



*Лекция*

*Методы культивирования микроорганизмов*

*Часть 2. Факторы, влияющие на рост микроорганизмов*

# План лекции

- *Методы культивирования микроорганизмов*
  - *Факторы, влияющие на рост микроорганизмов*
    - *источники азота,*
    - *источники углерода,*
    - *макро- и микроэлементы,*
    - *ростовые факторы,*
    - *доноры и акцепторы водорода*

## Часть 2.

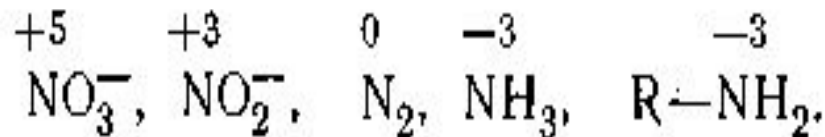
# Факторы, влияющие на рост микроорганизмов

**Главными факторами** при выращивании микроорганизмов являются питательные вещества, которые условно подразделяются на следующие типы:

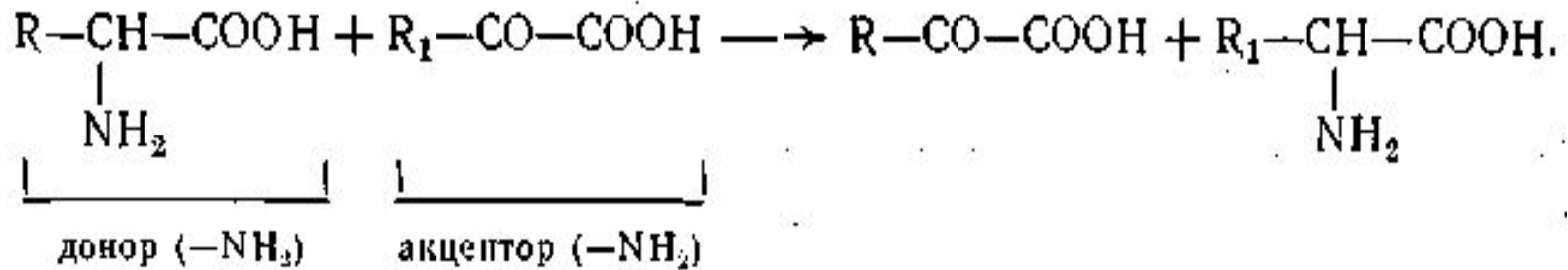
1. источники азота,
2. источники углерода,
3. макро- и микроэлементы,
4. ростовые факторы,
5. доноры и акцепторы водорода.

**Азот** входит в различные химические структуры, обнаруживаемые в микробных клетках (белки, нуклеиновые кислоты и пр.). У бактерий на азот приходится примерно 10 % от их сухого веса.

**Источниками азота могут быть:**



Для использования азота аминокислот существенна реакция трансаминирования или переаминирования:



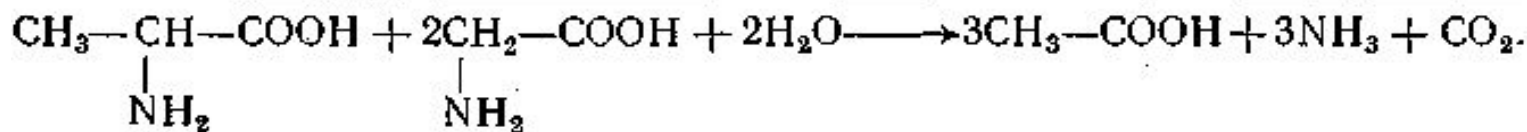
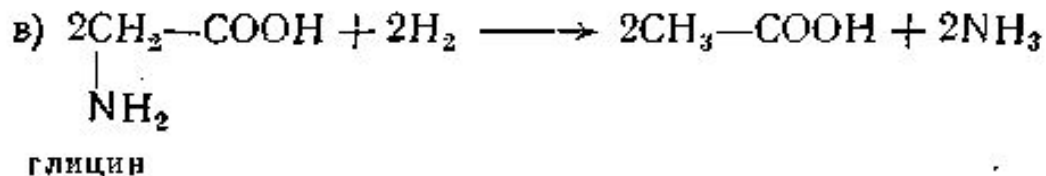
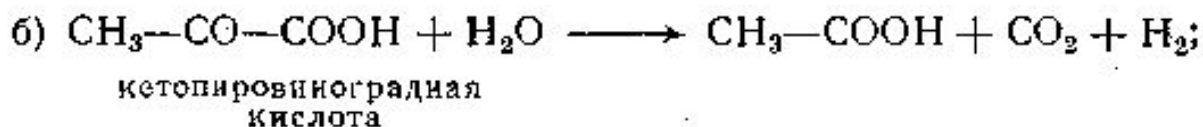
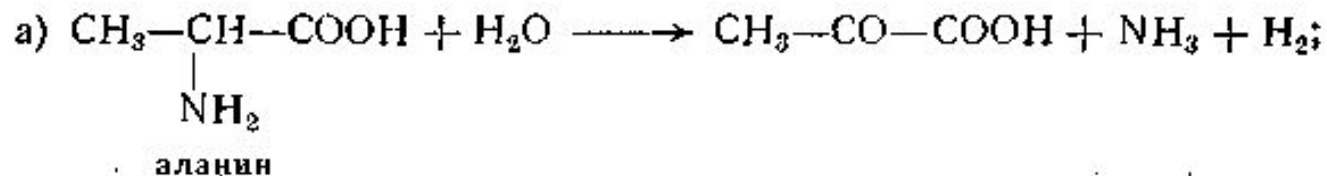
Большинство микроорганизмов может использовать  $\text{NH}_3$  в виде единственного источника азота. В этом случае главной реакцией, посредством которой обеспечивается включение  $\text{NH}_3$  в органические молекулы, является реакция с участием глутаматдегидрогеназы:



Глутаминовая кислота может вступать в реакции переаминирования с различными кетокислотами, что обеспечивает образование новых аминокислот.

У некоторых анаэробных организмов обнаружены реакции одновременного дезаминирования двух аминокислот. Например, у *Clostridium sporogenes* и некоторых других бактерий этот тип реакции является единственным источником энергии.

При взаимодействии аминокислот в этих реакциях одна из них выступает донором водорода, а другая — акцептором его.

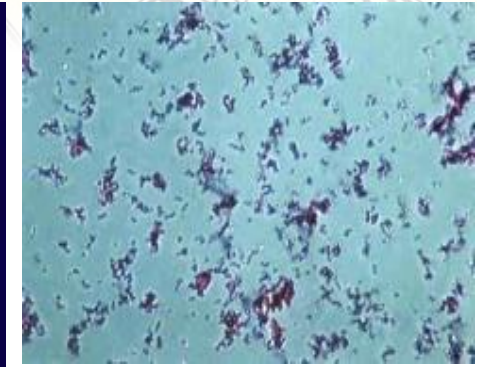


Ограниченное число микроорганизмов может фиксировать атмосферный азот, превращая его в клетках в  $\text{NH}_3$  (*Rhizobium*, *Azotobacter*, *Clostridium* и др.).

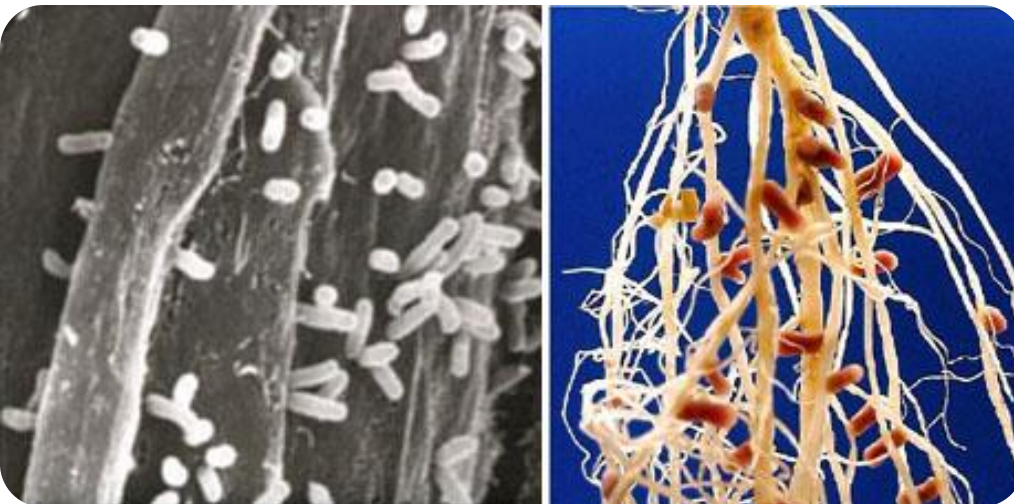
От этих микроорганизмов зависит жизнь на нашей планете. Известно, что первичным источником белка на Земле являются растения, способные синтезировать его из  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  и неорганических источников азота — нитратов и аммиака.



*Clostridium putrificum*    *Cl. sporogenes*



*Azotobacter chroococcum*



*p. Rhizobium*

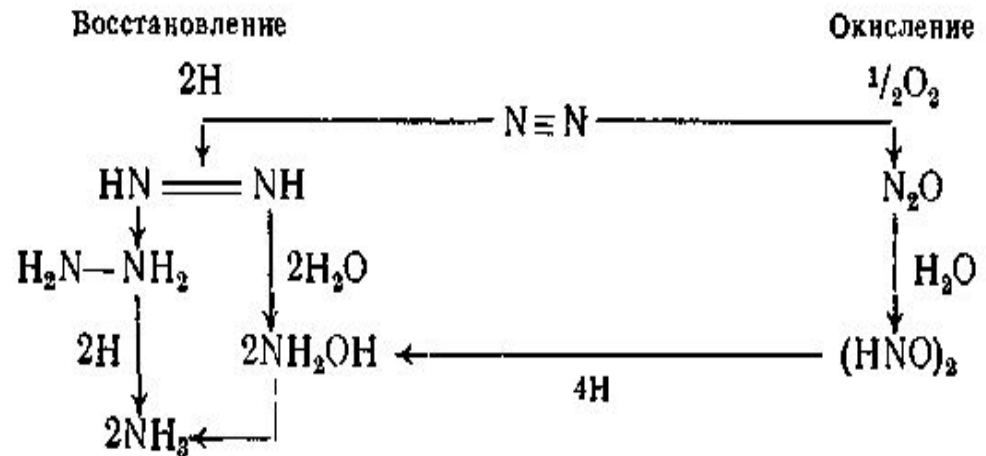
## Свободноживущие азотфиксаторы

найлены среди аэробов (азотобактеры, микобактерии, вибрионы, спириллы, спирохеты, актиномицеты, дрожжи), анаэробов (кlostридии, фотосинтезирующие бактерии, сине-зеленые водоросли), тогда как симбионты, кроме бобовых растений, теперь обнаружены в клубеньках ольхи, облепихи, болотного мирта и лоха.

**Нитрогеназа — это комплекс сложных белков, состоящий из одновалентных Mo-Fe-протеина и Fe-протеина.**

## Механизм азотфиксации

окончательно еще не выяснен. Однако возможные пути усвоения молекулярного азота микроорганизмами (с участием ферментного комплекса нитрогеназы) предполагаются в следующем виде:



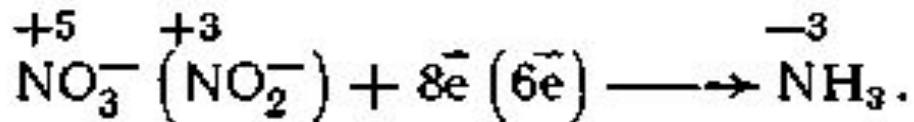
В качестве естественного электронодонора выступает **ферредоксин** — белок с низким молекулярным весом. Его извлекают из зеленых водорослей, высших растений, фотобактерий, различных видов кластридий; он содержит достаточно большое количество основных аминокислот.

В состав нитрогеназы *Clostridium pasteurianum* входит относительно высокомолекулярный компонент молибдоферредоксин.

**Бактериальный ферредоксин обнаружен только у анаэробных организмов.**

**Молибден является активатором молекулы азота, и этот металл не может быть заменен никаким другим, кроме ванадия.**

Некоторые бактерии и многие грибы используют **нитраты и нитриты** в качестве источников азота. Потребляемый в этой форме азот восстанавливается в клетках до  $\text{NH}_3$  при участии фермента **нитратредуктазы** (также молибденсодержащий фермент):





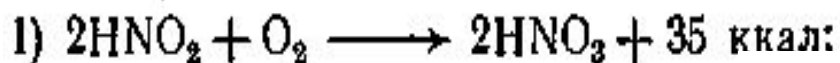
**Источники углерода** также необходимы микроорганизмам, поскольку многочисленные структуры их клеток состоят из полимерных соединений, включающих углерод (белки, жиры, углеводы).

Другие организмы потребляют этот элемент в иной форме, хотя углекислота у них выступает важным звеном в различных реакциях промежуточного обмена.

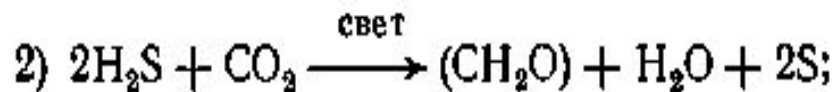
**По способам питания, в зависимости от потребляемых источников углерода**, микроорганизмы подразделяются на автотрофы и гетеротрофы. Те и другие могут быть хемо- и фотосинтезирующими.

В качестве примера приведем следующие реакции, характерные для некоторых микроорганизмов из названных групп:

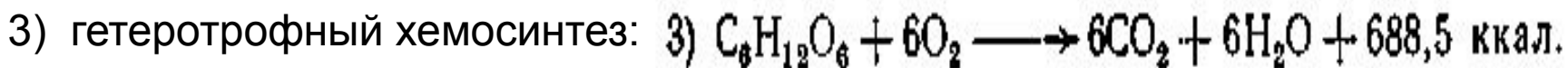
1) автотрофный хемосинтез:



2) автотрофный фотосинтез:



3) гетеротрофный хемосинтез:



Для гетеротрофных хемосинтезирующих организмов почти универсальным источником углерода является глюкоза.

В процессах своего роста и развития микроорганизмы нуждаются во многих элементах, доставляемых им в виде неорганических солей.

Отдельные элементы требуются в заметных количествах, тогда как другие используются ими в микроконцентрациях. Поэтому первые из них условно называются здесь **макроэлементами**, а вторые — **микроэлементами**. К макроэлементам должны быть отнесены фосфор, сера, калий и магний; к микроэлементам — железо, кобальт, кальций, цинк, медь, молибден и др.

Без **фосфора** клетки микробов погибают. Это естественно, поскольку фосфор входит в состав АТФ, НАД, НАДФ, флавинов, нуклеиновых кислот и других структур.

Независимо от источника фосфора клетка всегда потребляет этот элемент в виде неорганического фосфата.

Основное количество **серы** обнаруживается в белках, где она сосредоточена в виде сульфгидрильных групп ( $-\text{SH}$ ). Некоторые микроорганизмы потребляют ее из органических источников ( $\text{R}-\text{SH}$ ), другие — из сероводорода или сульфатов.

**Калий** весьма важен для синтеза белка. Если его содержание в клетке прогрессивно уменьшается, то нарушается белковый синтез. Он в виде ионов используется из солей неорганических кислот (чаще из  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  и  $\text{K}_3\text{PO}_4$ ).

**Магний** как кофактор существенен для многих энзимов и для функционирования рибосом. Так, высокие концентрации ионов магния сохраняют *in vitro* интегральность (целостность) бактериальных рибосом. Если же растущие клетки исчерпают катионы магния из среды, то численность их рибосом заметно уменьшается.

Ионы магния необходимы в среде в процессе синтеза ДНК из нуклеотидов дезокси-ряда. Замена магния на марганец сопровождается падением специфичности ДНК-полимеразы, которая начинает катализировать реакции включения в цепь ДНК «посторонних» звеньев — рибонуклеотидов.

**Макроэлементы в виде солей вносят в среду в долях процента, тогда как микроэлементы используют в следовых количествах.** Из числа последних **железо** входит в состав гемопротеидов, негеминовых металлопротеидов (например, гидрогеназы) и некоторых других окислительных ферментов; отдельные микробы (*Serratia marcescens*) включают железо в состав красных пигментов, хотя его функция там мало известна.

**Кобальт** входит в состав глицилглицин-дипептидазы и витамина B<sub>12</sub>.

**Кальций** входит в состав протеиназы и является важным компонентом эндоспор у некоторых бацилл.

**Цинк** является составным компонентом алкогольдегидрогеназы и различных других ферментов, он обнаружен в активном центре обратной транскриптазы, а РНК-полимераза и тимидинкиназа являются цинкзависимыми ферментами.

**Медь** входит в состав фенолоксидаз, аскорбатоксидазы, уратоксидазы и других ферментов. Она содержится в тирозиназе, которая катализирует реакцию образования меланина в темноокрашенных клетках или спорах у некоторых грибов.

**Молибден** важен для фиксации молекулярного азота и восстановления нитратов.

Ионы ряда других элементов выступают активаторами многих ферментов; к этому ряду относят: **марганец, алюминий, барий, кадмий, хлор, йод, хром, никель, цезий, вольфрам** и др., хотя понятно, что эффекты указанных ионов зависят от их концентраций в среде.

В этом плане интересно действие **селена**. Его соли (селениты) могут ферментативно восстанавливаться некоторыми микроорганизмами (***Candida albicans*, *Bac. megaterium***). И в то же время относительно высокие концентрации селенитов и селенатов ингибируют многие бактерии и грибы.

**Микроэлементы** находятся в достаточном количестве в водопроводной воде или в других неорганических солях, используемых для приготовления сред. При этом почти все **17 катионов**, активирующих один или более ферментов, оказываются внесенными в среду. **К их числу относятся: аммоний, калий, натрий, рубидий, цезий, магний, кальций, цинк, кадмий, хром, медь, марганец, железо, кобальт, молибден, никель, алюминий.** Замечено, что металлы с атомным весом выше 55 не активируют деятельность энзимов.

Катионы **ртути** и **серебра** токсичны для большинства известных ферментов. Так называемое олигодинамическое действие некоторых металлов (например, серебра) связано с токсическим эффектом малых катионов. Однако, **эффект других макро- и микроэлементов зависит от их концентрации в среде**, в которой обитают те или иные микроорганизмы. **Свинец** относится к очень слабым ингибиторам роста дрожжей, хотя он и причисляется многими исследователями к элементам олигодинамического действия. Тем не менее, свинец тормозит рост дрожжей в концентрациях, несколько больших, чем 0,04 % (1:2500).

Многие микроорганизмы нуждаются для своего роста и развития в определенных **ростовых факторах**. Эти последние являются органическими веществами, способствующими или поддерживающими рост микроба и которые им не синтезируются. Сюда относят витамины, аминокислоты, инозит, холин, ненасыщенные жирные кислоты, мевалоновую кислоту (предшественник изопреноидных структур), полиамины (спермин, спермидин, например, для некоторых штаммов *Neisseria*, *Pasteurella*), стероиды (для *Mycoplasma*).

Определенные бактерии и нитчатые грибы «отзывчивы» на следовые количества новой группы железосодержащих веществ, названных **феррохромами**, или ферроксаминами, образуемыми многими микроорганизмами. Функция этих веществ пока неизвестна.

Все хемосинтетические организмы нуждаются в источнике энергии в форме **донора водорода**, т. е. в окисляющихся субстратах. Доноры водорода необходимы и фотосинтезирующим организмам для осуществления процесса фотосинтеза.

В окислительно-восстановительных реакциях должны участвовать и **акцепторы водорода**. У аэробов таковым выступает кислород воздуха. У анаэробов акцепторами являются либо неорганические (сульфаты, карбонаты, нитраты), либо органические соединения (например, при брожениях).

Подходящая для роста организма среда должна содержать все необходимые питательные вещества, а также должна быть контролируемой по таким показателям, как pH, температура и аэрация.

В сугубо ориентировочном приближении при составлении сред необходимо использовать: доноры и акцепторы водорода — около 2 г/л, источник азота — около 1 г/л, источник углерода — около 1—2 г/л, макроэлементы (сера, фосфор, магний) — около 50 мг/л каждого, микроэлементы около 0,1—1 мг/л каждого, ростовые факторы: витамины — около 0,1—1 мг/л каждого, аминокислоты, пурины, пиримидины и др.— около 50 мг/л каждого.

Применительно к различным группам микроорганизмов имеются **главные факторы**, позволяющие накопить микробы в культурах при выращивании их на искусственных средах

**Зная особенности обмена веществ культуры-продуцента, можно регулировать качественную и количественную продукцию биологически активного вещества.**

## ***Вопросы для самоконтроля***

- 1. Какие выделяют методы культивирования микроорганизмов?*
- 2. Какие факторы влияют на рост микроорганизмов?*
- 3. Назовите основные факторы, определяющие рост продуцентов в процессе культивирования.*