Station in Antarctica and isolation of psychrophiles, J. Gen. Appl. Microbiol., **22**, 153—160 (1976).
32. Inoue K., Komagata K. Taxonomic study on obligately psychrophilic bacteria isolated from Antarctica, J. Gen. Appl. Microbiol., **22**, 165—176 (1976).
33. Iverson W. P. Growth of *Desulfovibrio* on the surface of agar media, Appl. Microbiol., **14**, 529—534 (1966).
34. Jannasch H. Enrichments of aquatic spirilla in continuous culture, Arch. Mikrobiol., **59**, 165—173 (1967).
35. Jannasch H. Competitive elimination of Enterobacteriaceae from seawater, Appl. Microbiol., **16**, 1616—1618 (1968).

36. *Johnstone K. I.* The isolation and cultivation of single organisms, p. 455—471. In: J. R. Norris and D. W. Ribbons (eds.), *Methods in microbiology*, vol. 1, Academic Press, Inc., New York, 1969.
37. *Joklik W. G., Willett H. P.* *Zinsser microbiology*, 16th ed., Appleton-Century Crofts, New York, 1976.
38. *Kenny G. E.*, *Mycoplasma*, p. 333—337. In: E. H. Lennette, E. H. Spaulding and J. P. Truant (eds.), *Manual of clinical microbiology*, 2nd ed., American Society for Microbiology, Washington, D. C., 1974.
39. *Killinger A. H.* *Listeria monocytogenes*, p. 135—139. In: E. H. Lennette, E. H. Spaulding and J. P. Truant (eds.), *Manual of clinical microbiology*, 2nd ed., American Society for Microbiology, Washington, D. C., 1974.
40. *Kucera S., Wolfe R. S.* A selective enrichment medium for *Gallionella ferruginea*, *J. Bacteriol.*, **74**, 344—349 (1957).
41. *Leadbetter E. R., Holt S. C.* The fine structure of *Bacillus fastidiosus*, *J. Gen. Microbiol.*, **52**, 299—307 (1968).
42. *Lederberg J.* A simple method for isolating individual microbes, *J. Bacteriol.*, **68**, 258—259 (1954).
43. *Leifson E.* New selenite enrichment media for the isolation of typhoid and paratyphoid (*Salmonella*) bacilli, *Am. J. Hyg.*, **24**, 423—432 (1936).
44. *Lichstein H. C., Oginsky E. L.* *Experimental microbial physiology*, W. H. Freeman and Co., San Francisco, 1965.
45. *Linn D. M., Krieg N. R.* Occurrence of two organisms in the type strain of *Spirillum lunatum*: rejection of the name *Spirillum lunatum* and characterization of *Oceanospirillum maris* subsp. *williamsiae* and an unclassified vibrioid bacterium, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **28**, 132—138 (1978).
46. *Mabbitt L. A., Zielinska M.* The use of a selective medium for the enumeration of lactobacilli in cheddar cheese, *J. Appl. Bacteriol.*, **19**, 95—101 (1956).
47. *McCurdy H. J., Jr.* A method for the isolation of myxobacteria in pure culture, *Can. J. Microbiol.*, **9**, 282—285 (1963).
48. *Matin A., Veldhuis C., Stegeman V., Veenhuis M.* Selective advantage of a *Spirillum* sp. in a carbon-limited environment. Accumulation of poly- β -hydroxybutyric acid and its role in starvation, *J. Gen. Microbiol.*, **112**, 349—355 (1979).
49. *Matin A., Veldkamp H.* Physiological basis of the selective advantage of a *Spirillum* sp. in a carbon-limited environment, *J. Gen. Microbiol.*, **105**, 187—197 (1978).
50. *Meiklejohn J.* The isolation of *Nitrosomonas europaea* in pure culture, *J. Gen. Microbiol.*, **4**, 185—191 (1950).
51. *Meynell G. G., Meynell E.* *Theory and practice in experimental bacteriology*, Cambridge University Press, London, 1965. [Имеется перевод: Мейнелл Дж., Мейнелл Э. Экспериментальная микробиология (Теория и практика). — М.: Мир, 1967.]
52. *Morita R. Y.* Psychrophilic bacteria, *Bacteriol. Rev.*, **39**, 144—167 (1975).
53. *Myrvik Q. N., Pearsall N. N., Weiser R. S.* *Fundamentals of medical bacteriology and mycology*, Lea and Febiger, Philadelphia, 1974.

54. Nunley J. W., Krieg N. R. Isolation of *Gallionella ferruginea* by use of formalin, Can. J. Microbiol., **14**, 385—389 (1968).
55. Peterson J. E. Isolation, cultivation and maintenance of the myxobacteria, p. 185—210. In: J. R. Norris and D. W. Ribbons (eds.), Methods in microbiology, vol. 3B, Academic Press, Inc., New York, 1969.
56. Pfennig N., Biebl H. *Desulfohalobium acetoxidans* gen. nov. and sp. nov., a new anaerobic, sulfur-reducing, acetate-oxidizing bacterium, Arch. Microbiol., **110**, 3—12 (1976).
57. Poindexter J. S. Biological properties and classification of the *Caulobacter* group, Bacteriol. Rev., **28**, 231—295 (1964).
58. Pramer D. A., Schmidt E. L. Experimental soil microbiology, Burgess Publishing Co., Minneapolis, 1964.
59. Rippka R., Deruelles J., Waterbury J. B., Herdman M., Stanier R. Y. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria, J. Gen. Microbiol., **111**, 1—61 (1979).
60. Rittenberg B. T., Rittenberg S. C. The growth of *Spirillum volutans* in mixed and pure cultures, Arch. Mikrobiol., **42**, 138—153 (1962).
61. Rosebury T. Microorganisms indigenous to man, McGraw-Hill Book Co., New York, 1962.
62. Rosebury T., Foley G. Isolation and pure cultivation of the smaller mouth spirochaetes by an improved method, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **47**, 368—374 (1942).
63. Rosebury T., McDonald J. B., Ellison S. A., Engel S. G. Media and methods for separation and cultivation of oral spirochaetes, Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol., **4**, 68—85 (1951).
64. Scotten H. L., Stokes J. L. Isolation and properties of *Beggiatoa*, Arch. Mikrobiol., **42**, 353—368 (1962).
65. Sehgal S. N., Gibbons N. E. Effect of some metal ions on the growth of *Halobacterium cutirubrum*, Can. J. Microbiol., **6**, 165—169 (1960).
66. Singh B. Myxobacteria in soils and composts: their distribution, number and lytic action on bacteria, J. Gen. Microbiol., **1**, 1—10 (1947).
67. Slack J. M., Snyder I. S. Bacteria and human disease, Year Book Medical Publishers, Chicago, 1978.
68. Smibert R. M. *Vibrio fetus* var. *intestinalis* isolated from fecal and intestinal contents of clinically normal sheep: isolation of microaerophilic vibrios, Am. J. Vet. Res., **26**, 315—319 (1965).
69. Smibert R. M. *Vibrio fetus* var. *intestinalis* isolated from the intestinal contents of birds, Am. J. Vet. Res., **30**, 1437—1442 (1969).
70. Smibert R. M., Claterbaugh R. L., Jr. A chemically-defined medium for *Treponema* strain PR-7 isolated from the intestine of a pig with swine dysentery, Can. J. Microbiol., **18**, 1073—1078 (1972).
71. Smith L. D., Dowell V. R. *Clostridium*, p. 376—380. In: E. H. Lennette, E. H. Spaulding and J. P. Truant (eds.), Manual of clinical microbiology, 2nd ed., American Society for Microbiology, Washington, D. C., 1974.
72. Stanier R. Y. The *Cytophaga* group: a contribution to the biology of myxobacteria, Bacteriol. Rev., **6**, 143—196 (1942).

73. Stanier R. Y., Kunisawa R., Mandel M., Cohen-Bazire G. Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales), *Bacteriol. Rev.*, **35**, 171—205 (1971).
74. Stanier R. Y., Palleroni N. J., Doudoroff M. The aerobic pseudomonads: a taxonomic study, *J. Gen. Microbiol.*, **43**, 159—271 (1966).
75. Stolp H., Starr M. P. *Bdellovibrio bacteriovorus* gen. et sp. n., a predatory, ectoparasitic and bacteriolytic microorganism. Antonie van Leeuwenhoek, *J. Microbiol. Serol.*, **29**, 217—248 (1963).
76. Van Niel C. B. Techniques for the enrichment, isolation and maintenance of the photosynthetic bacteria, *Methods Enzymol.*, **23**, 3—28 (1971).
77. Veldkamp H. A study of two marine agardecomposing, facultatively anaerobic myxobacteria, *J. Gen. Microbiol.*, **26**, 331—342 (1961).
78. Vishniac W., Santer M. The thiobacilli, *Bacteriol. Rev.*, **21**, 195—213 (1957).
79. Warke G. M., Dhala S. A. Use of inhibitors for selective isolation and enumeration of Cytophagas from natural substrates, *J. Gen. Microbiol.*, **51**, 43—48 (1968).
80. Waterbury J. B., Stanier R. Y. Patterns of growth and development in pleurocapsalean cyanobacteria, *Microbiol. Rev.*, **42**, 2—44 (1978).
81. Widdel F., Pfennig N. A new anaerobic, sporing, acetate-oxidizing sulfate-reducing bacterium, *Desulfotomaculum* (emend.) *acetoxidans*, *Arch. Microbiol.*, **112**, 119—122 (1977).
82. Wiley W. R., Stokes J. L. Requirement of an alkaline pH and ammonia for substrate oxidation by *Bacillus pasteurii*, *J. Bacteriol.*, **84**, 730—734 (1962).
83. Williams M. A., Rittenberg S. C. A taxonomic study of the genus *Spirillum* Ehrenberg, *Int. Bull. Bacteriol. Nomencl. Taxon.*, **7**, 49—111 (1957).
84. Wilson G. S., Miles A. A. Topley and Wilson's principles of bacteriology and immunity, 5th ed., The Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1964.

ТВЕРДАЯ КУЛЬТУРА

Н. Криг, Ф. Герхардт

Среды в твердом состоянии в форме плотных гелей используются в бактериологии с времен Роберта Коха. Наиболее важным преимуществом использования твердых сред является то, что на них можно выращивать микроорганизмы в виде колоний, образующихся из отдельных клеток популяции. Поэтому посев штрихом представляет собой простой и эффективный метод выделения чистых культур бактерий (разд. 8.4.1). Методы посева нанесением жидкой культуры на поверхность твердой среды, глубинного посева и послойного посева также пригодны для подсчета жизнеспособных бактерий (разд. 11.2). Другими методами, основанными на использовании твердых сред, являются посев с помощью бархатных репликаторов (разд. 13.6.2 и 20.2.5), а также ауксанографический метод (разд. 20.2.6).

В этой главе мы достаточно подробно рассмотрим основные отвердители, используемые для получения твердых сред, и их применение в бактериологии, поскольку эти вещества в других разделах данного руководства не рассматриваются. Общие подходы к существованию данного вопроса отражены в обзоре Коднера [6].

9.1. ОТВЕРДИТЕЛИ

9.1.1. Агар

Агар получают путем экстракции из некоторых видов красных морских водорослей; это самый распространенный из отвердителей бактериологических сред. Он состоит из двух полисахаридов — агарозы и агаропектина, причем первый из них составляет около 70% всей смеси. После первой экстракции агар бывает загрязнен остатками водорослей и другими примесями. Чтобы агар был пригодным для бактериологических целей, большинство

этих примесей необходимо удалить. Опубликован обзор методов экстрагирования и очистки агара в производственных масштабах [4]. Подробные сведения о химическом составе и структуре агара можно найти в работах [4, 17].

Для бактериологических исследований наиболее важны следующие свойства агара: он не разрушается ферментами большинства видов бактерий, агаровые гели устойчивы к температурам до 65 °С или выше, расплавленный агар не превращается в гель, пока не охладится почти до 40 °С, и, наконец, агаровые гели имеют высокую степень прозрачности.

В продаже имеются различные сорта агара, причем в большинстве случаев наиболее пригодным является «бактериологический» агар. «Специальный» и «очищенный» сорта агара с пониженным уровнем примесей в основном используются для электрофореза и серологических исследований, но иногда их применяют также при изучении потребностей микроорганизмов в питании. Для очистки бактериологического сорта агара от примесей существует следующая лабораторная процедура [12]. Гранулированный агар замачивают в 10 объемах дистиллированной воды на несколько часов и затем фильтруют; эту операцию повторяют 10 раз в течение 2 дней. Полученный агар погружают в равный объем 95%-ного этанола, оставляют на 12 ч при комнатной температуре и фильтруют. Затем вновь погружают агар на 4 ч в свежий раствор этанола и фильтруют еще раз. Добавляют агар к кипящему 95%-ному этанолу, доводят до кипения и фильтруют. Отмытый агар сушат при комнатной температуре.

Для приготовления твердой агаровой среды вначале доводят рН основной жидкой среды до желаемой величины и затем добавляют гранулированный агар. Бактериологический агар или агар более высоких сортов незначительно изменяет рН среды. Для получения твердой среды используют 15—20 г агара на 1 л, а полужидкой—1,5—4 г/л в зависимости от требуемой концентрации. Для получения среды определенной степени твердости требуются разные концентрации различных марок и сортов агара, поэтому необходимо всегда руководствоваться инструкциями фирмы-изготовителя.

После добавления агара к основной жидкой среде смесь нагревают до кипения, чтобы полностью растворить агар. Если нагрев производится над пламенем или на горячей плите, среду постоянно мешают в течение нагревания, чтобы не допускать осаждения агара на дно, где он может карамелизоваться и обуглиться. Дают среде покипеть приблизительно 1 мин; при этом следят, чтобы агар не вспенивался и не выплескивался через край. Агар можно также растворить на пару́ или в микроволновой печи в течение определенного времени. После того как агар растворится, его размешивают для получения равномерной концентрации во всей среде. Расплавленную среду разливают в пробирки, колбы или бутылки и стерилизуют в автоклаве.

Примечание. Если требуется агаровая среда со значением рН 6,0 или ниже, сначала готовят и стерилизуют среду с величиной рН выше этого значения, иначе агар в процессе нагревания будет гидролизаться и потеряет способность затвердевать при последующем охлаждении среды. Сразу же после стерилизации среды и охлаждения ее до 45—50 °С к ней добавляют с соблюдением правил асептики достаточное для получения необходимого значения рН количество стерильной кислоты. Для того чтобы экспериментально определить точное количество кислоты, которое необходимо добавить к основному раствору, полезно приготовить дополнительную порцию среды.

Если требуются пробирки со скошенной средой, то сразу же после автоклавирования их ставят в наклонное положение и дают среде остыть и затвердеть. При приготовлении среды в чашках Петри вначале расплавленную среду охлаждают до 45—50 °С в водяной бане в течение 10 мин, а затем с соблюдением правил асептики разливают в стерильные чашки (обычно 15—20 мл на чашку). Чашки с агаром накрывают сразу не стеклянными крышками (на них конденсируется влага), а бумагой или другим изолирующим материалом. После затвердения агара на его поверхности могут образоваться капли влаги. Перед инокуляцией дают возможность этой влаге испариться. Хранение чашек в перевернутом положении при комнатной температуре обычно обеспечивает достаточное высыхание агара. Чтобы ускорить ис-

парение влаги, перевернутые чашки помещают на полку воздушного термостата при температуре 45 °С, где устанавливают их в наклонном положении. Инкубируют чашки в таком положении до тех пор, пока не исчезнут капли воды. Для некоторых методов посева, таких, как методы с использованием бархатных репликаторов, необходимы чашки с агаром, высушенным более основательно.

Для предохранения чашек с агаром от чрезмерного высыхания их помещают в закрытые полиэтиленовые мешки (для этой цели пригодны мешки, в которые обычно запаковывают пластмассовые чашки Петри). Чашки со средой хранят в таких условиях при комнатной температуре в течение 4—5 нед.

Все жидкие и твердые среды следует хранить в темной комнате или шкафу. Хранение чашек со средами на свету, особенно солнечном, например возле окна, может привести к фотохимическому образованию перекиси водорода или других токсичных форм соединений кислорода, что способствует иногда ингибированию роста бактерий [16, 20]. Особенно чувствительными в этом отношении оказались микроаэрофилы [3, 10].

9.1.2. Каррагенан

Каррагенан, давно используемый в пищевой и молочной промышленности, только в последнее время стал употребляться как отвердитель для биологических сред. Он известен также под названием «ирландский мох» или «растительная желатина»; его добывают путем экстракции из определенных видов красных морских водорослей. Существует несколько типов каррагенана: каппа, лямбда, мю и йота [17]. Калиевые соли каррагенана типа каппа способны образовывать плотные прозрачные гели, которые могут быть эффективными заменителями агара во многих бактериологических средах [11, 21].

Каррагенан значительно дешевле агара. Подобно агаровым гелям, гели каррагенана можно использовать при посеве штрихом или разливом жидкой культуры. Каррагенан не разрушается большинством видов бактерий. Из него можно готовить гели, устойчивые к тем-

пературам до 60 °С. Однако каррагенан имеет некоторые недостатки. Высокая температура, при которой следует разливать жидкую среду с каррагенаном по чашкам Петри (от 55 до 60 °С), может препятствовать его использованию для выращивания бактерий, когда разведения суспензии клеток вносят в расплавленную среду перед ее затвердением.

Разные каррагенаны заметно отличаются друг от друга [21]. Некоторые исследователи обнаружили, что каррагенан не пригоден для полужидких сред, в то время как другие считают, что его можно использовать для этой цели [11]. В отличие от агара каррагенан может вызывать изменения рН некоторых сред в процессе их приготовления и стерилизации. Поэтому для каждой среды следует определять, меняется ли и в какой степени значение ее рН при добавлении каррагенана. Для предупреждения таких изменений следует готовить среды с разными исходными значениями рН или увеличивать их буферную емкость. Особенно сильно снижается рН при добавлении каррагенана к средам, содержащим фосфатный буфер [11].

Среды с каррагенаном готовят так же, как и среды с агаром. Каррагенан, классифицируемый при продаже как тип I (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) и содержащий в основном мох типа каппа и в меньшей степени типа лямбда, оказался пригодным почти для всех целей. Для гелей, устойчивых при 45 °С, добавляют 2% каррагенана; а для гелей, устойчивых при 60 °С — 2,4% [11]. После добавления каррагенана к основной жидкой среде ее кипятят, чтобы полностью растворить его, а затем стерилизуют автоклавированием. Стерильную среду охлаждают до 55—60 °С, разливают в чашки Петри и дают застыть. Поскольку среду с каррагенаном разливать с помощью пипетки довольно трудно, ее следует разливать непосредственно из бутылей и колб. Конденсирующуюся на геле воду удаляют таким же путем, как в случае применения агара.

9.1.3. Силикагель

Отверждение сред с помощью минерального вещества силикагеля применяют для получения культур автотроф-

ных бактерий, так как при этом в среде отсутствуют органические вещества. Кроме того, при добавлении в такие минеральные среды различных органических веществ можно исследовать способность гетеротрофных бактерий использовать их в качестве единственных источников углерода. С помощью силикагелевых сред можно также определять потребность бактерий в витаминах.

Для приготовления силикагелевых сред существует много различных методов [4]. Метод Функа и Кралвича [7] прост, надежен и обеспечивает получение прозрачных и достаточно прочных гелей, на которые без затруднений можно высевать бактерии штрихом инокуляционной иглой или размыиванием инокулята с помощью стеклянного шпателя. При их использовании готовят следующие растворы.

Жидкая питательная среда двойной концентрации. Ее готовят, как обычно, и стерилизуют автоклавированием.

Раствор силиката калия. К 100 мл 7%-ного (вес/объем) КОН добавляют 10 г порошкообразного силикагеля (N 923, 100—200 меш, Fisher Scientific Co., Pittsburg, Pa.) или кремневой кислоты (reagent grade, J. T. Baker Chemical Co., Phillipsburg, N. J.) и смесь нагревают до растворения ингредиентов. Разливают в колбы порции по 20 мл и стерилизуют их в автоклаве.

Раствор фосфорной кислоты. Готовят 20%-ный раствор о-фосфорной кислоты из 85%-ной кислоты (certified grade; Fisher Scientific Co.).

20 мл стерильной среды двойной концентрации добавляют к 20 мл стерильного раствора силиката калия. В этот раствор быстро вносят известное количество фосфорной кислоты, достаточное для доведения рН до 7,0 (согласно предварительным экспериментам, около 4 мл). Растворы перемешивают и немедленно разливают в две чашки Петри. Среда начинает затвердевать через 1 мин и становится твердой через 15 мин. Чтобы испарилась конденсированная вода, чашки ставят на некоторое время в термостат. После инокуляции среды для предупреждения высыхания и растрескивания геля чашки инкубируют во влажной атмосфере.

9.2. МЕТОДЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА ТВЕРДЫХ СРЕДАХ

9.2.1. Массовая культура на твердой поверхности

Выращиванием колоний на твердой поверхности получают максимальную плотность бактериальных клеток, поскольку в данном случае жидкость находится только в промежуточном (межклеточном) пространстве и составляет от 20 до 30% общего объема (27% от плотно упакованных сфер, независимо от их размера). Если инокулят сильно разбавлен, каждая клетка в результате деления дает начало отдельной колонии. Это может быть полезным для массовой культуры, если отбор колонии ведут по какому-то одному признаку (например, если необходимо вырастить вариант, который образует только «гладкие» колонии). Чаще инокулят бывает не разбавлен, и его равномерно разливают по всей поверхности среды: в этом случае бактерии растут в виде сплошного газона. Твердую поверхность обычно получают после добавления в среду агара или другого отвердителя. Известно также несколько методов, при которых колонии растут на мембране, помещенной на поверхности жидкой среды в сосуде [14].

Массовая культура бактерий на твердой среде имеет ряд преимуществ по сравнению с культурой в жидкой среде (гл. 10).

1. В случае культур, выращенных на твердой среде, нет необходимости использовать центрифугу или другие средства для сбора клеток, поскольку в этих культурах клетки находятся уже в сконцентрированном состоянии. Вместо этого на поверхность агара пипеткой наливают небольшое количество стерильного солевого раствора или буфера и суспендируют в нем выросшие колонии с помощью стерильного стеклянного шпателя. Таким способом можно получить большое количество клеток с поверхности агаровых сред в чашках Петри, в больших плоских культуральных матрасах (бутылях типа РУ) и в больших плоских чашках (покрытых крышками из пирекса). Особенно следует избегать центрифугирования при получении большого количества патогенных или

других вредных бактерий, поскольку при этом образуются аэрозоли.

2. Твердые культуры относительно свободны от макромолекулярных компонентов и полностью свободны от частиц питательной среды, так как последние обычно находятся внутри агарового геля. Более того, твердые культуры относительно свободны от низкомолекулярных питательных веществ и продуктов метаболизма микроорганизмов, поскольку для их растворения необходимы значительно большие объемы среды. Следовательно, культуры, выращенные на твердой среде, особенно полезны для приготовления антигенов или для других целей, когда важна чистота клеточной суспензии.

3. На твердых культурах можно получать результаты, которые невозможно достичь другим путем. Например, плодовые тела миксобактерий и эндоспоры определенных видов *Bacillus* образуются только при росте культур на твердой среде. Это объясняется тем, что лишь здесь бактерии сохраняют между собой физические связи, а также тем, что в данном случае обеспечивается максимальное снабжение кислородом из атмосферы и вымывание продуктов метаболизма (например, кислот) из клеточного окружения. Если этого не происходит, рост культуры подавляется.

Вместе с тем выращивание бактерий на твердых средах по сравнению с культивированием в жидкой среде имеет определенные недостатки.

1. Твердая культура имеет ограничения при выращивании больших количеств биомассы. Она дает возможность легко получать граммы клеток; десятки граммов выращивать уже затруднительно, а сотни граммов или килограммы клеток на твердой среде в лаборатории вырастить невозможно.

2. Твердые культуры не обеспечивают однородность популяции клеток в физиологическом отношении. Например, клетки в верхней части твердой аэробной среды (слой глубиной до 1000 клеток) могут находиться в условиях низкого содержания питательных веществ, но высокого содержания кислорода, в то время как в нижних слоях среды условия могут быть противоположными.

3. Твердые культуры характеризуются небольшим числом клеток в пересчете на данное количество среды.

9.2.2. Двухфазная массовая культура

Преимущества культуры, выращиваемой на твердой среде, сохраняются, а недостатки устраняются при использовании методов выращивания так называемой жидкой/твердой культуры, или двухфазной. Она по существу представляет собой форму диализной или диффузионной культуры, где вместо обычной мембраны имеется поверхность раздела фаз, которая как диффузионный барьер отделяет культуру от резервуара с питательной средой и продуктами обмена. Основные положения и история развития двухфазной диализной культуры как частного случая мембранной диализной культуры даны в обзоре Шульца и Герхардта [14], а методы культивирования с диализом описаны в следующей главе (разд. 10.3.4). Двухфазная система для концентрированной бактериальной культуры систематически изучалась Тиррелом и др. [19].

Двухфазная система в принципе состоит из толстого слоя затвердевшей питательной среды, покрытого тонким слоем питательного бульона (рис. 9.1). Чтобы приготовить такую систему, частично заполняют сосуд горячей средой, содержащей 2—3% агара. После затвердевания агарового слоя на него наливают с соблюдением правил асептики небольшое количество питательной среды, засевают ее и инкубируют. Для выращивания аэробов культуральный сосуд помещают на качалку, что обеспечивает хорошее снабжение кислородом и перемешивание среды во время инкубации. Культура развивается в жидкой части среды, но постепенно клетки диффундируют в твердую питательную среду и значительно концентрируются. Таким способом можно получить популяции с плотностью более 10^{11} клеток/мл, причем данный метод пригоден для выращивания бактерий любого типа.

Подходящим сосудом для такого способа культивирования бактерий является колба Эрленмейера; имеющиеся у ее основания выступы удерживают агар при встряхивании колбы на качалке. Для этих же целей пригодны прямоугольные сосуды. Если во время инкубации на качалке агар раскалывается, то следует использовать среду с более высоким содержанием отвер-

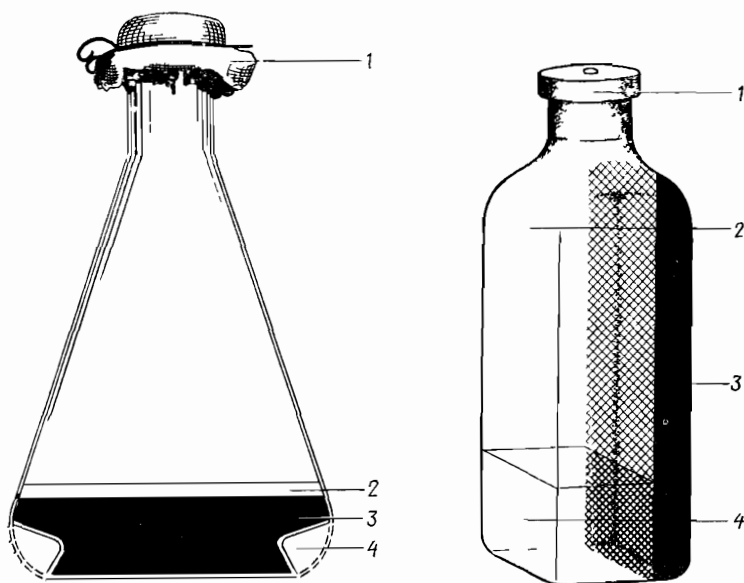


Рис. 9.1. Двухфазная система для концентрированной культуры. 1 — пробка из ваты и марли, обеспечивающая достаточный доступ воздуха (разд. 11.1.2); 2 — жидкий верхний слой среды (бульона) или водного диффузата; 3 — твердый слой агаровой среды; 4 — выемки у дна колбы, удерживающие агаровую основу и предохраняющие колбу от разбивания при встряхивании на качалке.

Рис. 9.2. Двухфазная система для культуры из крови на твердых и жидких средах. 1 — пробка, через которую вводится проба крови; 2 — воздух с 10%-ным содержанием углекислого газа; 3 — твердая агаровая среда; 4 — жидкая среда.

дителя. Поскольку перемещение питательных веществ зависит от диффузии, глубина агарового слоя должна быть не более 5 см. Отношение твердой фазы к жидкой должно быть не менее 4 : 1 и не более 10 : 1 в зависимости от того, что наиболее важно — выход биомассы или концентрация клеток.

Если все компоненты среды присутствуют в агаровом слое, то на него можно нанести слой дистиллированной воды и после уравнивания в течение ночи инокулировать бактериями. В таком верхнем слое можно вырастить относительно чистую и плотную популяцию не-

которых бактерий, например гонококков, которые обычно культивируют в мутной среде, обогащенной кровью и крахмалом, и для которых характерно образование неплотных популяций [8].

Другим примером двухфазной культуральной системы является система, созданная Кастанедой [5] для выделения *Brucella* из крови (рис. 9.2). Правда, принцип диализа используется в этой системе весьма ограниченно. Для приготовления системы сначала стерилизуют 3%-ную агаровую среду в прямоугольной бутылки с ватной пробкой, а затем бутылку кладут на бок, чтобы расплавленная среда образовала твердый слой на ее боковой стенке. После этого бутылку ставят в вертикальное положение, добавляют с соблюдением правил асептики стерильную жидкую среду и закрывают бутылку резиновой пробкой с мембраной. Для некоторых бактерий, таких, как *Brucella abortus*, иногда необходимо заменить обычный воздух в бутылки на воздух, содержащий 10% двуокиси углерода. Пробу крови вводят шприцем через резиновую пробку и инкубируют бутылку в вертикальном положении. Через каждые 2 дня наклоняют бутылку так, чтобы жидкая среда смочила всю поверхность агара, а затем вновь ставят ее вертикально, чтобы среда стекала к дну бутылки. При этом бактерии, находящиеся в жидкой среде, инокулируют поверхность агара и образуют видимые колонии. Описанный метод имеет ряд преимуществ перед выращиванием бактерий в жидкой среде. Во-первых, нет необходимости многократно открывать бутылку, чтобы получать пробы для микроскопирования или для субкультивирования при определении интенсивности роста. Это уменьшает возможность лабораторного заражения такими высоковирулентными бактериями, как *Brucella*, а также снижает возможность загрязнения самой культуры. Во-вторых, организмы, плохо растущие в жидкой среде, могут лучше расти на поверхности агара. И в-третьих, рост бактерий в присутствии окрашивающих и придающих мутность веществ, который трудно наблюдать в жидкой среде, легко обнаружить по развитию колоний на поверхности агара. Последние исследования Холла и др. [9] показали пригодность такой культуральной системы для обнаружения роста многих патогенных бактерий.

9.2.3. Биоавтография

Биоавтография является вариантом бумажной хроматографии, когда рост бактерий используется как высокочувствительный индикатор для выявления положения определенных веществ на хроматограмме. Метод имеет преимущества специфического определения веществ с биологической активностью, чего лишены химическая и радиоизотопная системы их обнаружения. Он применим при определении положения на хроматограммах факторов роста из супернатантов культур или клеточных экстрактов, когда концентрация этих факторов настолько низка, что их нельзя обнаружить другими обычными методами. Например, с помощью биоавтографии можно определить на хроматограмме 5—10 нг фолиевой кислоты. Примеры использования биоавтографии для определения факторов роста в клеточных экстрактах приведены в работе [15]. Биоавтографию широко используют также в фармацевтической промышленности для обнаружения антибиотиков на бумажных хроматограммах [22].

Для определения факторов роста готовят агаровую среду, содержащую все питательные компоненты, необходимые для обеспечения роста определенного штамма, кроме того фактора, который хотят определить. Стерильную расплавленную среду инокулируют при 45—50 °С отмытой суспензией определенного штамма бактерий. Наливают эту питательную агаровую среду в стерильную чашку, достаточно большую для помещения в нее бумажной хроматограммы (чашку можно прикрыть крышкой из пирекса). После затвердения среды на поверхность агара помещают высушенную бумажную хроматограмму лицевой стороной вниз. При этом обращают внимание на то, чтобы между агаром и бумагой не оставалось воздушного пространства. После инкубации хроматограмму вынимают и находят на агаре зоны наиболее сильного роста бактерий, которые соответствуют местоположениям фактора роста. Внесение слоя воды на поверхность агара часто помогает сделать эти области лучше видимыми.

Для успешного проведения биоавтографии выращивание бактерий, используемых в качестве инокулята, обычно проводят в жидкой среде, содержащей мини-

мальную концентрацию определяемого фактора роста. Таким путем удастся избежать избыточного накопления его в клетках бактерий, которое может приводить к неспецифическому росту бактерий на питательной агаровой среде. Для достижения максимальной чувствительности рассматриваемого метода определения факторов роста следует использовать высокую концентрацию клеток, высеваемых на агар, чтобы в местах расположения исследуемого фактора на хроматограмме появились хорошо видимые области скопления выросших бактерий. Наиболее подходящую концентрацию инокулята определяют в предварительных экспериментах. Контаминирующие бактерии, которые могут присутствовать на бумажной хроматограмме, обычно не мешают определению, поскольку они растут в виде отдельных колоний и их трудно спутать с более плотным диффузным ростом в агаре индикаторных микроорганизмов. Тем не менее количество контаминирующих бактерий следует свести к минимуму. Поэтому высушенные хроматограммы хранят в стерильных конвертах вплоть до использования, а накладывают хроматограммы на питательный агар в помещении, где нет воздушных потоков, переносящих пыль.

При биоавтографии антибиотиков агаровая среда должна содержать полный набор питательных субстратов. Это дает возможность микроорганизму расти по всей поверхности среды кроме тех зон, где на хроматограмме находятся антибиотики. Из-за высокой активности некоторых антибиотиков иногда полезно помещать бумажную хроматограмму на поверхность агара только на короткое время (около 10 мин), а затем снимать ее перед инкубацией чашки. Если надолго оставить хроматограмму на поверхности агара, то зоны ингибирования роста бактерий могут быть слишком большими, и тогда их трудно отчетливо различать.

9.3. МЕТОДЫ ВЫРАЩИВАНИЯ БАКТЕРИЙ НА ПОЛУЖИДКИХ СРЕДАХ

Полужидкая среда содержит гелеобразующее вещество в низкой концентрации и имеет мягкую желеподобную консистенцию. Такая среда пригодна для культиви-

рования микроаэрофильных бактерий, а также для изучения подвижности клеток и хемотаксиса.

9.3.1. Микроаэрофилы

Микроаэрофильным бактериям присуще аэробное дыхание, т. е. в качестве конечного акцептора электронов они используют кислород. Но они не растут в атмосфере с таким содержанием кислорода, как в воздухе (21%). Например, *Campylobacter fetus* лучше всего растет в атмосфере, содержащей 6% кислорода. Некоторые азотфиксирующие бактерии могут расти в аэробных условиях при наличии соединений азота (например, сульфата аммония), но в безазотистых средах ведут себя как микроаэрофилы. Например, *Azospirillum* в условиях фиксации N_2 лучше всего растет в атмосфере, содержащей 1% кислорода. Это происходит из-за инактивации избытком кислорода нитрогеназного комплекса, катализирующего процесс азотфиксации.

При условии низкого содержания кислорода микроаэрофилы можно выращивать и в жидких, и на твердых средах, но в этом условии нет необходимости при использовании полужидкой среды с 0,1—0,4% агара. Гелеобразующие вещества расслаивают среду таким образом, что конвекционные потоки не способны смешивать богатые кислородом верхние слои среды с нижними. Единственным путем для проникновения кислорода в более глубокие слои пробирки с полужидкой средой является диффузия. Таким образом, в пробирках с полужидкой средой создается градиент кислорода, где поверхность среды является местом наиболее высокого содержания кислорода. При инокуляции среды путем укола петлей микроаэрофилы начинают расти несколько ниже поверхности, где концентрация кислорода для них наиболее благоприятна. Рост начинается в форме тонких дисков, которые заметны на расстоянии нескольких миллиметров или сантиметров от поверхности. По мере роста диски становятся более плотными и перемещаются ближе к поверхности. В конце концов клетки образуют очень плотный диффузный слой непосредственно под поверхностью среды. Анаэробы, напротив, начинают расти в нижней части полужидкой среды, но впоследст-

вии могут также расти по всей среде, если создаются анаэробные условия.

Микроаэрофил *Campylobacter fetus* легко культивировать в пробирках с полужидкой средой для бруцелл (бульон для бруцелл, содержащий 0,15—0,3% агара; разд. 8.5.14). Азотфиксирующие клетки *Azospirillum* хорошо растут в полужидкой среде с малатом, дефицитной по азоту (разд. 8.5.37 или 20.3.4). В литровых бутылках РУ, содержащих слой полужидкой среды, можно получать большие биомассы этой бактерии для физиологических исследований [13].

Если пробирки с полужидкой средой хранятся долгое время, кислород может диффундировать в глубь среды. Градиент кислорода удастся восстановить после того, как такие пробирки помещают на несколько минут в кипящую водяную баню, а затем дают возможность пробиркам остыть, а среде затвердеть.

9.3.2. Определение подвижности бактерий

Полужидкие среды можно также использовать для определения подвижности бактерий. Для этого пробирку со средой для определения подвижности (бульон, содержащий 0,4% агара) инокулируют уколом прямой иглой до середины агарового слоя. В процессе роста подвижные бактерии мигрируют от линии инокуляции, образуя диффузную мутную зону в окружающей среде, тогда как неподвижные бактерии растут только по уколу (линии инокуляции).

Этот метод можно модифицировать следующим образом. В полужидкую среду помещают открытую с обоих концов и предварительно простерилизованную стеклянную трубочку (рис. 9.3), в которую вносят инокулят. Подвижные микроорганизмы мигрируют вниз, выходят из нижнего конца трубочки и затем начинают двигаться вверх к поверхности среды, где усиленно растут. Этот метод пригоден также для селекции высокоподвижных организмов, используемых для приготовления Н-антигенов при иммунизации.

9.3.3. Хемотаксис

Полужидкую среду используют, кроме того, при изучении хемотаксиса. Например, Адлер [1] использовал

полужидкую среду, содержащую окисляемое соединение углерода как источник энергии, для исследования положительного хемотаксиса *Escherichia coli*. При внесении большого инокулята в центр чашек Петри со средой клетки *E. coli* мигрируют к периферии в форме расходящегося круга и по мере продвижения используют весь окисляемый субстрат. При добавлении к среде двух окисляемых соединений углерода образуются два кольца из клеток, мигрирующих с различными скоростями. В отличие от методов изучения хемотаксиса в капиллярных трубках в данном случае запас кислорода в чашках с агаризованной средой никогда не истощается; поэтому мигрирующие кольца клеток появляются только в ответ на сформированный этими клетками градиент субстрата, а не на самопроизвольный градиент кислорода.

С помощью полужидкой среды можно изучать также отрицательный хемотаксис [18]. В этом случае клетки *E. coli* суспендируют в среде в концентрации, достаточной для того, чтобы появилось заметное помутнение. Затем инокулированную среду разливают в чашки Петри. После того как среда приобретает гелеобразную консистенцию, в нее вносят кусочек твердого 2%-ного агара, содержащего предполагаемое репеллентное вещество. Если вещество действительно является репеллентом, то окружающие его бактерии мигрируют в стороны от кусочка агара и оставляют за

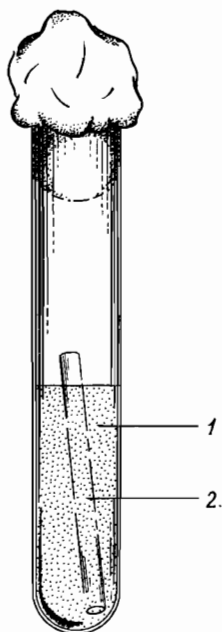


Рис. 9.3. Полужидкая среда (1), в которую перед автоклавированием помещен кусочек стеклянной трубки (2). Инокулят вносят внутрь стеклянной трубки. Подвижные бактерии мигрируют по трубке вниз к дну пробирки, а затем поднимаются к поверхности среды, где начинают интенсивно расти.

собой прозрачный след, который становится видимым примерно через 30 мин.

Использование полужидкой среды позволяет также осуществлять селекцию мутантов, не способных к хемотаксису [2, 18]. В случае положительного хемотаксиса эти мутанты (а также неподвижные мутанты) не реагируют на сформированный клетками градиент субстрата и остаются в центре чашки Петри, откуда их можно извлечь для субкультивирования и очистки. В случае отрицательного хемотаксиса мутанты, не способные к хемотаксису, можно выделить из прозрачной зоны, окружающей кусочек твердого агара.

9.4. ЛИТЕРАТУРА

1. Adler J. Chemotaxis in bacteria, *Science*, **153**, 708—716 (1966).
2. Armstrong J. B., Adler J., Dahl M. M. Non-chemotactic mutants of *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.*, **93**, 390—398 (1967).
3. Bowdre J. H., Krieg N. R. Water quality monitoring: bacteria as indicators. Va. Polytech. Inst. State Univ. Water Resour. Cent. Bull., 69, 1974.
4. Bridson E. Y., Brecker A. Design and formulation of culture media, p. 229—295. In: J. R. Norris and D. W. Ribbons (eds.), *Methods in microbiology*, vol. 3A, Academic Press, Inc., New York, 1970.
5. Castaneda M. R. A practical method for routine blood cultures in brucellosis, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **64**, 114—115 (1947).
6. Codner R. C. Solid and solidified growth media in microbiology, p. 427—454. In: J. R. Norris and D. W. Ribbons (eds.), *Methods in microbiology*, vol. 1, Academic Press, Inc., New York, 1969.
7. Funk H. B., Krulwich T. A. Preparation of clear silica gels that can be streaked, *J. Bacteriol.*, **88**, 1200—1201 (1964).
8. Gerhardt P., Hedén C. G. Concentrated culture of gonococci in clear liquid medium, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **105**, 49—51 (1960).
9. Hall M. M., Mueske C. A., Ilstrup D. M., Washington J. A., II. Evaluation of a biphasic medium for blood cultures, *J. Clin. Microbiol.*, **10**, 673—676 (1979).
10. Hoffman P. H., George H. A., Krieg N. R., Smibert R. M. Studies of the microaerophilic nature of *Campylobacter fetus* subspecies *jejuni*, II. Role of exogenous superoxide anions and hydrogen peroxide, *Can. J. Microbiol.*, **25**, 8—16 (1979).
11. Lines A. D. Value of the K⁺ salt of carrageenan as an agar substitute in routine bacteriological media, *Appl. Environ. Microbiol.*, **34**, 637—639 (1977).
12. Meynell G. G., Meynell E. Theory and practice in experimental bacteriology, Cambridge University Press, London, 1965. [Имеется перевод: Мейнел Дж., Мейнелл Э. Экспериментальная микробиология (Теория и практика). — М.: Мир, 1967.]
13. Okon Y., Albrecht S. L., Burris R. H. Carbon and ammonia metabolism of *Spirillum lipoferrum*, *J. Bacteriol.*, **128**, 592—597 (1976).

14. *Schultz J. S., Gerhardt P.* Dialysis culture of microorganisms: design, theory and results. *Bacteriol. Rev.*, **33**, 1—47 (1969).
15. *Sirotnak F. M., Donati G. J., Hutchison D. J.* Folic acid derivatives synthesized during growth of *Diplococcus pneumoniae*, *J. Bacteriol.*, **85**, 658—665 (1963).
16. *Sneath P. H. A.* Failure of *Chromobacterium violaceum* to grow on nutrient agar, attributed to hydrogen peroxide, *J. Gen. Microbiol.*, **13**, 1 (1955).
17. *Towle G. A., Whistler R. L.* Hemicellulose and gums, p. 198—248. In: L. P. Miller (ed.), *Phytochemistry*, vol. 1, Van Nostrand Reinhold Co., New York, 1973.
18. *Tso W., Adler J.* Negative chemotaxis in *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.*, **118**, 560—576 (1974).
19. *Tyrrell E. A., MacDonald R. E., Gerhardt P.* Biphasic system for growing bacteria in concentrated culture, *J. Bacteriol.*, **75**, 1—4 (1958).
20. *Waterworth P. M.* The action of light on culture media, *J. Clin. Pathol.*, **22**, 273—277 (1969).
21. *Watson N., Apiron D.* Substitute for agar in solid media for common usages in microbiology, *Appl. Environ. Microbiol.*, **31**, 509—513 (1976).
22. *Weinstein M. J., Wagman G. H.* (eds.). *Antibiotics: isolation, separation and purification*, Elsevier Scientific Publishing Co., New York, 1978.

ЖИДКАЯ КУЛЬТУРА

С. Дрю

Культивирование бактерий представляет собой процесс увеличения концентрации некоторых или всех компонентов популяции. Обычно характеристики этого процесса устанавливаются путем измерений тех или иных его показателей. Чаще всего измеряют увеличение числа клеток или клеточной массы (биомассы). Реже рост оценивают по синтезу макромолекул, когда увеличение количества белка, рибонуклеиновых кислот, липидов или других макромолекул отражает увеличение биомассы и числа клеток (сбалансированный рост). Однако один или несколько из этих показателей могут не зависеть от других (несбалансированный рост). Например, на ранней и поздней стадиях роста периодической культуры увеличение биомассы непропорционально числу клеток. В гл. 11 обсуждаются основные аспекты роста бактерий, методы его измерения и допущения, необходимые при использовании каждого метода.

В этой главе рассматриваются методы культивирования бактерий в жидких средах объемом от 10 мл до 100 л. Они пригодны для выращивания чистых культур бактерий в водной среде с различной степенью контроля за физическими условиями. После небольшой модификации методы можно использовать для смешанного культивирования двух или большего числа видов бактерий. Однако в задачи данной книги не входит обсуждение этого интересного раздела роста бактериальных культур.

Измерения роста микроорганизмов осложняются тем, что бактериальные культуры в значительной степени гетерогенны. Поэтому получаемые при измерении средние величины отражают скорее рост всей популяции, чем индивидуальных клеток. Хотя все члены каждой популяции могут быть генетически идентичными, нередко они различаются по таким параметрам, как время удвоения клеток, их возраст, состав, метаболические характери-

ки и размер. Размах этих колебаний зависит от среды; его можно свести к минимуму путем тщательного подбора условий культивирования. Большинство описываемых здесь систем культивирования построено именно так, чтобы максимально уменьшить гетерогенность популяции чистой культуры.

В таких системах рост популяции бактерий описывается простым соотношением

$$\frac{dx}{dt} = \mu x, \quad (10.1)$$

где dx — прирост биомассы за интервал времени dt , x — концентрация биомассы и μ — удельная скорость роста, представляющая собой скорость роста в пересчете на единицу количества биомассы и имеющая размерность обратного времени ($1/t$).

Если величина μ постоянная, то, проинтегрировав уравнение (10.1), можно видеть, что величина x увеличивается со временем:

$$\ln \frac{x}{x_0} = \mu t, \quad (10.2)$$

где $\ln$ — натуральный логарифм (логарифм с основанием $e=2,303$), а x_0 — концентрация биомассы при $t=0$.

После преобразования уравнения (10.2) получаем выражение для конечной концентрации биомассы:

$$x = x_0 e^{\mu t}. \quad (10.3)$$

Рост бактерий, подчиняющийся этому соотношению, называют *логарифмическим* или *экспоненциальным*.

Соотношение между временем удвоения биомассы (t_d) и удельной скоростью роста можно рассчитать, допустив, что в уравнении (10.2) $x=2x_0$ и $t=t_d$. Отсюда

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} = \frac{0,693}{\mu}. \quad (10.4)$$

Уравнения (10.1) — (10.4) описывают рост бактерий в простых системах, где факторы, влияющие на него, постоянны. Но эти уравнения нельзя использовать в случае отклонения от постоянных (равновесных) условий роста. Рассматриваемые ниже методы непрерывного

(проточного) культивирования теоретически предназначены для поддержания равновесных условий роста бактерий бесконечно долго, тогда как при периодическом культивировании в процессе роста культуры происходят значительные изменения условий среды. Для периодического культивирования уравнения (10.1)—(10.4) применимы без пересчета величины μ только в той части кривой роста, где изменения условий не влияют на рост популяции, т. е. во время экспоненциальной фазы роста.

10.1. ПЕРИОДИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ

Периодической называют систему, в которой после инокуляции клетками среды соответствующего состава не происходит ни добавления, ни удаления каких-либо компонентов, кроме газовой фазы (*закрытая система*). Отсюда следует, что периодическая система может поддерживать размножение клеток только в течение ограниченного времени, на протяжении которого меняется состав исходной среды и окружающие условия.

Типичная кривая роста

На рис. 10.1 представлена типичная кривая роста простой гомогенной периодической культуры бактерий. Рост проходит через *лаг-фазу*, в течение которой число клеток не увеличивается. Затем начинается *фаза роста*, которая обычно характеризуется экспоненциальным увеличением количества клеток и подчиняется уравнениям (10.1)—(10.4). В конечном счете изменения химического и физического состава среды приводят к переходу культуры в *стационарную фазу*, в которой увеличения количества клеток не происходит, но клетки еще нуждаются в источниках энергии для поддержания своей жизнедеятельности. Поскольку в периодической культуре питательные вещества ограничены, наступает фаза отмирания (автолиза), которая часто характеризуется экспоненциальным уменьшением количества жизнеспособных клеток.

Лag-фазу можно вызвать путем быстрого изменения состава среды культивирования. В свежей среде длительность лаг-фазы зависит от количества и возраста

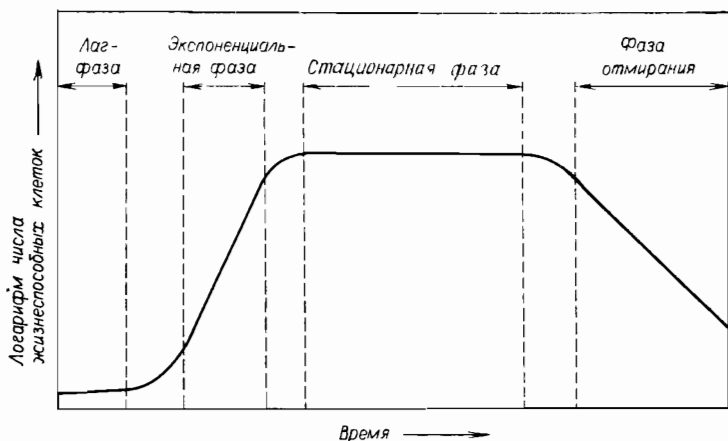


Рис. 10.1. Идеализированная нормальная кривая роста популяции бактерий в периодической системе культивирования.

посевного материала, а также от изменений состава и концентрации питательных компонентов при внесении инокулята. Внесение небольшого инокулята в большой объем свежей среды может привести к диффузии из клеток витаминов, кофакторов и ионов, которые необходимы для поддержания активности многих внутриклеточных ферментов. Если клетки инокулируют из богатой среды в минимальную, то продолжительность лаг-фазы очень сильно зависит от объема инокулята, поскольку он содержит микроэлементы, попадающие при инокуляции в ростовую среду.

Длительность лаг-фазы зависит и от возраста инокулята. Это связано с тем, что в клетках накапливаются токсичные вещества, но в них недостаточно питательных веществ, необходимых для первоначального роста. Таким образом, наблюдается как положительный, так и отрицательный эффект возраста инокулята на продолжительность лаг-фазы в свежей среде. Как правило, при переносе клеток из бедной среды в богатую с увеличением возраста инокулята лаг-фаза удлиняется. На кривой зависимости продолжительности лаг-фазы от возраста инокулята при пересеве культуры с богатой среды на более бедную можно обнаружить определенный «мини-

мальный» участок, отражающий обмен между питательными веществами и внутриклеточными токсичными соединениями.

Наконец, изменения состава питательных компонентов, а также их концентраций при переносе инокулята на свежую среду могут действовать как триггер при регуляции активности ферментов и морфологической дифференцировке клеток, например при прорастании спор. Если клетки переносят с бедной среды на богатую, то питательные компоненты и время расходуются на повышение активности ферментов, необходимых для осуществления метаболизма в целом. Если же клетки переносят с богатой среды на среду с более низким уровнем питательных веществ, то они способны немедленно, хотя и с низкой скоростью, вступить в экспоненциальную фазу роста.

Возможность постоянного экспоненциального роста в периодической культуре, хотя и в течение ограниченного времени, свидетельствует о том, что его скорость фактически не зависит от изменений концентрации субстратов в довольно широких пределах. В этом случае можно говорить о сбалансированном росте культуры (см. выше), который описывается только величиной μ . Со временем рост культуры начинает отклоняться от экспоненциального, и его уже нельзя описывать только с помощью одной величины μ , даже если можно рассчитать эту величину для случая лимитирования субстратом [уравнение (10.5)]. Моно [44] следующим образом описал соотношение между концентрацией субстрата и ростом бактерий в простой системе, находящейся в экспоненциальной фазе:

$$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{(K_S + S)}, \quad (10.5)$$

где μ — удельная скорость роста, $\mu_{\max}$ — максимальное значение μ , полученное при $S \gg K_S$, K_S — константа насыщения, эквивалентная константе Михаэлиса — Ментен, а S — концентрация субстрата во время экспоненциальной фазы роста.

Для описания зависимости роста культур от концентрации субстрата существует несколько альтернативных моделей [44]. Уравнение (10.5) можно использовать

для описания роста при лимитировании субстратом только в экспоненциальной фазе довольно простых бактериальных систем. Когда рост культуры замедляется в результате лимитирования субстратом, условия, которые в ней устанавливаются (концентрация биомассы и субстратов), резко отличаются от условий, существовавших во время экспоненциальной фазы. В этом случае для описания реакции культуры на уменьшение концентрации субстрата можно успешно использовать уравнение (10.1) наряду с уравнениями (10.5) и (10.6). Совместное решение уравнений (10.1), (10.5) и (10.6) приводит к обобщенной модели периодического роста, которая лучше других позволяет оценить процессы, происходящие в очень простых системах [44].

В периодической культуре максимальную биомассу определяют из экспериментальных данных, исходя из отношения прироста массы клеток к соответствующему снижению концентрации субстрата:

$$\frac{(x - x_0)}{(S_0 - S)} = Y, \quad (10.6)$$

где x и S — соответственно концентрации клеток и субстрата в момент времени t , x_0 и S_0 — концентрации клеток и субстрата в более раннее время t_0 , а Y — коэффициент общего выхода (экономический коэффициент). Уравнение (10.6) точно описывает соотношение между концентрациями клеток и субстрата во время экспоненциальной фазы роста. Если экспоненциальный рост продолжается с постоянной скоростью вплоть до достижения стационарной фазы, а субстрат полностью исчерпывается во время экспоненциального роста, то с помощью уравнения (10.6) можно рассчитать максимальное число клеток или их концентрацию. Этот расчет верен при условии, что экономический коэффициент остается на постоянном уровне в течение всего цикла роста и потреблением субстрата в течение лаг-фазы можно пренебречь. На самом деле экономический коэффициент остается постоянным лишь при условии постоянного экспоненциального роста с одной удельной скоростью. Отсюда следует, что предсказанная с помощью уравнения (10.6) величина максимальной биомассы явно завышена. Более под-

робно понятие экономического коэффициента обсуждается ниже в этой же главе (разд. 10.5). Чтобы предсказать время достижения максимальной плотности биомассы в периодической культуре, необходимо сделать ряд упрощающих допущений [2, 4].

Атипичные кривые роста

Представленная на рис. 10.1 кривая роста идеализирована и отвечает условиям постоянной морфологии клеток при их асинхронном бинарном делении. При этом одновременно с ростом биомассы происходит увеличение числа клеток и постоянная утилизация субстратов. Вариации в кривой роста — обычное явление. Морфологические изменения культуры, такие, как увеличение мутности, коэффициента преломления, размера отдельных клеток или их агрегации, могут приводить к кажущимся изменениям кривой роста, если скорость роста определять с помощью оптических измерений. Так, бактериальные клетки из культур в стационарной фазе часто более прозрачны, чем клетки из культур в экспоненциальной фазе. В результате кривая роста, построенная в виде зависимости логарифма оптической плотности от времени, отражает кажущееся снижение концентрации клеток в стационарной фазе по сравнению с концентрацией, достигнутой к концу экспоненциальной фазы. В этом случае измененная (аберрантная) кривая роста отражает скорее изменение морфологических характеристик клеток, чем изменение их количества.

Кривые роста, представленные в виде зависимости логарифма числа клеток от времени, иногда показывают необычно быстрое увеличение числа клеток сразу после лаг-фазы, вслед за чем скорость накопления клеток понижается. Это необычное значительное ускорение роста указывает на частичную или полную синхронизацию деления клеток в культуре. Не исключено, что такой синхронизованный рост обусловлен приспособлением культуры к новому питательному компоненту или прорастанием спор. Затем синхронность культуры быстро нарушается, и через две генерации преобладает асинхронный рост. Однако разработаны специальные методы, с помощью которых можно синхронизировать деление кле-

ток в растущей популяции, так что рост популяции соответствует росту отдельных клеток (разд. 10.3.3).

Большинство микроорганизмов размножаются путем бинарного деления отдельных клеток, но у некоторых, например у актиномицетов, размножение связано с ростом гиф. Если первичный рост культуры происходит за счет вытягивания концов гиф, то зависимость увеличения клеточной массы от времени будет линейной.

Линейный рост наблюдается и в том случае, когда добавление к среде критического питательного компонента регулируется линейным процессом (например, с помощью дробных добавок или диффузии) и этот процесс становится лимитирующим. Например, ограниченная диффузия воздуха в пробирку через ватную пробку или питательных компонентов через мембрану в диализную культуру [51] может перевести экспоненциальный рост в линейный.

В жидкой культуре нитчатые микроорганизмы часто образуют шарообразные скопления. В этом случае увеличение биомассы происходит медленнее, чем при экспоненциальном росте и пропорционально времени в третьей степени. Рост микроорганизмов в шарообразных скоплениях может зависеть от диффузии питательных компонентов внутрь этих скоплений и выхода наружу продуктов метаболизма, что не предусматривается в уравнении (10.5).

В комплексной среде бактериальные клетки часто используют имеющиеся субстраты последовательно. Присутствие определенных субстратов может привести к подавлению синтеза ферментов, участвующих в метаболизме других питательных веществ. В этом случае ферменты, катализирующие метаболизм некоторых веществ, начинают действовать лишь после того, как концентрация субстратов, репрессирующих их синтез, уменьшится в результате использования клетками. Регуляция физиологии бактерий приводит к изменениям кривой роста и появлению одной или нескольких переходных (т. е. временных) стационарных фаз. Такой ответ культуры на изменение состава среды называют диауксией. Классическим примером диауксии может служить рост *Escherichia coli* в присутствии глюкозы и лактозы (рис. 10.2). Сначала происходит рост культуры за счет использова-

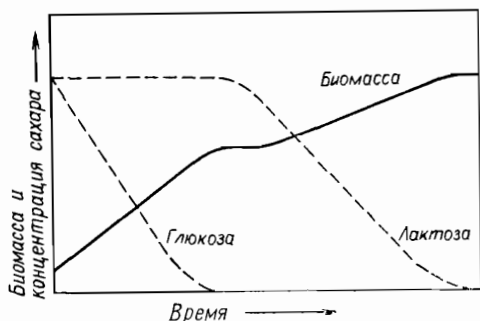


Рис. 10.2. Идеализированная диауксия роста бактерий в периодической системе культивирования с двумя субстратами (глюкоза и лактоза).

ния глюкозы. После исчерпания этого субстрата кривая роста резко меняет свой наклон, так что биомасса может даже уменьшиться. Во время этой лаг-фазы индуцируется синтез новой ферментной системы, участвующей в метаболизме лактозы, и накопление биомассы продолжается за счет потребления этого сахара.

10.1.1. Культуральные пробирки

Лишенные бортиков пробирки из стекла пирекс (обычно размером 16×150 мм) очень удобны для выращивания периодической жидкой культуры бактерий и широко используются для этой цели. Однако при культивировании аэробов в пробирках обычно удовлетворяется лишь минимальная их потребность в кислороде. Многие бактерии являются факультативными анаэробами, поэтому в преобладающем большинстве случаев при культивировании в пробирках они растут хорошо.

Для того чтобы улучшить аэрацию жидкой культуры в пробирке, увеличивают отношение поверхности среды к объему, например уменьшая объем среды или наклоняя пробирку. Еще лучше поместить пробирки на качалку, благодаря чему получают активное перемешивание среды. Снабжение воздухом улучшается, если для закрывания пробирок используют неплотные ватные пробки, колпачки типа Morton (Scientific Products) или проницаемые для газов мембранные пробки. Хотя мембранные пробки используют довольно редко, они очень эффективны, поскольку хорошо проницаемы для обмениваемых газов и в то же время почти непроницаемы

для водных паров, т. е. среда при этом не испаряется. Мембранные пробки производятся в виде колпачков типа Morton с тонкой поликарбонатной мембраной, встроенной в верхнюю часть колпачка (Kimble P. M. Cap Closure Scientific Products).

Более подробно условия оптимизации аэрирования в лабораторных культуральных сосудах описываются в разд. 10.1.2. Условия обеспечения строгого анаэробноза для культур в пробирках приведены в разд. 6.6.

10.1.2. Качалочные колбы

В качестве сосудов для получения биомассы в лабораторных условиях или на первом этапе в промышленных процессах, включающих периодическое культивирование бактерий в жидкой среде, широко используются колбы Эрленмейера объемом от 100 до 2000 мл. При этом для облигатных или факультативных аэробов подбираются максимально эффективные условия подачи воздуха (кислорода), а для анаэробов — такие же условия удаления воздуха.

Аэробная культура

Аэробное культивирование в колбах должно происходить при постоянном их встряхивании для того, чтобы облегчить массопередачу кислорода (а также других газов и питательных компонентов) на двух уровнях: из газовой фазы через поверхность раздела газ — жидкость в жидкую фазу, а также из жидкой фазы через поверхность раздела жидкость — клеточная поверхность внутрь клеток. На способность системы культивирования в колбах удовлетворить потребность бактерий в кислороде влияют два основных фактора: газообмен через пробку колбы и площадь поверхности жидкости, доступная для транспорта кислорода из газовой фазы.

Пробки (крышки) в культуральных колбах должны обеспечивать адекватный обмен газами между наружной средой и содержимым колбы в стерильных условиях. Негигроскопические ватные пробки, обернутые марлей, пригодны для культивирования аэробных бактерий до невысокого уровня плотности. Однако, если эти пробки

слишком велики для колб или если они очень плотные, они затрудняют доступ кислорода в бактериальные культуры высокой плотности [58]. В таком случае следует использовать ватно-марлевые пробки (рис. 10.10), обеспечивающие лучший доступ кислорода. Их делают следующим образом.

1. Один слой негигроскопической ваты кладут между двумя слоями хирургической марли.

2. Разрезают эту ватно-марлевую подушку на квадраты такого размера, чтобы ею можно было обернуть горлышко колбы.

3. Помещают квадратную подушку на горлышко колбы и фиксируют ее с помощью металлической пружины или двух (для большей надежности) резинок. Металлическую пружину можно изготовить из толстой рояльной струны, изогнув ее соответствующим образом.

Колпачки типа Morton также обеспечивают достаточно стерильное закрывание колб и хороший газообмен, однако при высоких скоростях вращения они могут отвинчиваться. Для закрывания колб при культивировании на качалке пригодны также пробки из пенопласта. Их надо подбирать так, чтобы они плотно входили в горлышко колбы без дополнительных усилий. Но следует помнить о том, что пробки могут содержать пластификаторы или другие токсичные вещества; поэтому перед использованием их следует тщательно промывать. Колпачки и пробки производятся различными фирмами (например, Arthur H. Thomas, Scientific Products, Bellco Glass, Inc.).

Поглощение растворенного кислорода жидкой бактериальной культурой зависит от плотности клеток и скорости их роста. Потребность в растворенном кислороде определяется его использованием клетками и удовлетворяется за счет постоянной диффузии кислорода из газовой фазы в жидкую. Область поверхностного контакта между газом и жидкостью часто регулирует поглощение кислорода или объемную скорость его переноса. Если эта область велика, то скорость переноса больших объемов кислорода также значительна, что позволяет культуре с высокой плотностью быстро расти без лимитирования по O_2 . Область поверхностного контакта увеличивается при снижении отношения объема жидкости

к объему колбы или при встряхивании колбы. Дефицит кислорода, вызванный его ограниченной диффузией, можно свести к минимуму, если заполнять жидкой средой не более 20% объема колбы и встряхивать колбы со скоростью 200—350 об/мин на круговой качалке с величиной хода 2,5 см или со скоростью 150—250 качаний в 1 мин на качалке с поступательным ходом.

Во время инкубации культур в колбах при соответствующей температуре в процессе кругового встряхивания жидкость должна подниматься примерно на $\frac{2}{3}$ высоты колбы. Это условие обычно достигается при заполнении 250-миллилитровой колбы Эрленмейера с отбойниками 50 мл среды и вращением ее на качалке со скоростью около 220 об/мин и величиной хода 2,5 см. Встряхивание на качалке с возвратно-поступательным движением должно быть настолько эффективным, чтобы вызывать значительную турбулизацию жидкости при ее движении от одного края колбы к другому [23].

В используемых при этом колбах с отбойниками происходит разбивание образующихся потоков жидкости при вращении колб на круговой качалке. Такие колбы производятся фирмой Bellco Glass Co. и другими.

Ниже приведена методика культивирования аэробных бактерий на качалке в колбах с марлевыми пробками.

1. В 250-миллилитровую колбу Эрленмейера вносят 50 мл соответствующей среды.

2. Делают, как описано выше, марлевую пробку.

3. Пробку кладут на горлышко колбы, надежно закрепляют ее резинкой или пружиной и покрывают сверху алюминиевой фольгой.

4. Фольгу обжимают вокруг пробки и горлышка колбы, чтобы предотвратить конденсацию жидкости во время автоклавирования.

5. Повторяют эту процедуру со всеми колбами и затем стерилизуют их автоклавированием, как описано в гл. 23 (т. 3).

6. Непосредственно перед инокуляцией удаляют алюминиевую фольгу.

7. Осторожно снимают резинки или поддерживающие пружины, стараясь не сдвинуть пробку. Пробка подходящего размера приобретает после автоклавирования

форму колпачка (крышки), прикрывающего входное отверстие колбы и ее горлышко.

8. Марлевую пробку приподнимают и держат ее так, чтобы не допустить загрязнения стерильного содержимого колбы.

9. Горлышко колбы быстро вносят в пламя горелки и вращают его, чтобы выпарить конденсат на его внутренней стороне.

10. В колбу добавляют инокулят с соблюдением правил асептики и быстро закрывают ее пробкой.

11. Пробку закрепляют резинкой или металлической пружиной.

Описанная процедура предполагает использование таких пробок, которые не препятствуют быстрому газообмену и сохраняют стерильность. Если необходима очень быстрая инокуляция, можно не обжигать горлышко колбы; при соответствующем навыке удастся сохранить стерильность и в этом случае.

Анаэробная культура

Для культивирования анаэробных бактерий можно использовать колбы Эрленмейера, а также любые другие колбы подходящих размеров. При этом необходимо соблюдать два основных условия: 1) питательная среда должна быть восстановлена до величины $E_h = -150$ мВ или ниже; 2) воздух из колб следует удалять. Специальные методики, используемые при работе с анаэробными бактериями, приведены в разд. 6.6.

При массовом культивировании анаэробов придерживаются следующих основных правил. Культуральные сосуды заполняют почти доверху, чтобы уменьшить влияние находящейся сверху газовой фазы. Вносят как можно больше инокулята на дно сосуда с восстановленной средой, стараясь держать пипетку вертикально. Воздух в сосуде заменяют очищенным от кислорода азотом или аргоном с 5—10% CO_2 . Сначала среду инкубируют без перемешивания, но после того как начинается активный рост, ее перемешивают либо с помощью магнитной мешалки, либо пропусканием азота или другого природного газа через трубку, опущенную на дно сосуда. Используют гидрозатвор, который затрудняет выход газов в

воздух. *Предостережение:* некоторые анаэробные бактерии образуют водород или метан, которые могут загораться или даже взрываться. Большинство анаэробов образуют CO_2 и другие газы, повышающие давление в сосудах до опасного уровня, если им не обеспечить своевременный выход.

10.1.3. Бутыли

Бутыли довольно часто используются для выращивания многолитровых культур бактерий в жидких средах, но существует несколько факторов, ограничивающих их применение. Так, при работе с большими стеклянными бутылями приготовление сред, их стерилизация и инокуляция сильно усложняются. Кроме того, встряхивание заполненных средой бутылей при аэробном культивировании микроорганизмов небезопасно. (Правда, при работе с пластмассовыми бутылями опасность значительно меньше.) В больших бутылях очень трудно перемешивать среду даже с помощью мешалок, поэтому создать в них достаточно высокую концентрацию кислорода — задача не из легких. Хотя при крупномасштабных работах часто приходится готовить среды в больших бутылях, культивирования бактерий в них следует по возможности избегать.

10.1.4. Ферментеры

Описанные ниже ферментеры и соответствующие методы культивирования в них в основном используются для выращивания аэробных бактерий, но они вполне пригодны (после небольших модификаций) и для выращивания анаэробов. Обсуждаемые здесь конструкции ферментеров предназначены для максимального снижения гетерогенности микробной популяции. Другие же ферментеры [например, колонные (plug-flow), с замкнутым контуром (closed-loop) и трубчатые], хотя и представляют интересные возможности для управления гетерогенностью популяции, не обсуждаются в данном руководстве. Основная литература, касающаяся конструкции ферментеров и характера работы с ними, приведена в табл. 10.1.

Таблица 10.1. Литературные источники данных по конструкции ферментеров и работе с ними

Предмет	Источник данных
Проектирование ферментеров	
Общая конструкция	[2, 4, 9, 18, 22, 27, 29, 45]
Способ действия:	
периодический	[32, 36]
периодический с добавлением субстрата (с подпиткой)	[16, 32]
непрерывный (проточный)	[18, 43]
диализный	[51]
Управление работой ферментера:	
теория и логика управления	[2, 3, 17, 33, 35, 43, 47, 51—53]
Физиологические эффекты:	
периодическая культура и периодическая культура с добавлением субстрата (с подпиткой)	[2, 3, 5, 16, 24, 32, 38, 40]
непрерывная (проточная) культура	[1, 2, 23—25, 37, 41, 54]
диализ	[14, 51]
иммобилизованные клетки	[6, 7, 13]

Ферментеры, или реакторы с мешалкой для культивирования бактерий, устроены таким образом, что обеспечивают постоянство среды. Рабочий объем ферментеров колеблется от 500 мл до тысяч литров. Обычные лабораторные ферментеры имеют рабочие объемы от 1 до 20 л. Поскольку они предназначены для того, чтобы максимально уменьшить температурный и химический концентрационный градиент в культуре, среда в них должна перемешиваться таким способом, чтобы достигалось быстрое и полное смешение всех компонентов жидкой фазы. В случае недостаточного перемешивания возникают застойные зоны, что приводит к появлению неконтролируемых локальных градиентов концентраций. Если перемешивание слабое, то популяция клеток будет сильно гетерогенной. Например, при слабом перемешивании аэробных культур контакт между кислородом воздуха и жидкой средой недостаточен, поэтому в некоторых участках ферментера могут создаваться почти анаэробные условия, что лимитирует рост культур. Если куль-

тивируют факультативно-аэробные микроорганизмы, то дыхательные характеристики разных клеток популяции могут сильно различаться, в результате чего снижается выход биомассы.

Ферментер можно сделать кустарным способом в мастерской, причем особое внимание следует уделить устройствам для перемешивания, аэрации и стерилизации, имеющимся в продаже. Необходимо также иметь гарантии асептики покупаемых блоков [12, 20, 31, 39]. Имеющиеся в продаже ферментеры (табл. 10.2) способны обеспечить хорошую аэрацию и перемешивание довольно густых культур. Ферментеры обычно оборудованы крышкой с рядом отверстий, через которые вводят датчики рН и растворенного кислорода, а также трубки для отбора проб и введения необходимых питательных веществ.

Аэрация и перемешивание

Минимальная скорость перемешивания, необходимая для достаточной подачи кислорода, подвержена изменениям, поскольку изменяются такие параметры, как плотность культуры (концентрация клеток) и условия культивирования (скорость и объем подачи воздуха, температура и объем жидкости в ферментере). В связи с тем что эта скорость зависит от факторов окружающей среды, управлять процессом культивирования с ее помощью весьма неудобно. Предпочтительнее скорость перемешивания доводить до такой величины, при которой концентрация растворенного кислорода никогда не падала бы ниже 10—15% начальной насыщающей его концентрации. Поддержание концентрации растворенного в среде кислорода на уровне выше 10% насыщения при соответствующей температуре позволяет выращивать большинство бактериальных культур в таких условиях, когда кислород не является субстратом, лимитирующим их рост. Теория перемешивания в барботируемых системах основана на классической кинетике Моно для роста микроорганизмов, чувствительного к лимитирующим его субстратам [1].

Требования перемешивания для соответствующего снабжения культур кислородом почти всегда превышают

Таблица 10.2. Фирмы — изготовители приборов и оборудования для ферментеров, используемых в лаборатории^a

Наименование прибора	Фирма
Фильтры для стерилизации воздуха	Dollinger Corp. Michigan Dynamics Millipore Corp.
Датчики и регуляторы растворенного кислорода	Sensorlabs, Division of Instrumentations Laboratories Inc. Beckman Instruments, Inc. Chemapec, Inc. New Brunswick Scientific Co.
Анализаторы выходящих газов	Beckman, Instruments, Inc. Infrared Industries, Inc. Leeds and Northrup Co. Mine Safety Appliances Co. Perkin — Elmer Corp.
Устройство для дожигания выхлопного воздуха	Air Resources, Inc. Trane Thermal Co.
Ферментационные установки	B. Braun Melsungen AG Chemapec, Inc. LKB Inc. L. E. Marubushi Co., Ltd. New Brunswick Scientific Co. The Vir Tis Co.
Устройство для регуляции пеногашения	Chemapec, Inc. Chemineer, Inc. Mixing Equipment Co., Inc. New Brunswick Scientific Co.
Дозирующие насосы и регуляторы	Cole — Palmer Instrument Co. Manostat Corp.
Системы контроля и регулирования pH	Beckman Instruments, Inc. Leeds and Northrup Co. The London Co.
Регуляторы температуры	Beckman Instruments, Inc. Leeds and Northrup Co. Taylor Instrument Co.

^a Адреса фирм приведены в разд 10 6

те, которые необходимы для хорошей гомогенизации высокорастворимых питательных компонентов. Это правило применимо также к условиям перемешивания в случае плохо растворимых субстратов, например углеводов и стероидов. Для установления в культуральной среде требуемой концентрации кислорода можно изменять как скорость ее перемешивания, так и скорость подачи воздуха. Для управления культивированием аэробных микроорганизмов полезны приборы, контролирующие содержание растворенного кислорода и скорость подачи воздуха. Они позволяют оператору управлять концентрацией растворенного кислорода как независимым параметром культивирования [20].

Регулирование температуры

Большинство используемых в лабораториях ферментеров оборудовано встроенными теплообменниками. Температура циркулирующей воды (или другой охлаждающей жидкости) регулируется с помощью особого устройства, которое поддерживает постоянную температуру в ферментере. Ферментеры, имеющиеся в продаже, оснащены стандартными устройствами, регулирующими температуру, или имеют эти устройства в качестве вспомогательного оборудования. Иногда ферментер погружают в термостат с постоянной регулируемой температурой. Этот способ применяют в тех случаях, когда необходимо точное регулирование температуры.

Стерилизация воздуха

Воздух или другой газ, поступающий в ферментер, должен предварительно стерилизоваться. Наиболее простой способ стерилизации заключается в физическом удалении микроорганизмов фильтрацией воздуха через волокнистые фильтры. В большинстве лабораторных ферментеров используются заполненные стеклотканью трубчатые фильтры, но иногда применяют мембранные фильтры. В любом случае фильтры следует регулярно менять, чтобы обеспечить стерильные условия. Поскольку при длительном культивировании микроорганизмов существует опасность загрязнения фильтров, возникает

необходимость в дополнительном (или предохраняющем) фильтре для стерилизации воздуха.

Фильтр для стерилизации воздуха можно изготовить из стальной трубки длиной 20 см и внутренним диаметром 2,5 см, оба конца которой подгоняют под соответствующие крышки или редукторы. В крышках трубки просверливают отверстия и укрепляют в них ниппели, с помощью которых она соединяется с резиновой трубкой. Тщательно очищенную стальную трубку неплотно набивают стеклянной ватой ($90\text{—}150\text{ кг/м}^3$), после чего на каждом конце трубки укрепляют чистые крышки с соединительными ниппелями. Для предотвращения утечки газа перед укреплением крышек трубки обматывают специальной тефлоновой изоляционной лентой.

Фильтр для стерилизации воздуха перед первым использованием следует простерилизовать в течение 2 ч при $170\text{—}190^\circ\text{C}$, завернув его в алюминиевую фольгу. После стерилизации и охлаждения фильтра проверяют, надежно ли укреплены крышки, и затем подсоединяют фильтр к трубке, через которую подается воздух. Выходное отверстие фильтра соединяют с ферментером резиновой трубкой. Фильтр для стерилизации воздуха обычно используют 2—3 раза, после чего его содержимое заменяют. Фильтры такого типа можно применять также для стерилизации не содержащей кислород смеси газов при культивировании анаэробов. Детальное описание устройства волокнистых фильтров для стерилизации воздуха приведено в работе [32].

Автоматическое пеногашение

Большинство перемешиваемых и аэрируемых культур во время роста образует довольно много пены. Если не препятствовать этому, пена смачивает воздушные фильтры, что приводит к заражению культуры, а также выходу пены наружу. Пеногашение осуществляют или с помощью механического пеногасителя, или путем добавления к среде химических пеногасителей. Большинство ферментеров имеет пеногасящие устройства, которые можно применять почти при любых условиях культивирования.

Химические пеногасители более дешевы; их исполь-

зуют время от времени при необходимости подавления пенообразования [11]. Однако при добавлении этих веществ меняется состав среды. Пеногасящие вещества растительного (кукурузное масло и масло из семян хлопчатника) и животного (свиное сало) происхождения могут использоваться микроорганизмами и тем самым вносить свой вклад в углеродный пул клеток [28]. Вместе с тем такие неметаболизируемые пеногасители, как силиконы (поставляются фирмами Dow Corning Co., Genegal Electric Corp. и Union Carbide), в высокой концентрации токсичны. Поэтому пеногасители, являющиеся поверхностно-активными веществами, следует использовать только в очень низких концентрациях и только после проверки на токсичность в каждом конкретном случае. Пеногасители добавляют непосредственно в среду перед ее стерилизацией или в ферментер через шланг в его крышке. Перед использованием пеногаситель вместе с емкостью, в которой он находится, и подающим шлангом должны быть простерилизованы. Имеются в продаже системы, обеспечивающие автоматический контроль подачи пеногасителей (New Brunswick Scientific Co., The Vir Tis Co., Chemapac Inc.).

Отбор проб и внесение инокулята

При подготовке ферментера к работе и в процессе его эксплуатации необходимо, чтобы при внесении компонентов среды и отбора проб не нарушалась стерильность и не происходило заражения ферментера микроорганизмами из внешней среды. Большинство лабораторных ферментеров оснащено трубкой для отбора проб, которая проходит через крышку ферментера и немного не доходит до его дна. При отборе проб и внесении инокулята требуется тщательное соблюдение инструкций фирмы-изготовителя. Нельзя забывать о том, что при работе ферментера должно поддерживаться положительное давление.

Культивирование в анаэробных условиях

Главным условием анаэробного культивирования в ферментерах является удаление из системы кислорода,

Прежде всего ферментер заполняют средой, насколько это максимально возможно, и в первые часы культивирования через среду продувают газ, не содержащий кислорода, поддерживая тем самым небольшое положительное давление. Использование больших объемов инокулята (10—20% объема среды) обеспечивает быстрое начало роста культуры и способствует уменьшению ее чувствительности к кислороду, попадающему из внешней среды. В случае контроля рН или добавления в среду питательных компонентов в процессе роста культуры используют максимально короткую гибкую трубку, соединяющую сосуды с ферментером, поскольку кислород способен проникать через большинство резиновых шлангов. Мало проницаемыми для кислорода считаются трубки из тайгона, но они размягчаются после автоклавирования, и поэтому их можно использовать, только если предварительно укрепить с помощью проволоки. Наконец, шланг для выхода газа из ферментера следует оборудовать водной ловушкой (гидрозатвором), чтобы предотвратить обратную диффузию газа в его верхнюю часть.

Простой гидрозатвор можно изготовить самим, поместив заполненный водой мерный цилиндр или какой-нибудь другой стеклянный сосуд в перевернутом положении в водяную баню. Трубку для выхода газа из ферментера подводят под перевернутый сосуд таким образом, чтобы выходящий газ собирался в этом сосуде. Трубка должна быть кислородонепроницаемой или максимально короткой, чтобы предельно уменьшить диффузию кислорода. По мере накопления газа в сосуде вода начинает вытесняться. Для того чтобы вытесняемая вода не выливалась, сосуд с водяной баней должен быть достаточно большим. После заполнения воздухом одного сосуда его заменяют другим, заполненным водой. Объем выделяемого газа легко определить, если сосудом с трубкой для выхода газа является мерный цилиндр. При активном пропускании бескислородного газа через ферментер потребность в гидрозатворе невелика. После начала роста анаэробной культуры уже нет необходимости в интенсивном продувании газа через среду в ферментере. Однако если его подача прекращается, то необходимо немедленно установить гидрозатвор.

Рекомендуется использовать предварительно восстановленную среду; ее либо получают нагреванием в ферментере, либо вводят в ферментер, через который предварительно пропускали газ, не содержащий кислорода, уже восстановленную среду. Кислоты, основания и растворы питательных компонентов, добавляемые в ферментер в процессе культивирования, готовят и хранят в отсутствие кислорода. Полностью удалять кислород из растворов, добавляемых в ферментер в небольших количествах, необязательно, поскольку восстанавливающая способность активной анаэробной культуры достаточно велика для удаления его из таких систем.

10.2. ПРОТОЧНЫЕ СИСТЕМЫ

Для непрерывного (проточного) культивирования в отличие от периодической культуры характерна постоянная подача свежих питательных компонентов со скоростью, равной скорости удаления среды из культуры (открытая система). Если культура хорошо перемешивается, то пробы, взятые из любой части ферментера, будут одинаковы по биомассе и концентрации субстрата. По составу они идентичны также культуральной жидкости, вытекающей из ферментера. При непрерывном культивировании теоретически бактерии растут экспоненциально в условиях постоянной подачи свежей среды и удаления части клеток вместе со старой средой, так что объем культуры со временем не меняется. Вообще говоря, постоянная концентрация клеток (равновесное состояние, *англ.* steady-state) для непрерывного культивирования не обязательна. Однако в большинстве работ по изучению количественных аспектов непрерывного культивирования описываются системы с постоянной концентрацией биомассы. Рассмотренные ниже принципы относятся только к непрерывному культивированию в равновесном состоянии.

Термин «равновесное состояние» часто употребляют в литературе в связи с непрерывным культивированием; буквально он означает, что во время исследования не происходит изменения состояния культуры. На самом деле это определение слишком широко, поскольку на практике при непрерывном культивировании некоторые

параметры могут меняться, тогда как другие при этом остаются постоянными. Поэтому непрерывную культуру в равновесном состоянии определяют как культуру с постоянной концентрацией биомассы в определенный период наблюдения. В противоположность этому в периодической культуре постоянная концентрация растворенного кислорода поддерживается происходящими в среде изменениями, но содержание в ней биомассы меняется.

Непрерывное культивирование в равновесном состоянии возможно только в том случае, когда все поступающие потоки, необходимые для накопления биомассы, точно сбалансированы с потоками, участвующими в выводе биомассы из системы. Это видно при рассмотрении общего материального баланса веществ в бактериальных клетках:

Клетки, добавляемые к системе — Клетки, удаляемые из системы +
+ Клетки, образующиеся в процессе роста культуры — Клетки
которые погибают = Клетки, накапливающиеся в системе

Математически это уравнение выражается следующим образом

$$\frac{FX_0}{V} - \frac{FX}{V} + \mu X - \alpha X = \frac{dX}{dt}, \quad (10.7)$$

где F — скорость подачи среды в ферментер и ее выхода из него (л/ч), V — объем жидкости в ферментере (л), X_0 и X — биомасса (г/л) соответственно в поступающем потоке среды и в самом ферментере, μ — удельная скорость роста, α — удельная скорость гибели клеток (ч⁻¹), dX/dt — скорость изменения биомассы (г/л·ч).

В состоянии равновесия $dX/dt = 0$. Теоретически объем чисто непрерывной культуры не меняется (на практике он подвержен незначительным колебаниям). Следовательно, скорости подачи среды в ферментер и выхода культуры из него должны быть одинаковыми. Наконец, поскольку удельная скорость гибели клеток почти всегда значительно меньше удельной скорости их роста, величину α можно не принимать во внимание. Исключения из этого правила наблюдаются только при очень низких скоростях роста микроорганизмов, в присутствии токсичных веществ или в случае культивирования в экстремальных биофизических условиях. При добавлении в

ферментер стерильных питательных веществ $X_0=0$, и если не принимать во внимание удельную скорость гибели клеток ($aX=0$), то в равновесном состоянии

$$\mu = \frac{F}{V} = D. \quad (10.8)$$

Иными словами, удельная скорость роста популяции в ферментере определяется скоростью разбавления D , которая равна F/V .

Существует много типов непрерывного культивирования; некоторые из них подробно описаны в работах [2, 4]. В последующем обсуждении мы ограничимся двумя основными типами непрерывного культивирования: 1) «хемостатом», в котором состояние равновесия достигается путем регулирования поступления лимитирующих рост субстратов, и 2) «турбидостатом», в котором состояние равновесия достигается путем удаления биомассы и замещения ее свежей средой со скоростью, соответствующей росту культуры. В табл. 10.3 сравниваются различные стационарные параметры турбидостата и хемостата. Хемостат в отличие от турбидостата позволяет с высокой точностью регулировать условия лимитирования роста (субстратное лимитирование), тогда как турбидостат предпочтителен для изучения микроорганизмов в условиях роста, близких к максимальной удельной скорости.

Людекинг [38] опубликовал очень полезный обзор теории и практики непрерывного культивирования. В его статье приведены графический расчет и анализ систем непрерывных культур, которые позволяют обойтись без точной модели реакции скорости роста на изменение свойств окружающей среды (например, модели Моно). Эмпирический подход к непрерывному культивированию, основанный на данных по периодической культуре, имеет свои подводные камни, которые обсуждаются в работах Людекинга [38] и других авторов [6—8]. Тем не менее этот подход полезен для получения расчетных критериев.

Существует много отклонений от теории простого хемостата. Большинство из них является результатом: 1) образования вещества, для которого может понадобиться усложненная модель выхода продукта как функции μ ; 2) недостаточного перемешивания среды в ферментере, из-за чего устойчивая скорость разбавления

Таблица 10.3. Сравнение хемостата и турбидостата

Рабочие параметры	Хемостат	Турбидостат
Культивирование при скорости, близкой к максимальной удельной скорости роста	Неустойчивое	Устойчивое, очень близкое к стационарному состоянию
Культивирование при низкой удельной скорости роста	Устойчивое стационарное состояние	Неустойчивое с пульсацией
Скорость разбавления равна удельной скорости роста	Только в стационарном состоянии	Во всех случаях
Концентрация клеток при постоянной удельной скорости роста зависит от	концентрации субстрата в поступающей питательной среде	концентрации субстрата в поступающей питательной среде
Скорость разбавления	Заранее определена	Регулируется как функция биомассы
Концентрация субстрата при культивировании в состоянии равновесия	Лимитирующая	Все субстраты могут присутствовать в избытке

может превысить критическую; 3) пристеночного роста, который вызывает такой же эффект, как недостаточное перемешивание, но еще более выраженный; 4) необычной физиологической реакции микроорганизмов. Первые три причины отклонений обсуждаются в работе Перта [4], некоторые аспекты четвертой причины в работе Уонга и Сински [59]. Другие аспекты физиологической реакции микроорганизмов на поступление питательных веществ и их удаление рассматриваются в разд. 10.5 этой главы.

10.2.1. Хемостат

Теория

Культивирование в хемостате основано на том, что в простейшей форме рост бактерий можно описать как совокупность реакций, в которых скорость роста культуры

определяется самой медленной реакцией метаболизма. Хотя в растущей культуре осуществляется метаболизм многих питательных веществ, скорость роста идеальной культуры в любой момент времени определяется скоростью метаболизма лишь одного питательного субстрата. Моно [45, 46] установил, что зависимость скорости роста от концентрации субстрата можно предсказать с помощью уравнения, весьма напоминающего уравнение Михаэлиса — Ментен:

$$\mu = \mu_{\max} (S / (K_s + S)), \quad (10.9)$$

где μ — удельная скорость роста культуры, которая для бактериальных культур в экспоненциальной фазе равна $(\ln 2)/t_d$, $\mu_{\max}$ — максимальная удельная скорость роста в изучаемой среде, S — концентрация изучаемого субстрата в среде, K_s — константа насыщения для субстрата, численно равная концентрации лимитирующего вещества при $\mu = \frac{1}{2} \mu_{\max}$. Уравнение Моно лучше всего удовлетворяет состоянию равновесия. Для наших задач можно считать, что состояние равновесия существует в том случае, когда концентрация субстрата не изменяется, и конечная микробная популяция в системе непрерывного культивирования постоянна во времени. Когда хемостат заполняют стерильной питательной средой ($X_0 = 0$) без возврата части потока культуральной жидкости, удельная скорость роста культуры численно равна скорости разбавления [уравнение (10.8)]. Это равенство обеспечивается путем управления потреблением лимитирующего субстрата за счет добавления свежей питательной среды. Для хемостата баланс лимитирующего питательного компонента можно представить схемой:

Поступление — Выход — Потребление = Накопление.

Математическое выражение, сходное с уравнением (10.7) для биомассы, выглядит так:

$$DS_0 - DS - \frac{\mu X}{Y_{x/s}} = \frac{dS}{dt}, \quad (10.10)$$

где D — скорость (или коэффициент) разбавления ($D = F/V$), S_0 и S — концентрации лимитирующего субстрата соответственно в поступающей среде и в фермен-

тере, μ — удельная скорость роста культуры в ферментере, X — сухая масса клеток в ферментере, $Y_{x/s}$ — коэффициент общего выхода клеток (экономический коэффициент), т. е. отношение образовавшихся клеток к количеству использованного субстрата, и dS/dt — скорость изменения концентрации субстрата в ферментере. Понятие общего выхода включает в себя рост культуры и ее поддержание (разд. 10.5). При этом предполагается, что происходит образование только клеток. Если образуется еще какой-нибудь продукт, то следует ввести в уравнение член, соответствующий дополнительному потреблению. В состоянии равновесия уравнение (10.10) выглядит так:

$$D(S_0 - S) = \frac{\mu X}{Y_{x/s}}. \quad (10.11)$$

Подставив в уравнение (10.11) уравнение (10.8), получим:

$$X = Y_{x/s}(S_0 - S). \quad (10.12)$$

Отметим, что уравнение (10.12) было представлено выше без вывода для использования его в периодических системах [уравнение (10.6)]. Допускается, что общий выход биомассы зависит только от лимитирующего питательного компонента, но не от удельной скорости роста культуры. Исключения из этого допущения обсуждаются в разд. 10.5. Уравнения (10.8) и (10.12) пригодны для описания равновесия при непрерывном культивировании. Прежде чем с помощью концентрации биомассы и субстратов, а также удельной скорости роста определить условия культивирования, полезно рассмотреть удельную скорость роста как функцию концентрации субстрата. Многим ситуациям удовлетворяет уравнение (10.5). Подставив в уравнение (10.5) уравнение (10.8), получим:

$$D = \frac{D_c S}{K_s + S}, \quad (10.13)$$

где D_c — критическая скорость разбавления (коэффициент разбавления), соответствующая максимальной удельной скорости роста ($\mu_{\max}$). Работа хемостата при скоростях разбавления выше D_c приводит к полному вымыванию культуры.

После преобразования уравнение (10.13) выглядит следующим образом:

$$S = \frac{DK_s}{D_c - D}. \quad (10.14)$$

Подставив уравнение (10.14) в уравнение (10.12), получим:

$$X = Y_{x/s} \left(S_0 - \frac{DK_s}{D_c - D} \right). \quad (10.15)$$

Уравнение (10.15) связывает концентрацию биомассы с коэффициентом разбавления в условиях равновесия. На рис. 10.3 представлена обобщенная реакция системы на скорость разбавления, предсказываемая уравнениями (10.14) и (10.15).

Модель Моно [уравнение (10.5)] — одна из нескольких моделей, описывающих зависимость скорости роста от концентрации субстрата. Допущения, принимаемые в ней, упрощают ситуацию, однако они приемлемы далеко не для всех систем. Фундаментальная теория проточного культивирования детально обсуждается в работах [2, 32, 56].

Оборудование

Большинство из описанного выше оборудования для периодического культивирования микроорганизмов с перемешиванием среды можно использовать непосредственно для непрерывного культивирования. Иногда для непрерывного удаления культуральной среды необходимо модифицировать ферментер. Так, для непрерывного культивирования требуется система двойного насоса (для добавления свежей среды и для удаления культуральной жидкости), используемая вместе с регулятором уровня среды; при этом культуральная жидкость удаляется через отверстие для отбора проб. Такие насосы и регуляторы уровня среды поставляют многие фирмы, производящие ферментеры (New Brunswick Scientific Co., The VirTis Co., and Chemapex Inc.).

Двойной насос и система регулирования уровня среды, используемые для внесения среды и удаления культуры, обладают рядом преимуществ при проточном

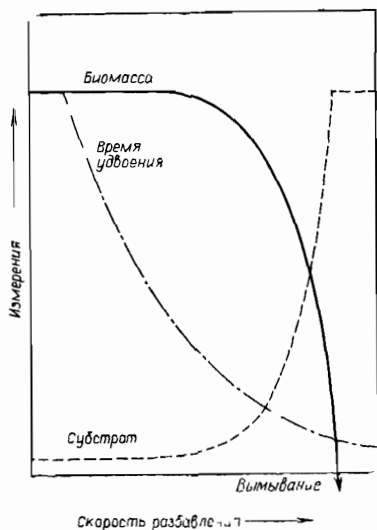


Рис. 10.3. Влияние изменений скорости разбавления на характеристики культуры в хемостатной системе проточного культивирования, где при вымывании культуры скорость разбавления приближается к $\mu_{\text{тах}}$.

культивировании в ферментерах больших емкостей, однако в малых ферментерах удаление переливающейся через край культуральной среды происходит просто под действием силы тяжести. Специальные культиваторы с боковым отводом для удаления жидкости можно изготовить из стандартных стеклянных или стальных сосудов. Особое внимание следует уделять поверхностному перемешиванию на уровне отверстия для отбора проб. Хорошее поверхностное перемешивание получают, если трубку для отбора жидкости [21] или турбинную лопасть помещают на уровне отверстия для отбора проб под углом 5° к поверхно-

сти. Стеклянные сосуды, из которых жидкость удаляется под действием силы тяжести, производит фирма Bellco Glass, Inc. (номер каталога 1970). Эти сосуды подходят для культивирования литровых объемов сред с небольшой плотностью бактерий. Компании, перечисленные в табл. 10.2, производят более универсальные сосуды для непрерывного культивирования, в которых обеспечивается перемешивание и аэрация даже очень плотных бактериальных культур. Однако эти сосуды необходимо дополнительно оборудовать для удаления культуральной жидкости.

Определение скорости потока среды

Тщательное регулирование скорости поступления среды в ферментер и выхода из него при постоянстве объе-

ма абсолютно необходимо для установления равновесных условий роста культуры. При проточном культивировании в хемостате скорость поступления свежей среды в ферментер определяет плотность культуры и удельную скорость ее роста. Скорость поступления среды в процессе ферментации следует тщательно отрегулировать и периодически проверять. На рис. 10.4 изображено простое устройство для измерения скорости поступления среды. Прокалиброванную пипетку (или бюретку) заполняют измеряемым объемом жидкости из резервуара, закрутив зажим *Б*; затем до начала измерений зажим *А* также закручивают. Для определения скорости поступления жидкости зажим *А* откручивают и одновременно зажим *В* закручивают. Измеряют время, необходимое для удаления измеренного объема жидкости из пипетки. Для возобновления нормальной работы системы откручивают зажим *В* и закручивают зажим *А*. Скорость разбавления (или удельная скорость роста в одном культуральном сосуде без рециклизации среды) можно высчитать, разделив скорость поступления среды на объем жидкости в ферментере.

Предотвращение заражения свежей среды в резервуаре (сборнике)

В результате аэрации и перемешивания проточной культуры образуется аэрозоль, содержащий большое число культивируемых микроорганизмов. Поэтому соединительный канал, через который поступает в ферментер свежая среда, может подвергнуться заражению. Отсюда возникает необходимость оснащения этого канала специальным «прерывателем», который действует по типу асептического затвора между ферментером и резервуаром со свежей средой. Рис. 10.5 иллюстрирует основной принцип такого прерывателя [21]. Его нижняя часть обеспечивает медленную, но постоянную подачу стерильного воздуха, предотвращая тем самым аэрозольное заражение канала, через который поступает среда. Верхняя камера устройства обеспечивает дополнительное прерывание потока поступающей жидкости. Этот прерыватель может быть использован как для периодического культивирования с добавлением субстрата, так и для непрерывного культивирования.

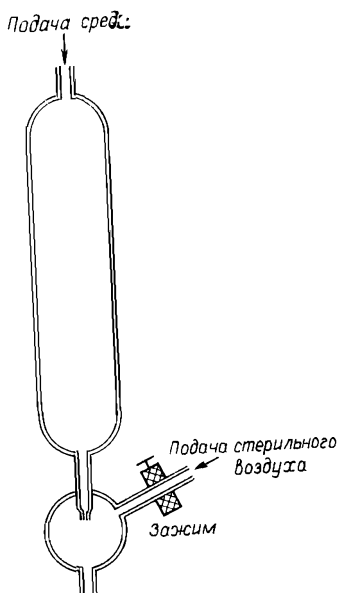
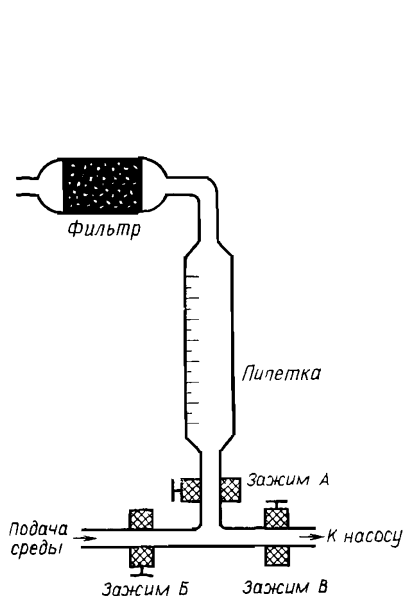


Рис. 10.4. Прибор для определения скорости подачи среды.

Рис. 10.5. Прибор для предотвращения заражения среды в сборнике при непрерывном или периодическом (с подпиткой) культивировании.

Сборники и приемники

Непрерывное культивирование требует довольно больших объемов среды и приводит к образованию соответствующих больших объемов культуральной жидкости с конечным продуктом. В табл. 10.4 представлены объемы свежей среды, необходимые для 20-часового непрерывного культивирования при различных скоростях разбавления. Для удобства там же приведено соответствующее время удвоения биомассы. Чтобы иметь возможность варьировать скорость подачи среды в случае 20-часового культивирования, рекомендуется готовить достаточное количество среды. Поскольку в большинстве лабораторных операций стерилизацию проводят путем автоклавирования, предпочтительнее готовить требуемые объемы среды в бутылках соответствующего размера.

10. ЖИДКАЯ КУЛЬТУРА

Таблица 10.4. Количество среды, необходимое для непрерывного культивирования при различных скоростях разбавления^a

Скорость разбавления b , ч ⁻¹	Соответствующее время удвоения биомассы		Отношение объема среды к объему ферментера, необходимое для 20 часового непрерывного культивирования, мл/мл
	ч	мин	
2,77	0,25	15	55,4
1,39	0,50	30	27,8
0,92	0,75	45	18,4
0,69	1,00	60	13,8
0,46	1,50	90	9,2
0,35	2,00	120	7,0
0,17	4,00	240	3,4
0,09	8,00	480	1,8

^a Бактериальная культура в 500 мл рабочего объема жидкости при скорости удвоения биомассы 30 мин ($D=1,39$ ч⁻¹) требует 13,9 л свежей среды в течение 20 ч культивирования

^b Скорость разбавления, высчитанная для одного сосуда без рециркуляции среды

(С большими объемами горячих жидкостей нужно обращаться с предельной осторожностью. Вместо стеклянных лучше использовать пластмассовые бутылки, которые можно автоклавировать.) Например, для культивирования в течение 20 ч в 14-литровом ферментере с 10-литровым рабочим объемом, в котором клетки бактерий удваиваются каждый час (скорость разбавления $0,69$ ч⁻¹), необходимо 138 л свежей среды. При тех же условиях культивирования для рабочего объема жидкости 1 л необходимо 13,8 л среды.

Небольшие объемы среды можно легко автоклавировать и хранить в стандартных 20-литровых бутылках. При приготовлении небольших объемов среды (10—14 л) ее удастся стерилизовать без избыточного нагревания. Для хранения стерильной среды годятся полипропиленовые или поликарбонатные бутылки, имеющиеся в продаже. На рис. 10.6 схематически изображен типичный резервуар со средой, который стерилизуют в вертикальном положении путем автоклавирования. Объем среды не должен превышать 75% объема резервуара, иначе возможно выплескивание среды во время ее автоклавирования. Кроме того, во время автоклавирования необходимо вы-

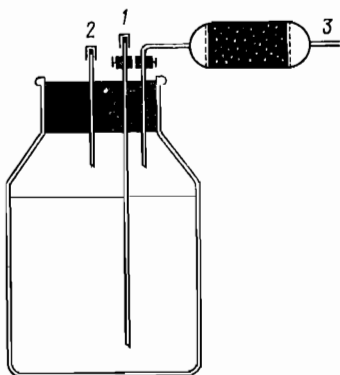


Рис. 10.6. Резервуар со свежей средой, стерилизуемый в автоклаве. Трубки 1 и 2 снабжены прижимными колпачками для стерильного закрывания. Трубки 1 и 3 снабжены зажимами, а трубка 3 содержит также фильтр для воздуха. Во время работы трубка 1 соединяется с ферментером специальной муфтой (рис. 10.7).

пустить газ из сосуда. После стерилизации несколько бутылей можно объединить вместе, увеличив тем самым общий объем резервуара. Для этого трубку 1 первого сосуда соединяют с трубкой 2 второго и т. д. (рис. 10.6).

Стерильные соединения сосудов

Для соединения сосудов между собой и с ферментером используют специальное устройство, изображенное на рис. 10.7. Оно состоит из двух секций стальных трубок, подобранных таким образом, что одна трубка легко входит в другую. На наружные концы этих трубок плотно надеваются резиновые шланги. Каждую трубку устройства перед автоклавированием заворачивают в алюминиевую фольгу. Чтобы стерильно соединить их, следует осторожно снять алюминиевую фольгу, обжечь на огне каждую трубку и плотно вставить трубку меньшего диаметра в трубку большего диаметра. Более тонкая трубка должна быть несколько длиннее, чтобы она проходила через всю большую трубку и соединялась с насаженным на нее резиновым шлангом. Для большей надежности место соединения стальной трубки с резиновым шлангом скрепляют проволокой или небольшим стягивающим зажимом. Устройство для быстрого соединения следует располагать таким образом, чтобы более широкая трубка своим открытым концом была направлена вертикально вниз. Для надежности все устройство заворачивают в стерильный защитный материал, чтобы

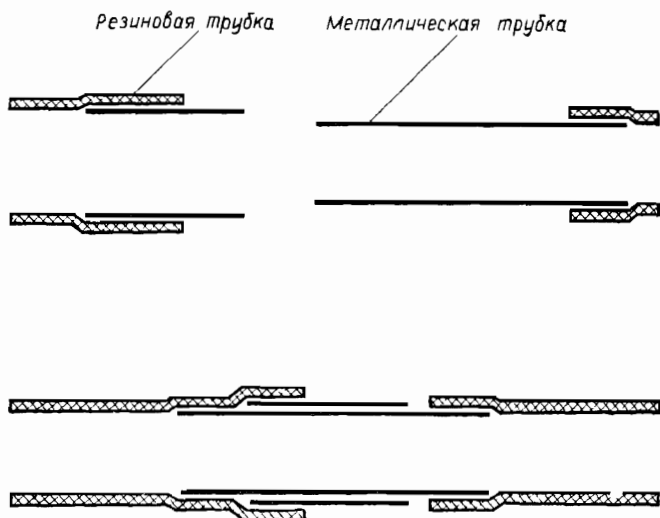


Рис. 10.7. Муфта для быстрого и стерильного соединения трубок и сосудов в системе непрерывного культивирования. *Вверху:* муфта в разобранном виде. *Внизу:* собранная муфта.

предотвратить попадание в трубки пыли и содержащихся в воздухе микроорганизмов. Эти предосторожности позволяют разъединять трубки и после стерилизации на огне вновь их соединять. Когда меняют сосуд, соединительное устройство освобождают от защитного материала; для надежности перед соединением со следующей стерильной линией более тонкую трубку следует обжечь на огне.

Стерилизация среды

Стандартные приемы стерилизации жидких сред описываются в гл. 23 этого руководства. Для предотвращения распада термолабильных компонентов среды используют стерилизацию фильтрованием. Небольшие объемы простых сред, используемых для культивирования бактерий, автоклавируют непосредственно перед их использованием, но для автоклавирования больших объемов

среды необходимо довольно длительное время. Так, в зависимости от состава среды сосуды, содержащие около 10 л жидкости, следует автоклавировать от 30 до 90 мин при 121°C. Для полной стерилизации 10-литровых объемов среды, содержащей такие компоненты, как кукурузная или соевая мука, требуется до 90 мин, тогда как среды, содержащие только растворимые компоненты, можно стерилизовать в течение 30 мин при 121°C. Во время автоклавирования все сосуды следует соединить друг с другом для уравнивания давления.

При автоклавировании больших объемов предварительно восстановленных сред для анаэробных бактерий необходимо особо тщательно установить, а затем и поддерживать химически восстановленное состояние этих сред. Сосуды, содержащие предварительно восстановленные среды, немедленно после автоклавирования подсоединяют к источнику с газом, не содержащим кислород. Как только в верхнем пространстве сосуда начинает конденсироваться пар, там создается частичный вакуум. Продувание газа без O_2 позволяет ослабить вакуум, образованный во время охлаждения сосуда, и предотвратить попадание в среду кислорода из воздуха.

Запуск

Непрерывному культивированию всегда предшествует непродолжительное периодическое культивирование, в процессе которого за счет избытка субстрата происходит накопление биомассы. Непрерывное культивирование следует начинать в тот момент, когда в периодическом режиме культура достигнет экспоненциальной фазы роста. При этом уменьшаются колебания, вызываемые подачей среды, и исключается непредусмотренное вымывание культуры, связанное с наличием лаг-фазы. Разбавление начинают со скоростью, меньшей, чем это требуется, и затем постепенно увеличивают ее до нужной величины. Такой прием позволяет уменьшить колебания роста, вызываемые токсичными субстратами, например фенолом. Реакция культуры в хеостате на токсичные субстраты более подробно обсуждается в работе Перта [4].

Отбор проб

Лучше всего производить отбор проб культуры через специальный отвод в ферментере. Иногда их отбирают также из выводной трубки ферментера, но это не рекомендуется делать при отборе малых объемов, поскольку на стенках выводной трубки могут находиться бактерии; при их попадании в пробу могут быть получены искаженные результаты. При отборе проб в процессе непрерывного культивирования необходимо следовать инструкции фирмы — изготовителя ферментера. Если пробы отбирают не из выводной трубки, а через специальный отвод, их объем должен составлять менее 10% рабочего объема ферментера, так чтобы равновесие системы нарушалось не сильно. Трубку для отбора проб следует предварительно тщательно очищать. Некоторые ферментеры оборудованы воздушной системой очистки, которая обеспечивает сброс в ферментер содержимого трубки после отбора проб. При использовании этой системы нет необходимости в ее предварительной очистке.

10.2.2. Турбидостат

Турбидостат представляет собой самую простую из всех хорошо перемешиваемых систем непрерывного культивирования [61]. Концентрация клеток в ней регулируется постоянной подстройкой определенной скорости поступления питательных компонентов. В отличие от случая хемостата концентрацию биомассы в турбидостате выбирает оператор, а скорость разбавления и соответственно концентрация субстратов поддерживается таким образом, чтобы сохранялся заданный уровень биомассы. Отсюда следует, что если нет необходимости в лимитирующих количествах субстрата, то он добавляется в избытке. Поэтому работа системы (для используемой среды) наиболее стабильна при удельной скорости роста культуры, близкой к максимальной $\mu_{\max}$. Пока концентрация всех компонентов среды избыточна, система работает в широких интервалах концентраций биомассы при скорости разбавления, близкой к критической. Именно в этих условиях хемостат наименее стаби-

лен. В отличие от того, что мы имеем в случае хеоста-та, скорость разбавления в турбидостате при тщатель-ном регулировании биомассы всегда равна удельной ско-рости роста, независимо от того, находится система в состоянии равновесия или нет.

Наиболее уязвимым местом культивирования в тур-бидостате является точность регулирования биомассы. Большинство старых методов регулирования плотности популяции основано на оптическом измерении (в рассе-янном или проходящем свете) с помощью фотоэлектри-ческого датчика. Недостатком этих методов являются помехи, вызываемые пеной и пузырьками, которые обра-зуются при аэрации, а также ростом клеток на стенках ферментера и, что более важно, на оптическом измери-тельном устройстве. Если от помех, вызываемых пузырь-ками, можно избавиться, используя внешнюю проточную кювету, то пена создает серьезные проблемы. Зараста-ние бактериями оптических поверхностей можно частич-но преодолеть их протираанием, однако это малоэффе-ктивный прием. Возлагаются надежды на новые методы волоконной оптики, однако они еще не апробированы.

Термин «турбидостат» относится к любому методу, при котором плотность клеток поддерживается на посто-янном уровне. Он включает в себя методы, основанные на изменениях метаболизма, измеряемых с помощью «рН-стата» [48] и «СО₂-стата». Поскольку основные ме-таболические функции (такие, как поглощение бактери-ями кислорода, выделение двуокиси углерода и в неко-торых случаях изменение рН) тесно связаны со ско-ростью роста клеток и в конечном счете с удельной скоростью роста культуры, их можно использовать как показательные переменные при регулировке потока среды.

Теоретически в качестве регулируемого параметра при культивировании в турбидостате может быть ис-пользован любой параметр, который поддается измере-нию. На практике же в этом качестве используют толь-ко те параметры, которые тесно связаны с ростом кле-ток. Введение сложных комплексов ферментер — ЭВМ обеспечит более высокий уровень использования турби-достатной теории, но эти комплексы требуют дальней-ших разработок.

10.3. СПЕЦИАЛЬНЫЕ СИСТЕМЫ

10.3.1. Управляемая периодическая культура (рН)

Управляемые периодические культуры нуждаются в специальных приборах, с помощью которых следят за параметрами среды и запуском подачи среды в ферментер таким образом, чтобы регулируемый параметр поддерживался на постоянном уровне. Примером регулируемого параметра среды в ферментере служит величина рН, поддерживаемая на постоянном уровне путем автоматического добавления кислоты или щелочи. Основными компонентами системы контроля рН являются рН-электроды с защитным покрытием, рН-метр, блок автоматического титрования, сосуды с кислотой и щелочью вместе с гибкими шлангами, соединяющими их с ферментером, а также простой перистальтический насос или соленоидный клапан. Хотя можно использовать отдельно рН-электрод и электрод сравнения, чаще применяют стерилизуемый паром объединенный электрод, который занимает меньше места и в без того ограниченном объеме небольшого лабораторного ферментера. Все компоненты системы ферментера, включая рН-электроды и электроды для определения растворенного кислорода, должны быть устойчивы к стерилизации паром или другими средствами, например парами окиси этилена или формальдегида.

Особенно надежными считаются электроды фирмы Ingold, которые могут быть автоклавированы многократно. рН-метр и блок автоматического титрования должны подходить друг к другу, поэтому их желательно покупать у одной и той же фирмы. Перистальтический насос надежно обеспечивает подачу кислоты или щелочи против довольно высокого отрицательного давления в ферментере, но при работе с лабораторными ферментерами вполне достаточно использовать простой соленоидный клапан (вентиль), регулирующий по принципу силы тяжести подачу в ферментер щелочи или кислоты. Фирма Radiometer (Копенгаген, Дания) выпускает очень надежные системы для измерения рН и титрования, которые легко приспособить к ферментеру. Системы регулирования рН этой фирмы и электроды фирмы Ingold

поставляются их лондонскими отделениями (The London Co.). Системы регулирования содержания растворенного кислорода поставляются всеми основными фирмами, производящими ферментеры; эти системы позволяют контролировать скорость перемешивания среды и скорость подачи кислорода. Особенно надежны электроды для измерения растворенного кислорода, поставляемые фирмой Instrumentation Laboratories, Inc., поскольку они без замены мембраны устойчивы к многократной стерилизации паром.

Регулирование рН описано также в разд. 6.1 и 16.2.1.

10.3.2. Периодическая культура с добавлением субстрата (подпиткой)

В периодической культуре переход от экспоненциальной фазы роста к стационарной может вызываться многими причинами, в том числе нехваткой важного питательного компонента или образованием токсичного метаболита. Если такой переход вызван нехваткой питательного компонента, то при добавлении свежей среды рост культуры будет продолжаться. Чтобы поддерживать экспоненциальный рост культуры с постоянной скоростью, скорость добавления среды и объем культуры в закрытой системе следует увеличивать экспоненциально. Такой способ поддержания роста называют периодическим культивированием с подпиткой [19]. Способ с периодическим удалением культуральной среды, позволяющим добавлять свежую среду, называют длительным периодическим культивированием или отъемно-доливным культивированием. Непрерывное культивирование отличается от периодического, периодического с подпиткой и отъемно-доливного тем, что при нем скорость подачи среды и скорость удаления культуры одинаковы.

Метод периодического культивирования с подпиткой можно использовать в случае потенциально токсичного субстрата, так как при этом его концентрация в среде будет поддерживаться на низком уровне. Культивирование в периодическом режиме с подпиткой является средним между обычным периодическим культивированием и непрерывным культивированием. Иногда при периодическом культивировании с подпиткой происходит более

значительное увеличение биомассы или выхода продукта, чем при обычном периодическом или непрерывном культивировании. Культивирование в лабораторных условиях по типу периодической культуры с подпиткой легко осуществляется простым добавлением в ферментер самотеком первичных или вторичных субстратов.

Настоящее периодическое культивирование с подпиткой требует, чтобы объем жидкой среды в ферментере увеличивался. Это требование обуславливает верхний предел времени культивирования, определяемый скоростью подпитки, а также изменение условий аэрации и эффективности перемешивания. Кроме того, при этом не исключена возможность обратного заражения свежей среды в сборнике из ферментера; поэтому желательно использовать прерыватель подачи среды (рис. 10.5).

Одним из преимуществ периодического культивирования с подпиткой и длительного периодического культивирования является возможность регулирования скоростей роста. Этот аспект изучен еще недостаточно [4], хотя он может стать ключевым при разработке улучшения процессов промышленного культивирования, например для биосинтеза антибиотиков.

10.3.3. Синхронная периодическая культура

Биохимические процессы, связанные с определенными этапами цикла развития индивидуальных клеток, можно изучать в синхронизированной периодической культуре. Синхронизация культуры наступает в том случае, когда все клетки начинают делиться с почти одинаковой скоростью. При этом зависимость логарифма числа клеток от длительности культивирования приобретает ступенчатый характер в отличие от линейного при обычном росте в периодическом режиме культивирования. Несмотря на то что развитие синхронизированной культуры происходит довольно равномерно, сохранить синхронность в течение длительного времени трудно, поскольку требуется точный контроль.

Синхронизация культуры может быть достигнута путем периодического изменения критических факторов среды. К числу технических приемов, вызывающих синхронизацию деления клеток, относятся подавление, уско-

рение или задержка их метаболических функций циклическим способом. Популяция постепенно синхронизирует свой ответ на периодические колебания метаболической активности, а затем и показатели роста. Однако этот метод требует значительных отклонений от нормального метаболизма, поэтому его использование ограничено. Единственным исключением является прорастание бактериальных спор как показатель начинающейся синхронизации культуры. Ступенчатые или резкие изменения состава среды могут привести к прорастанию спор и тем самым смоделировать процессы, близкие к естественным. Однако для получения гомогенной популяции (достичь 100%-ного образования спор или их прорастания практически невозможно) требуется применение некоторых физических способов предварительной селекции.

Общепринятый метод синхронизации культур основан на физическом выделении гомогенной фракции из гетерогенной популяции. Такой подход, часто называемый синхронизацией путем селекции, позволяет избежать проблем, связанных с нарушением метаболизма.

Согласно данным Кубитчека [34] и Пула [49], в процессе клеточного цикла объем клеток *E. coli* возрастает линейно и количество биомассы — экспоненциально. Тот факт, что после деления клетки имеют наименьший объем, наталкивает на предположение, что с помощью центрифугирования (особенно в градиенте плотности) можно получить популяцию новых дочерних клеток из асинхронной культуры. Данные о линейном увеличении объема клеток на фоне экспоненциального роста их массы свидетельствуют о том, что те клетки, которые готовы к делению, или те, которые уже разделились, имеют самую высокую плотность, несмотря на различия в их размерах. С помощью центрифугирования в градиенте плотности можно получить несколько фракций клеток, причем фракция с наибольшей плотностью будет содержать и молодые (дочерние), и зрелые (готовые к делению) клетки, а фракция с наименьшей плавучей плотностью будет содержать гомогенную популяцию клеток, которые находятся в одинаковой стадии роста.

При синхронизации путем селекции в результате центрифугирования в градиенте плотности нет возможности получить новые дочерние клетки для непосредственного

изучения физиологии их роста, поскольку во фракциях, содержащих эти клетки, всегда присутствуют зрелые клетки, готовые к делению. Однако с помощью центрифугирования в градиенте плотности можно получить инокулят для роста синхронизированной культуры. Затем путем прямого отбора проб из нее можно изучать физиологию бактерий, связанную с их клеточным циклом. Ниже описан главный метод получения синхронизированных культур, в основе которого лежит метод Митчисона и Винсента [43]. Этот метод можно использовать в качестве начального этапа синхронного культивирования, имеющего свои характерные особенности в случае каждого изучаемого микроорганизма [37].

Метод синхронизации путем селекции

К экспериментам по синхронизации приступают только тогда, когда определены основные условия периодического культивирования, в том числе кинетика асинхронной культуры. После этого устанавливают режим периодического культивирования таким образом, чтобы в течение экспоненциального роста клеточная масса удваивалась от двух до пяти раз.

1. Готовят 500 мл стерильной среды в нескольких колбах (например, в 250-миллилитровых колбах Эрленмейера). Инокулируют половину этих колб и инкубируют в соответствующих условиях, а остальные стерильные колбы хранят в тех же условиях.

2. Выращивают клетки в системе периодического культивирования до середины экспоненциальной фазы. Быстро охлаждают культуру до 0—4 °С, погружая колбы в ледяную баню. Клетки собирают 10-минутным центрифугированием на холоду при 10 000 g.

3. Осадок клеток ресуспендируют в 2 мл соответствующего ледяного буфера (например, 0,1 М калий-фосфатного буфера, pH 7,0), используя гомогенизатор типа Vortex. Если клетки склонны к агрегации, то для получения суспензии отдельных клеток используют мягкую обработку их ультразвуком или мягкую гомогенизацию (в гомогенизаторе или размельчителе тканей). Для культур, которые особенно плохо поддаются ресуспендированию, можно вначале добавить к буферу 0,01% (вес/

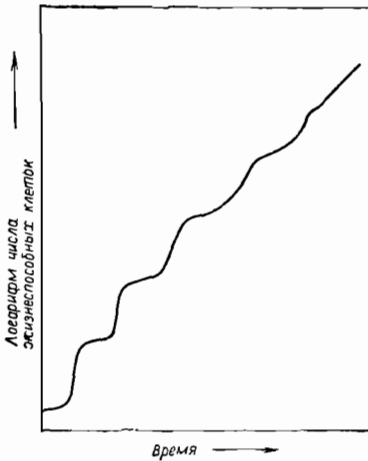


Рис. 10.8. Типичная кривая синхронизированной популяции бактерий.

/объем) твина 80, а затем применить ультразвуковую или механическую обработку.

4. Быстро, но осторожно наносят суспендированные клетки на стерильный охлажденный градиент плотности фикола. В зависимости от вида клеток градиент плотности готовят также из сахарозы, коллоидного силиказоля или других веществ. В случае градиента сахарозы ее стерильный охлажденный раствор наслаивают в увеличивающихся концентрациях в простерилизованные и охлажденные до 0°C центрифужные пробирки. Например, вносят в

стерильную центрифужную пробирку 10 мл 35%-ной (вес/объем) сахарозы в фосфатном буфере, а затем на этот слой последовательно наслаивают по 10 мл раствора сахарозы разной концентрации (26,5; 25,5; 24,5; 22,0; 19,0 и 15,0%), приготовленного на том же буфере. Все буферные растворы готовят из основного 35%-ного раствора сахарозы. Растворы сахарозы перед использованием следует стерилизовать фильтрованием, хранить на холоду и подвергать предварительной аэрации (в случае аэробных бактерий).

5. Закрытые крышками центрифужные пробирки с клетками аккуратно помещают в охлажденную центрифугу и центрифугируют 15—20 мин при 2500 g на холоду (0°C). Для более точного разделения клеток подбирают скорость и время центрифугирования таким образом, чтобы видимая полоса бактерий передвигалась не более чем на $\frac{2}{3}$ длины пробирки. И время, и скорость центрифугирования зависят от культуры.

6. 0,5 мл самой легкой фракции клеток из центрифужной пробирки вносят в колбу с нагретой ростовой средой.

7. Тщательно измеряют оптическую плотность инокулированной среды, чтобы затем определять ее ступенчатое увеличение, свидетельствующее о синхронном росте культуры.

Синхронность культуры поддерживается в течение двух или трех циклов деления клеток; в случае более длительного периода синхронность приходится устанавливать заново с помощью описанного выше метода. Проточное зональное центрифугирование в градиенте плотности позволяет получать большие количества инокулята для синхронизованного культивирования микроорганизмов. Оно представляется перспективным в обеспечении «непрерывной» синхронизации с помощью рассчитанной во времени инокуляции турбидиметрически регулируемой проточной культуры (турбидостат). На рис. 10.8 показана типичная кривая роста синхронизованной популяции бактерий; видно, что после двух циклов кривая начинает выравниваться.

10.3.4. Периодическое и непрерывное культивирование с диализом (Ф. Герхардт)

Диализ представляет собой движимый концентрационным градиентом процесс разделения растворенных молекул за счет их различной диффузии через полупроницаемую мембрану. Этот процесс, применимый для роста и поддержания живых клеток, лежит в основе диффузионного метода культивирования.

Существуют и другие процессы, в которых используются мембраны, например электродиализ, ультрафильтрация, микрофильтрация и обратный осмос. Однако для получения клеток и их метаболитов лучше всего использовать именно диализ, поскольку в отличие от других методов при диализе происходит наименьшее засорение мембраны. При культивировании с диализом между культуральной камерой и сосудом с жидкостью помещают мембрану. Для повышения эффективности такого способа культивирования объем диализной жидкости должен быть значительно больше объема диализуемой культуры, или же диализную жидкость следует менять.

Кроме того, мембраны должны иметь достаточную площадь, чтобы обеспечивалась удовлетворительная скорость диффузии. Такая система культивирования с диализом может действовать *in vivo* или *in vitro* в периодическом и непрерывном режимах или при их сочетании.

Для культивирования с диализом используются мембраны трех типов, отличающиеся размером пор. *Диализные мембраны* имеют номинальный размер пор ~ 10 нм. Они задерживают клетки и макромолекулы, но проницаемы для таких мелких молекул, как основные питательные компоненты, требующиеся бактериям для их роста. *Фильтрующие мембраны* (или *мембранные фильтры*) имеют номинальный размер пор ~ 100 нм; они тоже задерживают клетки, но пропускают макромолекулы со сравнительно низкомолекулярной массой. Диализные мембранные трубки различного размера получают из регенерированной целлюлозы путем вискозного процесса (Union Carbide Corp.). Имеются в продаже листы диализной мембраны с большим диапазоном пор, сделанные из различных материалов (Gelman Sciences, Inc., Millipore Corp., Nuclepore Corp.). Для бактериологических целей следует принимать во внимание такие факторы, как автоклавируемость мембран, размер их пор, химическая инертность и проницаемость (которая в свою очередь определяется пористостью, емкостью и толщиной мембраны). *Мембраны третьего типа, через которые проходят растворенные вещества*, не имеют пор и проницаемы для газов, поскольку газы растворимы в мембранном материале, например в резине или поликарбонате.

Для разделения культуры и диализата может использоваться также поверхность раздела двух физически различных фаз (интерфазная диализная культура), например в твердо-жидкой двухфазной системе (разд. 9.2.2).

К специфическим преимуществам использования диализа при культивировании бактерий относятся: 1) удлинение экспоненциальной фазы роста в периодической культуре, что позволяет получать высокие плотности живых клеток; 2) увеличение стационарной фазы роста культур, что позволяет увеличить выход метаболитов, связанных с этой фазой; 3) ослабление контроля путем ингибирования продуктом за счет удаления или

разведения продуктов метаболизма, что увеличивает их образование в периодической или непрерывной культуре; 4) установление состояния равновесия с высоким уровнем метаболизма, что позволяет иммобилизовать клетки для длительного образования определенных продуктов; 5) получение метаболитов, свободных от клеток, и, наоборот, клеток, свободных от макромолекул среды; 6) возможность изучения клеточной популяции *in situ* или при создании *in vivo* искусственной среды, например в природной экологической обстановке или в организме животного; 7) возможность изучения взаимодействия между популяциями клеток.

История диализной культуры восходит к 1896 г., когда Мечников провел свои опыты с холерными вибрионами. Чтобы изучить способность вибрионов продуцировать растворимый токсин, он помещал их в коллодиевом мешочке в брюшную полость живой морской свинки. История вопроса, общие принципы, математическая теория и практическое применение диализной культуры приведены в исчерпывающем обзоре Шульца и Герхардта [51]. Опубликован [7] обзор использования принципа диализной культуры иммобилизованных клеток, применяемых в качестве ферментных препаратов (разд. 10.3.5), а в докторской диссертации Стайбера (Университет штата Мичиган, Ист Лансинг, 1979) собраны последние данные по рассматриваемому вопросу.

Системы in vivo

Термин «диффузионная камера» часто используют для описания небольшой диализной культуральной системы, которую имплантируют подопытному животному (например, в брюшину, рубец или под кожу). Она представляет собой пластмассовый цилиндр, закрытый с обоих концов мембранными фильтрами. Из такого цилиндра (типа барабана) можно отбирать пробы. Введенные в жидкую среду внутри цилиндра бактерии растут исключительно за счет диффузии питательных компонентов хозяина. Такие системы используют в бактериологии для изучения иммунных реакций и роста плохо культивируемых патогенов типа *Mycobacterium leprae*, *Treponema pallidum* и *Neisseria gonorrhoeae*.

Системы ex vivo

К системам *ex vivo* относится, например, следующая. У крупных подопытных животных (допустим, коз) хирургически обнажают сосудистый пучок на шее, выводят наружу и обеспечивают его контакт с диализным мешком, внутри которого содержится бактериальная культура. Такая культуральная диализная система *ex vivo* позволяет бактериям расти исключительно за счет питательных компонентов крови, причем в культуре отсутствуют макромолекулярные и клеточные защитные механизмы (если используются соответствующие диализные мембраны). В одной из таких систем бактерии находятся в обычном лабораторном ферментере и культура постоянно циркулирует, например через рубашку (с волокнами) для искусственного почечного гемодиализа, которая соединяется трубкой с артерией экспериментального животного [50]. В другой системе бактерии помещают в небольшую (3 мл) камеру из прозрачной пластмассы (поликарбоната), закрытую мембраной, по другую сторону от которой может протекать кровь. Все устройство укрепляют на шее свободно передвигающегося животного. Такая система неприменима для облигатных анаэробов, но она успешно используется для многих факультативных анаэробов, и ее можно применить для изучения реакций между паразитом (специфическим патогеном) и хозяином [26].

Системы in vitro

При культивировании с диализом в лабораторных условиях мембранную диализную трубку с культурой помещают в пробирку, колбу или бутылку со средой, причем ее сгибают таким образом, что она образует полость с двойными стенками, между которыми находится культура (рис. 10.9).

В устройстве, основную часть которого составляет стеклянная трубка из пирекса с загнутыми краями (рис. 10.10), сочетаются преимущества встряхиваемых колб (разд. 10.1.2) и диализной культуры. В подобных устройствах [51] можно использовать любые типы листовых мембран.

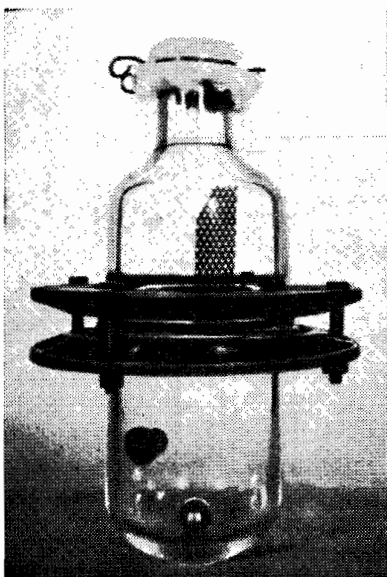
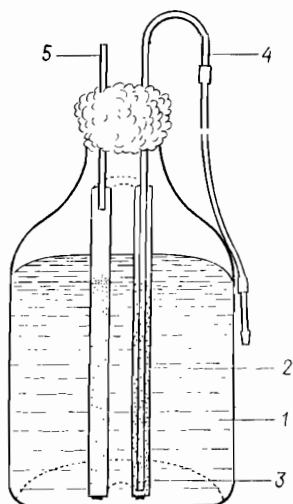


Рис. 10.9. Система для культивирования бактерий в диализном мешке. Трубка диализной мембраны свернута таким образом, что образует мешок с двойными стенками (3), в наружных полостях которого содержится культура (2). Среда (1) помещена в оплетенную бутылку. Имеются также трубка для инокуляции и внесения проб (5) и сифон для отбора культуры (4) [53].

Рис. 10.10. Сосуд для диализной культуры, оборудованный удерживающим устройством для крепления на круговой качалке. Нижняя часть сосуда заполнена стерильной средой, которая перемешивается вращающимся шариком. В верхней части находится культура, которая турбулентно аэрируется за счет перемешивания в присутствии отбойника [25].

При осуществлении культивирования с диализом в лабораторных или производственных масштабах целесообразно выращивать бактерии в отдельной замкнутой системе, которая соединялась бы с диализной замкнутой системой промежуточным диализатором [22]. Такое устройство «диализатор — диализная культура», схематически представленное на рис. 10.11, может работать в периодическом режиме в обеих замкнутых системах

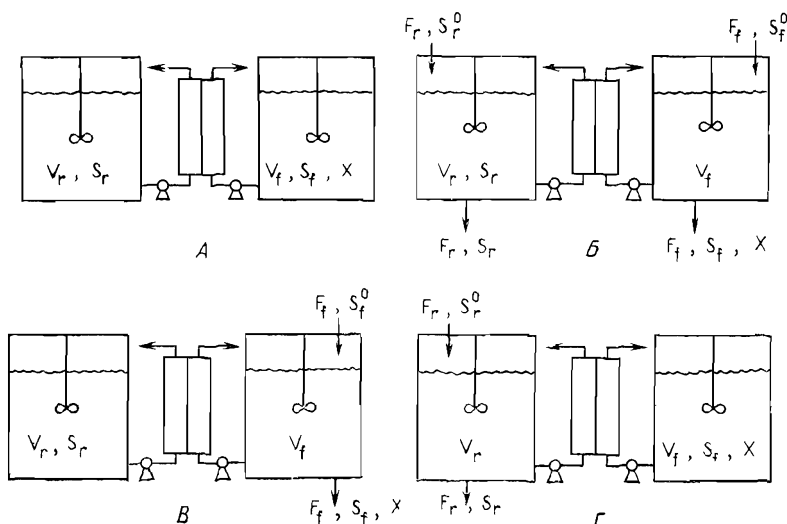
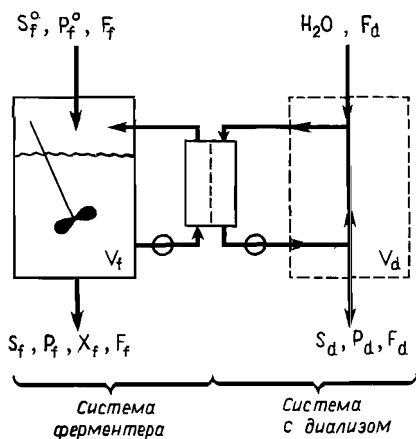


Рис. 10.11. Схемы четырех моделей диализного культивирования. Принципы изображенной системы диализатор—диализная культура пригодны для многих целей. Обозначения: F — скорость потока, S — концентрация субстрата, V — объем, X — концентрация клеток, поступающих в резервуар и ферментер, а также их концентрация в этих сосудах и в вытекающей из них среде. Воспроизводится с некоторыми изменениями из работы [51]. *А.* Резервуар и ферментер для периодического культивирования. *Б.* Резервуар и ферментер для непрерывного культивирования. *В.* Резервуар для периодического культивирования и ферментер для непрерывного культивирования. *Г.* Резервуар для непрерывного культивирования и ферментер для периодического культивирования.

(рис. 10.11, *А*), в непрерывном режиме в обеих системах (рис. 10.11, *Б*) или в двух комбинациях этих режимов (рис. 10.11, *В*, *Г*).

Основным условием эффективной работы таких систем является подходящее устройство для диализа. Такое устройство, напоминающее рамный фильтр-пресс, содержит сепараторы из силиконовой резины, которые способствуют созданию турбулентных потоков культуры и диализата по разные стороны от мембран [51]. Для этих целей используют также различные типы гемодиализаторов.

Рис. 10.12. Схема системы диализного проточного культивирования в ферментере с подпиткой. Для максимального удаления токсичных продуктов метаболизма в диализной системе используется поток воды [15]



Готовую систему можно приспособить к используемой культуре. Так, при лимитировании роста бактерий токсичными метаболитами (например, молочной кислотой) наиболее эффективно работает полностью проточная система (рис. 10.12). Непосредственно в ферментер субстрат (S_f^o) подают в довольно высокой концентрации, и поэтому потребность в обычном сосуде для диализата отпадает. Диализная система в данном случае состоит только из шлангов, насоса и диализной части диализатора и имеет относительно небольшой объем (V_d). В систему поступает только вода с довольно высокой скоростью (F_d). Такая система обеспечивает максимально возможный для диализа концентрационный градиент. Стайбер и др. [54] применили ее в своей работе и показали максимальное превращение концентрированной (25%) лактозы в молочную кислоту.

Математическое моделирование и применение ЭВМ

На примере описанных выше систем и практического использования проточного культивирования с диализом мы обсудим значение математического моделирования и расчетов на ЭВМ для предсказания результатов, которые можно получить при культивировании бактерий. Для подтверждения теоретических предсказаний прово-

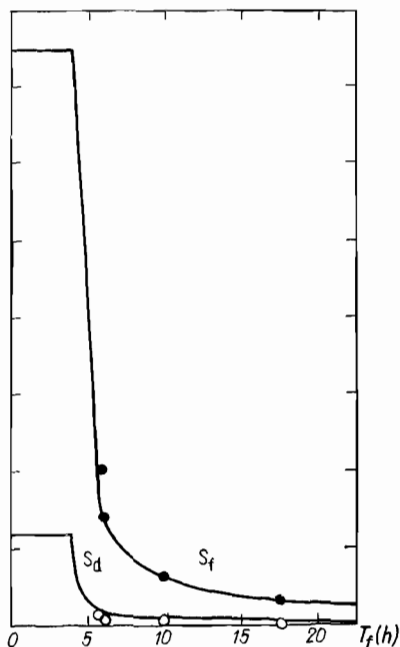


Рис. 10.13. Влияние времени задержки клеток (T_f) на остаточное содержание лактозы в ферментере S_f и диализной системе S_d в процессе проточного диализного культивирования. Кривые получены путем расчетов математической модели на ЭВМ; точки взяты из экспериментальных данных с целью продемонстрировать хорошее соответствие между результатами и теоретическими предсказаниями [55].

дят лабораторные опыты, изменяя лишь некоторые экспериментальные условия в заранее выбранных критических точках. В свою очередь экспериментальные результаты используются для установления констант роста и для того, чтобы подтвердить необходимость в дополнительных членах в уравнениях. Основываясь на успешных теоретических предсказаниях и экспериментальных подтверждениях, модель становится значительно более точной и может быть полезна при управлении процессом культивирования.

Примером такого сочетания теоретического и экспериментального подхода к бактериальному процессу могут служить данные Стайбера и др. [15, 54, 55], полученные при культивировании бактерий в среде с лактатом и аммонием. Для субстрата, продукта и биомассы в ферментере и диализной замкнутой системе были выведены уравнения материального баланса и скоростей соотношения реакций. Эти уравнения объединили, опреде-

лили в них переменные в безразмерной форме, а производные по времени приравняли к нулю, чтобы получить общее решение для состояния равновесия, которое описывается пятью квадратными уравнениями. Реальные величины для варьируемых членов были введены в программу для вычислительной машины. При сравнении смоделированных предсказаний с экспериментальными данными (рис. 10.13) была получена хорошая корреляция.

Такая методология, сочетающая теоретические предсказания и экспериментальные подтверждения, широко используется в промышленных микробиологических процессах, но в других областях бактериологии она почти не применяется. Этот важный метод следует значительно более широко применять в научных исследованиях, например для предсказания исхода инфекционных заболеваний.

10.3.5. Ферментеры с иммобилизованными клетками (Ф. Герхардт)

Большинство методов бактериальных культур предназначены для максимального размножения клеток, и основная масса питательных компонентов идет на поддержание их роста. Однако в промышленных ферментационных процессах часто необходимо получать максимальные количества определенных метаболитов, и поэтому желательно, чтобы питательные компоненты среды расходовались не для роста бактерий, а для образования ими требуемого продукта. В последнее десятилетие огромное количество исследований направлено на использование бактериальных ферментов или целых клеток, «иммобилизованных» в ферментере, с целью максимально возможного превращения субстрата в необходимый продукт.

Аббот [6] рассматривает иммобилизацию клеток как «физическую локализацию микроорганизмов, позволяющую повторно и экономно их использовать». Можно также определить ферментер с иммобилизованными клетками как устройство, обеспечивающее условия, в которых метаболизм поддержания достигает своего максимума, а рост сводится к минимуму.

Проиллюстрируем этот принцип на примере давно

известного «скорого способа образования уксуса», при котором колонии уксуснокислых бактерий в виде пленки находятся в иммобилизованном состоянии на деревянных стружках, заполняющих колонку. Сверху в такую колонку подают этанол, а снизу вверх — воздух, обеспечивающий синтез уксусной кислоты. После образования бактериальной пленки в дальнейшем она почти не растет, тогда как жизнеспособность бактерий поддерживается за счет окисления этанола в ацетат. Такой процесс может продолжаться непрерывно в течение недель или месяцев.

Одним из главных методов иммобилизации клеток остается их физическое прикрепление или химическое связывание с твердым носителем, в то время как для образования скоплений клеток используются другие методы.

Детальное описание методов иммобилизации клеток в ферментерах не входит в задачи этой книги; по этому вопросу существует несколько обзоров [6, 7, 13].

10.4. СБОР И ОЧИСТКА

Выбор способа отделения бактериальных клеток от среды культивирования определяется тем, как в дальнейшем будут использоваться фракции. Так, если собираются изучать клетки, то их отделение путем фильтрования нежелательно, поскольку при этом клетки могут загрязниться материалом, имеющимся в фильтре. Если же будут исследовать культуральную жидкость, то после центрифугирования культуры рекомендуется отбрасывать часть надосадочной жидкости, чтобы избежать ресуспендирования клеточного осадка при ее удалении.

10.4.1. Фильтрация

Осадочная фильтрация

Для получения бактериальных клеток из культуральной среды существуют два типа фильтрации: осадочная и мембранная. Для осадочной фильтрации используют высокопористые материалы. Обычно фильтрующая система состоит из подложки фильтра (фильтровальной бу-

маги или ткани с довольно большим диаметром пор) и толстого нанесенного сверху слоя фильтрующего материала (целлюлозы, диатомовой земли, кизельгура и др.), который легко суспендируется в водных средах с образованием пористого осадка, задерживающего бактерии [57]. При использовании фильтрующего материала увеличивается эффективная поверхностная зона фильтра и соответственно количество бактерий, задерживаемых одним фильтром. Фильтрующий материал можно добавлять непосредственно в культуральную среду или предварительно насаивать на подложку фильтра. На практике добавление фильтрующего материала, такого, как целлюлоза, в культуральную среду позволяет профильтровать в 10 раз больше жидкости, чем при предварительном нанесении того же количества целлюлозы на подложку фильтра. Однако при таком добавлении значительно возрастают трудности, связанные с извлечением клеток для последующих исследований.

Осадочное фильтрование проводят на воронке Бюхнера. Ее укрепляют в вакуумной колбе и выстилают высокопористой фильтровальной бумагой (например, ватман № 1). Включают вакуумный насос и на бумагу осторожно и равномерно наливают предварительно приготовленную суспензию кальцифицированной диатомовой земли, так чтобы образовался слой толщиной 2—5 мм. Поскольку через такой слой фильтрация происходит равномерно, бактерии можно удалять по мере накопления, соскабливая их с поверхности фильтра. Это позволяет проводить довольно длительное фильтрование без замены фильтра.

При осадочной фильтрации из культуральной среды удаляется большинство микроорганизмов, в результате чего получают хорошо просветленный фильтрат. Однако для стерилизации жидких сред этот метод неприменим. Клетки, полученные осадочной фильтрацией, обычно загрязнены большим количеством фильтрующего материала, который может помешать их дальнейшему изучению.

Мембранная фильтрация

В отличие от осадочной мембранная фильтрация основана не на использовании глубоких или извилистых пор фильтрующего материала, а на задержке бактерий

на его поверхности. Бактерии не способны проходить через поры мембраны, диаметр которых изменяется в очень узких пределах. На практике при мембранной фильтрации требуется дополнительное давление на фильтр. Аппараты для мембранной фильтрации и мембранные фильтры с различными размерами пор имеются в продаже (Millipore Corp., Nucleopore Corp., Gelman Sciences, Inc.).

Выбор мембраны зависит от характеристик культуры и от того, что необходимо получить — клетки или фильтрат. Поскольку средний размер клеток бактерий равен приблизительно 0,5—1,5 мкм, для их полного удаления в случае стерилизации фильтрованием требуется микропористый мембранный фильтр с размером пор менее 0,5 мкм. Для стерилизации фильтрованием часто используют мембраны с диаметром пор $0,22 \pm 0,02$ мкм. Такие мембраны подходят для большинства методов стерилизации, но из-за того, что бактерии обладают достаточной гибкостью, теоретически можно допустить, что они способны проходить через них. Поэтому растворы, стерилизованные фильтрованием через мембранные фильтры с диаметром пор 0,22 мкм, следует периодически проверять на стерильность.

Использование мелкопористых мембранных фильтров со средним размером пор $0,45 \pm 0,04$ мкм в принципе позволяет быстро и эффективно фильтровать бактериальные культуры, но не обеспечивает стерильности фильтрата. Сами мембранные фильтры и аппарат для стерилизации фильтрованием должны стерилизоваться автоклавированием или каким-либо другим способом. Собирать бактериальные клетки и готовить стерильные растворы путем фильтрования лучше всего под давлением азота. Такая фильтрация значительно снижает или полностью препятствует окислению фильтруемого вещества благодаря положительному давлению инертного газа в фильтрующем устройстве. Если необходимо собирать клетки в стерильных условиях, то азот следует предварительно простерилизовать фильтрованием. Все консультации по вопросам рабочего давления и размера используемого оборудования следует получить у фирмы-изготовителя.

Дополнительные сведения по осадочной и мембранной фильтрации можно найти в работах [47, 58, 60].

10.4.2. Центрифугирование

Сбор бактериальных клеток путем центрифугирования обычно приводит к менее полному их отделению от культуральной среды, чем с помощью фильтрации. Однако этот метод позволяет получить культуральную среду и клетки, свободные от загрязнения посторонними веществами, например фильтрующим материалом; поэтому он широко используется для получения биомассы в лабораторных условиях. Но для приготовления стерильных растворов центрифугирование не пригодно.

Скорость осаждения клеток в процессе центрифугирования зависит от таких факторов, как вязкость среды, размер (диаметр) частиц и разница в плотности между клетками и суспендирующей средой. Все эти факторы определяют время и скорость центрифугирования в каждом конкретном случае. Для осаждения большинства бактерий из относительно невязких сред (таких, как питательный бульон) вполне достаточно центрифугирования при 10 000 g в течение 10—15 мин. Поскольку упаковка бактерий в осадке зависит от их размера и условий культивирования, при подборе скорости или времени центрифугирования необходимо руководствоваться тем, чтобы осадок при сливании надосадочной жидкости как можно меньше подвергался ресуспендированию.

Оборудование для центрифугирования

Лабораторные центрифуги работают как в периодическом, так и в проточном режиме, причем иногда оба вида операций можно выполнять в одной центрифуге. Существуют роторы самых разных типов, но все они работают по одному общему принципу — регулируемого приложения центробежной силы во вращающемся роторе. Поскольку средний диаметр частиц в бактериальной культуре довольно мал, для разделения клеток и среды с помощью центрифугирования обычно необходимы высокие скорости вращения. При высокоскоростном центрифугировании образуется большое количество тепла, поэтому центрифуги должны быть оснащены собственной охлаждающей системой. Если такой системы нет,

то работу необходимо проводить в холодной комнате. Кроме того, поскольку центрифужные роторы выпускаются различных размеров, при работе с ними следует исходить не из скорости и времени центрифугирования, а из величины центробежной силы (обычно выражаемой в единицах g) и времени центрифугирования. Фирмы — изготовители центрифуг — DuPont Instruments, Ivan Sorval, Inc., International Equipment Co., Beckman Instruments, Inc. — публикуют табличные данные о скоростях вращения роторов и эквивалентных им величинах центробежных сил.

При работе с большими объемами культуральной среды используют проточное центрифугирование (сепараторные центрифуги). Центрифуги с охлаждением фирмы DuPont — Sorval оборудованы специальным ротором и системой подачи среды для работы в проточном режиме. Этот метод пригоден для выделения большинства бактерий, кроме хлопьеобразующих видов и грибов, обычно забивающих пути подачи среды.

Центрифуги типа Sharples оборудованы длинными и узкими роторами, через которые культура подается снизу вверх. При высокой скорости вращения таких роторов клетки оседают на их стенках. Данный способ центрифугирования дает возможность очень быстро получать большие количества клеток, а также проводить дифференциальное центрифугирование частиц различного размера или плотности. Существуют модели центрифуг как с ограниченной емкостью для биомассы, так и с непрерывным удалением осадка клеток.

Методика центрифугирования

Ниже описана методика центрифугирования, позволяющая получать отмытые клетки в стерильных условиях. Если стерильность не требуется, то метод можно упростить.

1. Прежде всего готовят соответствующее количество раствора для промывания клеток, получаемых после центрифугирования (разд. 25.1). Объем раствора должен быть в 4—6 раз больше объема культуры, а значения ионной силы и pH промывающего раствора и росто-

вой среды должны быть очень близки. Перед использованием раствор стерилизуют и охлаждают до 0—4 °С.

2. Используемый в работе центрифужный ротор охлаждают в холодильнике. *Предостережение:* нельзя помещать ротор, имеющий комнатную температуру, на ось центрифуги, а затем охлаждать его с помощью центрифужной системы охлаждения. При этом ротор может сжаться и настолько плотно закрепиться на оси, что впоследствии возникнут сложности при его снятии.

3. Стерилизуют несколько центрифужных пробирок с крышками (полипропиленовые и поликарбонатные пробирки можно автоклавировать) и дают им остыть. Для сохранения стерильности пробирки при ее последующем использовании перед автоклавированием крышку и верхнюю часть пробирки обертывают алюминиевой фольгой.

4. Определяют объем центрифужных пробирок и с соблюдением правил асептики заполняют их на $\frac{2}{3}$ бактериальной культурой. Пробирки попарно уравнивают. Если окажется непарная пробирка, ее уравнивают с пробиркой, заполненной дистиллированной водой. Все пробирки надежно закрывают стерильными крышками.

5. Помещают попарно уравновешенные пробирки в ротор друг против друга.

6. Проводят центрифугирование в соответствующих условиях согласно инструкции фирмы-изготовителя. Большинство бактерий осаждаются при центрифугировании в течение 10—15 мин при 10 000 g. Некоторые центрифужные системы имеют специальное приспособление, ограничивающее вибрацию ротора при его вращении с малыми скоростями (при остановке). Если такое приспособление отсутствует, не исключена опасность взбалтывания осадка.

7. Пробирки вынимают осторожно из ротора и отмечают положение бактериального осадка. Надосадочную жидкость в стерильных условиях декантируют или переносят пипеткой в стерильный сосуд. При этом практически невозможно не вызвать частичного ресуспендирования бактериального осадка. Чтобы бактерии не попадали в сосуд, приходится оставлять часть надосадочной жидкости в пробирке.

8. Каждую пробирку с бактериальным осадком с соблюдением правил асептики заполняют на $\frac{2}{3}$ объема стерильным холодным раствором для промывания. Осадок бактерий суспендируют в этом растворе с помощью миксера типа Vortex. Этапы 4—6 повторяют не менее 4 раз, меняя раствор для промывания.

9. После завершения промывки надосадочную жидкость удаляют с соблюдением правил асептики и осадок суспендируют в небольшом количестве стерильной среды. Полученную суспензию используют в дальнейших исследованиях.

Число отмывок при фильтрации или центрифугировании зависит от условий культивирования, объема раствора для промывания и объема сырой биомассы. Если сырая биомасса занимает около $\frac{1}{10}$ объема всей культуральной суспензии, то 4-кратной промывкой объемами раствора, равными исходному объему культуры, удаляется до 99,99% всех растворимых примесей. Несколько промывок нельзя заменить одной, объем которой равнялся бы суммарному объему всех промывок, поскольку каждая последующая промывка снижает уровень примесей почти в 10 раз.

10.5. РАСЧЕТЫ ВЫХОДА БИОМАССЫ

При расчете выхода биомассы исходят из материального баланса устойчивой системы культивирования. Моно определил константу выхода, или экономический коэффициент (Y), следующим образом:

$$Y = \frac{\text{Образованные клетки, г}}{\text{Использованный субстрат, г}}$$

Выход биомассы в расчете на использованный субстрат часто обозначают как $Y_{x/s}$, где в индексе указано отношение соответствующих концентраций. Широко принято использование соотношения масс для выражения выхода клеток на основании потребления углеродного субстрата [10, 42]. Выход можно довольно легко рассчитать, определив продукцию сухой биомассы за определенный период культивирования по отношению к массе использованного в этот же период углеродного субстрата.

Если выход биомассы хотят отнести к потреблению

кислорода или образованию АТР, синтезируемого в процессе роста, то его определяют следующим образом:

$$Y_{x/\text{АТР}} = \frac{\text{Сухой вес клеток, г}}{\text{Образованный АТР, моль}},$$

$$Y_{x/\text{O}_2} = \frac{\text{Сухой вес клеток, г}}{\text{Поглощенный кислород, моль}}$$

При различных условиях и для многих микроорганизмов выход клеток, рассчитанный по отношению к образовавшемуся АТР или поглощенному кислороду, отличается постоянством. Например, в условиях лимитирования энергетическим субстратом и довольно быстрой скорости роста выход клеток составляет примерно 10 ± 2 г сухой биомассы на 1 моль синтезируемого АТР.

Однако выход биомассы в пересчете на 1 моль АТР довольно широко варьирует для разных бактерий, если рост не лимитируется энергетическим субстратом, а скорость роста культуры значительно ниже максимальной. Источники углерода и энергии могут использоваться не только для роста клеток, но и для образования продукта. Кроме того, энергетические субстраты расходуются на поддержание жизнеспособности клеток. Поскольку клетки могут использовать энергетические субстраты для дыхания в отсутствие роста, энергетические затраты на поддержание жизнеспособности бактерий будут вносить свой вклад в потребление этих субстратов без сопутствующего увеличения биомассы. Эндогенный метаболизм практически не оказывает влияния на расчеты выхода клеток, если скорость роста культуры близка к максимальной и энергетический субстрат является лимитирующим питательным компонентом. Однако потребление энергетических субстратов для поддержания жизнеспособности клеток может значительно возрасти при скоростях роста ниже максимальной или в экстремальных биофизических условиях среды. Поскольку надежные расчеты выхода биомассы требуют осторожного и тщательного контроля условий культивирования, лучше всего их проводить для хеостатных систем. Именно в этих условиях лимитирующий рост субстрат и удельная скорость роста μ могут регулироваться.

Расчет общего выхода биомассы на основании данных, полученных в проточной культуре, предполагает,

что концентрации субстрата и клеток находятся в состоянии равновесия. Поэтому легче всего такой расчет провести для культуры, выращиваемой в хемостате. В хемостатной среде скорость роста бактерий лимитируется только одним питательным компонентом. Все остальные питательные компоненты добавляются в избытке. Для составления такой среды следует провести элементный анализ бактерий, которые будут культивироваться в хемостате. В среду добавляют все компоненты клетки, обнаруженные при таком анализе. В конечном счете рост определяется концентрацией лимитирующего питательного компонента. Поскольку концентрация клеток в хемостате регулируется автоматически в соответствии со скоростью добавления к среде лимитирующего питательного компонента, более важно отношение компонентов среды, а не их абсолютные количества. Поэтому для определения общего выхода биомассы среду следует составлять так, чтобы отношение элементов, поставляемых в среду, к элементам, являющимся лимитирующими, было значительно выше, чем отношение, вычисленное на основании данных элементного анализа.

Приводимые ниже расчеты основаны на том, что в отношении концентрации клеток и концентрации субстрата система находится в состоянии равновесия. За этим следят в течение периода времени, достаточного для замены одного объема среды в ферментере. Если условия культивирования начинают изменяться (увеличивается или уменьшается скорость подачи среды в хемостат), то оператор должен иметь достаточно времени для возвращения культуры в состояние равновесия. Этого достигают путем смены не менее четырех объемов жидкости в ферментере. Поскольку проточный ферментер работает по принципу разбавления, ступенчатое или импульсное изменение условий работы ферментера может вызвать отклонения от существующего состояния равновесия. В результате система будет стремиться к новому состоянию равновесия со скоростью, определяемой скоростью разбавления культуры. Иными словами, для завершения перехода культуры к новому равновесному состоянию необходимы четыре цикла. Например, 2-литровый хемостат, в котором скорость поступления и удаления среды равна 0,5 л/ч, работает со скоростью раз-

бавления $F/V = D = 0,25 \text{ ч}^{-1}$. Время, необходимое для четырех обновлений объема среды, рассчитывается путем деления 4 на скорость разбавления. В данном случае объем среды в ферментере будет полностью обновлен 4 раза за 16 ч ($4/0,25 \text{ ч}^{-1}$), т. е. после изменения условий роста проточной культуры и до установления нового равновесия должно пройти не менее 16 ч.

В действительности время, необходимое для достижения нового состояния равновесия, может зависеть от способа изменений условий культивирования. Если такие изменения заключаются, например, в ступенчатом снижении поступления питательных компонентов, то достаточно четырех циклов. Если же эти изменения включают в себя увеличение поступления питательных компонентов в условиях быстрого роста культуры, то для достижения нового равновесия будет необходимо более четырех циклов. В этом случае для быстрорастущих клеток могут понадобиться новые ферменты, осуществляющие метаболизм добавляемых питательных компонентов.

После достижения состояния равновесия при проточном культивировании общий выход биомассы можно определить следующим образом:

$$Y_{x/s} = \frac{(X - X_0)}{(S_0 - S)} \frac{\text{Сухой вес клеток, г}}{\text{Поглощенный субстрат, г}},$$

где X — сухой вес клеток (в граммах) на 1 л вытекаемой из ферментера среды, X_0 — сухой вес клеток (в граммах) на 1 л среды, подаваемой в ферментер (обычно нуль), S — вес субстрата (в граммах) на 1 л вытекаемой среды и S_0 — вес субстрата (в граммах) на 1 л среды, подаваемой в ферментер. Если в ферментер подается стерильная среда, то величина X_0 равна нулю и выход становится равным $Y_{x/s} = X/(S_0 - S)$.

Для определения сухого веса клеток путем количественного фильтрования через предварительно взвешенный мембранный фильтр с размером пор 0,22 мкм пропускают тщательно отмеренный объем культуры из ферментера. Клеточный осадок на фильтре отмывают буфером или дистиллированной водой, чтобы удалить остатки среды. Мембранный фильтр высушивают до постоянного веса в термостате с температурой не выше 105°C.

Чтобы избежать излишнего подсушивания клеток, которое приводит к потере веса, температуру термостата можно снизить. *Предостережение:* многие фильтры после отмывки и высушивания теряют свой вес. Поэтому следует всегда фильтровать и взвешивать несколько проб, а также промывать и взвешивать несколько фильтров в качестве контроля. Более точный метод заключается в центрифугировании и отмывке клеток, как описано выше (разд. 10.4.2). При этом отбирают большие объемы среды, ресуспендируют клетки в небольшом объеме воды, высушивают и взвешивают (разд. 25.2.2).

Общий выход биомассы связан с потребностями в лимитирующих субстратах для поддержания жизнеспособности клеток и их роста, причем субстраты выступают в роли источника энергии согласно следующему уравнению:

$$\frac{1}{Y_{x/s}} = \frac{m}{\mu} + \frac{1}{Y_G},$$

где μ — удельная скорость роста (ч^{-1}), m — удельная скорость потребления субстрата для поддержания жизнеспособности клеток (ч^{-1}), $Y_{x/s}$ — общий выход клеток и Y_G — удельный выход роста. Величины m и Y_G можно определить, построив на миллиметровой бумаге график зависимости $1/Y_{x/s}$ от $1/\mu$ (напомним, что для простой проточной культуры без рециклизации клеток $\mu = D$). Если данная зависимость имеет вид прямой линии, то эта линия пересекает ось ординат в точке $1/Y_G$, а ее наклон соответствует величине m .

Хотя выход биомассы удобно выражать в виде биомассы в пересчете на массу или количество молей использованного субстрата, при этом иногда возможна путаница. Херберт [30] предложил выражать выход биомассы в грамм-атомах углерода выросших клеток в пересчете на грамм-атомы элемента, поглощенного из лимитирующего субстрата. Принятие этого определения поможет стандартизировать приводимые в литературе методы и устранить большую часть неясностей при интерпретации полученных данных. При выражении интенсивности роста в грамм-атомах углерода образованных клеток нет необходимости определять их полный эле-

Таблица 10.5. Термины, используемые при расчетах выхода биомассы

Обозначение <i>a</i>	Определение
$Y_{x/s}, Y_s, Y$	Коэффициент общего выхода биомассы (общий экономический коэффициент), $Y_{x/s}$ равен отношению веса образованных клеток (в граммах) к весу потребленного питательного субстрата (в граммах)
$Y_{x/m}$	Молярный коэффициент выхода; $Y_{x/m}$ равен отношению веса образованных клеток (в граммах) к весу потребленного питательного субстрата (в молях)
$Y_{x/s(\text{MAX})}, Y_{\text{MAX}}$	Теоретический или максимальный коэффициент выхода; Y_{MAX} равен отношению веса образованных клеток (в граммах) к весу потребленного питательного субстрата (в граммах)
Y_G	Удельный коэффициент выхода; Y_G равен отношению веса образованных клеток (в граммах) к весу питательного субстрата (в граммах), потребленного для образования клеток
$Y_{x/O_2}, Y_{O_2}$	Коэффициент общего выхода биомассы Y_{x/O_2} равен отношению веса образованных клеток (в граммах) к весу потребленного кислорода (в молях)
$Y_{x/ATP}, Y_{ATP}$	Коэффициент общего выхода биомассы, $Y_{x/ATP}$ равен отношению веса образованного химического продукта (в граммах) к весу образованного АТР (в молях)
$Y_{p/s}, Y_p$	Коэффициент общего выхода продукта; $Y_{p/s}$ равен отношению веса образованного химического продукта (в граммах) к весу потребленного субстрата (в граммах)
$Y_{p/s}$	Удельный коэффициент выхода продукта; $Y_{p/s}$ равен отношению веса синтезированного продукта (в граммах) к весу образованных клеток (в граммах)
$Y_{p/s(\text{MAX})}, Y_{p(\text{MAX})}$	Теоретический или максимальный коэффициент выхода продукта; $Y_{p/s(\text{MAX})}$ равен отношению веса продукта (в граммах) к весу субстрата, превращенного в продукт (в граммах)

Обозначение ^a	Определение
μ	Удельная скорость роста [отношение веса образованных за 1 ч клеток (в граммах) к общему весу клеток (в граммах)]
m	Коэффициент поддержания [отношение веса потребленного за 1 ч субстрата (в граммах) к общему весу клеток (в граммах)]

^a Символ, обозначенный первым, используется чаще.

ментный состав; достаточно только определить содержание углерода. В табл. 10.5 суммированы термины, используемые при расчетах выхода биомассы.

10.6. ФИРМЫ-ИЗГОТОВИТЕЛИ

1. Aaron Equipment Co., Div. Areco Inc., 9301 W. Bernice St., Schiller Park, IL 60176
2. Air Resources, Inc., 800 E. Northwest Highway, Palatine, IL 60067
3. Alloy Crafts Co., Subsidiary of Lox Equipment Co., RR Box 2C-A, Delphi, IN 46923
4. Artisan Industries, Inc., 73 Pond St., Waltham, MA 02154
5. B. Braun Melsungen AG, P.O.B. 346, D-3508 Melsungen, West Germany
6. Beckman Instruments, Inc., 2500 Harbor Blvd., Fullerton, CA 92634
7. Bellco Glass, Inc., 340 Edrudo Rd., Vineland, NJ 08360
8. Brighton Corp., 11861 Mosteller Rd., Cincinnati, OH 45241
9. Chemapec, Inc., 230-C Crossway Park Dr., Woodbury, NY 11797
10. Chemineer Agitators, P. O. Box 1123, Dayton, OH 45401
11. Cole-Palmer Instrument Co., 7425 N. Oak Park Ave., Chicago, IL 60648
12. Crepaco, Inc., 8303 W. Higgins Rd., Chicago, IL 60631
13. Dollinger Corp., P. O. Box 23200, Rochester, NY 14692
14. Dow Corning Corp., P. O. Box 1767, Midland, MI 48640
15. DuPont Co., Instrument Products, Scientific and Process Div., Concord Plaza, Quillen Bldg., Wilmington, DE 19898
16. Fisher Scientific Co., 711 Forbes Ave., Pittsburgh, PA 15219
17. Gelman Sciences, Inc., 600 S. Wagner Rd., Ann Arbor, MI 48106
18. General Electric Co. (Silicone Products Dept.), Waterford, NY 12188
19. Glitsch Inc., 4900 Singleton Blvd., P. O. Box 226227, Dallas, TX 75266
20. Infrared Industries, Inc., Box 989, Santa Barbara, CA 93102
21. Koch Engineering Co., Inc., 4111 S. 37 St. N, Wichita, KS 67220
22. Leeds and Northrup Co., Sumneytown Pike, North Wales, PA 19454
23. LKB Instruments, Inc., 1221 Parklawn Dr., Rockville, MD 20852
24. The London Co., 811 Sharon Dr., Cleveland, OH 44145

25. Manostat Corp., 519 Eighth Ave., New York, NY 10018
26. L. E. Marubushi, Co., Ltd., Koki Bldg., 8—7 2-Chome, Kaji-cho, Chiyoda, Tokyo, Japan
27. Michigan Dynamics, Division of AMBAC Industries Inc., 32400 Ford Rd., Garden City, MI 48135
28. Millipore Corp., Ashby Rd., Bedford, MA 01730
29. Mine Safety Appliances Co., 600 Penn Center Blvd., Pittsburgh, PA 15235
30. Mixing Equipment Co., Inc., Unit of General Signal, 177 Mt. Read Blvd., Rochester, NY 14603
31. New Brunswick Scientific Co., Inc., 44 Talmadge Rd., P. O. Box 986, Edison, NJ 08811
32. Nuclepore Corp., 7035 Commerce Circle, Pleasanton, CA 94566
33. Perkin-Elmer Corp., Maine Ave., Norwalk, CT 06856
34. Perry Products Corp., Mount Laurel Rd., Hanesport, NJ 08036
35. The Pfaudler Co., The Sybron Corp., 1000 West Ave., Rochester, NY 14603
36. Scientific Products, Division of American Hospital Supply, 1430 Waukegan Rd., McGraw Park, IL 60085
37. Sensorlabs, Division of Instrumentation Laboratories, Inc., 113 Hartwell, Lexington, MA 03173
38. Sharples-Stokes, Division of Pennwalt Corp., 955 Mearens Rd., Warminster, PA 18974
39. Taylor Instrument Co., 95 Ames St., Rochester, NY 14601
40. Trane Thermal Co., 250 Brook Rd., Conshohocken, PA 19428
41. Union Carbide Corp., 270 Park Ave., New York, NY 10017
42. The VirTis Co., Route 208, Gardiner, NY 12525

10.7. ЛИТЕРАТУРА

10.7.1. Общая литература

1. *Aiba S., Humphrey A. E., Millis N. F.* Biochemical engineering, 2nd ed., Academic Press, Inc., New York, 1973. В этой работе даны фундаментальные основы многих представленных в данной главе способов культивирования и сбора клеток.
2. *Bailey J. E., Ollis D. F.* Biochemical engineering fundamentals McGraw-Hill Book Co., New York, 1977. Работа, в которой приведена интересная дискуссия по вопросу кинетики микробного роста. Она доступна микробиологам с незначительной инженерной подготовкой или не имеющим ее вообще.
3. *Holdeman L. V., Cato E. P., Moore W. E. C.* Anaerobe laboratory manual, 4th ed., Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, 1977. Это очень подробное руководство для лабораторного изучения анаэробных бактерий. Многие считают его основным источником лабораторных методик выращивания анаэробов.
4. *Pirt S. J.* Principles of microbe and cell cultivation, John Wiley and Sons, Inc., New York, 1975 [Имеется перевод: Перт С. Основы культивирования микроорганизмов и клеток. — М.: Мир, 1978.]
5. *Seeley H. W., Van Demark P. J.* Microbes in action, 2nd ed., W H Freeman and Co., San Francisco, 1972

10.7.2. Специальная литература

6. *Abbott B. J.* Annu. Rep. Ferm. Proc., **1**, 205—233 (1977).
7. *Abbott B. J.* Annu. Rep. Ferm. Proc., **2**, 91—124 (1978).
8. *Abbott B. J., Laskin A. I., McCoy C. J.* Appl. Microbiol., **28**, 58—63 (1974).
9. *Borkowski J. D., Johnson M. J.* Biotechnol. Bioeng., **9**, 635—639 (1967).
10. *Boyles D. T.* Biotechnol. Bioeng., **20**, 1101—1104 (1978).
11. *Bryant J.* In: J. R. Norris and D. W. Ribbons (eds.), Methods in microbiology, vol. 2, p. 187—203, Academic Press, Inc., New York, 1970.
12. *Cameron J., Godfrey E. I.* Biotechnol., Bioeng., **11**, 967—985 (1969).
13. *Chibata I.* Adv. Appl. Microbiol., **22**, 1—27 (1977).
14. *Collins E. B., Tillion A. W.* J. Dairy Sci., **60**, 387—393 (1976).
15. *Coulman G. A., Stieber R. W., Gerhardt P.* Appl. Environ. Microbiol., **34**, 725—732 (1977).
16. *Dietrich G. G., Watson R. J., Silverman G. J.* Appl. Microbiol., **24**, 561—566 (1972).
17. Difco manual of dehydrated culture media and reagents for microbiological and clinical laboratory procedures, 9th ed., Difco Laboratories, Detroit, Mich., 1953.
18. *Dowell V. R., Hawkins T. M.* Laboratory methods in anaerobic bacteriology. Center for Disease Control Laboratory Manual, US Government Printing Office, Washington, D. C., 1974.
19. *Dunn I. J., Mor M. R.* Biotechnol. Bioeng., **18**, 1805—1822 (1975).
20. *Elsworth R.* Chem. Eng. (London), **258**, 63—71 (1972).
21. *Evans C. G. T., Hervert D., Tempest D. W.* In: J. R. Norris and D. W. Ribbons (eds.), Methods in microbiology, vol. 2, p. 277—327, Academic Press, Inc., New York, 1970.
22. *Evans J. B. J.* Gen. Microbiol., **91**, 188—190 (1975).
23. *Freedman D.* In: J. R. Norris and D. W. Ribbons (eds.), Methods in microbiology, vol. 2, p. 175—185, Academic Press, Inc., New York, 1970.
24. *Gallup D. M., Gerhardt P.* Appl. Microbiol., **11**, 506—512 (1963).
25. *Gerhardt P., Gallup D. M.* J. Bacteriol., **86**, 919—929 (1963).
26. *Gerhardt P., Quarles J. M., Beaman T. C., Belding R. C.* J. Infect. Dis., **135**, 42—50 (1977).
27. *Grant G. A., Han Y. W., Anderson A. W.* Appl. Environ. Microbiol., **35**, 549—553 (1978).
28. *Hall M. J., Ratledge C.* Appl. Environ. Microbiol., **33**, 577—584 (1977).
29. *Harrison D. E. F.* J. Appl. Chem. Biotechnol., **22**, 417—420 (1972).
30. *Herbert D.* In: A. C. R. Dean, D. C. Ellwood, C. G. T. Evans and J. Melling (eds.), Continuous culture 6: applications and new fields, p. 1—30, Ellis Horwood Ltd., Chichester, 1976.
31. *Hishinuma K., Iida Y., Kobayashi K., Ikeda S.* In: G. Terui (ed.), Proceedings of the 4th International Fermentation Symposium, Fermentation Technology Today, p. 155—161, 1972.
32. *Humphrey A. E.* In: J. J. McKetta and W. A. Cunningham (eds.), Encyclopedia of chemical process design, vol. 4, p. 359—394, Marcel Dekker, Inc., New York, 1977.

33. *Khaergaard L.* Biotechnol. Bioeng., **20**, 1691—1694 (1978).
34. *Kubitschek H. E.* Biophys. J., **8**, 792—804 (1968).
35. *Lien H. C., Chem B. J., Creagan C. C.* Biotechnol. Bioeng., **19**, 425—433 (1977).
36. *Linek, Sobotka V. M., Prokop A.* Biotechnol. Bioeng. Symp. **4**, 429—453 (1973).
37. *Lloyd D. L., Edwards J. C., Chagla A. H. J.* Gen. Microbiol., **88**, 153—158 (1975).
38. *Luedeking R.* In: N. Blackebrough (ed.), Biochemical and biological engineering science, vol. 1, p. 181—243, Academic Press, Inc., New York, 1976.
39. *Margaritis A., Zajic J.* Biotechnol. Bioeng., **20**, 939—1001 (1978).
40. *Martin D. F., Kutt E. C., Kim Y. S.* Environ. Lett., **7**, 39—46 (1974).
41. *Melling J.* In: A. Wiseman (ed.), Topics in enzyme and fermentation biotechnology, p. 10—39, Ellis Horwood Ltd. (John Wiley and Sons, Inc., distributors), Chichester, 1976.
42. *Mickelson M. N. J.* Bacteriol., **190**, 96—105 (1971).
43. *Mitchison J. M., Vincent W. S.* Nature (London), **205**, 987—989 (1965).
44. *Monod J.* Recherches sur le croissance des cultures bacteriennes, 2nd ed., Hermann, Paris, 1942.
45. *Monod J.* Annu. Rev. Microbiol., **3**, 371—394 (1949).
46. *Monod J.* Ann. Inst. Pasteur Paris, **79**, 390—410 (1950).
47. *Mulvany J. G.* In: J. R. Norris and D. W. Ribbons (eds.), Methods in microbiology, vol. 1, p. 205—253, Academic Press, Inc., New York, 1969.
48. *Oltmann L. F., Schoenmaker G. S., Reunders W. N. M., Stauthamer A. H.* Biotechnol. Bioeng., **20**, 921—925 (1978).
49. *Poole R. K. J.* Gen. Microbiol., **98**, 177—186 (1977).
50. *Quarles J. M., Belding R. C., Beaman T. C., Gerhardt P.* Infect. Immun., **9**, 550—558 (1974).
51. *Schultz J. S., Gerhardt P.* Bacteriol. Rev., **33**, 1—47 (1969).
52. *Scott D. C., Hancher C. W.* Biotechnol. Bioeng., **18**, 1393—1403 (1976).
53. *Sterne M., Wentzel I. M. J.* Immunol., **65**, 175—183 (1950).
54. *Stieber R. W., Coulman G. A., Gerhardt P.* Appl. Environ. Microbiol., **34**, 733—739 (1977).
55. *Stieber R. W., Gerhardt P.* Appl. Environ. Microbiol., **37**, 487—495 (1979).
56. *Tempest D. W.* In: J. R. Norris and D. W. Ribbons (eds.), Methods in microbiology, vol. 2, p. 259—276, Academic Press, Inc., New York, 1970.
57. *Thomson R. O., Foster W. H.* In: J. R. Norris and D. W. Ribbons (eds.), Methods in microbiology, vol. 2, p. 377—405, Academic Press, Inc., New York, 1970.
58. *Van Suijdam J. C., Kossen N. W. F., Joha A. C.* Biotechnol. Bioeng., **20**, 1695—1709 (1978).
59. *Wang D. I. C., Sinskey A. J.* Adv. Appl. Microbiol., **12**, 121—152 (1970).
60. *Watson T. G. J.* Gen. Microbiol., **59**, 83—89 (1969).
61. *Watson T. G. J.* Appl. Chem. Biotechnol., **22**, 229—243 (1972).

ИЗМЕРЕНИЕ РОСТА

А. Кох

В работе по измерению бактериального роста необходимо пользоваться четким определением роста. Один из главных подходов к определению роста основан на способности микроорганизмов размножаться, т. е. начинать и завершать клеточное деление. Такой подход предполагает возможность контроля увеличивающегося числа дискретных бактериальных частиц. При этом используются два основных типа контроля: микроскопический подсчет частиц в определенном объеме и электронный подсчет частиц, проходящих через соответствующий канал (жиклер).

Поскольку некоторые клетки могут быть мертвыми, вышеуказанное определение роста отличается от определения, основанного на подсчете живых микроорганизмов. Особенно существенно увеличение числа организмов, способных к неограниченному росту. Именно поэтому так важны подсчет колоний и методы наиболее вероятного числа.

Методы подсчета живых клеток применимы только к культурам, разбавленным до такой степени, что в них не происходит взаимодействий между клетками. Например, эти методы в принципе не пригодны для микроорганизмов, которые размножаются половым путем, требующим взаимодействия между мужской и женской особями. Даже при работе с прокариотами для них существует довольно много ограничений.

Обычно бактериологи, биохимики и молекулярные биологи измеряют рост бактерий по синтезу макромолекул и компонентов бактериальной клетки. С их точки зрения, клеточное деление представляет собой существенный, но второстепенный процесс, редко лимитирующий рост, который обычно ограничивается способностью ферментных систем быстро использовать источники питания, необходимые для образования биомассы.

Сбалансированный рост

Несколько подходов к определению роста совпадают лишь в одном случае — при сбалансированном росте [13]. Асинхронная культура достигает сбалансированного роста лишь тогда, когда каждое «экстенсивное свойство» культуры экспоненциально растет во времени. Понятие «экстенсивное свойство» происходит из физической химии и относится к таким свойствам системы, которые увеличиваются тем значительнее, чем их больше в системе. Например, масса и количество клеток в определенном объеме культуры являются ее экстенсивными свойствами, а температура или количество ДНК на клетку таковыми не являются. Приложимость этого физико-химического принципа к бактериологии связана с идеей о том, что если культура растет достаточно долго и при этом незначительно изменяет окружающую среду, то рано или поздно бактерии достигают одинакового сбалансированного со средой состояния независимо от начальных условий их роста. При достижении сбалансированного роста и при условии постоянства среды культура будет оставаться в этом состоянии бесконечно долго (если не изменится в результате мутаций или селекции). Однако это только теория. Практически невозможно измерить все параметры культуры, даже если она поддерживается в состоянии непрерывного разведения. Однако если использовать менее жесткие критерии, то культуры, находящиеся в состоянии сбалансированного роста, изучать довольно просто.

Рассмотрим культуру в состоянии сбалансированного роста. Обозначим какое-нибудь экстенсивное свойство, например биомассу, ДНК, РНК или площадь поверхности клеток в пересчете на миллилитр культуры, буквой X . Скорость увеличения X пропорциональна количеству биомассы, и, следовательно,

$$\frac{dX}{dt} = \lambda X,$$

где λ — коэффициент пропорциональности. После интегрирования и подстановки граничных условий ($X = X_0$, когда $t = 0$) получаем

$$X = X_0 e^{\lambda t}.$$

Иными словами, для каждого вещества увеличение X происходит экспоненциально во времени. Если соотношение между двумя веществами остается постоянным, тот же самый коэффициент пропорциональности следует использовать при любом выборе параметра X . Коэффициент λ называют удельной скоростью роста. Экспоненциальное увеличение в соответствии с одной и той же удельной скоростью роста характерно не только для любого вещества, обозначенного X , но и для любой комбинации веществ или скорости обмена любого вещества. Это позволяет использовать в качестве показателя роста потребление кислорода или образование метаболита.

Такие интенсивные свойства, как λ и отношение концентраций различных субстратов в условиях сбалансированного роста, остаются постоянными. Кроме того, остается постоянным распределение клеток по размерам. При этом в нормальной клетке все внутриклеточные процессы идут с постоянными скоростями, остается также постоянной способность каждой вновь образованной дочерней клетки к образованию колонии (т. е. не изменяется доля нежизнеспособных клеток). Поэтому в данных специфических условиях независимо от способа измерения роста (подсчет частиц, образование колоний или химическое определение клеточных компонентов) получают одинаковую удельную скорость роста, которая не меняется со временем.

В принципе такие «идеальные» условия можно создать лишь при непрерывном культивировании в проточном режиме. Сбалансированный рост достигается за счет роста, ограниченного скоростью добавления питательных компонентов в условиях хемостата, а также за счет неограниченного роста в условиях турбидостата, где культура механически разбавляется для сохранения постоянного количества биомассы в единице объема среды. Сбалансированный рост бактерий получают также при повторяющемся разбавлении периодической культуры [39, 49].

Изменения в клетках при различных скоростях роста

Организмы отвечают на изменения химических и физических условий среды изменением собственного состава

ва. Эти изменения четко продемонстрированы для некоторых энтеробактерий [31, 39], но они характерны вообще для всех прокариот. В принципе благоприятные условия способствуют быстрому росту, который требует более высоких концентраций рибосом и связанных с ними белков. В терминах состава клеток это означает более высокое содержание РНК. Кроме того, при благоприятных условиях роста клетки могут накапливать резервный материал, например гликоген и поли- β -оксимасляную кислоту, а также увеличиваться в размерах. Как предполагают, последнее связано с тем, что клетки в таких условиях не нуждаются в увеличении относительной поверхности, облегчающем использование субстратов в разбавленных средах. Из-за изменений в составе клеток при измерении роста по содержанию клеточных компонентов возможны ошибки. Строго говоря, подобные измерения можно проводить лишь при росте в одной и той же среде и при условии, что сами бактерии не изменяют ее состав.

Несбалансированный рост

В ходе развития стационарных культур, в особенности при разведении таких культур свежей средой, происходят значительные изменения свойств микроорганизмов. Как уже упоминалось, это было продемонстрировано для некоторых энтеробактерий [1, 11], но, вероятно, относится и ко всем прокариотам. В некотором смысле стадии развития стационарной культуры являются артефактом, зависящим от состава среды, а также возраста и состояния клеток инокулята; однако во всех случаях эти стадии существенны при измерениях роста. Феномены, проявляющиеся на различных стадиях развития стационарной культуры, важны в экологических исследованиях, где особую роль играют условия окружающей среды, которые в значительной степени неконтролируемы. Ответ культуры на колебания естественных условий включает в себя также изменения клеточных характеристик [31, 34]. Так, например, при разведении стационарной культуры, растущей в богатой среде, происходит ускорение макромолекулярного синтеза. Вначале синтезируются компоненты системы биосинтеза белка — рибо-

сомные белки и рибосомная РНК. И только после завершения синтеза ряда макромолекул происходит клеточное деление. В этой фазе значительно возрастает средний размер клеток. Когда среда уже не способна поддерживать быстрый рост бактерий, интенсивность клеточных процессов замедляется, что приводит к образованию мелких клеток с недостаточным содержанием РНК. Наконец, часть бактерий гибнет, т. е. происходит уменьшение числа колониеобразующих единиц [16]

Вероятно, большинство исследователей, предполагающих применять приведенные в этом руководстве методы, будут вызывать изменения роста преднамеренно. Такие изменения можно вызвать колебаниями в содержании или недостатком питательных компонентов в среде, добавлением ингибиторов роста (особенно антибиотиков), ионизирующим излучением и другими экстремальными физическими факторами, например высокой или низкой температурой и осмотическим давлением. Поскольку влияние перечисленных факторов на рост может быть довольно сложным, при интерпретации результатов нужно быть очень осторожными.

Источники ошибок

Существуют четыре вида источников ошибок. Первый и наиболее опасный из них заключается в том, что бактерии, которые обычно делятся регулярно, в условиях слабой токсичности способны расти с образованием скоплений и нитей. Второй опасный момент связан с различной степенью жизнеспособности поврежденных бактерий при различных условиях культивирования. Восстановлению жизнеспособности бактерий способствуют процессы репарации, но они протекают лишь в определенных условиях [8]. Третий источник ошибок связан с возможным образованием резистентных форм. Учет бактерий, способных к образованию спор, не составляет проблемы, поскольку известны методы контроля и измерения, позволяющие вносить соответствующие поправки. В том случае, когда споры в растущих спорообразующих культурах не появляются, возможны ошибки при измерении роста. Четвертый источник ошибок имеет отношение к процедурам, с помощью которых

инокулят вводят в новую среду. Результаты зависят от того, как увеличивается при введении концентрация инокулята — постепенно или ступенчато, насколько долго инокулят присутствует в высокой концентрации и как она потом изменяется. Во время угрожающих популяциям изменений среды клеточная концентрация может быть критической. Для защиты от токсического действия факторов среды бактерии имеют индуцибельные или какие-либо другие, пока неизвестные системы. Эффективность защиты зависит от численности микроорганизмов, осуществляющих детоксикацию в результате совместной деятельности. Защиту против медленно проникающих токсичных веществ способен обеспечивать сам по себе быстрый рост клеток.

Все вышеперечисленные взаимоотношения можно проиллюстрировать на примере взаимодействия рифампина с клетками *E. coli* [36]. В достаточной концентрации клетки способны инактивировать рифампин в определенных дозах; после их обработки антибиотиком в постепенно нарастающих концентрациях культуры становятся толерантными к повышенным дозам препарата. Независимо от этого быстро растущие бактерии более устойчивы к антибиотику, чем медленно растущие. Возможно, это объясняется тем, что препарат не успевает эффективно проникать в быстро растущие клетки. Например, если антибиотик добавляется в относительно высокой концентрации, а затем разводится до низкой, то происходит подавление роста в условиях, при которых обычно низкие концентрации не оказывают ингибирующего действия. После того как в результате кратковременной обработки культуры высокими дозами антибиотика рост замедляется, ингибирование остается постоянным, поскольку препарат успевает проникать в клетку и в этих условиях процесс ингибирования вызывается и низкими дозами антибиотика.

Мицелиальный тип роста

Изучать рост микроорганизмов, имеющих мицелий, сложнее, чем рост более «удобных» микроорганизмов, клетки которых бинарно делятся и затем немедленно расходятся. Проблемы и методы изучения роста колоний

уже обсуждались Кэлэмом [12] и Кохом [33], поэтому мы рассмотрим их здесь очень кратко. Фильтровать и взвешивать высушенный или влажный мицелий удобнее, нежели мелкие немиецелиальные клетки. Кроме того, довольно легко регистрировать увеличение размеров мицелиальной колонии. Например, для измерения роста можно использовать очень длинную стеклянную трубку, содержащую слой питательного агара. После инокуляции на одном конце трубки мицелий начинает расти вдоль трубки, и если ее соединить еще с одной, то он может «перерасти» в следующую и т. д. [47] При этом колонии растут в одном измерении, тогда как на поверхности агара они растут в двух измерениях, а во встряхиваемых культурах — в трех.

Скорость увеличения размера колонии в одном, двух или трех измерениях зависит от скорости удлинения концевых гиф, которые иногда растут перпендикулярно поверхности колонии, тогда как использование растущей массой мицелия питательных компонентов зависит от площади поверхности колонии. В случае встряхиваемой культуры на характер роста накладывает отпечаток природа и величина фрагментов инокулята; для крупных фрагментов рост ограничивается уже на ранней стадии за счет медленной диффузии питательных компонентов в мицелиальную массу. Следовательно, основная сложность заключается в том, что мицелиальный тип роста, вероятно, отклоняется от экспоненциального и зависит от геометрии роста и природы инокулята. Во встряхиваемых культурах рост зависит от скорости встряхивания, которая влияет на склонность мицелия распадаться на более мелкие фрагменты.

Клеточная дифференцировка

Процесс превращения клеток энтеробактерий из крупных и богатых РНК форм в мелкие и бедные РНК клетки по достижении стационарной фазы характеризуется рядом свойств, присущих клеточной дифференцировке. Правда, в бактериологии существует много более четких примеров дифференцировки, например превращение палочек в кокки, вегетативных клеток бацилл в эндоспоры, а также образование микроорганизмами экзо-

спор, цист и почек. При определенных обстоятельствах формирование нитевидных клеток можно также рассматривать как процесс дифференцировки. Рассмотренные выше изменения клеток и их возможная обратимость создают потенциальные причины ошибок при измерениях роста микроорганизмов.

Адсорбция на поверхности

Многие бактерии в результате адаптации или мутации могут приобретать высокое сродство к поверхностям, в частности к стеклу (эффект обрастания). Прикрепление микроорганизмов к стенкам сосуда явилось причиной неудач некоторых экспериментов с хеостатными культурами. Именно поэтому при длительных контактах микроорганизмов со стенками сосудов для культивирования следует использовать пластмассу или тефлон [31]. Другие способы уменьшения способности клеток расти на стенках сосудов заключаются в использовании фторуглеродных покрытий или больших объемов культуры в крупных емкостях, а также интенсивного перемешивания и частых пересевов бактерий в новые стеклянные сосуды. Кроме того, эффект обрастания может быть снижен в результате использования детергентов, силиконового покрытия стенок и сред с высокой ионной силой.

В частности, с этой проблемой приходится сталкиваться при разведении культуры для измерений высокочувствительными методами, например для микроскопии или подсчета колоний в чашках. Эта проблема обсуждается также в разделах, посвященных соответствующим методам (разд. 11.1.1, 11.2.1 и 25.1).

Гетерогенное окружение

Измерение роста микроорганизмов в естественных условиях связано с большими трудностями [9]. Как правило, в природных условиях встречаются смешанные культуры, в которых бактерии прикрепляются друг к другу, к частичкам почвы и листьям. В этих случаях рост измеряют четырьмя основными методами. Первый из них заключается в определении фиксации ^{14}C -двуокси углерода растущей биомассой [53]. Второй предус-

матривает идентификацию клеток с реплицирующейся ДНК, меченной ^3H -тимидином, по радиоавтографии [10]. В третьем методе для идентификации микроорганизмов в образцах почвы применяют флуоресцирующие антитела [48]. Наконец, информацию о росте микроорганизмов можно получить с помощью усовершенствованной масс-спектрометрии газов, выделяемых образцами почвы [41]. Подробное обсуждение этих вопросов не входит в задачи настоящего руководства.

Рост бактерий рассматривается также в гл. 10 и в работах [1—7].

11.1. ПРЯМОЙ ПОДСЧЕТ

11.1.1. Подсчет в микроскопе

Подсчет в микроскопе представляет собой широко распространенный быстрый и дешевый метод, оборудование для которого имеется в каждой бактериологической лаборатории. Однако его применение иногда может привести к ошибочным результатам. Возникающие при этом проблемы в значительной степени решены в работе Норриса и Поуэлла [42], но широкое использование подхода этих авторов ограничено требованием специальной техники и оборудования.

Основная трудность прямого микроскопического подсчета связана с воспроизводимостью процесса заполнения камеры жидкостью [42]. В предлагаемом ниже методе толщину жидкости в камере измеряют с помощью хорошего микроскопа, фокусируя объектив на бактериях, находящихся на верхней и нижней поверхностях жидкости. Расстояние между ними измеряют с помощью микрометрической шкалы микроскопа. Горизонтальные размеры между двумя отметками в имеющихся в продаже камерах довольно точны [42], и поэтому здесь не возникает проблем.

Второй трудностью является адсорбция бактерий на поверхности стекла, в частности пипеток. Эту адсорбцию можно снизить, если для разведений вместо воды использовать раствор с высокой ионной силой. Другой способ заключается в использовании раствора формальдегида (нейтрализованного K_2HPO_4) со следами анион-

ного детергента [42]. Преимуществом формальдегида является его способность подавлять рост и подвижность бактерий, а смеси K_2HPO_4 с детергентом — ее способность препятствовать агрегации. Однако детергент даже в очень низких концентрациях может лизировать некоторые микроорганизмы. Адсорбцию клеток можно уменьшить, если использовать пластмассовые сосуды и пластмассовые наконечники пипеток. В описываемой ниже процедуре отбираемые пробы разводят 0,1 н. HCl. Пипеткой с пластмассовым наконечником их быстро переносят в стеклянную счетную камеру, где клетки прикрепляются к поверхностям камеры.

Счетная камера Хауксли (A 70 Helber; Hawksley, Ltd., Lancing, England) лучше камеры Петрова-Хаузера (Arthur H. Thomas Co., Philadelphia, Pa.), поскольку ее оптическая толщина с обычным покровным стеклом достаточно мала, чтобы ее можно было просматривать с масляной иммерсией. Хотя большинство подсчетов проводят в безымерсионных системах, иногда из-за большого числа клеток или из-за их способности образовывать скопления необходимо использовать масляную иммерсию. Камера Хауксли представляет собой пластинку, имеющую круглую выемку глубиной 20 мкм, на дне которой нанесены метки, ограничивающие зону 50×50 мкм.

Основным преимуществом микроскопического метода подсчета является возможность получить дополнительную информацию о размерах и морфологии изучаемого объекта. Наблюдение с масляной иммерсией делает подсчет более утомительным, однако в этом случае лучше различаются индивидуальные клетки. Другие рекомендации можно найти в инструкциях фирм — изготовителей счетных камер, а также в лабораторных пособиях для микробиологов. Обсуждение методов разведения и статистической обработки результатов приведено в разд. 11.5 и в ряде работ [5, 46].

Методика

1. Камеру и покровное стекло промывают водой с небольшим количеством анионного детергента, а затем споласкивают водой и спиртом, промокают и сушат на воздухе.

2. Предварительно определяют концентрацию клеток. Если эта концентрация ниже $3 \cdot 10^8$ клеток в 1 мл, то приступают к следующему этапу. Если она выше, то предварительно разводят клеточную суспензию раствором Норриса — Пауэлла, приготовленным следующим образом. К 1 л воды добавляют 5 мл формалина (40%-ного формальдегида) и доводят рН (можно по индикаторной бумаге) до 7,2—7,4 с помощью твердого Na_2HPO_4 . Количество добавляемого фосфата зависит от содержания в формалине муравьиной кислоты. На кончике шпателя добавляют столько додецилсульфата натрия, сколько необходимо для прекращения быстрого лопания пузырьков, образующихся при продувании воздуха через раствор с помощью пастеровской пипетки.

3. К пробе добавляют равное количество 0,1 н. HCl . Это приводит к гибели бактерий и появлению на их поверхности положительного заряда, благодаря чему они перестают агрегировать, но начинают адсорбироваться на стекле.

4. Немедленно с помощью автоматической пипетки с пластмассовым наконечником (Pipette-man, Eppendorf, Centaur) в камеру Хауксли вносят около 5 мкл суспензии, переворачивают камеру на 1—2 мин, затем возвращают ее в нормальное положение и оставляют на 3—5 мин.

5. Рассматривают содержимое камеры в микроскоп, используя фазово-контрастный объектив (лучше с масляной иммерсией). Большинство клеток прикрепляется к нижней поверхности камеры, часть — к верхней, а остальные свободно движутся в камере (броуновское движение).

6. Фокусируют объектив на клетки, прикрепленные к дну камеры, и отмечают показания на микровинте (у хороших микроскопов шкала микровинта откалибрована в микрометрах). Затем фокусируют объектив на клетки, прикрепленные к верхней поверхности камеры, снимают показания и прибавляют величину диаметра бактерий. Таким способом можно определить толщину камеры, которая обычно равна 20 мкм. В целях освоения метода тщательно измеряют толщину камеры в различных ее участках, чтобы убедиться в том, что она заполнена равномерно.

7. Подсчитывают число клеток в каждом малом квадрате. В оптимальном случае оно должно составлять 5—15. Клетки, расположенные по краям квадрата, учитывают лишь в том случае, если они находятся на верхней или правой стороне. Для подсчета клеток внутри квадрата используют один регистр механического счетчика; второй регистр используют для подсчета количества квадратов. Некоторые исследователи пользуются счетчиком только для подсчета десятков, в уме подсчитывая однозначные числа. Для точного определения подсчитывают не менее 600 клеток, причем это необходимо делать при нескольких заполнениях камеры. Ряд авторов рекомендует вести подсчет при многократном заполнении камеры, с тем чтобы усреднять получаемые при этом результаты. При использовании описываемого здесь метода в этом нет необходимости, поскольку каждый раз измеряется толщина заполненного пространства камеры. Лучше подсчитывать количество клеток в определенных квадратах, например в четырех угловых, и в квадратах, расположенных по диагонали. Это позволяет избежать подсчета одного квадрата дважды, а также усреднить возможный геометрический градиент клеток в камере.

8. Число клеток определяют по следующей формуле:

$$\frac{\text{Общее число подсчитанных клеток} \cdot \text{Фактор разведения} \cdot 4 \cdot 10^8}{\text{Число подсчитанных малых квадратов} \cdot \text{Толщина камеры (мкм)}}$$

Если точно расположить покровное стекло, то объем раствора над малым квадратом равен $50 \cdot 50 \cdot 20 \text{ мкм}^3 = 5 \cdot 10^4 \text{ мкм}^3 = 5 \cdot 10^{-8} \text{ мл}$. Обратная этому числу цифра $2 \cdot 10^7 / \text{мл}$ представляет собой обычный фактор в формуле, предлагаемой в инструкциях фирм — изготовителей камер. Приводимая выше формула уменьшается до этой величины, если толщина камеры равна 20 мкм. Чтобы процедура оказалась успешной, необходимо, чтобы при измерении толщины камеры к каждой поверхности было прикреплено по крайней мере несколько клеток. Удобнее, однако, производить подсчет, когда основная масса клеток прикреплена к одной поверхности. Для завершения счета в малом квадрате следует сфокусировать объектив на свободных клетках, а затем на поверхности раздела, где расположено меньшее число клеток. Подсчитав об-

щее число клеток в квадрате, заново фокусируют объектив на исходной поверхности и затем передвигают камеру.

11.1.2. Электронный подсчет

Счетчик клеток типа Coulter Counter (Coulter Electronics, Hialeah, Fla.), его аналоги, производимые другими фирмами, а также аналогичные приборы, создаваемые в лабораториях, в последние 25 лет оказали значительное влияние на развитие бактериологии. Такие приборы давно и широко используются в клинической гематологии. Они весьма удобны для подсчета клеток простейших и немиелиальных дрожжей, но непригодны для миелиальных организмов. Хотя применение таких счетчиков привело к созданию новых концепций в бактериологии, их использование в случае мелких палочкообразных бактерий крайне затруднительно. При участии физиков и инженеров проводятся исследовательские работы с целью улучшения электронного метода подсчета и повышения его надежности. О реальных трудностях, с которыми столкнулись при использовании метода, свидетельствует, например, тот факт, что исследователи, принимавшие участие в его разработке, больше не пользуются им. В настоящем руководстве мы обсудим лишь принципы метода, основные трудности при работе с ним и пути их преодоления. По остальным вопросам мы отсылаем читателя к опубликованным работам. После этого читатель сам сможет сделать вывод о применимости метода электронного подсчета для решения различных задач в бактериологии.

Принцип электронного подсчета заключается в следующем. Разбавленная бактериальная суспензия подается через очень маленькое отверстие (жиклер), соединяющее две камеры с жидкостью. В каждой камере с помощью электродов измеряется электрическое сопротивление. Несмотря на то что электропроводность среды достаточно велика, размер жиклера настолько мал, что электрическое сопротивление в нем несоизмеримо выше, чем в остальном объеме. Когда частица переносится с жидкостью через жиклер, сопротивление возрастает еще сильнее, поскольку электропроводность бактерий ниже,

чем среды. Эти изменения сопротивления улавливаются с помощью измерительной цепи и превращаются в импульс напряжения или силы тока. Подсчет импульсов в электронной цепи подобен подсчету радиоактивности, причем очень слабые импульсы элиминируются (отсекаются) с помощью дискриминатора. Слишком сильные импульсы могут быть отсечены с помощью второго дискриминатора («верхнего уровня»), если предполагают, что они имеют своим источником частички грязи или другие примеси. В усовершенствованных счетчиках импульсы анализируются по их величине и запоминаются в многоканальном анализаторе. При необходимости эти данные извлекаются из памяти и переносятся на гистограмму, где можно определить число частиц, их среднюю величину и среднеквадратичное отклонение. Все данные рассматриваются в совокупности, и в ходе анализа дискриминируются очень сильные или очень слабые импульсы. Подобные приборы требуют в процессе подсчета принудительной подачи точно измеренных объемов жидкости через жиклер. Обычно это достигается за счет вытеснения жидкости, находящейся в контакте с ртутным столбиком; при этом ток эффективно проходит через ртуть, но не через поступающую среду.

При использовании электронного метода подсчета сталкиваются с тремя важными проблемами. Первая из них заключается в том, что, поскольку некоторые бактерии очень малы (меньше $0,4 \text{ мкм}^3$), импульсы сопротивления, возникающие при их прохождении через жиклер, сравнимы с величиной «шума» (фона), образующегося из-за турбулентности проходящей через жиклер жидкости. Можно установить дискриминирующее устройство, «срезающее» турбулентные шумы, однако при этом не исключена потеря некоторой информации об истинном числе клеток, особенно в случае присутствия только что разделившихся клеток. Другой способ учета турбулентных шумов состоит в измерении «шумов» контрольных (не содержащих клеток) проб и вычитании их из измеряемых импульсов. Однако хорошо известно, что пробы, не содержащие клеток, значительно отличаются друг от друга по импульсам сопротивления. К тому же турбулентность в потоке жидкости устанавливается сама по себе, сохраняется некоторое время, а затем меняется.

Наконец, вероятность общей ошибки возрастает, если контрольные пробы обладают статистически значимыми различиями (разд. 11.5.5). Не возникает проблем лишь при работе с определенными бактериями, растущими на богатой среде, где даже вновь образованная клетка дает импульс больший, чем турбулентный шум, или при работе с крупными бактериями типа *Azotobacter agilis*, клетки которых в несколько раз крупнее клеток *E. coli*.

Вторая проблема заключается в том, что после деления дочерние клетки не всегда в достаточной степени отделяются друг от друга. Эту проблему, а также проблему, связанную с тенденцией к образованию нитевидных клеток, можно исключить, если правильно подобрать микроорганизм и условия его роста. Совершенно очевидно, что выбор *E. coli* для физиологических и генетических исследований в значительной мере был обусловлен низкой способностью клеток этого организма к агрегации, сцеплению дочерних клеток между собой, образованию цепочек и нитей. Для диспергирования агрегатов, отделения разделившихся дочерних клеток и фрагментирования нитей используют интенсивное перемешивание в миксере типа Vortex или мягкую ультразвуковую обработку. Следует, однако, отметить следующее: для доказательства того, что все частицы представляют собой отдельные клетки, а разрушение клеток незначительно, счетчик типа Coulter Counter отнюдь не лучше, чем микроскопия с масляной иммерсией.

Существует также связанная с предыдущей проблема (разд. 11.5.5) совместного прохождения через жиклер более чем одной частицы в течение короткого времени, достаточного для того, чтобы электронное устройство зарегистрировало прохождение более чем одной крупной частицы. Ее можно решить, используя различные разведения суспензии, поскольку, чем больше разведение, тем меньше вероятность совместного прохождения (см. ниже). Особенно важно эту проблему учитывать при изучении распределения клеток по размерам.

Третьей важной проблемой, возникающей при работе с электронными счетчиками, является засорение жиклера. Если увеличить его диаметр, то изменение сопротивления при прохождении частицы составит лишь незначительную часть общего сопротивления. Поэтому для под-

счета мелких палочковидных бактерий типа *E. coli* диаметр жиклера должен быть не больше 12—30 мкм. Видимо, за выбор подходящего жиклера, который позволяет достаточно сильно увеличивать сигнал, приходится расплачиваться повышенным шумом и мириться с возможностью засорения жиклера. Одним из способов борьбы с засорениями является ультрафильтрация всех растворов. Можно также дать отстояться растворам в течение долгого времени в бутылках с сифоном и затем слить растворы, лишенные частиц. Важную роль играет выбор растворителя, не способствующего образованию частиц, например, Кубичек [38] рекомендует использовать 0,1 н. HCl. HCl обладает хорошей летучестью и не выщелачивает из стекла вещества, которые в дальнейшем могут образовывать осадки. Однако на практике проблема засорения решается далеко не просто, причем при использовании модификаций методов, разработанных для точного определения размеров клеток, она усугубляется.

Введение в практику электронного счетчика системы Coulter Counter оказало влияние на изучение роста бактерий, причем главным образом благодаря принципиальной возможности измерять распределение клеток по размерам и в меньшей степени возможности подсчета клеток. На практике крайне сложно точно измерить размер клетки из-за импульсной природы сопротивления, генерируемого проходящей через жиклер частицей. Были предприняты попытки преодолеть эту трудность, используя сравнительно длинные (100 мкм) поры [37]. Хотя при этом снимаются некоторые физические ограничения, с замедлением потока жидкости в длинной поре увеличивается возможность засорения. В другом подходе используется специальное гидродинамическое фокусирование растворов, обеспечивающее движение бактериальных клеток очень близко к центральной оси поры и окружение их жидкостью, не содержащей частиц [50, 52, 55].

Дополнительную информацию об этом методе можно найти в работах [2, 17, 38], а также в инструкциях, прилагаемых к приборам фирмами-изготовителями.

11.2. ПОДСЧЕТ КОЛОНИЙ

По существу бактериология превратилась в экспериментальную науку начиная с того момента, когда Роберт Кох по совету Фанни Хессе впервые в лабораторной практике использовал чашки с агаровой средой. Это позволило не только осуществлять клонирование чистых культур, но также подсчитывать количество колоний, образующихся из отдельных «жизнеспособных клеток». Существует много вариантов этого метода.

1. Метод посева в агар: пробу вносят пипеткой в пустую стерильную чашку Петри, в которую затем вливают расплавленный, но остуженный до температуры 45°C агар; содержимое осторожно перемешивают и дают агару застыть. **2. Метод посева на поверхность агара:** небольшие (0,1 мл) объемы разбавленной культуры вносят пипеткой непосредственно на поверхность затвердевшего агара в чашке Петри и затем клетки распределяют по поверхности с помощью стеклянного или тефлонового шпателя. **3. Метод посева в тонком слое:** разбавленную культуру вносят в пробирки с небольшим объемом (2,5—3,5 мл) расплавленного агара (0,6—0,75%), затем разливают по стерильным чашкам, уже содержащим один слой застывшего агара, и дают застыть верхнему слою. **4. Метод посева в многослойный агар** напоминает предыдущий. Он отличается лишь тем, что на верхний слой засеянного застывшего агара наливают или наносят пипеткой дополнительный слой стерильного агара. Поэтому все колонии развиваются под поверхностным слоем агара. **5. Метод мембранных фильтров:** разбавленную культуру фильтруют через соответствующий предварительно тщательно промытый мембранный фильтр, который затем переносят на питательный агар в чашке или на фильтровальную бумагу, пропитанную концентрированной питательной средой.

Вариантом метода посева в агар является посев на агар (или в агар) во вращающиеся пробирки и микротрубки [44]; при этом мелкие колонии можно рассматривать в микроскоп [45]. Имеются и другие варианты перечисленных выше методов. Использование автоматического подсчета колоний создает дополнительные специфические ограничения при работе этими методами,

однако оно позволяет быстро и без ошибок, свойственных исследователю, просчитывать колонии в чашках Петри.

Ниже описываются два метода. Один из них — это метод посева в чашки на поверхность агара, при котором все выросшие колонии являются поверхностными. Именно на поверхностных колониях изучают характерные изменения в индикаторных агаровых средах. Подповерхностные колонии часто отличаются по цвету от поверхностных, так как они развиваются в других условиях аэрации и, следовательно, характеризуются другой способностью к кислотообразованию и другим окислительно-восстановительным потенциалом. Второй метод — посев в многослойный агар — обладает своими преимуществами: поскольку здесь все колонии развиваются под слоем агара, они невелики, компактны и могут интенсивно окрашиваться. В чашке в данном случае может вырастать значительно больше колоний по сравнению с другими методами, причем вероятность их слияния невелика. Можно проецировать несколько тысяч колоний на чашке и получить достоверные результаты. Поскольку при использовании других методов основная сложность заключается в подсчете нарастающего числа колоний на чашку, совершенно очевидно, что в этом плане данный метод явно следует предпочесть другим. Существует правило, согласно которому оптимальное для подсчета число колоний на чашку лежит в пределах от 30 до 300. Нижний предел устанавливается из соображений статистической достоверности, а верхний — из-за опасности слияния индивидуальных колоний. Указанный 10-кратный диапазон неудобен для многих экспериментов, поскольку в ряде случаев при разведении трудно заранее определить, будет ли число колоний входить в указанный сравнительно узкий диапазон. Дополнительные усилия по приготовлению чашек с многослойным агаром окупаются тем, что вырастающие в этом случае колонии можно считать в широком диапазоне (от 30 до 2000). Вторым важным преимуществом метода является возможность дополнительных манипуляций с составом питательной среды. Первым слоем в чашки Петри можно разлить минимальную среду с агаром и в таком виде хранить их неопределенно долго. Может храниться так-

же подготовленная для посева и разлитая по пробиркам минимальная полужидкая среда с агаром. В агар, используемый для верхнего слоя, можно добавлять необходимые питательные вещества в 10—50-кратном избытке. При необходимости к полужидкому агару добавляют красители или хромогенные субстраты, облегчающие обнаружение колоний.

Попыткам ускорить и автоматизировать измерения роста посвящен ряд статей и книг [2, 23]. Однако эта область только начинает развиваться, и мы ее здесь обсуждать не будем.

Некоторые микроорганизмы обладают высокой чувствительностью к ряду веществ, присутствующих в агаре. По этому вопросу опубликовали прекрасный обзор Мейнелл и Мейнелл [5]. Если под действием этих веществ микроорганизм повреждается, то не исключено, что он нуждается в специальных питательных добавках. Этой проблеме посвящен 26-й симпозиум Общества общей микробиологии [19]. Обычно при проведении эксперимента исследователь должен решать, какие условия культивирования ему использовать — те ли, при которых наблюдается высокое выживание, или те, при которых оно низкое. Появление генетически дефектных организмов порождает свои проблемы, например проблему способности мутантов с поврежденной системой репарации образовывать колонии, поддающиеся счету [14].

Проблемы подсчета клеток в культурах строгих анаэробов обсуждаются в работах [15, 24, 25].

11.2.1. Посев в чашки на поверхность агара

Подходящую агаровую среду разливают в стеклянные или пластмассовые чашки Петри (диаметром 9 см). Из ряда методик заполнения и подсушивания чашек можно рекомендовать следующую.

1. После автоклавирования и добавления термолабильных субстратов (сахаров, красителей, антибиотиков, хромогенных субстратов) закрытую емкость с расплавленным агаром помещают в лоток с горячей (45—50 °C) водопроводной водой. Агар быстро и равномерно охлаждается, достигает температурного плато выше точки застывания агара (обычно для 1 л агара достаточно ин-

кубации в течение 30 мин). При этом образования геля возле стенок емкости не происходит. Такой достаточно охлажденный агар при разливе дает лишь немного конденсата на внутренней поверхности крышек чашек Петри.

2. Агар в чашки Петри заливают возле зажженной бунзеновской горелки. Если на поверхности агара появляются пузыри, пламя горелки немедленно направляют на эти участки, пока пузыри не лопаются. Обычно для чашки с диаметром 9 см достаточно 15—20 мл агара, что соответствует высоте слоя 0,24—0,32 см. Чем толще слой, тем менее контрастно выглядят колонии на агаровом фоне. В тонких слоях агара из-за ограничения некоторых питательных субстратов или локального подсыхания агара могут вырастать мелкие колонии и может уменьшаться их число, особенно в истонченных участках агарового слоя.

3. В зависимости от влажности чашки подсушивают при комнатной температуре 12—24 ч.

4. Чашки хранят при 4°C в закрытых пластмассовых контейнерах неограниченное время.

Посев производят следующим образом.

1. На основании имеющейся информации готовят разведения культуры таким образом, чтобы получить после инкубации 100—200 колоний на чашку. Для подсчетов, однако, можно использовать и чашки в более широком диапазоне числа колоний (30—300). Если колонии мелкие, удастся просчитать до 500 колоний в одной чашке. При работе со стеклянными чашками и пипетками для разведения суспензий бактерий используют растворы, препятствующие адсорбции клеток на стекле, например растворы с высокой ионной силой, с низким рН (4—5) или содержащие немного нетоксичного анионного детергента. Можно также использовать пластмассовые чашки Петри и пластмассовые наконечники на пипетки.

2. Разведения проводят несколькими способами. Традиционно к 1 мл пробы добавляли большие (99 мл) объемы соответствующего стерильного раствора; однако с усовершенствованием техники все чаще стали использовать небольшие объемы, экономя реактивы и время, необходимое для перемешивания. Современные полуав-

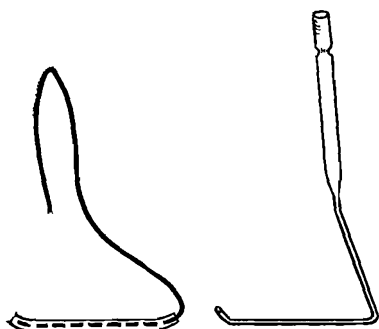


Рис. 11.1. Шпатели Слева: изогнутая скрепка для бумаги, нижняя часть которой помещена в тефлоновую трубку. Справа пастеровская пипетка с оплавленным концом, изогнутая в двух местах. Ручки обоих устройств изгибают, исходя из соображений удобства. Оба шпатели обладают низкой теплоемкостью; левый шпатель благодаря присутствию тефлоновой трубки сорбирует меньше бактерий

томатические пипетки с пластмассовыми наконечниками позволяют работать с очень малыми объемами, однако такие пипетки трудно стерилизовать. Для многих целей можно использовать 0,1-миллилитровую серологическую пипетку и добавлять 0,1 мл культуры к 0,9 или 4,9 мл раствора, которым разводят пробы (в пробирках 13×100 мм), или к 9,9 мл этого раствора (в пробирках 16×150 мм). При оптимальном разведении облегчается перемешивание.

3. 0,1 мл разведенной культуры наносят на поверхность агара в чашке Петри. Для этого 2—3 капли капают на поверхность, а оставшуюся в пипетке жидкость выдувают (в автоматической пипетке нажимают поршень до упора). Это делают быстро, поскольку клетки имеют тенденцию немедленно прикрепляться к твердому субстрату.

4. Шпатели (рис. 11.1) стерилизуют погружением в спирт, удаляют избыток последнего и обжигают в пламени горелки. Шпатель можно изготовить из большой скрепки для бумаг (Giant Gem. Nestling). Скрепку изгибают, как показано на рисунке, надевают на ее конец специальную тефлоновую трубку (№ 16, Small Parts, Inc., Miami, Fla.) и слегка нагревают на огне, чтобы трубка плотно охватила проволоку. Часть скрепки, используемую в качестве ручки, можно изогнуть наиболее удобным образом. По сравнению с толстыми стеклянными палочками такой шпатель обладает низкой теплоемкостью, быстро остывает и значительно более инертен по отношению к бактериальным клеткам. Подобный шпа-

тель можно так же быстро изготовить из пастеровской пипетки.

5. Культуру равномерно распределяют по агару в чашке, стараясь покрыть всю его поверхность вплоть до периферии. Равномерный посев требует определенного опыта. После инкубации проверяют распределение колоний на всех чашках, чтобы убедиться в равномерности посева. Лучшими для оценки равномерности посева являются чашки с наибольшим числом выросших колоний, хотя подсчет колоний в этом случае затруднителен. Если количество колоний, выросших вокруг наносимых на агар капель суспензии, выше, чем на остальной поверхности, то технику распределения следует улучшить. Капли влаги на крышках чашек Петри удаляют интенсивным встряхиванием крышек. Чашки с разлитым в них агаром следует подсушивать до тех пор, пока капля жидкости (0,1 мл), наносимая пипеткой, не поглотится агаром в течение 15—20 с.

6. Перевернутые чашки инкубируют при постоянной температуре в хорошо термостатируемой комнате или камере (разд. 6.3). Лучше использовать закрытые контейнеры, однако их не следует перегружать чашками. Если тем не менее без этого не обойтись, увеличивают время для выравнивания температуры чашек и камеры, что особенно важно при работе с температурочувствительными мутантами. Инкубация в закрытых контейнерах позволяет также избежать токсического воздействия вредных газов, которые могут присутствовать в атмосфере термостатируемых помещений общего назначения (например, паров уксусной кислоты, используемой для обесцвечивания гелей). Непрозрачные контейнеры защищают светочувствительные компоненты сред и красители от инактивации светом. Наконец, в контейнерах среда в чашках не высыхает, и поэтому такие чашки пригодны для наблюдения за медленно развивающимися или поздно появляющимися колониями. Еще одной проблемой является поддержание необходимой концентрации CO_2 , поскольку в CO_2 могут нуждаться даже организмы, выделяемые обычно в отсутствие высоких концентраций этого газа. Эта зависимость особенно наглядно выявляется в случае нанесения на агар отдельных редких клеток из разбавленных суспензий и при инкубации в обыч-

ной лабораторной атмосфере. Хотя эти проблемы возникают далеко не всегда, о них надо помнить.

7. Наблюдение за чашками начинают до того, как колонии разовьются в полной мере. Часто вырастает слишком много колоний. Тогда прибегают к дополнительным разведениям и посевам либо к подсчетам (с помощью лупы) мелких недоразвившихся колоний, опасность слияния которых меньше, нежели в случае крупных развитых колоний.

8. Подсчет колоний следует вести при хорошем освещении, однако соответствующее оборудование далеко не всегда придается к обычным счетчикам колоний. Иногда увеличительные линзы укрепляют в оправе очков или используют лампы с линзами. Счет ведут либо «вручную», отмечая чернилами колонии на дне чашки Петри, либо с помощью электронного счетчика или телевизионного сканирующего устройства. Отдельные колонии на поверхности агара можно отмечать прикосновением к ним специального красящего карандаша. Далеко не все виды таких карандашей способны окрашивать колонии на агаре. Лучше всего использовать окрашивающие карандаши фирмы Eberhard Faber Mongol, причем одни красители (например, French Green № 898) окрашивают колонии лучше, чем другие. Для дифференциального подсчета можно использовать несколько красителей. Некоторые исследователи предпочитают считать единичные колонии в уме, а десятки откладывают на клавишном счетчике. При работе с электронными сканирующими счетчиками особое внимание уделяют тому, чтобы избежать ошибок, источником которых могут служить частички грязи или не видимые невооруженным глазом дефекты в стеклянных или пластмассовых чашках. Для повышения контрастности колоний и уменьшения числа ложнопозитивных случаев в агар вводят красители.

11.2.2. Посев в многослойный агар

1. Готовят чашки Петри с первым слоем агаризованной среды (1,5% агара, толщина слоя около 0,4 см). Как первую, так и последующие среды наливают в чашки, установленные на строго горизонтальной поверхности (с помощью уровня).

Заполняют небольшие (13×100 мм) пробирки 2,5—3 мл 0,7%-ного расплавленного агара. Удобно иметь приготовленные заранее бутылки с агаровой средой, содержащей основные компоненты. Агар в бутылках расплавляют (это можно сделать в микроволновой печи при наличии определенного навыка, следя за тем, чтобы агар бурно не вскипал) и добавляют к нему необходимые питательные компоненты, красители и ингибиторы. Аликвоты готовой горячей среды переносят пипеткой в предварительно прогретые до 45°C серологические пробирки (13×100 мм). Работа с горячей средой снижает вероятность заражения посторонними бактериями. При 45°C агар остается жидким в течение нескольких часов. При 50°C это время еще больше, однако при этой температуре гибнут многие бактерии.

2. Пробы с культурой разводят, как описано выше (разд. 11.2.1).

3. Переносят чашки Петри в комнату с температурой $25\text{--}30^{\circ}\text{C}$.

4. Делают отметку на наружной стороне серологической пробирки и наносят на внутреннюю поверхность пипеткой 0,1 мл разведенной пробы.

5. Расплавленный агар немедленно выливают из пробирки в чашку Петри таким образом, чтобы, вытекая, он смыл приставшие к стеклу клетки на месте внесения пробы. Это позволяет не только перенести все клетки в чашку, но и равномерно перемешать их с агаризованной средой; кроме того, при этом уменьшается адсорбция клеток на стекле.

6. Чашку наклоняют и покачивают, чтобы расплавленный агар, содержащий клетки, равномерно покрыл всю поверхность первого слоя.

7. Чашку помещают на установленный по уровню столик и дают агару застыть.

8. Эту процедуру проводят и с другими чашками, необходимыми в опыте.

9. Добавляют пипеткой или выливают из пробирки 2,5—3 мл 0,7%-ного расплавленного агара на застывшую поверхность и покачиванием равномерно распределяют его. Чашки помещают на установленный по уровню столик и дают застыть третьему слою агара.

10. Чашки можно инкубировать в любом положении,

поскольку при использовании этого метода возможность заражения и высыхания значительно ниже, чем при методе посева в чашках на поверхность агара.

11. Следят за ростом колоний и просчитывают их. Колонии, растущие под поверхностью, более компактны, имеют четко очерченные края и меньший размер по сравнению с обычными поверхностными колониями. Их труднее считать, однако увеличительные стекла или специальные насадки на очки помогают снизить напряжение глаз в процессе счета.

Дополнительные затраты труда, необходимые при посеве в многослойный агар, оправдываются, когда вырастает очень много колоний. Равномерность распределения колоний по чашке определяют визуально. Если распределение действительно равномерно, просчитывают колонии в какой-либо части чашки и затем получают общее их число на чашках перемножением. Использование бинокулярной лупы позволяет избежать трудностей, связанных с подсчетом мелких и близко расположенных колоний, и в ряде случаев «спасти» эксперимент, узким местом которого оказался именно этап подсчета колоний.

11.3. НАИБОЛЕЕ ВЕРОЯТНЫЕ ЧИСЛА

Концентрация живых клеток может быть определена методом наиболее вероятных чисел (НВЧ), заключающимся в математической оценке вероятности присутствия жизнеспособных клеток в серийных разведениях, в которых рост уже не регистрируется.

Готовят несколько параллельных разведений клеток в ростовой среде и после инкубации учитывают пробирки с выраженным бактериальным ростом. Полагают, что в пробирки, в которых отсутствует рост, не было внесено даже одной клетки, способной расти. Поскольку распределение частиц должно подчиняться формуле Пуассона (см. ниже), среднее число клеток в таком разведении можно вычислить по формуле $P_0 = e^{-m}$, где m — среднее, а P_0 — отношение количества пробирок, где отсутствует рост, к общему числу пробирок. Затем среднее умножают на фактор разбавления и на объем инокулята, который дает заметный рост исходной культуры. Метод НВЧ статистически весьма неэффективен, поскольку каждая

пробирка соответствует только небольшой части поверхности чашки Петри. В связи с этим приходится либо использовать много пробирок, либо удовлетвориться весьма приблизительным результатом.

Одним из преимуществ метода НВЧ является возможность его использования в отсутствие способа культивирования бактерий на твердой среде. Второе преимущество заключается в том, что он удобен в случае высокой вариабельности кинетики роста. Предположим, что некоторые клетки из смешанной культуры растут быстро, образуя на агаре крупные колонии, которые, распространяясь по поверхности, маскируют появляющиеся позже мелкие колонии интересующего нас микроорганизма. Хотя количество таких мелких колоний может быть больше, их невозможно учесть на чашках из-за присутствия колоний более подвижных или быстрее растущих бактерий. Третье преимущество метода НВЧ состоит в том, что в присутствии не представляющих интереса организмов и в отсутствие подходящего метода селекции его можно использовать для выявления легко обнаруживаемых продуктов (например, пигментов или антибиотиков), продуцируемых изучаемыми микроорганизмами. В этом случае, несмотря на более выраженный рост контаминирующих микроорганизмов, количество исследуемых бактерий определяют по числу пробирок, где образование характерных продуктов отсутствует. И наконец, метод НВЧ используют в случае, если агар или другие отвердители содержат некоторые факторы (например, тяжелые металлы), которые изменяют достоверность подсчета или взаимодействуют с изучаемыми бактериями.

Подсчет по методу НВЧ помогает ускорить современная лабораторная техника. Существуют, например, специальные устройства для заполнения лунок в пластмассовых пластинах, имеющих до 144 лунок. Для подсчета лунок, в которых рост отсутствует, используют сканирующие устройства, а для заполнения небольших пробирок широко применяются автоматические и полуавтоматические пипетки. Благодаря этому появляется возможность проверять значительно больше культур, чем с помощью классических методов, в которых используют фиксированное число разведений и фиксированное число

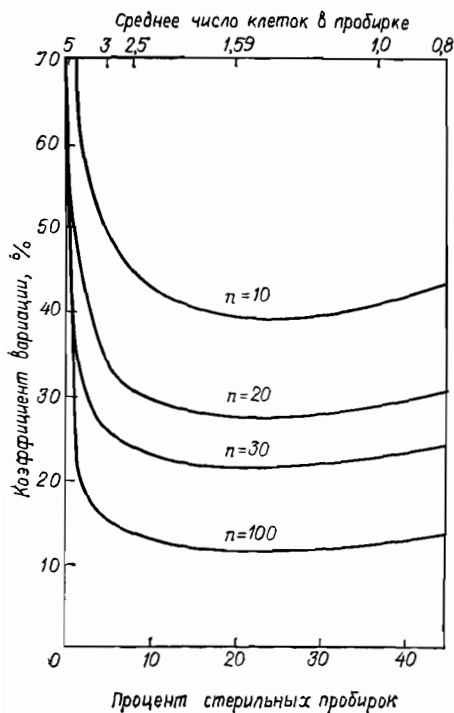


Рис. 11.2. Ошибки (коэффициент вариаций), возникающие при использовании метода наиболее вероятных чисел (НВЧ), как функции относительного числа сохранивших стерильность пробирок (нижняя абсцисса) и среднего числа клеток на одну пробирку (верхняя абсцисса). Соответствующие оптимумы имеют место при числе стерильных пробирок 20,8 и среднем числе клеток 1,59. Пробирки (n) готовят при одном разведении.

пробирок. Все это заставляет отказаться от старых таблиц и приемов вычислений и искать новые подходы к проблеме и новые методы расчета.

Несмотря на статистическую неэффективность, при работе с одним разведением метод НВЧ наиболее точен в том случае, когда среднее число способных неопределенно долго расти бактериальных клеток составляет 1,59 на пробирку [18]. Это соответствует положению, когда 20,8% пробирок остаются стерильными (рис. 11.2). Если предполагаемое число клеток в исходной суспензии известно довольно точно, то все имеющиеся пробирки следует засеять из разведения культуры, соответствующего величине 1,59. Точность быстро падает при отклонении от оптимальной величины, особенно при выходе за пределы интервала 1—2,5 клетки на пробирку. Так,

работа с 10-кратным (по сравнению с оптимальным) разведением не дает никакой информации о среднем числе клеток. Соответственно если предполагаемое число жизнеспособных клеток находится в пределах 5-кратного разведения, то целесообразно использовать все пробирки для получения разведения, предположительно соответствующего 1,59 клетки на пробирку, и исходить при этом из предположения, что истинное число жизнеспособных клеток находится в середине возможного интервала.

Обычно, однако, ориентировочная информация отсутствует, и необходимо готовить ряд разведений, например в 10-кратном или каком-либо ином интервале. В этом случае можно отбросить данные по разведениям, где процент сохранившихся стерильными пробирок лежит вне интервала 8—36 или (если допустим более широкий интервал ошибок) вне интервала 5—50. Ошибку для разведений в пределах интервала можно найти или интерполировать по данным рис. 11.2. Этот метод прост, но требует много времени. Поэтому были предложены статистические приемы, позволяющие объединять данные, полученные с использованием различных разведений и определенным числом пробирок для каждого разведения.

В табл. 11.1 приведены результаты расчетов для определения НВЧ. Они применимы при интерпретации данных, полученных при учете посевов в 10 параллельных пробирок из трех последовательных 10-кратных разведений. Рассмотрев 1000 возможных результатов таких тестов, Халворсон и Зиглер [21] отмечают 210 случаев, когда величины P превышают 0,01% (объяснения и определения терминов см. в сносках к табл. 11.1). Финни [18] подробно рассмотрел статистические аспекты и подходы к определению НВЧ для параллелей в каждом разведении. Он указывает, что в вычислении, связанном с подсчетом ошибок, существуют определенные преимущества, если серия разведений составляет такой интервал, что по крайней мере в одном разведении в каждой пробирке обнаруживается рост, а в следующем разведении в каждой пробирке роста нет. Но даже и в таком случае точные статистические расчеты весьма громоздки.

Таблица 11.1. Вероятности для метода наиболее вероятных чисел [21]^a

Вероятность			Вероятность		
Код	X	P	Код	X	P
10 10 10	100,0	100,0	7 5 1	0,209	0,08
10 10 9	23,0	38,7	7 5 0	0,191	0,16
10 10 8	16,2	30,2	7 4 2	0,208	0,01
10 10 7	12,0	26,2	7 4 1	0,188	0,12
10 10 6	9,18	25,0	7 4 0	0,171	0,68
10 10 5	7,02	24,2	7 3 2	0,188	0,03
10 10 4	5,42	23,4	7 3 1	0,169	0,35
10 10 3	4,28	21,7	7 3 0	0,152	2,44
10 10 2	3,49	17,3	7 2 2	0,167	0,04
10 10 1	2,75	10,2	7 2 1	0,150	0,78
10 7 5	1,95	0,20	6 0 2	0,106	0,04
10 7 4	1,74	0,80	6 0 1	0,092	0,83
10 7 3	1,53	2,57	6 0 0	0,078	9,77
10 7 2	1,33	6,17	5 5 0	0,128	0,04
10 7 1	1,16	10,01	5 4 1	0,127	0,02
10 7 0	1,01	9,33	5 4 0	0,114	0,14
10 6 6	1,75	0,01	5 3 1	0,113	0,08
10 6 5	1,57	0,08	5 3 0	0,100	0,79
10 6 4	1,41	0,11	5 2 2	0,113	0,01
10 6 3	1,25	0,59	5 2 1	0,099	0,28
10 3 0	0,399	17,67	3 3 2	0,086	0,00
10 2 4	0,631	0,01	3 3 1	0,075	0,02
10 2 3	0,534	0,12	3 3 0	0,064	0,23
10 2 2	0,456	0,99	3 2 1	0,064	0,08
10 2 1	0,388	5,30	3 2 0	0,053	1,53
10 2 0	0,329	18,14	3 1 2	0,064	0,01
10 1 3	0,442	0,04	3 1 1	0,053	0,31
10 1 2	0,376	0,60	3 1 0	0,043	7,00
10 1 1	0,317	3,71	3 0 2	0,052	0,02
10 1 0	0,275	15,14	3 0 1	0,042	0,51
9 2 3	0,316	0,03	10 10 0	2,40	3,4
9 2 2	0,284	0,26	10 9 9	6,07	0,01
9 2 1	0,253	2,19	10 9 8	5,26	0,04
9 2 0	0,223	9,53	10 9 7	4,58	0,27
9 1 2	0,249	0,19	10 9 6	3,98	0,85
9 1 1	0,221	1,84	10 9 5	3,46	2,25
9 1 0	0,193	9,03	10 9 4	2,98	4,80
9 0 2	0,217	0,07	10 9 3	2,63	8,57
9 0 1	0,191	0,79	10 9 2	2,28	11,77
9 0 0	0,164	5,02	10 9 1	1,97	11,02

11. ИЗМЕРЕНИЕ РОСТА

Продолжение табл. 1.11

Вероятность			Вероятность		
Код	X	P	Код	X	P
10 6 3	1,25	0,59	5 2 0	0,086	3,36
10 6 2	1,09	2,73	5 1 2	0,099	0,03
10 6 1	0,933	8,42	5 1 1	0,086	0,58
10 6 0	0,792	10,73	5 1 0	0,073	8,28
10 5 5	1,30	0,02	5 0 2	0,085	0,01
10 5 4	1,15	0,14	5 0 1	0,072	0,79
10 5 3	1,02	0,91	5 0 0	0,060	12,10
10 5 2	0,872	3,30	4 5 0	0,106	0,02
10 5 1	0,742	8,94	4 4 0	0,093	0,06
10 5 0	0,622	12,68	4 3 1	0,092	0,03
10 0 2	0,314	0,15	3 0 0	0,032	18,64
10 0 1	0,268	1,44	2 4 0	0,062	0,02
10 0 0	0,231	7,95	2 3 0	0,051	0,11
9 8 0	0,499	0,03	2 2 0	0,041	3,95
9 7 1	0,488	0,02	2 1 1	0,040	0,02
9 7 0	0,435	0,17	2 1 0	0,030	6,01
9 6 2	0,474	0,06	2 0 2	0,040	0,01
9 6 1	0,425	0,23	2 0 1	0,030	0,41
9 6 0	0,381	0,56	2 0 0	0,020	24,13
9 5 2	0,416	0,10	1 3 0	0,038	0,04
8 6 0	0,270	0,11	10 9 0	1,70	5,30
8 5 1	0,267	0,11	10 8 7	3,10	0,01
8 5 0	0,242	0,46	10 8 6	2,78	0,14
8 4 2	0,266	0,04	10 8 5	2,49	0,56
8 4 1	0,240	0,33	10 8 4	2,21	1,64
8 4 0	0,217	1,47	10 8 3	1,96	4,50
8 3 2	0,239	0,08	10 8 2	1,71	8,46
8 3 1	0,214	0,77	10 8 1	1,50	10,83
8 3 0	0,193	3,73	10 8 0	1,30	7,21
8 2 3	0,233	0,01	10 7 6	2,19	0,01
7 2 0	0,133	5,49	10 4 5	1,073	0,01
7 1 2	0,149	0,08	10 4 4	0,943	0,07
7 1 1	0,132	1,10	10 4 3	0,818	0,48
7 1 0	0,116	8,98	10 4 2	0,700	2,26
7 0 2	0,132	0,04	10 4 1	0,589	7,97
7 0 1	0,116	0,80	10 4 0	0,493	14,99
7 0 0	0,101	7,92	10 3 4	0,773	0,02
6 5 0	0,155	0,08	10 3 3	0,662	0,24
6 4 2	0,171	0,00	10 3 2	0,561	1,60
6 4 1	0,155	0,04	10 3 1	0,474	6,93

Продолжение табл. 1.11

Вероятность			Вероятность		
Код	X	P	Код	X	P
9 5 1	0,372	0,86	6 2 1	0,122	0,45
9 5 0	0,334	1,78	6 2 0	0,107	4,12
9 4 3	0,408	0,02	6 1 2	0,121	0,06
9 4 2	0,365	0,22	6 1 1	0,106	0,87
9 4 1	0,324	1,13	6 1 0	0,092	8,73
9 4 0	0,290	3,58			
9 3 3	0,362	0,04	4 3 0	0,080	0,43
9 3 2	0,324	0,26	4 2 1	0,080	0,16
9 3 1	0,288	1,77	4 2 0	0,068	2,16
9 3 0	0,255	6,23	4 1 2	0,080	0,01
			4 1 1	0,068	0,50
8 2 2	0,210	0,14	4 1 0	0,056	7,21
8 2 1	0,188	1,24	4 0 2	0,067	0,02
8 2 0	0,169	7,12	4 0 1	0,056	0,76
8 1 2	0,187	0,11	4 0 0	0,045	14,62
8 1 1	0,166	1,46	3 4 0	0,076	0,04
8 1 0	0,147	9,31			
8 0 2	0,166	0,06	1 2 1	0,038	0,02
8 0 1	0,146	0,88	1 2 0	0,029	0,53
8 0 0	0,128	6,41	1 1 1	0,028	0,12
7 6 0	0,212	0,02	1 1 0	0,019	0,34
			1 0 1	0,019	0,34
6 4 0	0,139	0,32	1 0 0	0,110	34,58
6 3 2	0,153	0,01	0 2 0	0,018	0,21
6 3 1	0,138	0,20	0 1 1	0,018	0,04
6 3 0	0,123	1,35	0 1 0	0,009	3,05
6 2 2	0,137	0,03	0 0 1	0,009	0,26

^a В таблице указано количество бактерий в 1 мл, вычисленное на основании учета числа пробирок, в которых обнаружен рост клеток после инокуляции соответствующими разведениями. В 10 пробирок вносят по 10 мл культуры, в другие 10 пробирок — по 1 мл и еще в 10 пробирок по 0,1 мл. Код отражает количество пробирок, в которых обнаружен рост; первая цифра кода — количество пробирок с наличием роста после инокуляции 10 мл культуры, вторая и третья цифры — то же после инокуляции соответственно 1 мл и 0,1 мл культуры. В колонке X представлено наиболее вероятное число бактерий в 1 мл инокулята. В колонке P приведен процент количества случаев воспроизведения кода при условии неограниченного числа определений с суспензией, содержащей число микроорганизмов, указанное в колонке X.

Примеры. Предположим, что каждым из серии 10-кратных разведений исследуемой культуры инокулируют 10 пробирок с бульоном. Допустим, что после инкубации признаки роста обнаружены в случае девяти пробирок, инокулированных 10^{-7} мл исходной культуры; трех пробирок, инокулированных 10^{-8} мл; 0 пробирок, инокулированных 10^{-9} мл. Код будет представлен цифрами 930. Соответствующее ему по таблице число X составляет 0,255. Это означает, что НВЧ в восьмом разведении исходной культуры составляет 0,255 бактерий в 1 мл, а НВЧ бактерий в исходной суспензии составляет соответственно $0,255 \cdot 10^8 = 25\,500\,000$ бактерий в 1 мл. Если бы такой эксперимент был повторен неограниченно большое число раз с такой же исходной суспензией, результат воспроизводился бы в 6,23% случаев.

Таблица 11.2. Вычисление НВЧ с помощью микрокалькулятора с введенной программой

Общая формула:

$$\Sigma \frac{\alpha_i \rho_i}{1 - e^{-\alpha_i x}} = \Sigma \alpha_i \eta_i$$

Символ	Значения в примере
x — НВЧ	?
α_i — исследуемый объем	10 1,0 0,1
η_i — общее количество определений	10 10 10
$\Sigma \alpha_i \eta_i$	$10 \cdot 10 + 10 \cdot 1 + 10 \cdot 0,1 = 111$ мл
ρ_i — число определений, в которых наблюдается рост	8 5 1
$\alpha_i \rho_i$	80 5 0,1

Численные значения подставляют в формулу:

$$\frac{80}{1 - e^{-10x}} + \frac{5}{1 - e^{-x}} + \frac{0,1}{1 - e^{-0,1x}} = 111 \text{ мл} = \text{Общий исследованный объем.}$$

Программируемый калькулятор переводят в режим прибавления $\frac{Y}{1 - e^{-X}}$ к регистру, где Y и X — содержимое ячеек рабочей памяти.

Программа для калькулятора Hewlett-Packard, модель 33E, имеет следующий вид 32, 15-1, 1, 41, 32, 71, 51, 13—00. Чтобы начать работу, нужно нажать клавишу R/S.

Выбрать значение x (например, 0,3) Очистить регистры.

Набрать 80, ввести 3,0, нажать клавишу R/S.

Набрать 5, ввести 0,3, нажать клавишу R/S.

Набрать 0,1, ввести 0,03, нажать клавишу R/S.

Записать результат 106,87 и очистить регистры.

Выбрать новую величину x , скажем 0,25.

Набрать 80, ввести 2,5, нажать клавишу R/S.

Набрать 5, ввести 0,25, нажать клавишу R/S.

Набрать 0,1, ввести 0,025, нажать клавишу R/S.

Записать результат 113,81 и сравнить его с первым.

Полученные результаты находятся по обе стороны от значения 111 мл, соответствующего исследуемому объему, поэтому проводят интерполяцию или находят промежуточную величину, стараясь отыскать такое значение x , которое дает для суммы указанных трех слагаемых значение 111 мл. В любом случае получают $x=0,27$, что соответствует значению, приведенному в табл. 11.1

С помощью современных калькуляторов, в которые вводятся программы, можно, не прибегая к помощи таблиц, определить НВЧ для любых вариантов наборов параллельных пробирок и разведений (табл. 11.2). Этот метод хорош и для стандартных серий разведений,

подобных приведенным в табл. 11.1, когда получают наборы цифр (кодов), не представленных в опубликованных таблицах.

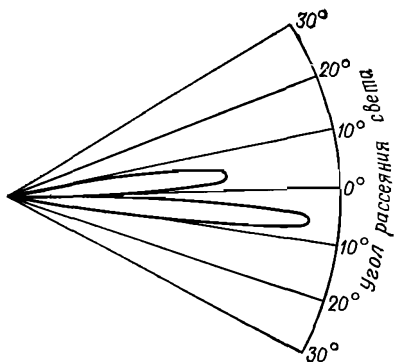
В случае инокуляции 10 пробирок в каждом из трех последовательных 10-кратных разведений, несмотря на суммарное число пробирок 30, точность расчета ниже, чем в случае использования всех 30 пробирок для учета роста в одном разведении и оценки результатов с помощью кривой $n_d=30$ на рис. 11.2. В первом случае точность примерно соответствует линии $n=20$ на том же рисунке.

11.4. СВЕТОРАССЕЯНИЕ

Методы, основанные на измерении светорассеяния, широко используются для изучения роста чистых культур. Они очень эффективны и часто бывают полезны, но иногда при их использовании можно получить ошибочные результаты. Основными преимуществами методов являются быстрота и то, что при их применении клетки сохраняются в интактном состоянии. С помощью методов светорассеяния можно получить информацию о содержании макромолекул, что обычно не представляет первоочередного интереса для бактериолога, но с их помощью нельзя определить число клеток. Физические и математические основы светорассеяния сложны, однако и при упрощенном рассмотрении этого явления можно получить ответы на большинство интересующих микробиолога вопросов.

Метод основан на принципе Гюйгенса. Электромагнитное излучение взаимодействует с электронными зарядами в любом веществе. Если энергия света не может быть поглощена, то квант света той же самой энергии (цвета) должен быть отражен. Этот свет распространяется во всех направлениях, т. е. все атомы в физическом теле служат вторичными источниками света. Те фотоны, которые движутся в исходном направлении, остаются в фазе, но те, которые движутся в других направлениях, с точки зрения наблюдателя, отличаются по фазе от световой волны, идущей непосредственно от источника света. В зависимости от расстояния и направления фотон, испускаемый атомом, отличается по фазе от фо-

Рис. 11.3. Светорассеяние случайно ориентированных бактерий. Показано угловое распределение света, рассеиваемого при прохождении пучка слева направо через суспензию клеток, которые по размерам и физическим свойствам сходны с *E. coli*, выросшими в минимальной среде. Нижний пучок соответствует распределению света для сферических клеток, верхний — для эллипсоидных клеток с отношением осей 4 : 1.



тонов, испускаемых другими точками физического тела. Свет, проходящий через вещество, замедляется вследствие этих взаимодействий пропорционально показателю преломления.

Описанные явления определяют закон отклонения и фокусировку света в больших телах, таких, как призма, линза, дождевая капля или оконное стекло. В последнем случае свет, рассеиваемый во всех направлениях, кроме прямого, взаимно компенсируется. Остается идущий в исходном направлении пучок света, слегка замедленный относительно светового пучка, не проходящего через стекло.

11.4.1. Турбидиметрия

Бактериальные суспензии состоят из частиц, размеры которых лежат в пределах между атомами — с одной стороны и стеклянными линзами — с другой. Основная часть рассеиваемого суспензией света направлена почти (но не полностью) в том же направлении, что и падающий пучок (рис. 11.3). Интенсивность света, рассеиваемого атомом или очень малой частицей, обратно пропорциональна длине волны падающего света в четвертой степени. Поэтому мелкие частицы сильнее рассеивают голубой свет и лучше пропускают красный. Именно по этой причине небо кажется голубым, а дым и многие вирусные суспензии — голубоватыми. В случае оконного стекла свет, идущий в любом направлении, кроме исход-

ного, взаимно компенсируется, и поэтому проходящий свет сохраняет свой исходный оттенок. В случае бактерий рассеянный свет примерно обратно пропорционален второй степени длины волны светового пучка исходного направления [28]. Если небо кажется голубым, а оконное стекло прозрачным, то бактериальная суспензия, подобно облаку, имеет промежуточный цвет и кажется белой, но не прозрачной. Поскольку она выглядит мутной, или непрозрачной, приборы используемые для измерения этого феномена, называют турбидиметрами (от лат. «*turbidus*» — мутный).

В бактериологии для измерения мутности широко принято использовать любой колориметр или спектрофотометр. В этих приборах измеряется первичный пучок света, который проходит через пробу и, не отклоняясь, попадает на фотоэлемент (рис. 11.4, А). Обычно при этом сравнивается интенсивность света, проходящего через суспензию клеток и через среду без клеток. В идеальном фотометре пучок света должен быть очень узким, так чтобы фотоэлемента достигал свет, рассеиваемый только в прямом направлении, т. е. прибор должен иметь хорошо коллимированную оптику. Такой фотометр дает значительно большие величины поглощения, чем обычные приборы с плохо коллимированной оптикой, у которых значительная часть света, рассеиваемого суспензией, попадает на фотоумножитель (рис. 11.4, Б). Поэтому их измерительная система реагирует таким образом, как будто света рассеивается меньше, чем в действительности.

Чем больше бактерий на пути света, тем ниже интенсивность света, проходящего через пробу. При низком уровне мутности это явление описывается простой геометрической зависимостью, поскольку интенсивность нерассеиваемого света убывает экспоненциально с увеличением числа бактерий. Геометрическую зависимость между мутностью суспензии бактерий и их количеством можно вывести, если рассмотреть суспензию, которая в 10 раз (по сравнению с исходной) снижает интенсивность проходящего света.

Предположим, что имеются две одинаковые суспензии в двух кюветах, расположенных таким образом, что свет последовательно проходит через обе кюветы. На-

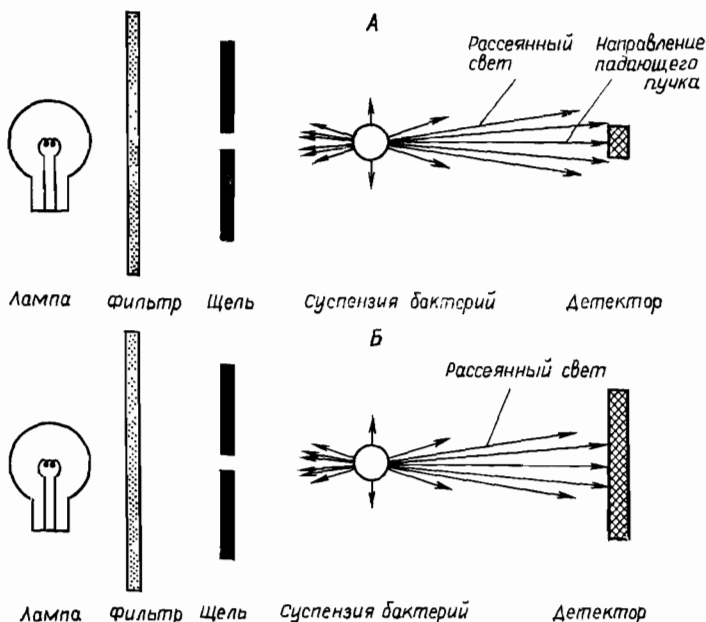


Рис. 11.4. Схематическое изображение колориметра с фильтрами. А. Колориметр с узким пучком: практически весь отклоняющийся от прямого направления рассеянный свет не попадает на фотодетектор. Б. Колориметр с широким пучком: часть отклоняющегося от прямого направления рассеянного света попадает на фотодетектор, из-за чего снижается чувствительность измерений.

сколько снизится интенсивность света после прохождения через две кюветы? Интенсивность света будет равна $0,1 \cdot 0,1$, т. е. $0,01$ интенсивности исходного пучка. В идеальном случае такое же соотношение будет справедливо для одной кюветы с удвоенной концентрацией бактерий. Математически эта закономерность формулируется так: интенсивность нерассеиваемого света (I) равна интенсивности падающего света (I_0), умноженной на $10^{-W/W_{10}}$, где W_{10} — концентрация суспензии, которая в 10 раз снижает интенсивность проходящего света:

$$I = I_0 \cdot 10^{-W/W_{10}}.$$

Так, при $W = W_{10}$ $I = 0,1I_0$, а при удвоении концентрации бактерий $I = 0,01I_0$.

После логарифмирования обеих частей равенства имеем

$$-\lg I/I_0 = \lg I_0/I = W/W_{10}.$$

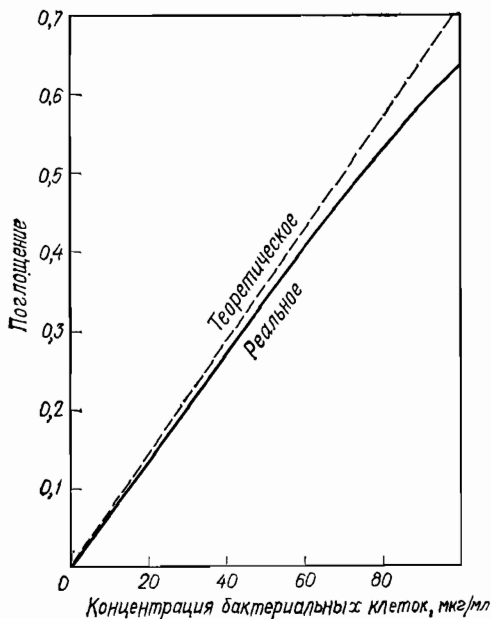
Сходная зависимость (закон Ламберта — Бэра; разд. 16.1.1) справедлива для поглощения света окрашенными пробами. Ее можно вывести аналогичным путем. Большинство приборов для определения мутности имеет шкалу, градуированную в $\lg(I_0/I)$ [эта величина называется поглощением (адсорбцией, A) или оптической плотностью (OD)]. Термин «оптическая плотность» раньше был распространен (его используют как для мутных, так и для светопоглощающих растворов), но мы будем пользоваться более новым термином — «поглощение». В идеальном случае в соответствии с вышеприведенным уравнением график зависимости величины A бактериальной культуры от числа клеток имеет вид прямой линии, проходящей через начало координат. Ее можно описать уравнением

$$A = K \cdot W,$$

где K — наклон (равный $1/W_{10}$) и $A = \lg I_0/I$. Как показано на рис. 11.5, истинное поглощение увеличивается меньше, чем предсказывает формула (см. также разд. 16.1.1), так как свет, рассеивающийся от одной бактерии, попадает на другую и вновь рассеивается таким образом, что возвращается в фотоумножитель. Кроме того, в результате взаимодействия бактерий благодаря броуновскому движению они распределяются более равномерно и меньше рассеивают проходящий пучок света (подобно оконному стеклу).

Приведенные рассуждения позволяют сделать некоторые практические выводы, касающиеся измерения мутности суспензий. Теоретические [28, 29] и экспериментальные [20, 28, 30, 31] исследования свидетельствуют о том, что разбавленные суспензии большинства бактерий независимо от размера клеток характеризуются почти одинаковым поглощением на единицу сухого веса. Однако в пересчете на частицу или на колониеобразующую единицу величины поглощения зависят от размера клеток. Было предложено следующее приближенное правило: поглощение прямо пропорционально величине сухого ве-

Рис. 11.5. Поглощение (при 420 нм) как функция концентрации бактериальных клеток. Штриховая линия — теоретическая кривая. Сплошная линия — экспериментальная кривая, полученная с пятнадцатью разведениями бактериальной культуры (концентрации клеток измеряли по сухому весу биомассы). Она построена путем аппроксимации квадратичной кривой, проходящей через нулевую точку.



са [28]. Это правило приложимо к коккам и палочкам и является первым приближением более точного правила, которое гласит, что рассеяние первичного пучка света пропорционально среднему объему клеток в культуре в степени $4/3$. Объекты, которые мельче бактерий (например, вирусы), или бактерии, суспензия которых имеет голубоватый оттенок, плохо подчиняются этим правилам. Более крупные объекты, например дрожжи, нитевидные бактерии и скопления бактерий, суспензии которых выглядят мутными и не обязательно окрашенными, тоже могут не подчиняться рассматриваемому правилу. Там же, где правило приложимо, константа пропорциональности, связывающая измеренное в любом хорошо коллимированном фотометре поглощение с величиной сухого веса, будет одинаковой для разных объектов. У хороших фотометров фотоумножитель находится на значительном расстоянии, и благодаря отличной коллимации детектор в них улавливает только узкий пучок света. Такими свойствами обладают модели

фотометров Zeiss и Cary. Другие фотометры можно оценить по чертежам, конструкциям их оптических систем, а также путем прямого сравнения поглощения в них клеточной суспензии с поглощением в спектрофотометрах Zeiss или Cary.

Если спектрофотометр или размер микроорганизма не удовлетворяет упомянутым критериям, во многих случаях надежные измерения можно проводить с помощью стандартной кривой, построенной на основании абсолютного или относительного поглощения. Сложности возникают только тогда, когда физические или биологические условия сравниваемых образцов варьируют, поскольку в этом случае экспериментатор не всегда уверен, можно ли использовать одну и ту же стандартную кривую.

Все это приложимо только к разбавленным суспензиям. При величинах поглощения выше 0,3 и при длине волны 500 нм или меньше следует принимать во внимание отклонения от закона Ламберта — Бэра (см. пример, приведенный на рис. 11.5). Этот вопрос подробно обсуждается в работе [26]. О таких отклонениях часто забывают, и это очень осложняет анализ микробиологической литературы по турбидиметрии. Одним из способов обойти эту проблему является ограничение плотности культуры или разведение ее до плотности ниже 0,3. Однако фотометрические измерения на этом уровне не точны, а разведение с помощью пипеток может явиться источником дополнительных ошибок. Для измерения малых поглощений крайне важно, чтобы кюветы были тщательно подобраны, очень хорошо промыты и правильно установлены в спектрофотометре. Предпочтительнее проводить измерения при высоких плотностях культуры и затем корректировать их на отклонение от закона Ламберта — Бэра.

Методика

Парадоксально, но при турбидиметрическом определении мутности не существует строго определенной методики. Некоторым исследователям удастся получить надежные результаты с помощью любого доступного прибора. Дорогие спектрофотометры характеризуются

высокой точностью, стабильностью, точной настройкой длины волны и, что самое важное, широким диапазоном измерений поглощения. Это сказывается при измерении слабых поглощений, поскольку такие приборы обладают хорошей электронной стабильностью и повышенной воспроизводимостью положения кювет; сами кюветы имеют тщательно подобранные размеры, а стенки их строго параллельны. Измерение плотных суспензий также лучше проводить на высококачественных приборах, поскольку рассеянный свет при этом очень незначителен. Кроме того, у них имеются устройства для настройки темного тока, что позволяет более точно снимать показания.

Какие фотометры предпочтительнее для измерения мутности: однолучевые или двухлучевые? Проверочный тест заключается в том, что фотоумножитель закрывают шторкой или на пути луча помещают непрозрачный объект, а затем следят за кинетикой уменьшения светопропускания. В простых дешевых приборах наблюдается очень быстрое падение светопропускания, сменяющееся значительно более медленным, которое может продолжаться очень долго. Соответственно после открывания шторки или удаления непрозрачного объекта в таких приборах пропускание вначале происходит очень быстро, а затем наблюдается медленный подъем светопропускания, которое никогда не достигает стабильной величины. Этот дрейф связан с тем, что фотоумножитель «помнит» условия предшествующего освещения. Двухлучевые фотометры с одним умножителем лишены этого недостатка, так как в них один и тот же детектор попеременно измеряет контрольную пробу и опытную. Ошибку при измерениях в однолучевом спектрофотометре можно свести к минимуму, если попеременно освещать контрольные и опытные пробы в течение строго определенного времени.

Существует и вторая причина установления строго определенного времени измерения мутности даже при работе с высококачественным фотометром. Это — зависимость колебаний мутности от способности палочковидных бактерий образовывать скопления. Чем длиннее палочки, тем более выраженной будет их агломерация в свежеперемешанных культурах. При работе с микро-

организмами типа *E. coli* с небольшим отношением длины к диаметру их следует перемешать в кювете, поместить в спектрофотометр, выждать определенное время (например, 45 с) и затем снять показания. Долго выдерживать кювету не рекомендуется, поскольку она нагревается от источника света с образованием конвекционных потоков, вызывающих частичную вертикальную ориентацию палочковидных бактерий. Можно также проводить измерения мутности суспензий, содержащих палочковидные бактерии, в условиях небыстрого протока, где они ориентируются вдоль потока жидкости [22]. Возле стенок кюветы такая ориентация более выражена, чем в центре, из-за более значительного перепада скоростей потока у стенок. Безусловно, этот метод требует калибровки в адекватных условиях с использованием организмов, характеризующихся одинаковыми осевыми отношениями.

Калибровка

Чтобы иметь возможность сравнивать результаты различных исследователей, необходимо провести калибровку спектрофотометра применительно к данной культуре. По причинам, изложенным ниже, не следует регистрировать показатели мутности в единицах поглощения при определенной длине волны. Вместе с тем, если проводят измерения клеток размером от 0,4 до 2 мкм³ на спектрофотометре с узким пучком и допускается пересчет полученных данных на сухой вес, то необходимо использовать факторы пересчета и учитывать отклонения от закона Ламберта — Бэра [30, 32].

Для калибровки готовят концентрированную суспензию микроорганизмов, выросших в соответствующих условиях, и делают серию разведений хорошо перемешанной суспензии. Измерения проводят максимально быстро, чтобы не возникало необходимости специально прекращать рост клеток и чтобы последний не мешал измерениям. Можно также охладить суспензию в ледяной бане и затем выполнить разведения и измерения или же предварительно подавить синтез белка, например с помощью хлорамфеникола. Все это снижает колебания количества биомассы в процессе измерений. В любом

случае по окончании всех необходимых измерений готовят повторную серию последовательных разведений исходной суспензии. Данные первой и последней серий измерений должны совпадать. По мере получения данных их используют для построения рабочего графика, подобного изображенному на рис. 11.5, но в данном случае по оси абсцисс откладывают концентрацию суспензии в пробах (в процентах) относительно концентрации исходной суспензии. Нанося точки рабочего графика, получают представление о форме кривой. После нанесения каждой экспериментальной точки проверяют график, что помогает выявить ошибку наблюдения. Если подозревают, что имеется ошибка, разведения повторяют. В той части кривой, которая наиболее изогнута, делают дополнительные разведения. Повторные разведения позволяют немедленно обнаружить ошибку, тогда как дополнительные промежуточные разведения помогают лучше выявить кривизну графика. Значительных ошибок, обусловленных использованием пипеток, избегают, если исходную суспензию разводят таким образом, чтобы интервалы последующих разведений не были очень широкими и сравнительно большие объемы переносили в мерные сосуды. Получаемый рабочий график позволяет точно определять рост культуры, поскольку для расчета удельных скоростей роста и времени удвоения необходимо знать лишь относительное изменение биомассы во времени. Однако для многих других целей необходимо проводить не относительные, а абсолютные измерения. К тому же экспериментальные данные по измерению биомассы в абсолютных единицах могут быть точно воспроизведены в других лабораториях, и в связи с этим лучше проводить калибровку в абсолютных единицах.

Для калибровки в абсолютных единицах необходимо точно измерить в исходной суспензии некоторые параметры бактериальной биомассы или числа клеток, например сухой вес ([40]; см. также разд. 25.2.2), содержание нуклеиновых кислот (разд. 17.5), белков (разд. 17.6) или общего азота (разд. 17.6.9). Во всех случаях необходимы параллельные пробы и качественный контроль. Для надежного подсчета жизнеспособных клеток используют много независимых разведений, а для

микроскопического подсчета в счетной камере — много независимых заполнений этой камеры. Точность на этом этапе очень важна, так как она определяет судьбу последующего исследования.

С помощью спектрофотометрических данных строят график зависимости величин поглощения от числа клеток или биомассы (как показано на рис. 11.5). При наличии компьютера проводят наилучшую линейную, квадратичную или кубическую аппроксимацию. Имеющиеся в большинстве вычислительных центров программы содержат так называемый F-тест для выбора типа кривой, которая наилучшим образом соответствовала бы данным. Наиболее подходящую аппроксимированную кривую можно затем рассчитать с помощью простых программ на любом компьютере, в том числе микрокалькуляторе.

В нашей лаборатории для таких работ используются спектрофотометры типа Cary или Zeiss с узким пучком света. Проверка ряда других спектрофотометров с суспензиями, содержащими бактерии различных размеров [30], показала, что при величинах клеток в интервале $0,4\text{—}2\text{ мкм}^3$ результаты в пересчете на сухой вес практически одинаковы. Поскольку для всех бактерий можно использовать одну и ту же кривую, ясно, что формулы пересчета приложимы ко всем неокрашенным прокариотам тех же размеров. Если измеряемое поглощение ниже значения 1,1, квадратичная кривая, проходящая через начало координат, адекватно удовлетворяет экспериментальным данным: $A_\lambda = a_\lambda W - b_\lambda W^2$, где W — сухой вес бактерий, a_λ и b_λ — константы, используемые при данной длине волны λ . Эмпирические формулы для двух длин волн выглядят следующим образом

$$A_{420} = 7,114 \cdot 10^{-3} W - 7,702 \cdot 10^{-6} W^2,$$

$$A_{660} = 2,742 \cdot 10^{-3} W - 0,138 \cdot 10^{-6} W^2.$$

С увеличением длины волны коэффициент первого порядка $W(a_\lambda)$ снижается. Этот коэффициент можно вычислить и при других длинах волн, поскольку он обратно пропорционален длине волны во второй степени (точнее, в степени 2,11). Соответственно при других проме-

жуточных длинах волн a_λ можно вычислить из уравнения

$$a_\lambda = 2,439/\lambda^{2,11}.$$

При других длинах волн нет правила для определения b_λ , но Кэйвенагу [26] удалось измерить эту величину при некоторых длинах волн. Эта константа зависит от формы клеток, внутренней гетерогенности суспензии, типа фотометра и т. д. в большей степени, чем a_λ . Фактически при высоких мутностях суспензии квадратичная аппроксимация удовлетворительна лишь частично. Именно поэтому, а также из-за осложнений при фотометрии предпочтительнее работать при значениях поглощения ниже 1. С увеличением длины волны снижается величина b_λ , многократно снижается рассеяние света на детекторе и улучшается линейность.

Для обычных подсчетов величины W можно использовать приведенные выше уравнения, выразив выход в микрограммах сухого веса на миллилитр:

$$W = 461,81 (1 - \sqrt{1 - 0,60881 A_{420}}),$$

$$W = 9929 (1 - \sqrt{1 - 0,07347 A_{660}}).$$

Последнее уравнение с той же точностью можно выразить иначе:

$$W = 364,74 A_{660} + 6,7 A_{660}^2.$$

Все три выражения применимы для значения поглощения меньше 1.

Если бактерии не окрашены, длину волны выбирают на основании следующих соображений. Чем меньше длина волны, тем меньшую мутность способен регистрировать прибор, т. е. при этом он обладает повышенной чувствительностью; следовательно, при малых длинах волн могут измеряться низкие концентрации клеток. И наоборот, для некоторых целей желательна пониженная чувствительность, поскольку иногда представляют интерес плотные суспензии и желательно избегать дополнительного разведения. Более длинные волны предпочитают также использовать в связи с тем, что многие ростовые среды содержат вещества, поглощающие в голубой части видимого спектра, и поэтому кажутся жел-

тыми или коричневыми. В связи с этим лучше проводить измерения при 660 нм, поскольку при этой длине волны контрольные пробы со средой почти не отличаются по поглощению от проб с водой. Использование более длинных волн нежелательно, так как для многих фотометров могут понадобиться дополнительные фотоумножители. При более коротких длинах волн химические изменения, вызываемые бактериями, окисление воздухом или различные режимы автоклавирования могут влиять на интенсивность светопропускания в сложных средах. В любом случае при работе с новой средой необходимо сравнить надосадочную жидкость, полученную после осаждения выросшей культуры, с исходной средой роста и определить, образуются или исчезают в процессе роста бактерий пигменты.

Фотометрию с окрашенными микроорганизмами проводят при определенной длине волны, которую выбирают таким образом, чтобы избежать поглощения в области спектра, соответствующей цвету клеток. Можно также выбрать такую длину волны, при которой поглощение света клеточными пигментами максимально, и затем определить количество биомассы, используя пигмент в качестве индикатора. Сложность в этом случае заключается в том, что содержание пигмента зависит от условий культивирования.

При отсутствии узколучевого спектрофотометра для постоянных каждодневных исследований можно пользоваться вышеприведенной формулой для сухого веса, снимая показания на приборе лишь периодически. Для этого сначала строят калибровочную кривую, измеряя мутность известной суспензии на спектрофотометре, и затем используют приведенные выше формулы.

С одинаковыми по форме и размерам кюветами мутность, измеренная в широколучевом спектрофотометре, меньше, чем измеренная в узколучевом (т. е. широколучевой спектрофотометр характеризуется меньшей чувствительностью). Это осложняет работу, поскольку каждый раз при замене фотоумножителя или источника света возникает необходимость в новой калибровке. В некоторых приборах заметное изменение поглощения происходит даже при замене или удалении держателя для кювет. Поэтому рекомендуется частая настройка таких

приборов по узколучевому спектрофотометру. Например, чувствительность спектрофотометра типа Beckman-DU резко изменяется после помещения в кюветное пространство термостатирующего устройства [30]. Это неудивительно, поскольку за счет такого устройства удлиняется рабочее расстояние, и тем самым этот спектрофотометр по своим параметрам (в том числе чувствительности) становится похож на аналогичный узколучевой прибор.

При работе со спектрофотометрами, в которых используются дифракционные решетки, необходим специальный контроль. Это связано с тем, что по мере старения реплик решетки спектр искажается, в результате чего на фотоумножитель попадает больше рассеянного света.

Колориметр типа Klett-Summerson

Это, пожалуй, один из лучших колориметров, отличающийся невысокой стоимостью, надежностью и стабильностью. Он используется многими исследователями вот уже более 40 лет. Стабильность прибора объясняется тем, что все колебания интенсивности его источника света компенсируются двухлучевой системой. Он имеет простой и не очень чувствительный детектор на CdS, который обеспечивает сигнал, достаточный для регистрации гальванометром. Детектор в этом колориметре отнесен далеко от кювет и поэтому улавливает меньше рассеянного света, чем в других аналогичных приборах.

Калибровка этого прибора отличается от калибровки современных приборов: поглощение в 1 ед. на других приборах соответствует поглощению в 500 ед. на шкале колориметра Klett-Summerson. Показания снимаются настолько медленно, что мутность суспензии палочковидных бактерий становится стабильной ко времени, когда заканчивают подводку шкалы. К этому времени клетки приобретают случайную ориентацию. Следует быть особенно внимательными при снятии показаний со шкалы прибора и подведении шкалы гальванометра к нулю. Чтобы избежать ошибки, связанной с параллаксом, необходимо найти постоянное положение. Основным недостатком этого прибора является отсутствие устрой-

ства для настройки темнового тока. При рассеянии на внутренних поверхностях прибора, при отражении от стеклянных стенок кюветы и т. п. свет может попасть на детектор, минуя содержимое кюветы. Чтобы учесть этот эффект, свойственный другим приборам без настройки темнового тока, кювету заполняют раствором с очень высоким поглощением (0% пропускания). Для колориметра типа Klett-Summerson должно иметь место зашкаливание прибора, т. е. стрелка должна находиться на уровне вертикальной линии, которая образует левую сторону буквы R в слове COPYRIGHT. Частые нарушения калибровки могут приводить к постоянной ошибке, вызывающей дополнительные отклонения от закона Ламберта — Бэра. В этом случае необходимы специальная настройка прибора, ремонт или замена источника света. Частично эту проблему можно разрешить путем повторного нанесения черной краски на внутренние поверхности прибора.

11.4.2. Нефелометрия

Хотя основная часть света рассеивается практически в прямом направлении, для измерения концентрации бактерий используются приборы, в которых светорассеяние измеряется под углом 90° к падающему пучку света. Такие приборы называют нефелометрами. По этому же принципу концентрацию бактерий можно измерить в спектрофлуориметре, установив монохроматоры возбуждения и эмиссии на одну длину волны.

Очень высокая чувствительность нефелометров позволяет измерить крайне низкую концентрацию бактериальных суспензий. На практике основная трудность заключается в возникновении ложных сигналов за счет присутствия в среде примесей; ее можно частично преодолеть предварительной ультрафильтрацией среды. Вторая трудность заключается в необходимости постоянной калибровки прибора при серийных измерениях. В отличие от спектрофотометра для нефелометра или спектрофлуориметра калибровка заключается в установке темнового тока таким образом, чтобы контрольная проба, содержащая только компоненты среды, давала на шкале нуль. Затем шкалу устанавливают на фиксированный

ответ, вызываемый стандартным рассеивающим раствором, т. е. строят стандартную кривую. Поскольку бактериальная суспензия нестабильна, она не подходит в качестве стандарта; эту роль может играть пластинка опалового стекла или суспензия стеклянных бус, используемых для разрушения какого-либо биологического материала. Обычно при калибровке прибора используют запаянную пробирку, содержащую стандарт мутности. Затем строят стандартную кривую, отражающую зависимость между показаниями прибора и концентрацией бактерий в серии разведений. При высоких концентрациях бактерий такая кривая нелинейна.

Хотя существует очень много приборов для измерения рассеянного света и ими широко пользуются уже довольно давно, всем им присущ недостаток, который заключается в том, что от частиц, сравнимых по размерам с бактериями, значительная часть света рассеивается почти в прямом направлении (рис. 11.3). Чтобы зарегистрировать такой рассеянный свет, необходимо иметь возможность ориентировать детектор прибора таким образом, чтобы он улавливал световые пучки, отличающиеся по направлению от пучка падающего света лишь на несколько градусов. Важно также, чтобы детектор не испытывал помех со стороны неотклоняющегося света падающего пучка. Иными словами, необходим очень хорошо коллимированный пучок света. Этому требованию удовлетворяет лазерный луч или пучок света, расходящийся лишь на небольшой угол ($2-12^\circ$), однако из-за очень высокой стоимости приборы, в которых их получают, пока практически недоступны. Измерения при больших углах, помимо информации о количестве клеточного материала, дают также информацию о внутренней структуре клеток и распределении внутриклеточного материала. Если известны факторы, влияющие на светорассеяние, а также тип ориентации в пространстве удлиненных частиц, то светорассеяние при определенных углах может дать информацию о состоянии агрегации цитоплазмы (например, полисомной или моносомной организации рибосом) [6], толщине клеточной оболочки [27, 29, 35, 54] и распределении клеточного содержимого от центра к периферии клетки [27, 54].

Уайт [54] разработал прибор для измерения угловой зависимости сигнала светорассеяния при температурах от 30 до 150 °С. В этом интервале различные организмы, различные воздействия на культуру, а также культуры в различных стадиях развития характеризуются своими особенностями. Этот метод можно использовать для диагностики и для изучения действия лекарственных препаратов. Как уже упоминалось выше, светорассеяние при больших углах малоприспособно для измерения роста бактерий, поскольку оно чувствительно к деталям структур клеток.

Светорассеяние в интервале углов 0—30° меньше зависит от этих трех факторов, но значительно более чувствительно к размеру частиц. С помощью светорассеяния в этом интервале на неповрежденных клетках можно получить информацию о концентрации биомассы, количестве клеток, среднем отношении длины клетки к ее ширине, а также о распределении биомассы вокруг центра бактериальной клетки.

11.5. СТАТИСТИКА И РАСЧЕТЫ

В руководствах по основам микробиологии или в курсе статистики, преподаваемом студентам-микробиологам, некоторые аспекты измерения бактериального роста почти никогда не рассматриваются. В первом случае это связано с перегруженностью основного материала руководств, а во втором — с тем, что подсчет колоний или частиц опирается на событие типа «все или ничего» и поэтому не представляет интереса для большинства лиц, применяющих статистику. Приводимый ниже материал преследует цель сделать используемые в бактериологии математические средства более доступными.

11.5.1. Распределение популяций

Биномиальное распределение описывает вероятности реализации двух противоположных событий. Например, оно позволяет ответить на вопрос: «Какова вероятность иметь 5 мальчиков в семье из 9 человек при условии, что доля рождения мальчиков составляет 0,56 от общего

числа всех родившихся?». Численный ответ будет $P_5=0,2600$, а соответствующая формула имеет вид

$$P_r = \frac{n!}{(n-r)!r!} \cdot p^r (1-p)^{n-r},$$

где p — вероятность наступления благоприятного события при одном испытании, n — общее число испытаний, r — число благоприятных событий, которое может принимать значения от 0 до n . Эта формула показывает, что большинство семей с девятью детьми имеют 5 мальчиков, а не какое-либо другое количество, поскольку $P_4=0,2044$, $P_5=0,2600$ и $P_6=0,2207$. Кривая зависимости P_r от r представляет собой гистограмму распределения. Биномиальное распределение позволяет определить математическое ожидание и среднеквадратичное отклонение p по экспериментальным данным. Если допустить, что данные получены только для одной семьи с 9 детьми и что в этой семье есть случайно 5 мальчиков, то с помощью статистической теории можно показать, что лучшей оценкой величины p является отношение r/n . В нашем примере $p = 5/9 = 0,5556$, а среднеквадратичное отклонение для этой величины будет равно $\sqrt{p(1-p)/n} = \sqrt{(5/9) \times (4/9)/9} = 0,1656$.

Этот результат не очень надежен, поскольку коэффициент вариаций (к.в.) близок к 30% (к.в. = $0,1656 \cdot 100\% / 0,5556 = 29,81\%$). Точность оценки p можно увеличить, используя ту же формулу для семьи со значительно большим числом детей. Однако не только гораздо легче, но и лучше объединить статистические данные для ряда семей. Предположим, что для большого числа семей мальчики составляют 50 000 из 90 000 детей. Следовательно, по той же формуле $p = 0,5556$, но к.в. уже равен 0,2981%. Это более точный подсчет не только благодаря значительно большему числу семей, но и благодаря тому, что разные семьи в силу генетических и социологических причин могут иметь различные величины p . Поэтому предпочтительнее оценивать значение p по отношению ко всей популяции.

Для больших чисел довольно трудно использовать эту формулу для вычислений. Для этого случая формулу биномиального распределения упростил Гаусс. Гауссово распределение используется как обобщение биномиаль-

ного распределения в случае, когда числа настолько велики, что распределение можно рассматривать как непрерывное, а не считать его функцией дискретных переменных. Переменными гауссова распределения, заменяющими n и p , являются среднее популяции, или математическое ожидание (m), и среднеквадратичное отклонение (σ). Формула имеет вид

$$P_x = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma} e^{-(x-m)^2/2\sigma^2}.$$

В этой формуле непрерывная величина (x) заменяет целую положительную переменную (r). Это распределение, подобно биномиальному, можно использовать для оценки двух указанных параметров (m и σ) по имеющимся данным. Гауссово распределение называют также нормальным распределением частично из-за его симметричности относительно среднего.

Для данных, подчиняющихся гауссову распределению, оценкой среднего называют величину $\bar{x} = \Sigma x/n$, а оценкой среднеквадратичного отклонения называют величину s , выражаемую формулой

$$\sqrt{\frac{\Sigma x^2 - (\Sigma x)^2/n}{n-1}}.$$

В этом случае к.в. определяется как $s/\bar{x}$.

Распределение Пуассона представляет собой другое предельное распределение для биномиального. Оно применимо, когда n очень велико, а p очень мало, но произведение $n \cdot p$ конечно. Лучшей оценкой произведения $n \cdot p$ является N , т. е. наблюдаемое число конкретных событий. Распределение Пуассона применимо, например, если мальчики встречаются очень редко (скажем, 1 на 10 000), но семьи очень велики (скажем, 100 000 детей). Тогда средняя семья будет иметь $N=10$ мальчиков при среднеквадратичном отклонении:

$$\begin{aligned} n \sqrt{p(1-p)/n} &= \sqrt{n(N/n)(1-N/n)} = \\ &= \sqrt{10\,000 \cdot (10/10\,000)(1-10/10\,000)} = 3,1621. \end{aligned}$$

Упрощение Пуассона применимо в предположении, что $N/n \ll 1$. Тогда формула для биномиального распределе-

ния упрощается до однопараметрического распределения.

$$P_r = \frac{e^{-m} \cdot m^r}{r!},$$

для которого наилучшей оценкой среднего будет $m=N$, а наилучшей оценкой среднеквадратичного отклонения будет $\sqrt{N}$. Следует обратить внимание на незначительное отличие этой величины от биномиального распределения, поскольку $\sqrt{10}=3,1623$ мало отличается от 3,1621. Отметим, что n и r вновь заменяются другими символами, в данном случае одним символом m . Важным моментом является то, что подсчет числа дискретных объектов не только дает наилучшую оценку среднего значения (т. е. $N=\bar{x} \simeq m$), но также оценку точности этой оценки ($\sqrt{N}=s \simeq \sigma$).

Следовательно, при подсчете объектов не имеет значения, как они подразделяются. С точки зрения статистики Пуассона 2 параллельные чашки с 200 колониями в каждой не лучше и не хуже для счета, чем одна чашка с 400 колониями. В обоих случаях среднеквадратичное отклонение (s) измерения равно $\sqrt{400}=20$, а к.в. равен $\sqrt{400/400}=5\%$. Поэтому для получения наилучшей оценки в группе чашек из одинаковых и различных разведений одной и той же суспензии лучше всего просто сложить количество колоний на всех чашках и разделить его на общий объем исходной суспензии. Среднеквадратичное отклонение составляет квадратный корень из общего количества колоний, поделенного на объем суспензии, внесенной во все чашки.

Для примера рассмотрим две пары чашек, засеянных разведениями 10^{-5} и 10^{-6} и количествами выросших колоний 534 и 580 и 32 и 60 соответственно. Общее количество колоний равно 1206. Если для посева в одну чашку использовали по 0,1 мл разведения, то общий объем исходной культуры составляет $2,2 \cdot 10^{-6}$ мл. Следовательно, наилучшей оценкой концентрации является величина $1206/2,2 \cdot 10^{-6} = 5,46 \cdot 10^8/\text{мл}$, а среднеквадратичное отклонение равно $\sqrt{1206/2,2 \cdot 10^{-6}} = \pm 0,16 \cdot 10^8/\text{мл}$.

В данном случае рассмотрение результатов двух раз-

личных разведений отдельно, а не совместно оправдано тем, что мы хотели избежать больших ошибок. Сравнивая результаты для различных уровней разведения, получают некоторые оценки разброса из-за дополнительного разведения суспензии с помощью пипетки и других источников ошибок, которые не учитываются при расчете ошибки по Пуассону. Если этот разброс представляет интерес, его можно измерить более прямо с помощью независимых разведений одной и той же клеточной суспензии. Допустим, что в каждую из серии 12 чашек внесено по 0,1 мл независимо приготовленных разведений 10^{-5} исходной суспензии; после инкубации в чашках выросли следующие количества колоний: 534, 580, 760, 643, 565, 498, 573, 476, 555, 634, 514, 694. Их сумма равна 7026, а среднеквадратичное отклонение по Пуассону равно $\sqrt{7026} = 83,8$. Среднее этих чисел равно 585, а среднеквадратичное отклонение по Гауссу составляет $\pm 81,2$. Расчет количества бактерий в исходной суспензии и двух оценок ошибки дает

$$\frac{7026}{1,2 \cdot 10^{-5} \text{ мл}} = \frac{585,5}{0,1 \cdot 10^{-5} \text{ мл}} = 5,85 \cdot 10^8 / \text{мл};$$

$$\pm \frac{81,2}{0,1 \cdot 10^{-5} \text{ мл}} = \pm 0,81 \cdot 10^8 / \text{мл} \text{ (ошибка по Гауссу);}$$

$$\pm \frac{83,8}{1,2 \cdot 10^{-5} \text{ мл}} = \pm 0,07 \cdot 10^8 / \text{мл} \text{ (ошибка по Пуассону).}$$

Сравнение этих двух оценок ошибки свидетельствует о том, что значительная ошибка вызвана не случайным отбором проб, а какой-то другой причиной. Следует найти источники ошибки и уменьшить их влияние. До тех пор пока это не сделано, необходимо получить ряд независимых разведений и использовать гауссову статистику, поскольку пуассонова оценка ошибки здесь неприменима.

Рассмотрим этот пример еще раз. Допустим, что была засеяна только одна чашка, скажем первая. В этом случае расчет ошибки может быть сделан только по Пуассону. Тогда количество колоний будет составлять $5,34 \cdot 10^8 \pm 0,23 \cdot 10^8$, а величина реальной ошибки будет в 4 раза ниже. Поэтому не следует полагаться на статистику Пуассона до тех пор, пока ее использование не

будет оправданно для данных условий. Вместо этого можно проводить расчеты для нескольких случаев, измеряя ошибку с помощью статистики Гаусса, как указано выше.

11.5.2. Статистические тесты

Большая часть статистики, изучаемая в элементарных курсах, связана с определением соответствия имеющихся данных гипотезе. Обычно вычисляют вероятность (P) того, что наблюдаемые отклонения от гипотезы случайны. Если величина P мала, то гипотеза может быть еще верна, хотя и маловероятна. Статистические тесты обычно проводятся в предположении, что данные подчиняются гауссову распределению. В бактериологии во многих случаях это предположение следует подвергать сомнению, однако в общем статистические методы, если они применимы, могут быть очень полезны.

Среднеквадратичное отклонение, определенное выше, часто путают со **среднеквадратичной ошибкой**, называемой также **среднеквадратичным отклонением среднего**. Среднеквадратичное отклонение характеризует отклонение индивидуального измерения от среднего многих измерений. Среднеквадратичная ошибка характеризует насколько близко наблюдаемое среднее к истинному значению среднего, которое определяется в предположении бесконечного числа наблюдений.

Единственный тест, упоминаемый ниже, — это t -тест Стьюдента. Он применяется к разности средних двух групп. Разность делят на среднеквадратичную ошибку для объединенных данных и вычисленное значение сравнивают со значениями в таблицах, получая таким образом величину P . Для пользования таблицами необходимо знать количество измерений, а также возможность отклонения от среднего в обе стороны или только в одну. Если величина P очень мала, то гипотезу об идентичности двух популяций можно отвергнуть.

В последние годы был разработан дисперсионный анализ, являющийся ветвью статистики. В настоящее время его можно применять для решения многих проблем; во многих областях он заменяет использовавшиеся ранее более специализированные методы. Сейчас овладе-

ние статистическими методами (там, где они применимы) в бактериологии требует значительно меньших затрат труда, чем раньше.

11.5.3. Распространение ошибок

Точность общей оценки зависит от точности измерений ее составляющих. Так, ошибка по Пуассону при подсчете колоний и ошибка при разведении вносят свой вклад в ошибку при определении концентрации бактерий в исходной неразбавленной суспензии. Как правило, дополнительные ошибки только снижают точность измерений. Даже если ошибки на различных этапах компенсируют друг друга, в среднем они увеличивают общую ошибку. Когда ошибки одного измерения не зависят от ошибок другого, общую ошибку можно вычислить с помощью двух правил для «распространения ошибок».

1. Если две величины (x и y) складываются или вычитаются, то среднеквадратичное отклонение (s) составной величины равно

$$s_{x+y} = s_{x-y} = \sqrt{s_x^2 + s_y^2}.$$

2. Если две величины умножаются или делятся, то коэффициент вариации (к.в.) составной величины равен

$$\text{к.в.}_{x \cdot y} = \text{к.в.}_{x/y} = \sqrt{\text{к.в.}_x^2 + \text{к.в.}_y^2}.$$

В качестве иллюстрации используем второе правило для оценки общей ошибки счета колоний в чашках, засеянных пробами из пяти последовательных 10-кратных разведений. Если разведения проводили в 5 этапов и при одном 10-кратном разведении ошибка, обусловленная использованием пипетки, характеризуется к.в. = 0,02, то общая ошибка для всех 5 этапов разведения будет равна $\sqrt{5} \cdot 0,02$. Этот результат получен повторным использованием второго правила. Его следует объединить с ошибкой по Пуассону. Поскольку наилучшая оценка к.в. для ошибки по Пуассону равна $1/\sqrt{585,5}$, общий к.в. определяют следующим образом:

$$\text{к.в.} = \sqrt{1/585 + 5(0,02)^2} = \sqrt{0,001709 + 0,00200} = 6,1\%.$$

Эта ошибка в 6,1% состоит из ошибок, накапливающихся при использовании пипеток ($\sqrt{5} \cdot 2\% = 4,47\%$), и ошибки по Пуассону, равной $4,1\% = 100/\sqrt{585,5}$. Объединение их по указанному правилу дает меньшую величину, чем их сумма ($4,1 + 4,47 = 8,57\%$), но большую, чем наибольшая ошибка из составляющих.

Из рассмотренного примера следуют два важных экспериментальных вывода. Во-первых, *нет необходимости увеличивать точность одного этапа эксперимента, пока существуют источники других сравнимых по величине ошибок*. Во-вторых, *если операцию необходимо провести много раз, следует подумать о том, как провести ее как можно более точно, и затем не прибегать к статистическим расчетам*. В предыдущем разделе, например, мы пренебрегли ошибкой, обусловленной использованием пипетки, потому что предполагалось, что отбор проб пипеткой был выполнен очень точно. Это имеет смысл делать в том случае, если к.в. данной ошибки меньше половины ошибки по Пуассону. Предположим, что точность каждого отбора пробы пипеткой равна 1% вместо 2%. Тогда общая ошибка, обусловленная использованием пипетки, составляет $\sqrt{5} \cdot 1\% = 2,23\%$, а общий к.в. соответственно равен $\sqrt{4,1\%^2 + 2,23\%^2} = 4,7\%$, т. е. лишь немного больше, чем сама ошибка по Пуассону при подсчете.

Подобные рассуждения используют в тех случаях, когда производят вычитание фоновых величин и величин, характеризующих контрольные пробы, где применимо первое правило распространения ошибок, или после стандартизации прибора и метода, где применимо второе правило. При использовании контрольных измерений ошибки должны быть снижены благодаря многократным измерениям или благодаря более точному измерению по сравнению с опытными данными, так что они не вносят существенного вклада в общую ошибку.

11.5.4. Коэффициент точности

Существует очень мощный общий метод, пригодный для различных экспериментальных условий в диапазоне от крупных природных экосистем и до капли культуры

на сетке, предназначенной для электронной микроскопии.

Метод применим к различным эталонным частицам — бактериям, частичкам ферритина, полистироловым шарикам, abortивно трансдуцированным бактериям, плазмидам, вирусам и т. д. После перемешивания суспензии отбирают пробы и с помощью соответствующего метода определяют отношение числа изучаемых бактерий к числу эталонных частиц. Метод можно проиллюстрировать для случая микроскопических мазков, содержащих эталон (полистироловые бусы) и неизвестное количество клеток изучаемых микроорганизмов. Мазок готовят из известных объемов клеточной суспензии и взвеси бус известной концентрации. Из произведения концентрации бус на отношение количества клеток к количеству эталонных бус определяют концентрацию клеток. В этом случае применимо второе правило распространения ошибок. Если концентрация эталонных частиц в исходном основном растворе заведомо определена без ошибок, то к.в. неизвестных частиц можно определить по формуле

$$\text{к.в.} = \sqrt{1/N_u + 1/N_r},$$

где N_u и N_r — количество неизвестных и эталонных частиц соответственно.

Для минимизации общего числа подсчетов N_u в этой формуле должно быть примерно равно N_r . Тогда к.в. будет примерно в $\sqrt{2} = 1,4$ раза выше, чем в случае, когда подсчитывалось бы бесконечное число эталонных частиц (или неизвестных частиц).

11.5.5. Коррекция на совпадения

Коррекцию на совпадение необходимо проводить в ряде случаев, например при наличии очень большого числа колоний на чашке или клеток в квадрате счетной камеры, а также при высокой радиоактивности, регистрируемой счетчиком. Предположим, что при подсчете числа колоний две клетки, находящиеся ближе чем на расстоянии r , учитываются как одна. Пусть N_t — истинное количество колоний, N_a — результаты счета, а R —

радиус чашки Петри. Рассмотрим единственную клетку. Вероятность того, что другая клетка находится от нее на расстоянии не более r , равна $N_t \pi r^2 / \pi R^2$, или $N_t r^2 / R^2$. Если зарегистрировано N_a колоний, то потеря в счете составит $N_a N_t r^2 / R^2$. Отсюда

$$N_t = N_a + N_a N_t r^2 / R^2 = N_a (1 + c N_t),$$

где $c = r^2 / R^2$. При незначительной коррекции обычно удобно заменять в правой части формулы N_t на N_a . Из этой формулы видно, почему 4-кратное снижение размеров колонии в 16 раз снижает коррекцию несовпадения при таком подсчете. Это является основой описанного выше метода посева в многослойный агар.

11.5.6. Расчеты экспоненциального роста

При постоянных условиях, когда межклеточное взаимодействие мало в течение достаточно длительного времени, ожидается, что рост, измеряемый любым методом, происходит в соответствии с формулой $X = X_0 e^{\lambda t}$. Ее можно переписать в любой из нижеследующих эквивалентных форм:

$$\ln X = \ln X_0 + \lambda t,$$

$$\lg X = \lg X_0 + \lambda t / 2,303,$$

или

$$X = X_0 2^{t/T_2},$$

В последней формуле T_2 — время удвоения, которое можно рассчитать по формуле

$$T = (\ln 2) / \lambda = 0,6931 / \lambda.$$

Кроме λ для обозначения удельной скорости роста (или константы скорости роста) используют многие другие символы, в том числе a , k и μ . Это необходимо знать, поскольку они встречаются в ряде статей без определения. Наибольшая путаница происходит с символом μ , который в литературе используется как для обозначения удельной скорости роста (при проточном культивировании), так и для обозначения числа удвоений культуры в час (в литературе по физиологии клетки). В послед-

нем случае в значение μ входит множитель $\ln 2 = 0,6931$. Чтобы избежать путаницы, удельную скорость роста лучше обозначать символом λ , так как его редко применяют для других целей в микробиологии. Для времени могут использоваться любые единицы, но обычно его выражают в часах. Время удвоения (T_2) выражают как в минутах, так и в часах.

11.5.7. Построение и аппроксимация кривой в случае экспоненциального роста

Существует несколько альтернативных способов аппроксимации данных в модели экспоненциального роста. Все они одинаково надежны, но отличаются между собой степенью точности и количеством извлекаемой из них информации.

Наиболее простой подход заключается в том, что строят график зависимости натуральных логарифмов концентрации клеток (или сухого веса биомассы, или другого измеряемого в процессе роста параметра бактерий) от времени и определяют наклон получаемой прямой. Если шкала времени выражена в часах, то наклон будет выражаться в час^{-1} . Здесь возникают два вопроса. Насколько прямая линия соответствует имеющимся данным? Отражает ли полученная линия всю совокупность данных?

Можно использовать десятичные логарифмы с основанием 10; в этом случае наклон следует умножать на $2,303 = \ln 10$. При использовании логарифмов с основанием 2 (таблицы приведены в работе [5]) наклон умножают на $0,6931 = \ln 2$; последний способ имеет свои преимущества, поскольку величина, обратная наклону, выраженному таким образом, представляет собой время удвоения. Независимо от того, какое используется основание логарифма, на шкалу следует наносить как характеристику, так и мантиссу.

Удобно пользоваться бумагой с полулогарифмической шкалой (Keuffel and Esser Co., № 46-4850). Ось абсцисс (ось X) размечают в часах или сутках на главных делениях, так чтобы на малые деления приходилось четное число минут или часов. На каждом третьем делении по оси ординат (ось Y) откладывают 10 в соответ-

ствующей степени. Единицы шкалы можно умножать на постоянную величину, но нельзя прибавлять или вычитать постоянную из значений логарифмической шкалы. На оси Y отмечают точки, соответствующие количеству биомассы, количеству клеток или другому показателю, характеризующему рост. Для большей наглядности полезно обводить эти точки кружками. При использовании методов светорассеяния следует наносить точки на график сразу же после того, как сделаны измерения. Это часто помогает выяснить, когда были совершены ошибки и какие они — биологические, инструментальные или арифметические. Если ошибка сразу же обнаружена, еще есть возможность заново засеять культуру, или повторно провести измерение, или же снова нанести точку. После того как нанесены все данные, по точкам проводят прямую.

Математический метод, с помощью которого определяют минимальную сумму квадратов расстояний по вертикали от всех точек до прямой, называется способом наименьших квадратов. Аппроксимированную прямую можно провести визуально, мысленно отмерив расстояние от тех нескольких точек, которые дальше всего расположены от предполагаемой прямой линии. Построенная с помощью линейки, такая прямая может быть почти идентична прямой, рассчитанной с помощью способа наименьших квадратов.

На рис. 11.6 показана реальная кривая роста, построенная на глаз, которая совпадает с прямой, построенной с помощью компьютера. Этот пример взят из тщательно выполненного эксперимента с точными данными, полученными в период времени, за который произошло 30-кратное увеличение клеточной массы. Следует отметить, что полученные точки очень близки к прямой, что свидетельствует об отсутствии явной ошибки в процессе эксперимента. Этот пример был выбран с целью показать, что при высокой чувствительности измерений скорости роста получают точные данные.

Имеется много типов полулогарифмической бумаги, которые различаются числом порядков, уместяющихся на оси Y . Чем меньше число порядков, тем больше отдалены точки на этой оси и тем точнее можно построить график. Именно полулогарифмическую бумагу рекомен-

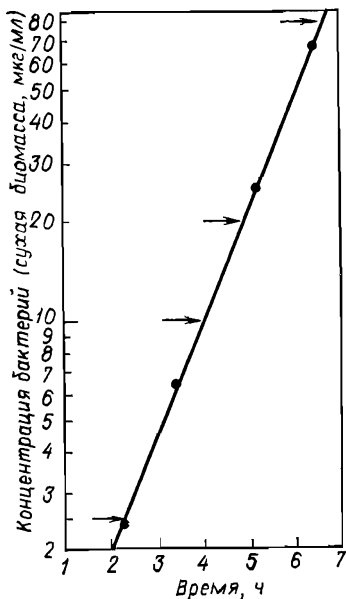


Рис. 11.6. Кривая роста в полулогарифмических координатах. Условия опытов и построения графика даны в тексте. Горизонтальные стрелки указывают на кривой значения концентрации бактерий, соответствующие различным степеням, в которые нужно возвести основание 2. Используя эти значения, легко определить время удвоения.

дуются использовать при работе как с натуральными, так и с десятичными логарифмами, а также с логарифмами, которые имеют основание 2.

График используют для определения времени удвоения, которое является одним из самых важных параметров скорости роста (позднее при желании можно вычислить удельную скорость роста). Время удвоения легко найти, измерив время, за которое концентрация бактерий удваивается. Для этого на графике выбирают точку и снимают показания на оси абсцисс для двух других точек с ординатой вдвое большей или вдвое меньшей, чем ордината выбранной точки. Время удвоения находят, определив разность между значениями абсциссы этих точек и первой выбранной точки. Более точные результаты можно получить, определив время увеличения массы в 4,8 или 2^N раз и затем разделив его на 2,3 или N , что дает время удвоения. После этого можно вычислить удельную скорость роста и другие его параметры.

11.5.8. Аппроксимация по способу наименьших квадратов

Поскольку метод наименьших квадратов является наиболее точным для аппроксимации данных, его следует широко использовать, тем более что стоимость микрокалькуляторов с программами вычисления линейной регрессии невысока. В табл. 11.3 представлены данные для рис. 11.6, обработанные на микрокалькуляторе Hewlett-Packard с использованием способа наименьших квадратов.

Можно использовать любой калькулятор с программами вычисления линейной регрессии, руководствуясь прилагаемыми к нему инструкциями.

Первым этапом является накопление сумм, сумм квадратов и сумм перекрестных произведений. Особое внимание следует обратить на вычисление натурального логарифма числа клеток и использовать его в качестве переменной Y . Время соответствует переменной X . Перед процессом суммирования ($\Sigma +$) на некоторых калькуляторах можно преобразовать часы и минуты в десятичные единицы. Так, если в программу вводят 10,30 ч и под этим подразумевается 10 ч и 30 мин, то они переводятся в десятичные единицы как 10,50, которые затем можно использовать для регрессии. Если эксперимент начали после полудня (или полночи), то ко времени прибавляют 12 ч. Пользуются также лабораторными часами, имеющими деления в минутах и в десятичных долях минут. Измерения обычно проводят каждые полчаса, час или в любом другом интервале времени.

Важно использовать время в качестве переменной X , поскольку формулы, применяемые в линейной регрессии, выведены в предположении, что все ошибки измерения представляют собой ошибки в переменной Y , но не в переменной X . В случае измерения роста время определяют очень точно, при необходимости с точностью до секунды. Тогда основная ошибка будет связана с измерением количества клеток или других показателей биомассы.

Калькулятор дает лучшую оценку отсекаемого отрезка и наклона прямой по формулам, применяемым

Таблица 11.3. Построение модели экспоненциального роста.
Данные получены на субкультуре *E. coli* ML 308, выращенной на среде М9 с 0,2% глюкозы при 28 °С

Фактически		После преобразования	
время, ч мин	A_{420}	время, мин	W , мкг/мл
2:13	0,017	133	2,39
3:23	0,045	203	6,36
3:57	0,071	237	10,09
5:10	0,174	310	25,14
6:23	0,439	383	66,50

Графическое определение

Из рис 11.6 (он представляет собой график, отражающий зависимость между данными в первом и четвертом столбцах) определяют время при любом значении W , а также при двойном значении W (например, при $W=10$ и 20).

Время	W	Разность времен=52 мин, $T_2=52$ мин, и отношение $W_2/W_1=2$.
4 : 00	10	
4 : 52	20	

Можно также определить время при любом значении W и при значении в 2^N раз больше этого значения (например, при $W=2,5$ и для $N=5$ при $W=2,5 \cdot 2^5=80$):

Время	W	Разность времен=4 : 23=263 мин; $T_2 = \frac{263}{5} \approx 52,6$ мин.
2 : 15	2,5	
6 : 38	80	

Расчет на микрокалькуляторе

Для получения регрессии логарифмов данных, приведенных в четвертом столбце, относительно данных, приведенных в третьем столбце, необходимо выполнить следующие операции:

1. Очистить память
2. Набрать 2,39, ln, набрать 133, $\Sigma+$
3. Набрать 6,36, ln, набрать 203, $\Sigma+$
4. Набрать 10,09, ln, набрать 237, $\Sigma+$
5. Набрать 25,14, ln, набрать 310, $\Sigma+$
6. Набрать 66,50, ln, набрать 388, $\Sigma+$
7. Нажать клавишу линейной регрессии Прочсть $\ln W_0 = -0,85456$
8. Нажать клавишу $Y \rightleftharpoons X$. Прочсть $\lambda = +0,01321/\text{мин}$.
9. Эти результаты можно представить в виде $\ln W = -0,85156 + 0,013213t$, или $W = 0,4255e^{+0,013213t}$, когда t выражено в минутах
10. Для того чтобы выразить удельную скорость роста в часах, умножить ее на 60, что дает $\lambda = 0,0793/\text{ч}$.
11. Для выражения результатов в единицах времени удвоения разделить их на $\ln 2$, что дает $T_2 = 52,47$ мин
12. Для определения ошибки (см. текст) $T_2 = 52,47 \pm 0,65$ мин, а k в $= 1,24\%$.

к линейному уравнению $Y = a_0 + a_1 X$:

$$a_0 = \frac{(\sum X^2)(\sum Y) - (\sum X)(\sum XY)}{n(\sum X^2) - (\sum X)^2},$$

$$a_1 = \frac{n(\sum XY) - (\sum X)(\sum Y)}{n(\sum X^2) - (\sum X)^2},$$

где a_0 — оценка величины Y при $X=0$, а a_1 — коэффициент регрессии. Для случая экспоненциального роста величина a_0 равна натуральному логарифму исходной плотности клеток. Эта величина представляет меньший интерес, чем наклон (a_1), который является наилучшей оценкой удельной скорости роста (λ).

Довольно серьезная проблема возникает при обычном использовании линейной регрессии (в ее невзвешенной форме). Чтобы яснее понять это, рассмотрим гипотетическую ситуацию, в которой эта проблема не возникает. Предположим, что рост измеряют по количеству жизнеспособных клеток, а разведения сделаны таким образом, что на каждой чашке вырастает точно 400 колоний. В этом случае к.в. равен $\sqrt{400}/400 = 5\%$, он остается постоянным в течение всего периода роста, хотя в этот период может происходить многократное увеличение числа клеток на единицу объема. Это означает, что каждое значение $\ln N$ определено с точностью до среднеквадратичного отклонения $\ln(1,05) = +0,05$ вверх и $\ln(0,95) = -0,05$ вниз от средней величины и остается постоянным в течение всего эксперимента. Постоянство ошибки в переменной Y — другое основное допущение при выведении формул невзвешенной линейной регрессии по способу наименьших квадратов.

Теперь представим, что рост оценивают по мутности без предварительного разведения проб. При низкой мутности к.в. велик из-за сложностей подбора и поддержания равновесия в контрольной пробе. При поглощении приблизительно 0,4 относительная ошибка сводится к минимуму, тогда как при высоких плотностях чувствительность фотометра снижается, показания становятся менее точно и соответственно растет к.в. Дополнительные ошибки возможны при коррекции отклонений

рассеяния света от закона Ламберта — Бэра в культурах с высокой плотностью и при учете рассеянного света.

В силу этих причин после взятия логарифмов среднеквадратичное отклонение не постоянно, оно снижается до минимума при умеренной плотности культуры, а затем возрастает. Следовательно, данные полученные с культурой, имеющей умеренную плотность, более точны, но они не определяют наклона прямой, построенной по экспериментальным данным, так же как и начальные и конечные ее точки, которые сильно отклоняются от прямой при ее продолжении. Можно решить эту проблему, если внести в используемые данные значения весов. Для этого необходимо тем или иным путем оценить ошибку каждого измерения, что представляет собой трудоемкую экспериментальную и вычислительную задачу. Ошибки будут минимальными, если измерения мутности проводить на прецизионном приборе в очень большом числе точек и быть более осторожными на верхних и нижних участках прямой.

Если данные обрабатываются на компьютере или ручном калькуляторе, вероятность арифметической ошибки мала. Вместе с тем ошибка, сделанная исследователем, более вероятна, и она может легко исказить результаты. Именно поэтому настоятельно рекомендуется строить графики таким образом, чтобы результаты, полученные на компьютере, можно было сравнить и количественно сопоставить с результатами, полученными графически. Можно также вычислить ошибку наклона линейной регрессии:

$$s_{a_1} = s_{\lambda} = \sqrt{\frac{(\sum Y^2 - a_0 \sum Y - a_1 \sum XY) n}{(n-2) (\sum X^2) - (\sum X)^2 / n}}.$$

За исключением $\sum Y^2$, остальные суммы в этой формуле уже встречались в формулах для подсчета a_0 и a_1 . В связи с тем что $\sum Y^2$ необходима для подсчета коэффициентов корреляции среднеквадратичного отклонения значений Y , большинство современных микрокалькуляторов в отличие от старых моделей способны делать все необходимое для расчета ошибки при введении пар данных с помощью клавиши $\Sigma +$. Имея $\sum Y^2$, нетрудно составить программу для ручного калькулятора с целью вы-

числить ошибку наклона. Таким способом была рассчитана ошибка, приведенная в табл. 11.3. Можно также вычислить ошибки отрезка, отсекаемого на оси Y , средние значения X и Y , а также доверительный интервал. Однако самой важной является ошибка удельной скорости роста, и ее вычисление заслуживает особого внимания. Среднеквадратичную ошибку времени удвоения можно рассчитать достаточно точно, предположив, что λ и T_2 (равное $\ln 2/\lambda$) имеют одинаковые к.в. Алгебраическое преобразование показывает, что среднеквадратичное отклонение времени удвоения представляет собой среднеквадратичное отклонение удельной скорости роста, умноженное на $\ln 2$ и деленное на λ^2 :

$$s_{T_2} = \frac{s_\lambda \ln 2}{\lambda^2}.$$

В нашей лаборатории микрокомпьютер был запрограммирован для обработки данных роста и вычисления величин λ и T_2 . Значения к.в., которые также вычисляются на компьютере, оказались чрезвычайно полезными, особенно для обнаружения грубых ошибок, возникающих как за счет повторения ошибок, так и в случае, если исследователь забыл включить аэрацию после отбора пробы. Компьютер играет ту же роль при проведении ростового эксперимента, что и рабочий график на полулогарифмической бумаге, который строится параллельно с проведением эксперимента. Ошибка в коэффициенте регрессии имеет такие же свойства, как и пуассонов $\sqrt{N}$ при оценке ошибки счета. Она свидетельствует о внутренней точности измерения, но не определяет внешние источники вариации.

В настоящее время удельную скорость роста можно измерить в пределах одного эксперимента с точностью, превышающей точность ее измерений в различных экспериментах или в различные дни. Пока неизвестны источники, вызывающие вариации удельной скорости роста, и они представляют собой важное поле исследований в будущем. Эти изменения удельной скорости от эксперимента к эксперименту следует иметь в виду для практических целей при измерении скорости роста и использовании ее для изучения биологии бактерий.

Часто скорость роста измеряют при изучении эффекта какого-либо воздействия, когда необходимо сравнивать рост при воздействии (опыт) и без него (контроль). Такое сравнение требует измерения параллельных проб для контрольных и опытных культур. В этом случае для определения вероятностей того, что опытные пробы не отличаются от контрольных, достаточно стандартного t -теста для удельных скоростей роста тех и других проб. К другим статистическим методам [51] следует прибегать только в том случае, когда различие очевидно и эффект воздействия нужно оценить количественно. Значение s_k заключается в том, что оно позволяет экспериментатору пользоваться меньшим числом параллельных опытных и контрольных проб, если соотношение между наружными и внутренними ошибками измерений уже оценивалось достаточно часто, чтобы внушать доверие. Если при проверке эти ошибки всегда сравнимы, то индивидуальным экспериментам можно придавать большее значение, особенно когда они подтверждаются оценкой ошибки наклона.

В случае вариабельности субкультур точность измерения эффекта воздействия можно увеличить с помощью так называемого «самоконтроля объекта». Сначала определяют скорость роста культуры до воздействия, а затем обрабатывают культуру необходимым веществом и вновь измеряют удельную скорость роста. Это позволяет выделить воздействие как единственную переменную между двумя фазами ростового эксперимента. Параллельно проводят контрольный эксперимент, в котором обработка заведомо неэффективна.

11.5.9. Неэкспоненциальный рост

Если не считать условий турбидостата или хемостата, рост не остается сбалансированным в течение долгого времени. Даже в условиях непрерывного культивирования происходят долговременные изменения, которые вызывают отклонения от сбалансированного состояния. Так что допущение экспоненциальной модели независимо от сложностей и несовершенства выполненных измерений ограничено с точки зрения процесса биологического роста. Поэтому необходимо ограничить область измерений.

Для растущей периодической культуры это означает исключение данных при высокой или низкой плотности или проведение экспериментальных измерений только в ограниченном интервале плотности. Оба этих подхода направлены на получение сбалансированного роста путем ограничения рассмотрения общего процесса. Все подобные подходы сложны, и их выбор нельзя обосновать со статистических позиций. Измерения роста могут быть усовершенствованы до такой степени, что появится возможность оценить постоянство роста. Например, была предпринята попытка с помощью двухлучевого спектрофотометра, соединенного с компьютером, и аэрируемой кюветы с длинным световым путем достичь точности и высокой чувствительности измерений [39]. В этих условиях были выполнены столь многочисленные и точные измерения, что среднеквадратичное отклонение составляет менее 1% удельной скорости роста за период измерения, продолжающийся лишь 200 с. Можно создать определенные условия (очень богатая среда, очень низкая плотность клеток), при которых будет наблюдаться постоянный рост в определенный период времени, но в других условиях скорость роста колеблется в зависимости от предшествующего развития культуры.

11.6. ЛИТЕРАТУРА

11.6.1. Общая литература

1. *Dawson P. S. S. (ed.)*. Microbial growth, Halsted Press, New York, 1974. Сборник статей, в которых главное внимание уделено физиологии бактериального роста.
2. *Gall L. S., Curby W. A.* Instrumental systems for microbiological analysis of body fluids CRC Press, West Palm Beach, Fla., 1979.
3. *Kavenagh F. (ed.)*. Analytical microbiology, vol. 1, 1963 and vol. 2, 1972, Academic Press, Inc., New York.
4. *Meadows P., Pirt S. J. (eds.)*. Microbial growth. Symposium of the Society for General Microbiology, vol. 19, Cambridge University Press, London, 1969.
5. *Meynell G. G., Meynell E.* Theory and practice in experimental bacteriology, 2nd ed., Cambridge Press, Cambridge, 1970. Критическое обсуждение техники и методов, используемых в экспериментальной бактериологии.
6. *Miller J. H.* Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y., 1972.

7. *Pirt S. J.* Principles of microbe and cell cultivation, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1975. [Имеется перевод: Перт С. Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток. — М.: Мир, 1978.]

11.6.2. Специальная литература

8. *Bridges B. A.* Symp. Soc. Gen. Microbiol., **26**, 183—208 (1976).
9. *Brock T. D.* Science, **155**, 81—83 (1967).
10. *Brock T. D.* Bacteriol. Rev., **35**, 39—58 (1971).
11. *Buchanan R. E. J.* Infect. Dis., **23**, 109—125 (1918).
12. *Calam C. T.* In: J. R. Norris and D. W. Ribbons (eds.), Methods in microbiology, vol. 1, p. 567—592, Academic Press, Inc., New York, 1969.
13. *Campbell A.* Bacteriol. Rev., **21**, 263—272 (1957).
14. *Capaldo F. N., Barbour S. D.* In: P. C. Hanawalt and R. B. Setlow (eds.), Molecular mechanisms for repair of DNA, part A, p. 405—418, Plenum Publishing Corp., New York, 1975.
15. *Cato E. P., Cummins C. S., Holdemann L. V., Johnson J. L., Moore W. E. C., Smibert R. M., Smith K. D. S.* Outline of clinical methods in anaerobic bacteriology, Virginia Polytechnic University, Blacksburg, 1970.
16. *Clifton C. E. J.* Bacteriol., **92**, 905—912 (1966).
17. *Drake J. F., Tsuchiya H. M.* Appl. Microbiol., **26**, 9—13 (1973).
18. *Finney D. J.* Statistical method in biological assay, 2nd ed., p. 570—586, Hafner Publishing Co., New York, 1964.
19. *Gray T. R. G., Postgate J. R.* Symp. Soc. Gen. Microbiol., **26**, 1—43 (1976).
20. *Günther H. H., Bergter F., Z.* Allg. Microbiol., **11**, 191—197 (1971).
21. *Halvorson H. O., Ziegler N. R. J.* Bacteriol., **25**, 101—121 (1933).
22. *Haney T. A., Gerke J. R., Pagaon J. F.* In: F. Kavenagh (ed.), Analytical microbiology, p. 219—247, Academic Press, Inc., New York, 1963.
23. *Hedén C.-G., Illéni T.* Automation in microbiology and immunology, John Wiley and Sons, Inc., New York, 1975.
24. *Holdeman L. V., Cato E. P., Woore W. E. C.* (eds.), Anaerobe laboratory manual, 4th ed., Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, 1977.
25. *Hungate R. E.* In: J. R. Norris and D. W. Ribbons (eds.), Methods in microbiology, vol. 3, p. 117—132, Academic Press, Inc., New York, 1971.
26. *Kavenagh F.* In: F. Kavenagh (ed.), Analytical microbiology, p. 43—121, Academic Press, Inc., New York, 1972.
27. *Kerker M., Coke D. D., Chew H., McNulty P. J.* J. Opt. Soc. Am., **68**, 592—601 (1978).
28. *Koch A. L.* Biochim. Biophys. Acta, **51**, 429—441 (1961).
29. *Koch A. L. J.* Theor. Biol., **18**, 133—156 (1968).
30. *Koch A. L.* Anal. Biochem., **38**, 252—259 (1970).
31. *Koch A. L.* Adv. Microb. Physiol., **6**, 147—217 (1971).
32. *Koch A. L. J.* Bacteriol., **124**, 435—444 (1975).
33. *Koch A. L. J.* Gen. Microbiol., **89**, 209—216 (1975).
34. *Koch A. L.* Perspect. Biol. Med., **20**, 44—63 (1976).

35. Koch A. L., Ehrenfeld E. Biochim. Biophys. Acta, **169**, 44—57 (1968).
36. Koch A. L., Gross G. H. Antimicrob. Agents Chemother., **15**, 220—228 (1979).
37. Kubitschek H. E. Rev. Sci. Instrum., **35**, 1598—1599 (1964).
38. Kubitschek H. E. In: J. R. Norris and D. W. Ribbons (eds.), Methods in microbiology, vol. 1, p. 593—610, Academic Press, Inc., New York, 1969.
39. Maaløe O., Kjeldgaard N. O. Control of macromolecular synthesis, W. A. Benjamin, Inc., New York, 1966.
40. Mallette M. F. In: J. R. Norris and D. W. Ribbons (eds.), Methods in microbiology, vol. 1, p. 521—566, Academic Press, Inc., New York, 1969.
41. Mitruka B. M. Methods of detection and identification of bacteria, CRC Press, Cleveland, 1976.
42. Norris K. P., Powell E. O. J. R. Microsc. Soc., **80**, 107—119 (1961).
43. Novick A., Szilard L. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **36**, 708—719 (1951).
44. Perfil'ev B. V., Gabe D. R. Capillary methods of investigation of microorganisms, University of Toronto Press, Toronto, 1969.
45. Postgate J. R. Adv. Microb. Physiol., **1**, 2—23 (1967).
46. Postgate J. R. In: J. R. Norris and D. W. Ribbons (eds.), Methods in microbiology, vol. 1, p. 611—628, Academic Press, Inc., New York, 1969.
47. Ryan F. J., Beadle G. W., Tatum E. L. Am. J. Bot., **30**, 789—799 (1943).
48. Schmidt E. L., Bantkole R. O., Bohlool B. B. J. Bacteriol., **95**, 1987—1992 (1968).
49. Shehata T. E., Marr A. G. J. Bacteriol., **107**, 210—216 (1971).
50. Shuler M. L., Aris R., Tsuchiya H. M. Appl. Microbiol., **24**, 384—388 (1972).
51. Sokal R. R., Rohlf F. J. Biometry, W. H. Freeman and Co., San Francisco, 1969.
52. Spielman L., Coren S. L. J. Colloid Interface Sci., **26**, 175—182 (1968).
53. Vollenweider R. A. A manual on methods for measuring primary production in aquatic environments. IBP Handbook No. 12, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1974.
54. Wyatt P. J. In: J. R. Norris and D. W. Ribbons (eds.), Methods in microbiology, vol. 8, p. 183—263, Academic Press, Inc., New York, 1973.
55. Zimmerman U., Schultz J., Pilwat G. Biophys. J., **13**, 1013 (1973).

ХРАНЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ

Р. Герна

В большинстве бактериологических лабораторий организованы музеи живых культур микроорганизмов, используемые в процессе обучения, в исследовательских, промышленных и других целях. Правильное хранение культур является чрезвычайно важной проблемой, которой следует уделять (но часто не уделяется) такое же внимание, как стандартизации оборудования и выбору химических веществ. Потеря или изменение свойств основных культур вследствие их неправильного хранения помешали выполнению многих научных программ.

Основными целями хранения является поддержание жизнедеятельности клеток и чистоты культур, а также предупреждение изменений и мутаций, т. е. сохранение микроорганизма в состоянии, максимально близком к исходно выделенному штамму. Существует много методов хранения бактерий, однако не все штаммы при использовании какого-либо из них ведут себя одинаково. Выбор метода часто определяется наличием оборудования, места для хранения и квалифицированных сотрудников.

Ведение записей является важным аспектом сохранения основной культуры, которым нередко пренебрегают. Слишком часто при выделении микроорганизмов не обозначают штамм, а если и обозначают, то это не отражают документально в каталоге штаммов. Цифровое или буквенное обозначение штамма связано с его спецификой, т. е. с отличительными фенотипическими характеристиками, которые и должны быть отражены. При документации должны указываться источник выделения и имя исследователя, выделившего штамм, поскольку таким же цифровым или буквенным индексом могут быть обозначены еще какие-либо штаммы, выделенные другими исследователями. В некоторых случаях отмеченные изменения штаммов, которые, как полагали, были

вызваны условиями хранения, на самом деле оказались результатом ошибок при документации, например имели неправильный номер в рабочем журнале или на контейнерах.

12.1. МЕТОДЫ НЕПРОДОЛЖИТЕЛЬНОГО ХРАНЕНИЯ

12.1.1. Субкультивирование

Традиционным методом хранения бактериальных культур является их периодический пересев на свежие среды. Интервал между пересевами зависит от микроорганизма, используемой среды и внешних условий. Некоторые бактерии следует пересевать через день, другие — только через несколько недель или месяцев. При использовании этого метода для хранения культур должны быть соблюдены три условия: 1) подходящая поддерживающая среда; 2) идеальная температура хранения; 3) необходимая частота пересевов.

Поддерживающая среда

Предпочтительнее использовать минимальные среды [13], поскольку в них процессы метаболизма в микроорганизмах идут с пониженными скоростями и поэтому промежутки между пересевами удлиняются. Однако для роста некоторых бактерий требуются комплексные среды, или же для сохранения их специфических физиологических свойств необходимо присутствие в среде сложных соединений. При использовании комплексной среды могут потребоваться более частые пересевы, связанные с ускоренным ростом бактерий или накоплением конечного продукта метаболизма.

Хранение

Простейшим способом является хранение культур микроорганизмов при комнатной температуре в штативе или в специально сконструированном для хранения боксе, в котором имеются полки с отверстиями для пробирок. При таком хранении культур необходим постоянный

контроль, поскольку они имеют тенденцию быстро высыхать, и если условия в лаборатории не регулируются, то культуры плохо переносят температурные колебания.

Для уменьшения высыхания культур используют заворачивающиеся крышки с резиновыми прокладками, обертывают верхнюю часть пробирок парафильмом (VWR Scientific, Inc.; № 52858-000) или помещают пробирки в пластмассовый мешок (VWR Scientific, Inc.; № 11215-790). Чтобы уменьшить скорости метаболизма микроорганизмов, культуры хранят в холодильнике при 5—8°C. Используя эти меры предосторожности, можно сохранять большинство бактерий в течение 3—5 мес без пересева.

Режим пересевов

Частоту пересевов (субкультивирования) определяют экспериментальным путем. Субкультивирование следует проводить как можно реже во избежание селекции вариантов. На случай потери культуры желательно сохранять дубликаты пробирок с ней. После каждого пересева культуру проверяют на чистоту и периодически проводят сокращенную проверку для выявления каких-либо изменений в фенотипических свойствах бактерий. В пересеваемых культурах не следует выделять единичные колонии, поскольку при этом повышается вероятность селекции мутантов.

Основными недостатками метода периодического пересева являются: риск заражения, ошибки при обозначении штаммов или наклеивании неправильной этикетки, селекция вариантов или мутантов, возможная потеря культур и необходимость выделения специального места для их хранения.

12.1.2. Хранение под минеральным маслом

Многие виды бактерий успешно хранят месяцами или даже годами с помощью сравнительно простого и дешевого метода, а именно под слоем стерильного медицинского минерального масла (можно использовать вазелиновое масло с удельной плотностью 0,865—0,890). Однако из-за недостаточной стерильности минерального мас-

ла при использовании этого метода может происходить заражение культур.

Масло стерилизуют в сушильном шкафу при 170°C в течение 1—2 ч; автоклавирование для этой цели применять не рекомендуется [19].

Культуры выращивают на косяках, в столбиках агара или в жидкой среде соответствующего состава. После появления достаточно хорошего роста в пробирку в стерильных условиях наливают слой минерального масла высотой не менее 2 см (косяки агара должны быть покрыты полностью) для защиты от высыхания, а также для уменьшения метаболической активности и замедления роста культур [5, 11].

Покрытые маслом культуры хранят в вертикальном положении в холодильнике. Для проверки сохранности культур периодически определяют их жизнеспособность.

Культуру под маслом можно пересевать на свежую среду с помощью инокуляционной иглы, а полученную культуру можно снова покрывать стерильным маслом. При обжиге иглы следует позаботиться о том, чтобы брызги масла не попали на окружающие предметы и персонал. Первичную культуру хранят не менее нескольких недель на тот случай, если субкультура окажется загрязненной или бактерии в ней будут иметь измененные свойства.

Этому методу присущи такие же недостатки, как и обычному субкультивированию (разд. 12.1.1). Кроме того, следует помнить о возможном загрязнении масла.

12.1.3. Обычное замораживание

Хранение бактерий в морозильной камере холодильника или обычном морозильнике при температуре от 0° до -20°C приводит к различным последствиям в зависимости от вида бактерий. В принципе, такой способ хранения не рекомендуется из-за повреждения клеток в эвтектических смесях концентрированных растворов электролитов (например, в такой смеси NaCl имеет эвтектическую точку -20°C) [14, 17]. Вместе с тем некоторые бактерии при замораживании можно хранить от 6 мес до 2 лет.

12.1.4. Высушивание

Большинство культур гибнет при высыхании в лабораторных условиях. Однако некоторые культуры, особенно спорообразующих бактерий, можно сохранять годами, если высушивать их в соответствующей среде [3]

Почва

Спорообразующие бактерии можно успешно хранить годами в стерильной почве, высушенной на воздухе [10]. Почву стерилизуют автоклавированием по несколько часов в течение двух дней. Инокулят из суспензии спор (по 1 мл) вносят в пробирки, содержащие стерильную почву, и оставляют при комнатной температуре до заметного высыхания. Затем пробирки закрывают стерильными резиновыми пробками и хранят в холодильнике.

Бумага

Сравнительно простым и недорогим способом хранения бактерий является их высушивание на полосках или дисках стерильной фильтровальной бумаги. Этот метод идеален для обеспечения контроля за качеством культур. В общей пробирке или в пузырьке с закручивающейся крышкой можно хранить много дисков, содержащих одну и ту же культуру. При необходимости диск достают стерильным пинцетом и в стерильных условиях вносят его в соответствующую жидкую среду. Представителей сем. *Enterobacteriaceae*, а также многие другие бактерии можно сохранять на бумаге в течение нескольких лет.

Техника этого метода заключается в следующем. Стерильную бумагу пропитывают суспензией бактерий, содержащей не менее 10^8 клеток/мл, и высушивают на воздухе или под вакуумом [2]. Бактерии лучше выживают при высушивании под вакуумом. Полоски или диски бумаги хранят в запечатанных пробирках в эксикаторах или между листами стерильной прозрачной пластмассы [7] Если эксикаторы поместить в холодильник, то срок жизни культуры удлинится.

Желатина

Многие гетеротрофные бактерии можно хранить в высушенных каплях или дисках желатины [24]. Обычно в таком виде бактерии лучше сохраняются при температуре -20°C , чем при $+4^{\circ}\text{C}$ или при комнатной температуре.

Желатиновые культуры готовят следующим образом. Культуры выращивают в соответствующих средах и клетки получают центрифугированием в стерильных условиях. Осадок клеток ресуспендируют в малом количестве жидкой среды, переносят в пробирку с 2—5 мл расплавленной пищевой желатины и инкубируют при 30°C до достижения плотности 10^8 — 10^{10} клеток/мл. Затем с помощью стерильной пастеровской пипетки или шприца вводят каплю бактериальной суспензии на дно стерильной пластмассовой чашки Петри. Чашку Петри помещают в эксикатор, содержащий пятиокись фосфора, и откачивают из него воздух вакуумным насосом. После того как капли желатины высохнут, их переносят с соблюдением правил асептики в стерильные пробирки с завинчивающимися крышками и хранят в холодильнике. Культуру бактерий получают после переноса желатиновой капли в стерильных условиях в пробирки, содержащие соответствующие среды.

12.2 МЕТОДЫ ДЛИТЕЛЬНОГО ХРАНЕНИЯ

12.2.1. Высушивание из замороженного состояния

Высушивание из замороженного состояния, или лиофилизация, является одним из самых экономичных и эффективных методов длительного хранения бактерий и других микроорганизмов. При его использовании многие физиологически разнородные виды бактерий и бактериофаги удается сохранять в жизнеспособном состоянии 30 лет и более. Этим методом бактерии можно хранить небольшими порциями в ампулах. Сама процедура лиофилизации достаточно проста, однако ее теоретические аспекты довольно сложны, и для более детального обсуждения мы отсылаем читателя к нескольким превосходным обзорам [1, 21, 22].

Лиофилизация заключается в удалении воды из замороженных суспензий бактерий путем сублимации при низком давлении, т. е. при этом вода испаряется, минуя жидкую фазу. Высушенные клетки сохраняются довольно долго, если защитить их от действия кислорода, влаги и света. В любой момент клетки можно перевести в гидратированное исходное состояние.

Лиофилизацию проводят разными способами с помощью различных приборов. Простейший из них представляет собой эксикатор, который охлаждают, чтобы клеточная суспензия во время подключения к вакуумному насосу оставалась в нем замороженной. Детали других способов лиофилизации и соответствующего оборудования описаны Уикерхэмом и Андреасеном [26], а также Хейнесом и др. [12].

Наиболее широко используется лиофилизация с центрифугированием и предварительное замораживание. Детальное описание метода лиофилизации с центрифугированием можно найти в работах Маглитона [18] и Лапажа и др. [2].

Оборудование

Для лиофилизации существует как простое и недорогое оборудование, включающее систему эксикатора с вакуумным насосом, так и достаточно сложное, которое стоит тысячи долларов. Воспроизводимость и сохранность культур зависят от используемой системы. Однако часто очень хорошие результаты можно получить с помощью простой системы, состоящей из высоковакуумного насоса, конденсора и камеры, или распределительной гребенки (рис. 12.1 и 12.2).

Ампулы

Существуют ампулы самой разной формы и размеров; чаще других для лиофилизации используются два основных типа. Для клеток, лиофилизуемых в камере (рис. 12.1), рекомендуются двойные ампулы (рис. 12.3). Такими ампулами легче пользоваться, они менее подвержены загрязнению посторонними микроорганизмами и более надежны для хранения патогенных штаммов, чем

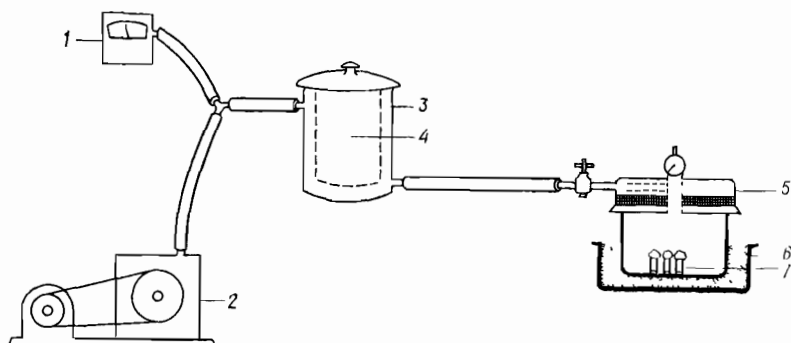


Рис. 12.1. Лиофильная сушка с использованием двойных ампул. 1 — вакуумный манометр; 2 — вакуумный насос; 3 — конденсор типа Vir Tis; 4 — резервуар, заполненный сухим льдом и этилцеллосольвом; 5 — вакуумная прижимная крышка; 6 — стальной сосуд с измельченным сухим льдом и этилцеллосольвом; 7 — ампулы с образцами.

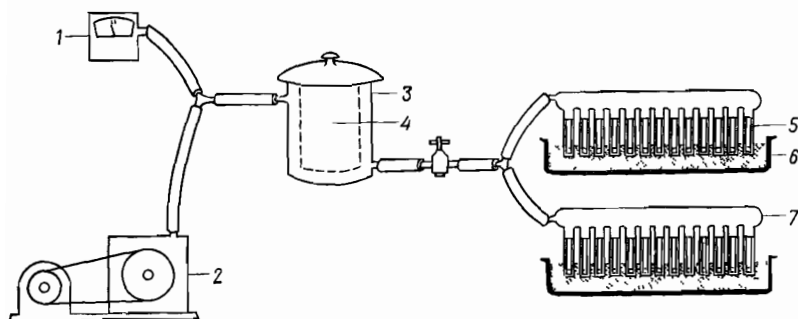


Рис. 12.2. Лиофильная сушка с использованием одинарных ампул. 1 — вакуумный манометр; 2 — вакуумный насос; 3 — конденсор типа Vir Tis; 4 — резервуар, заполненный сухим льдом и этилцеллосольвом; 5 — ампулы с образцами; 6 — стальной сосуд с измельченным сухим льдом и этилцеллосольвом; 7 — гребенка.

обычные одинарные ампулы [25], которые сушат и закрывают непосредственно перед установкой в гребенку (рис. 12.2).

Внутренний сосуд ампулы сделан из мягкого стекла (VWR Scientific № 27921-015; 11,5×35 мм). Подготовку ампул к работе проводят следующим образом. На дно наружного сосуда из мягкого стекла (VWR Scientific

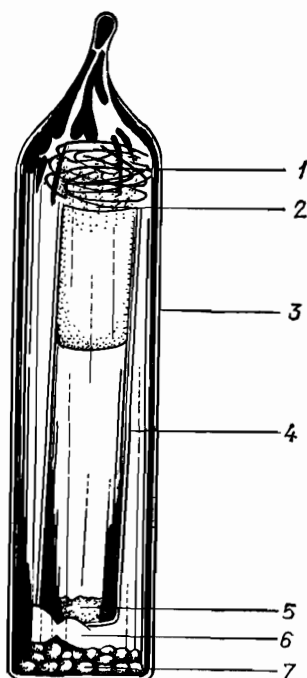


Рис. 12.3. Двойная ампула с высушенным образцом. 1 — стеклянная вата; 2 — ватная пробка; 3 — наружная ампула; 4 — внутренняя ампула; 5 — лиофилизованная культура; 6 — ватная прокладка; 7 — силикагель.

№ 27921-015; 14,25×25 мм) помещают гранулы силикагеля (Fisher Scientific Co., № 42, 6—16 меш, сорт Tel-Tale). Туда же кладут маленький кусочек ваты, чтобы предохранить от разбивания внутренний сосуд. Перед работой наружные сосуды выдерживают при 100 °С в течение ночи. В результате нагревания силикагель окрашивается в темно-синий цвет. При закрытии и хранении ампул цвет силикагеля не должен меняться.

Для гребенки используют одинарные ампулы двух типов. При поверхностном замораживании культуры используют 1-миллилитровые шариковые ампулы в форме капли (фирма Kontes, наружный диаметр 8 мм). При высушивании осадка применяют 1-миллилитровые ампулы «Edwards» трубчатого типа (Bellco Glass, Inc.) с наружным диаметром 8 мм.

Внутренние сосуды двойных ампул и одинарные ампулы в гребенке слегка прикрывают гигроскопической ватой и стерилизуют в течение 2 ч в сушильном шкафу при 170 °С. Иногда вата содержит остатки масел и солей, которые, высвобождаясь в процессе нагревания, оставляют слабый налет на внутренних стенках ампул, токсичный для некоторых видов бактерий. Можно также стерилизовать ампулы автоклавированием в течение 1 ч; при этом их кладут на бок, чтобы внутрь легче проникал пар.

Ампулы метят несмываемыми чернилами. Для

этой цели рекомендуется пользоваться маркирующим прибором (Markem Machine Co., тип 135A) и специальными чернилами (Markem Machine Co., № 7224). Эти чернила выдерживают сверхнизкие температуры и кратковременное воздействие такого растворителя, как спирт. После маркировки ампулы нагревают в течение 20 мин в сушильном шкафу при 160°C для закрепления чернил.

Подготовка культуры

Успех лиофилизации зависит от качества используемых клеток, от того, насколько они жизнеспособны и в каких условиях они выросли. Выращивают достаточно большое количество клеток так, чтобы в суспензии содержалось не менее 10^8 клеток/мл. Клетки собирают в период максимальной стабильности и жизнеспособности культуры, т. е. в поздней экспоненциальной или ранней стационарной фазах роста.

Криопротекторы

Для подготовки клеток к лиофилизации их суспендируют в среде, содержащей криопротекторы. Американская Коллекция типовых культур достигла успеха в длительном хранении физиологически различных бактерий, применяя в качестве криопротекторов либо 20%-ное снятое молоко (при использовании двойных ампул), либо 24%-ный раствор сахарозы, разведенный равным объемом ростовой среды (конечная концентрация сахарозы 12% при использовании одинарных ампул). В других лабораториях в качестве криопротекторов используют декстран (10%), лошадиную сыворотку, инозит и др. [8, 14, 20].

В случае использования двойных ампул применяют следующую процедуру. Готовят 20%-ное снятое молоко (Difco 0032) и стерилизуют его порциями (по 5 мл) в течение 20 мин при 116°C. Следует избегать перегрева, так как при этом может произойти карамелизация молока. В стерильных условиях собирают клетки, выросшие на поверхности агара, смывая их 20%-ным снятым молоком. Клетки, выращенные в жидкой культуре, отделяют в стерильных условиях центрифугирова-

нием и затем суспендируют осадок в стерильном мо-
локе, так чтобы получилась суспензия, содержа-
щая по меньшей мере 10^6 клеток/мл. Эту же процедуру
применяют и в том случае, когда в качестве криопротек-
тора используется сахароза.

В каждую двойную ампулу наливают 0,2 мл суспен-
зии клеток, закрывают их ватными пробками и подрав-
нивают пробки ножницами. После приготовления суспен-
зии ее следует разливать по ампулам как можно быст-
рее. Интервал между разливом и процессом лиофилиза-
ции должен быть сведен до минимума, чтобы избежать
изменений в культуре.

При использовании одинарных ампул в каждую из
них наливают 0,1 мл суспензии бактерий. Вставляют
ватные пробки на глубину приблизительно 1,3 см ниже
края ампулы и обжигают их верхнюю часть, чтобы
убрать лишние волокна ваты.

Лиофилизация с использованием двойных ампул

На рис. 12.1 показана типичная система для лиофи-
лизации, в которой используются двойные ампулы. Все
вакуумные шланги сделаны из тайгона и имеют внутрен-
ний диаметр 0,9 см и толщину стенки 2,2 см. Система
оснащена термисторным вакуумным измерительным при-
бором (Consolidated Vacuum Corp., модель GT-340A),
с помощью которого можно измерять давление ниже
 $3 \cdot 10^{-2}$ мм рт. ст. Когда прибор, измеряющий вакуум,
помещают между конденсором и вакуумным насосом,
давление должно оставаться постоянным. Если же его
установить между камерой с ампулами и конденсором,
то он будет регистрировать изменения давления пара в
системе, и в частности подъем давления в момент нача-
ла высушивания. Однако после завершения процесса вы-
сушивания давление должно вновь опуститься ниже
 $3 \cdot 10^{-2}$ мм рт. ст.

Внутренние ампулы с клетками помещают в верти-
кальном положении в сосуд из нержавеющей стали. Для
лучшего высушивания используют только один ряд ам-
пул. Чтобы заморозить клетки, сосуд с ампулами поме-
щают на 1 ч в морозильник с температурой от -60 до
 -65°C .

Ловушкой для паров воды служит конденсор (The Virtis Co., Inc.), куда кладут кусок сухого льда и наливают этилцеллосольв (Fisher Scientific Co., E-180). Кран между вакуумной крышкой Atmo-vac (Refrigeration for Science, Inc.) и конденсором закрывают и из системы откачивают воздух до тех пор, пока давление не опустится ниже $3 \cdot 10^{-2}$ мм рт. ст.

Через 1 ч сосуд из нержавеющей стали с ампулами помещают в большой неглубокий сосуд с колотым льдом, так чтобы лед окружал внутренний сосуд со всех сторон. В таком положении сосуды оставляют на 2—3 ч. Необходимо следить, чтобы сухой лед не попал в сосуд с ампулами. Внутренний сосуд накрывают вакуумной крышкой, которую до момента открывания крана придерживают рукой. Кран проверяют на отсутствие утечки. Высушивание проводят в вакууме $2\text{—}3 \cdot 10^{-2}$ мм рт. ст. в течение 18 ч. Для удобства сушку можно начать во второй половине дня и завершить утром.

Наружные ампулы с силикагелем извлекают из сушильного шкафа, помещают в сухой бокс с относительной влажностью $<10\%$ и дают им охладиться. Закрывают кран между вакуумной крышкой и конденсором. Выходное отверстие в верхней части крышки присоединяют резиновой трубкой к колонке с силикагелем, помещенной внутри сухого бокса. Открывают ventиль выходного отверстия, чтобы сухой воздух из колонки с силикагелем вошел в сосуд с ампулами. Ампулы переносят в сухой бокс и помещают каждую из них в наружную, сделанную из мягкого стекла. На ватную пробку во внутренней ампуле кладут кусочек бумаги (0,6 см) из стекловолокна (Whatman, Inc.) (линии на рис. 12.3 соответствуют изгибам стекловолокна, а не его слоям).

Двойные ампулы извлекают из сухого бокса и нагревают наружную ампулу на газовой горелке в том месте, где вставлена бумага из стекловолокна. Ампулу вращают над горелкой до тех пор, пока стекло не начнет размягчаться. Его медленно вытягивают пинцетом до того момента, когда сужение в ампуле превращается в узкий капилляр.

После охлаждения ампулы подсоединяют к вакуумному насосу с помощью резиновых пробок с отверстием, подходящим по размеру к открытому концу ампулы.

Воздух откачивают до тех пор, пока давление не снижается до $5 \cdot 10^{-2}$ мм рт. ст., и затем запаивают капиллярное сужение в пламени газовой горелки.

Лиофилизация с использованием одинарных ампул

Используя специальное натягивающее устройство, заполненные ампулы вставляют в гребенку (рис. 12.2) с помощью стерильных трубок из латекса янтарного цвета длиной 2,5 см (American Hospital Supply Corp., № 17610-063; $0,47 \times 0,16$ см). Когда используют ампулы типа «Edwards», суспензию клеток замораживают, погружая ампулы в баню с этилцеллосольвом. Ампулы вращают в бане до образования ледяной корки, а затем закрепляют их в гребенке.

Ловушку для паров воды готовят так же, как описано в случае лиофилизации с использованием двойных ампул. Ампулы, помещенные в гребенку, остаются в бане из сухого льда с целлосольвом в течение всего процесса высушивания. Лиофилизацию проводят 18 ч в вакууме $< 3 \cdot 10^{-2}$ мм рт. ст. Во время процесса лиофилизации температура бани постепенно повышается; ее снижают, добавляя в наружный сосуд куски сухого льда.

По окончании высушивания ампулы запаивают ниже ватной пробки в пламени газовой горелки и дают им остыть.

Хранение

Культуры, лиофилизированные как в двойных, так и в одинарных ампулах, хранят при температуре ниже 5°C . Если культуры находятся в холодильнике типа Revco при -30 или -69°C , они сохраняются еще лучше. При комнатной температуре лиофилизированные культуры хранить нельзя.

Восстановление культур из лиофилизированных клеток

Сильно нагревают запаянный конец наружной ампулы на бунзеновской горелке и быстро капают на него 1—2 капли воды, чтобы горячее стекло треснуло. Осторожно, но быстро пинцетом надламывают и удаляют верхушку, а затем вытаскивают пробку из стекловолокна

и вынимают внутреннюю ампулу. Из последней аккуратно удаляют ватную пробку, стараясь не допустить загрязнения культуры попадающими извне волокнами.

Прежде чем открыть одинарные ампулы, их надрезают трехгранной пилочкой на расстоянии около 2,5 см от верхнего конца, а затем дезинфицируют, протирая кусочком марли, пропитанной 70%-ным спиртом. Обертывают ампулу стерильной марлей и обламывают надпиленный конец. Обычно это делают в вытяжном шкафу, а в случае патогенных бактерий — в специальном закрытом боксе. Перед тем как внести в ампулу жидкую среду, обломанный конец слегка обжигают. Некоторые исследователи используют вольфрамовую иглу, нагретую в кислородно-газовой горелке до белого каления. Такой иглой им удастся сделать в верхней части ампулы маленькое отверстие. Это обеспечивает более медленное проникновение воздуха в ампулу и стерильность пространства вокруг отверстия. Жидкую среду вносят в ампулу стерильным шприцем с иглой и извлекают суспензию бактерий им же.

Лиофилизированную культуру переводят в суспензию сразу после вскрытия ампул, добавляя в каждую 0,3—0,4 мл соответствующей стерильной жидкой среды. Суспензию в ампулах хорошо перемешивают и переносят в пробирки с 5 мл жидкой среды. После тщательного перемешивания отбирают 0,2 мл суспензии и наносят на твердую или полужидкую среду того же состава. Необходимо проверять чистоту культуры до лиофилизации и после нее. Для этого суспензию клеток стерильно разводят и делают посев штрихом на твердые среды. Пробирки и чашки со средой инкубируют при оптимальной для бактерий температуре и, как только начинается их рост, делают пересев на свежую среду, чтобы убедиться в чистоте культуры. Рост бактерий, подвергавшихся лиофилизации, часто начинается после длительной лаг-фазы. Поэтому нельзя делать заключение о гибели культуры, если инкубация была недостаточно длительной.

Проверка жизнеспособности бактерий

Чтобы определить, насколько эффективен процесс высушивания бактерий в замороженном состоянии, проверяют их жизнеспособность как до, так и после лиофи-

лизации. Кроме того, следует проводить периодические проверки, подтверждающие жизнеспособность хранящихся лиофилизированных культур. Их желательно также проверять на случай появления каких-либо изменений в свойствах бактерий в результате их замораживания — высушивания или длительного хранения.

12.2.2. Ультразамораживание

Некоторые виды бактерий, не поддающихся лиофилизации, удается длительно сохранять в замороженном состоянии при температуре жидкого азота (-196°C) или в его парах (-150°C) в хорошо изолированных резервуарах. В Американской коллекции типовых культур успешно хранится таким способом множество «привередливых» бактерий, которые не утратили при этом свои фенотипические свойства в течение >15 лет.

Бактериальные культуры длительно сохраняются также в морозильниках с очень низкими температурами (например, в морозильнике типа Revco, Inc. при -70°C). Такой метод хранения вполне пригоден для многих бактерий. Однако при этом необходимо помнить, что иногда выключается электропитание сети или выходит из строя компрессор. В таких случаях потерю ценных коллекций помогают предотвратить сигналы предупреждения, а также запасные морозильники или электрические генераторы. Имеющиеся в настоящее время в продаже морозильники (например, Revco, Inc.) обычно оборудованы аварийной сигнальной системой, работающей на аккумуляторе.

Рекомендуется также использование дополнительных систем предупреждения, таких, как звуковой, чувствительный к отключению напряжения датчик температуры (Arthur H. Thomas Co., № 4052-W20), работающий в интервале от -75°C до 200°C ($\pm 0,3^{\circ}\text{C}$). Он работает от аккумулятора и может быть укреплен на стенке.

Хранение в жидком азоте

Считается, что использование жидкого азота для длительного хранения микроорганизмов обходится очень дорого. Однако данные последних лет об успешном хра-

нении в жидком азоте физиологически разнородных бактерий свидетельствуют о том, что его использование рентабельно несмотря на высокую стоимость. Цена жидкого азота колеблется от 20 до 50 центов за 1 л.

Имеется много холодильников, работающих на жидком азоте, различной конструкции и емкости, например типа MVE, Cryogenics, Linde, Union Carbide Corp. Их емкость варьирует от 10 до 1000 л, в них можно хранить от 300 до 40 000 ампул.

Ампулы

Выпускаются различные виды ампул для хранения бактерий в жидком азоте. Особенно широко используются следующие типы: боросиликатные с толстыми стенками (Wheaton Scientific, Cryule № 12483 и 12523 с готовыми насечками) и специальные широкогорлые ампулы (Wheaton, Gold Band Cell and Tissue Cryule № 12742). Эти ампулы емкостью 1,2 мл имеют вдавления, облегчающие их вскрытие. Вместо стеклянных ампул можно использовать предварительно простерилизованные полипропиленовые пробирки (38×12,5 мм) с завинчивающимися крышками и силиконовыми прокладками (Vanguard International).

Криопротекторы

При хранении бактерий в жидком азоте применяют криопротекторы двух типов. К первому относятся глицерин и диметилсульфоксид (ДМС), которые легко проходят через клеточную мембрану и обеспечивают как внутриклеточную, так и внеклеточную защиту от замораживания. Ко второму виду криопротекторов относятся такие вещества, как сахароза, лактоза, глюкоза, маннит, сорбит, декстран, поливинилпирролидон и полигликоль, которые обеспечивают защитное действие на наружной поверхности клеточной мембраны. Протекторы первого типа, т. е. глицерин и ДМС, оказались более эффективными и пригодными для широкого круга бактерий. Выбор криопротектора зависит от вида бактерий. При замораживании новых штаммов следует предварительно проверить действие на них криопротектора.

Глицерин и ДМС обычно добавляют в ростовую среду в концентрации 10 и 5% (объем/объем) соответственно. Глицерин стерилизуют автоклавированием 15 мин при 10^4 Па.

Стерилизацию ДМС осуществляют фильтрованием, используя пористые свечи Села с размером пор 03. ДМС собирают порциями по 10—15 мл в стерильные пробирки и хранят в замороженном состоянии при 5°C (ДМС замерзает при 18°C). Из-за накопления продуктов окислительного распада ДМС в открытых бутылках хранят не более 1 мес.

Подготовка культуры

В выживании бактерий после замораживания жидким азотом важную роль играет физиологическое состояние культуры. В основном в замороженном состоянии хранят активно растущие клетки из культур в середине или в конце экспоненциальной фазы роста [23].

Клетки выращивают в соответствующей среде. В случае жидких культур клетки отделяют в стерильных условиях центрифугированием и ресуспендируют осадок в стерильной свежей среде, содержащей или 10% (объем/объем) глицерина (готовят добавлением 20%-ного глицерина к равному объему стерильной среды), или 5% (объем/объем) ДМС (приготовленного добавлением соответствующего количества 100%-ного ДМС к стерильной среде). В случае роста культур на агаре клетки смывают с его поверхности стерильной жидкой средой, содержащей подходящий криопротектор, и разливают в стерильные маркированные ампулы по 0,4 мл суспензии, содержащей не менее 10^8 клеток/мл.

Если штамм является патогенным, ватную пробку срезают на уровне верхнего конца ампулы и хранят ампулы в парах жидкого азота незапаянными. Это делают во избежание несчастных случаев в процессе их запаивания или во избежание взрывов в процессе оттаивания (из-за попадания в ампулу жидкого азота через мелкие отверстия и последующего быстрого выхода газа при комнатной температуре).

В случае непатогенных бактерий ампулу перед запаиванием охлаждают при 4°C не менее 30 мин. Затем

ее нагревают над местом круговой насечки (надрезом) стекла, вращая в пламени в течение нескольких секунд, чтобы удалить влагу. Эта процедура позволяет избежать увеличения давления внутри ампулы, которое может привести к появлению пузырей в процессе ее запаивания. Перед запаиванием из ампулы извлекают часть ватной пробки. Желательно запаивать ампулы с помощью оборудованного кислородно-газовой горелкой полуавтоматического устройства (например, Kahlenberg-Globe Equipment Co.), предназначенного для вытягивания и запаивания стекла. Считается, что в этом случае гарантируется минимум мелких капиллярных пор.

Осторожно пинцетом горячую ампулу ставят в штатив, погруженный в баню с холодной водой, с таким расчетом, чтобы она была погружена на глубину 0,6 см. Нельзя допускать попадания воды на горячую часть ампулы, иначе стекло может треснуть. После охлаждения ампулы готовы к замораживанию. Если все операции были выполнены удовлетворительно, температура содержимого в ампулах не должна подниматься выше 25 °С. В отсутствие автоматического устройства ампулы запаивают вручную на газовой горелке, но их необходимо при этом проверять на герметичность. С этой целью ампулы после запаивания оставляют на 30 мин при 5 °С в 0,05%-ном растворе метиленового синего. Плохо запаянные ампулы обнаруживают по проникновению в них краски.

Замораживание

Опубликовано много работ о влиянии скорости охлаждения в процессе замораживания на выживание бактерий [4, 15]. Наилучшие результаты по выживанию и восстановлению бактериальных культур были получены в случае медленного охлаждения клеток, например со скоростью 1 °С/мин.

Медленного охлаждения достигают следующим образом:

1. Ампулы с культурой помещают в алюминиевые банки (Nasco № A545), которые вставляют в картонные коробки (Murray and Heister, Inc.) с прямоугольными отверстиями 6,4×27,9 см.

2. Коробки ставят в морозильную камеру автомати-

ческого низкотемпературного холодильника (Union Carbide Corp., Linde BF3-2) и устанавливают определенную скорость охлаждения.

3. Замораживают клетки при контролируемой скорости охлаждения $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до -30°C , а затем при значительно большей скорости ($15-30^{\circ}\text{C}/\text{мин}$) до -150°C .

4. После достижения этой температуры ампулы переносят в сосуд с жидким азотом и хранят в нем при -196°C или в парах азота (-150°C).

Если нет автоматического холодильника с программой, медленное охлаждение может быть достигнуто с помощью одного из следующих приемов:

1. Стекланные или пластмассовые ампулы с культурой в лотке из нержавеющей стали помещают на дно морозильника Revco на 1 ч при температуре -60°C , а затем погружают их на 5 мин в баню с жидким азотом. Скорость охлаждения до -60°C при этом составляет приблизительно $1,5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$.

2. Рекомендуются также погружать поставленные в банки запаянные ампулы в градуированный цилиндр с 95%-ным этиловым спиртом [6]. Цилиндр с ампулами помещают в морозильник Revco при -85°C , чтобы содержимое ампул охладилося до этой температуры, а затем банки с ампулами помещают в жидкий азот.

Оттаивание

Обнаружено, что быстрое нагревание замороженных микроорганизмов или спор приводит к их быстрому восстановлению (оживлению) [9, 14, 16, 17]. Подобные испытания были проведены с замороженными клетками бактерий из Американской коллекции типовых культур.

Чтобы оживить замороженные культуры, их быстро оттаивают в водяной бане при 37°C и слабым встряхивании, пока не растает весь лед. В случае стекланных ампул для этого обычно требуется 40—60 с, а в случае полипропиленовых — 60—120 с. Сразу же после оттаивания ампулу извлекают из водяной бани и дезинфицируют ее 70%-ным этанолом. Ампулу вскрывают и в стерильных условиях переносят культуру в свежую среду.

Предостережение: при извлечении замороженных стекланных ампул из жидкого азота не исключена возмож-

Таблица 12.1. Время выживания бактерий при использовании различных методов их хранения

Род	Частота пересевов ^а	Время выживания				
		под минеральным маслом	в стерильной почве, годы	при глубоком замораживании, годы	после лиофилизации, годы	в жидком азоте, годы
<i>Acetobacter</i>	1—2 мес.	1 г.		1—3	>30	>30
<i>Achromobacter</i>	1 мес.	1—2 г.		1—3	>30	>30
<i>Acinetobacter</i>	Еженед.				>30	>30
<i>Actinobacillus</i>	Еженед.	2—3 г.			>30	>30
<i>Actinomyces</i>	1 мес.		1—2	2—3	>30	>30
<i>Agrobacterium</i>	1—2 мес.	1—2 г.	1—2		>30	>30
<i>Arthrobacter</i>	1—2 мес.			1—2	>30	>30
<i>Bacillus</i>	2—12 мес.	1 г.	1—2	2—3	>30	>30
<i>Bacteroides</i>	Еженед.			1	>30	>30
<i>Bifidobacterium</i>	Еженед.				>30	>30
<i>Chromatium</i>	1 мес.				>6	>10
<i>Clostridium</i>	6—12 мес.	1—2 г.		2—3	>30	>30
<i>Corynebacterium</i>	1—2 мес.	1 г.		1—2	>30	>30
<i>Enterobacterium</i>	1—4 мес.	1—2 г.			>30	>30
<i>Escherichia</i>	1—4 мес.	1—2 г.			>30	>30
<i>Erwinia</i>	1—4 мес.	1—2 г.			>30	>30
<i>Flavobacterium</i>	1 мес.	2 г.			>30	>30
<i>Gluconobacter</i>	1 мес.				>30	>30
<i>Haemophilus</i>	Еженед.	1 мес. (37 °C)			>30	>30

Продолжение табл. 12.1

Род	Частота пересевов ^a	Время выживания				
		под минеральным маслом	в стерильной почве, годы	при глубоком замораживании, годы	после лиофилизации, годы	в жидком азоте, годы
<i>Klebsiella</i>	1—4 мес.	1 г.		1—2	>30	>30
<i>Lactobacillus</i>	Еженед.				>30	>30
<i>Methanobacterium</i>	1 мес.				>10	>10
<i>Methanomonas</i>	1 мес.				>10	>10
<i>Micromonospora</i>	1 мес.		1—2	1	>30	>30
<i>Neisseria</i>	1 мес.				>30	>30
(<i>N. gonorrhoeae</i>)	Еженед.	1 мес. (37° С)			>30	>30
(<i>N. meningitidis</i>)	Еженед.	1 мес. (37° С)			>30	>30
<i>Nocardia</i>	1—4 мес.	1 г.		1—2	>30	>30
<i>Proteus</i>	1—2 мес.	1 г.		1—2	>30	>30
<i>Pseudomonas</i>	1—3 мес.				>30	>30
<i>Spirillum</i>	Еженед.	6 мес.		1	>30	>30
<i>Staphylococcus</i>	1—2 мес.			1	>30	>30
<i>Streptococcus</i>	1—2 мес.	1 г.			>30	>30
<i>Streptomyces</i>	1—8 мес.	1—2 г.	2—3	1—3	>30	>30
<i>Xantomonas</i>				1—2	>30	>30

^a Частота пересевов зависит от используемой среды. Время, указанное в таблице, является приблизительным, в каждом роду возможны вариации для отдельных видов бактерий, мес — месяц, Еженед — еженедельно, г — год.

ность взрыва, поэтому во время этой процедуры следует надевать перчатки и защищать экраном лицо.

Для определения эффективности метода хранения в случае каждого штамма проверяют жизнеспособность культуры. Предполагаемое время выживания разных бактерий приведено в табл. 12.1.

12.3. ФИРМЫ-ИЗГОТОВИТЕЛИ

1. American Hospital Supply Corp., 1450 Waukegan Rd., McGaw Park, IL 60085
2. Bellco Glass, Inc., 340 Edrudo Rd., P. O. Box «B», Vineland, N. J. 08360
3. Consolidated Vacuum Corp., 1775 Mt. Read Blvd., Rochester, NY 14603
4. Difco Laboratories, P. O. Box 1058A, Detroit, MI 48232
5. Fisher Scientific Co., 711 Forbes Ave., Pittsburgh, PA 15219
6. Kahlenberg-Globe Equipment Co., Sarasota, FL 33577
7. Kontes, Spruce St., P. O. Box 739, Vineland, NJ 03860
8. Markem Machine Co., 150 Congress St., Box 480, Keene NH 03431
9. Minnesota Valley Engineering, Inc., New Prague, MN 56071
10. Murray and Heister, Inc., 10738 Tucker St., Beltsville, MD 20705
11. Nasco, 901 Janesville Ave., Fort Atkinson, WI 53538
12. Refrigeration for Science, Inc., 3441 Fifth St., Oceanside, NY 11572
13. Revco Inc., 1100 Memorial Drive, West Columbia, SC 29169
14. Arthur H. Thomass Co., P. O. Box 779, Philadelphia, PA 19105
15. Union Carbide Corp., Linde Division, 270 Park Ave., New York, NY 10017
16. Vanguard International, 1111-A Green Grove Rd., Neptune, NJ 07753
17. The VirTis Co., Inc., Gardiner, NY 12525
18. VWR Scientific, Inc., 3202 Race St., Philadelphia, PA 19104
19. Whatman, Inc., 9 Bridewell Place, Clifton, NH 07014
20. Wheaton Scientific, 1000 N. 10th St., Millville, NJ 08332

12.4. ЛИТЕРАТУРА

12.4.1. Общая литература

1. Cabasso V. J., Regamy R. H. (eds.). International Symposium on Freeze-Drying of Biological Products, p. 1—398, S. Karger AG, Basel, 1977. Сборник работ по теоретическим аспектам, оборудованию и перспективам исследований лиофилизации.
2. Lapage S. P., Shelton J. E., Mitchell T. G., Mackenzie A. R. Culture collections and the preservation of bacteria, p. 135—228. In: J. R. Norris and D. W. Ribbons (eds.), *Methods in microbiology*, vol. 3A, Academic Press, London, 1970. Обсуждаются проблемы поддержания большой коллекции культур, а также использование лиофилизации в комбинации с центрифугированием.
3. Onions A. H. S. Preservation of fungi, p. 113—159. In: C. Booth (ed.), *Methods in microbiology*, vol. 4, Academic Press, London, 1971. Обсуждается хранение грибов с помощью различных мето-

дов, в том числе серийного пересева, лиофилизации, замораживания и т. д.

4. Rinfret A. P., LaSalle B. (eds.). Round Table Conference on the Cryogenic Preservation of Cell Cultures, p. 1—78, National Academy of Sciences, Washington, D. C., 1975. Сборник, содержащий восемь статей по различным аспектам хранения клеток, причем особое внимание уделяется хранению в жидком азоте.

12.4.2. Специальная литература

5. Buell C. B., Weston W. H. *Am. J. Bot.*, **34**, 555—561 (1947).
6. Canale-Parola E. In: J. R. Norris and D. W. Ribbons (eds.), *Methods in microbiology*, vol. 8, p. 61—73, Academic Press, London, 1973.
7. Coe A. W., Clark S. P. *Mon. Bull. Min. Health Public Health Lab. Serv.*, **25**, 97—100 (1966).
8. Fry R. M., Greaves R. I. *N. J. Hyg.*, **49**, 220—246 (1951).
9. Goos R. D., Davis E. E., Butterfield W. *Mycologia*, **59**, 58—66 (1967).
10. Gordon R. E., Ryneerson T. K. In: S. M. Martin (ed.), *Culture collections: perspectives and problems*, p. 118—128, University of Toronto Press, Toronto, 1963.
11. Hartsell S. E. *Appl. Microbiol.*, **4**, 350—355 (1956).
12. Haynes W. C., Wickerham L. J., Hasseltine C. W. *Appl. Microbiol.*, **3**, 361—368 (1955).
13. Kauffmann F. *The bacteriology of Enterobacteriaceae*, p. 1—368, The Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1966.
14. Mackenzie A. P. In: V. J. Cabasso and R. H. Regamy (eds.), *International Symposium on Freeze-Drying of Biological Products*, p. 263—277, S. Karger, Basel, 1977.
15. Mazur P. *J. Gen. Physiol.*, **39**, 869—888 (1956).
16. Mazur P. In: H. T. Meryman (ed.), *Cryobiology*, p. 213—315, Academic Press, London, 1966.
17. Meryman H. T. (ed.). *Cryobiology*, p. 1—114, Academic Press, London, 1966.
18. Muggleton P. W. *Prog. Ind. Microbiol.*, **4**, 191—214 (1963).
19. Perkins J. J. *Principles and methods of sterilization in health science*, p. 286—292, Charles C Thomas, Publisher, Springfield, Ill., 1976.
20. Redway K. F., Lapage S. P. *Cryobiology*, **11**, 73—75 (1974).
21. Rey L. (ed.) *Aspect theoriques et industriels de la lyophilisation*, p. 199—234, Hermann, Paris, 1964.
22. Rey L. (ed.). *Lyophilisation: recherches et applications nouvelles*, p. 1—244, Hermann, Paris, 1966.
23. Speck M. L., Cowman R. A. In: H. Iizuka and T. Hasegawa (eds.), *Proceedings of the First International Conference on Culture Collections*, p. 241—250, University of Tokyo Press, Tokyo, 1970.
24. Stamp L. J. *Gen. Microbiol.*, **1**, 251—265 (1947).
25. Weiss F. A. In: *Manual of microbiological methods*, Committee on Bacteriological Technic, Society of American Bacteriologists, p. 99—119, McGraw-Hill Book Co., New York, 1957.
26. Wickerham L. J., Andreasen A. A. *Wallerstein Lab. Commun.*, **5**, 165—169 (1942).

ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие редакторов перевода	5
Предисловие (Перевод Х. С. Андреевой)	7
Методы общей бактериологии. <i>Ф. Герхардт</i> (Перевод С. Ф. Барбашова)	11

Часть I

МОРФОЛОГИЯ

Введение. <i>Р. Мюррэй</i> (Перевод С. Ф. Барбашова)	14
Глава 1. Световая микроскопия. <i>Р. Мюррэй, К. Робиноу</i> (Перевод С. Ф. Барбашова)	16
1.1. Обычная микроскопия (17). 1.2. Фазово-контрастная микроскопия (22). 1.3. Микроскопия с высоким разрешением (24). 1.4. Люминесцентная микроскопия (29). 1.5. Иммерсионные масла (31). 1.6. Уход за микроскопом (33). 1.7. Неисправности (36). 1.8. Оптимальные условия работы (36). 1.9. Фотографирование с помощью микроскопа (41). 1.10. Источники информации (43). 1.11. Литература (44).	
Глава 2. Приготовление препаратов для световой микроскопии. <i>Р. Мюррэй, К. Робиноу</i> (Перевод С. Ф. Барбашова)	45
2.1. Живые культуры (46). 2.2. Фиксированные препараты (47). 2.3. Литература (52).	
Глава 3. Методы идентификации в световой микроскопии. <i>Р. Дойч</i> (Перевод С. Ф. Барбашова)	54
3.1. Взятие проб (54). 3.2. Приготовление препаратов для микроскопирования (56). 3.3. Обнаружение признаков (63). 3.4. Специальные методы (82). 3.5. Литература (89).	
Глава 4. Электронная микроскопия. <i>Р. Коул, Т. Попкин</i> (Перевод С. Ф. Барбашова)	90
4.1. Просвечивающая электронная микроскопия (95). 4.2. Сканирующая электронная микроскопия (120). 4.3. Фотография (121). 4.4. Интерпретация результатов (123). 4.5. Идентификация (124). 4.6. Материалы (127). 4.7. Фирмы-изготовители (131). 4.8. Литература (131).	
Глава 5. Получение клеточных фракций. <i>К. Шнайтман</i> (Перевод С. Ф. Барбашова)	138
5.1. Методы разрушения клеток (138). 5.2. Методы фракционирования (148). 5.3. Пример фракционирования: <i>E. coli</i> (158). 5.4. Литература (161).	

ОГЛАВЛЕНИЕ

Часть II

РОСТ

Введение. <i>Р. Костилоу</i> (Перевод Г. И. Бурда)	163
Глава 6. Биофизические факторы. <i>Р. Костилоу</i> (Перевод Г. И. Бурда)	165
6.1. pH (165). 6.2. Активность воды и осмотическое давление (173). 6.3. Температура (175). 6.4. Давление (178). 6.5. Кислород (178). 6.6. Анаэробноз (181). 6.7. Литература (195).	
Глава 7. Биохимические факторы. <i>Б. Гирард, Э. Снелл</i> (Перевод Г. И. Бурда)	198
7.1. Потребности в питательных веществах (200). 7.2. Составление сред (211). 7.3. Количественное определение веществ по росту культур (260). 7.4. Литература (268).	
Глава 8. Получение накопительных и чистых культур. <i>Н. Криг</i> (Перевод Г. И. Бурда)	277
8.1. Биофизические методы (279). 8.2. Биохимические методы (295). 8.3. Биологические методы (316). 8.4. Получение чистых культур (318). 8.5. Среды и реактивы (324). 8.6. Литература (350).	
Глава 9. Твердая культура. <i>Н. Криг, Ф. Герхардт</i> (Перевод Г. И. Бурда)	356
9.1. Отвердители (356). 9.2. Методы культивирования на твердых средах (362). 9.3. Методы выращивания бактерий на полужидких средах (368). 9.4. Литература (372).	
Глава 10. Жидкая культура. <i>С. Дрю</i> (Перевод Г. И. Бурда)	374
10.1. Периодические системы (376). 10.2. Проточные системы (395). 10.3. Специальные системы (411). 10.4. Сбор и очистка (426). 10.5. Расчеты выхода биомассы (432). 10.6. Фирмы-изготовители (438). 10.7. Литература (439).	
Глава 11. Измерение роста. <i>А. Кох</i> (Перевод Г. И. Бурда)	442
11.1. Прямой подсчет (450). 11.2. Подсчет колоний (458). 11.3. Наиболее вероятные числа (466). 11.4. Светорассеяние (474). 11.5. Статистика и расчеты (490). 11.6. Литература (509).	
Глава 12. Хранение микроорганизмов. <i>Р. Герна</i> (Перевод Г. И. Бурда)	512
12.1. Методы непродолжительного хранения (513). 12.2. Методы длительного хранения (517). 12.3. Фирмы-изготовители (533). 12.4. Литература (533).	

Уважаемый читатель!

Ваши замечания о содержании книги, ее оформлении, качестве перевода и другие просим присылать по адресу:

129820, Москва, И-110, ГСП
1-й Рижский пер., д. 2, издательство «Мир»