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:

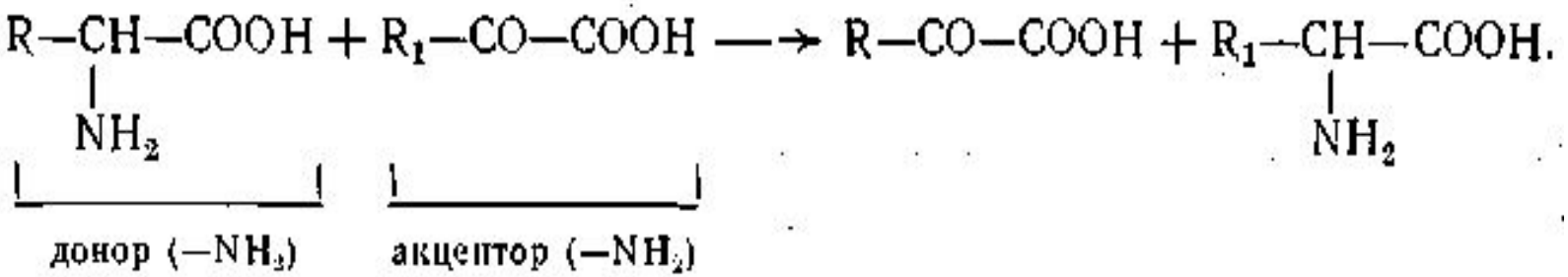
1. источники азота,
2. источники углерода,
3. макро- и микроэлементы,
4. ростовые факторы,
5. доноры и акцепторы водорода.

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:

$$\overset{+5}{NO_3^-},\ \overset{+3}{NO_2^-},\ \overset{0}{N_2},\ \overset{-3}{NH_3},\ R-\overset{-3}{NH_2}.$$

Для использования азота аминокислот существенна реакция трансаминирования или переаминирования:



Большинство микроорганизмов может использовать NH_3 в виде единственного источника азота. В этом случае главной реакцией, посредством которой обеспечивается включение 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.

а) $CH_3-\underset{\underset{NH_2}{|}}{CH}-COOH + H_2O \longrightarrow CH_3-CO-COOH + NH_3 + H_2;$

аланин

б) $CH_3-CO-COOH + H_2O \longrightarrow CH_3-COOH + CO_2 + H_2;$

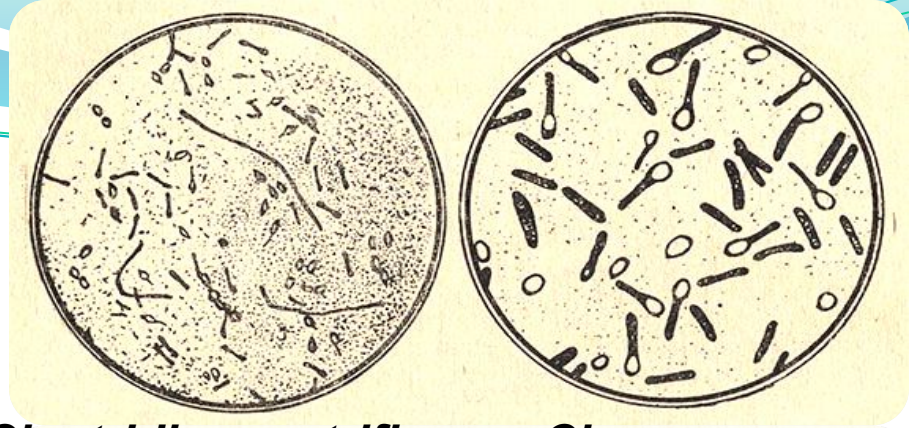
кетопировиноградная кислота

в) $2\underset{\underset{NH_2}{|}}{CH_2}-COOH + 2H_2 \longrightarrow 2CH_3-COOH + 2NH_3$

глицин

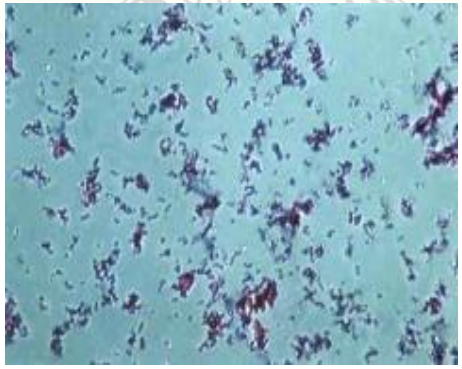
$$CH_3-\underset{\underset{NH_2}{|}}{CH}-COOH + 2\underset{\underset{NH_2}{|}}{CH_2}-COOH + 2H_2O \longrightarrow 3CH_3-COOH + 3NH_3 + CO_2.$$

Ограниченное число микроорганизмов может фиксировать атмосферный азот, превращая его в клетках в **NH_3** (***Rhizobium, Azotobacter, Clostridium* и др.**).

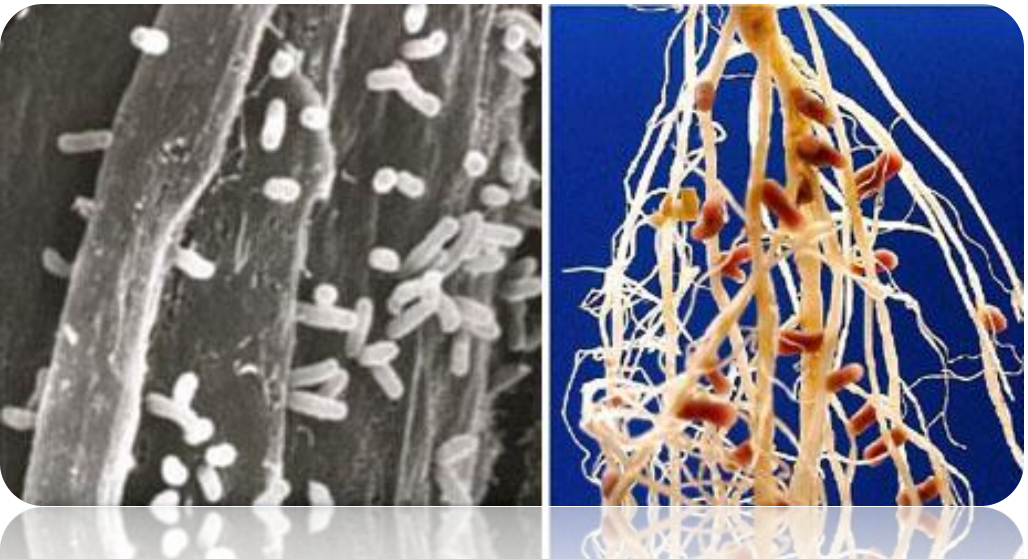


Clostridium putrificum ***Cl. sporogenes***

От этих микроорганизмов зависит жизнь на нашей планете. Известно, что первичным источником белка на Земле являются растения, способные синтезировать его из CO_2, H_2O и неорганических источников азота — нитратов и аммиака.



Azotobacter chroococcum

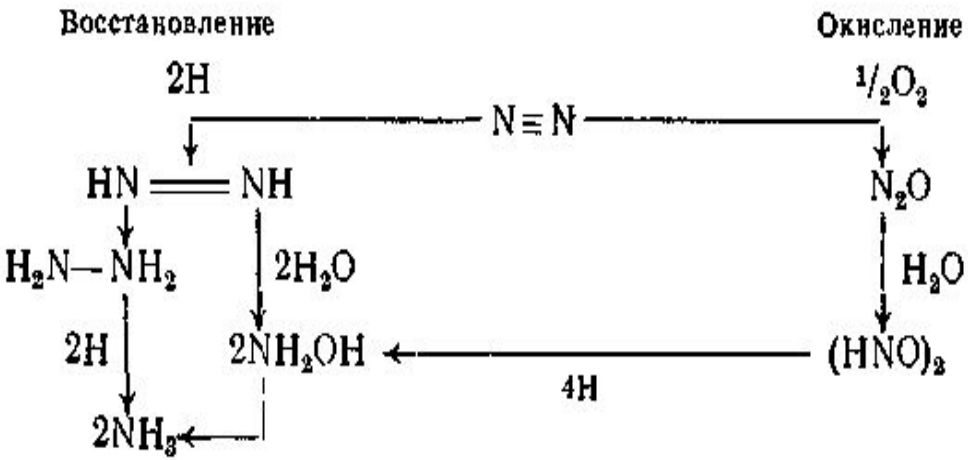


p. Rhizobium

Свободноживущие азотофиксаторы найдены среди аэробов (азотобактеры, микобактерии, вибрионы, спириллы, спирохеты, актиномицеты, дрожжи), анаэробов (клостридии, 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 клостридий; 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 NH3 при участии фермента **нитратредуктазы** (также молибденсодержащий энзим):

$$\overset{+5}{N}O_3^- \left(\overset{+3}{N}O_2^-\right) + 8\vec{e}\ \left(6\vec{e}\right) \longrightarrow \overset{-3}{N}H_3 .$$

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:

$$1)\ 2HNO_2 + O_2 \longrightarrow 2HNO_3 + 35\ \text{ккал};$$

2) автотрофный фотосинтез:

$$2)\ 2H_2S + CO_2 \xrightarrow{\text{свет}} (CH_2O) + H_2O + 2S;$$

3) гетеротрофный хемосинтез:

$$3)\ C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \longrightarrow 6CO_2 + 6H_2O + 688{,}5\ \text{ккал}.$$

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 (—SH). Некоторые микроорганизмы потребляют ее из органических источников (R— 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 K_2HPO_4, KH_2P0_4 и $KзP0_4$).

Магний как кофактор существен 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_{12}.

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 энзимами.

Медь входит в состав фенолоксидаз, аскорбатоксидазы, уратоксидазы и других энзимов. 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 энзимов; 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 потребные 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.