

ПЕРМСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
НАЦИОНАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ

Л. Ю. Нестерова,
А. В. Ахова,
В. Ю. Ушаков

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ БАКТЕРИЙ,
ОДНОКЛЕТОЧНЫХ ЭУКАРИОТ
И ИЗОЛИРОВАННЫХ КЛЕТОК



МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего образования
«ПЕРМСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Л. Ю. Нестерова, А. В. Ахова, В. Ю. Ушаков

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ БАКТЕРИЙ, ОДНОКЛЕТОЧНЫХ ЭУКАРИОТ И ИЗОЛИРОВАННЫХ КЛЕТОК

*Допущено методическим советом
Пермского государственного национального
исследовательского университета в качестве
учебного пособия для студентов, обучающихся
по направлениям подготовки бакалавров
«Биология», «Биотехнология»
и специальности «Фармация»*



Пермь 2024

УДК 579(075.8)

ББК 28.4я73

H561

Нестерова Л. Ю.

H561 Культивирование бактерий, одноклеточных эукариот и изолированных клеток [Электронный ресурс]: учебное пособие / Л. Ю. Нестерова, А. В. Ахова, В. Ю. Ушаков; Пермский государственный национальный исследовательский университет. – Электронные данные. – Пермь, 2024. – 2,27 Мб; 88 с. – Режим доступа: <http://www.psu.ru/files/docs/science/books/uchebnie-posobiya/Nesterova-Ahova-Ushakov-Kultivirovanie-bakterij-odnokletochnyh-eukariot-i-izolirovannyh-kletok.pdf>. – Заглавие с экрана.

ISBN 978-5-7944-4145-1

Учебное пособие посвящено культивированию различных микроорганизмов и клеток растений и животных *in vitro*. Подробно рассмотрены среды, оборудование, приемы культивирования микроорганизмов и изолированных клеток многоклеточных организмов. Представлены теоретические основы и конкретные методики работы с прокариотическими и эукариотическими объектами. Большое внимание уделено методам учета численности и расчета кинетических параметров культур.

Предназначено для студентов вузов, обучающихся по направлениям 06.03.01. Биология, 19.03.01. Биотехнология, 33.05.01. Фармация, изучающих дисциплины: «Микробиология», «Введение в биотехнологию», «Основы биотехнологии растений», «Низшие эукариоты» и другие смежные дисциплины. Пособие направлено на формирование у студентов современных представлений об основных направлениях и возможностях культивирования различных клеток, а также методах и различных системах культивирования.

УДК 579(075.8)

ББК 28.4я73

*Издается по решению ученого совета биологического факультета
Пермского государственного национального исследовательского университета*

Рецензенты: кафедра микробиологии и вирусологии Пермского государственного медицинского университета им. акад. Е. А. Вагнера (рец. – д-р мед. наук, профессор **М. В. Кузнецова**; зав. кафедрой – д-р мед. наук, профессор **Э. С. Горовиц**); зав. лабораторией физиологии и генетики микроорганизмов Института экологии и генетики микроорганизмов – филиала ПФИЦ УрО РАН, д-р биол. наук, профессор **О. Н. Октябрьский**

© ПГНИУ, 2024

ISBN 978-5-7944-4145-1

© Нестерова Л. Ю., Ахова А. В., Ушаков В. Ю., 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	5
1. Культивирование бактерий.....	7
1.1. Микроорганизмы. Особенности микроорганизмов.....	7
1.2. Среда для культивирования микроорганизмов	7
1.3. Размножение и рост микроорганизмов	12
1.4. Параметры для характеристики роста культуры микроорганизмов	14
1.5. Кривые роста и стадии роста культуры микроорганизмов.....	19
1.6. Удельная скорость роста микроорганизмов	22
1.7. Определение длительности лаг-периода.....	24
2. Культивирование эукариотических микроводорослей и фототрофных прокариот.....	26
2.1. Общая характеристика микроводорослей.....	26
2.2. Техника сбора и получение накопительных культур микроводорослей	27
2.3. Метод получения чистых культур микроводорослей	29
2.4. Культивирование хлореллы.....	31
2.5. Культивирование пурпурных и зеленых бактерий.....	33
2.6. Питательные среды для культивирования микроводорослей и фототрофных прокариот.....	34
3. Культивирование протистов.....	37
3.1. Техника сбора и определение количества клеток протистов.....	37
3.1.1. Методы подсчета протист в почвенной суспензии	38
3.2. Методы культивирования отдельных групп протистов.....	40
3.2.1. Культивирование парамеций	41
3.2.2. Культивирование амёб	43
3.2.3. Культивирование автотрофных жгутиконосцев (эвглен)	44
3.3. Среда для культивирования протист	45
3.3.1. Основные питательные среды для инфузорий	45
3.3.2. Основные питательные среды для амёб.....	47

3.4.3. Основные питательные среды для жгутиконосцев	47
3.4.4. Универсальные питательные среды	48
4. Культивирование растительных клеток и тканей	49
4.1. Особенности растений	49
4.2. Виды культур клеток растений.....	50
4.3. Среда и добавки для культивирования клеток и тканей растений	52
4.4. Условия культивирования изолированных клеток и тканей растений ..	53
4.5. Метод получения и культивирования каллусных тканей	54
4.6. Параметры роста культуры клеток растений.....	55
4.7. Области применения культивирования изолированных клеток и тканей растений.....	57
5. Культивирование клеток и тканей животных	59
5.1. Клетки животных как объект культивирования	59
5.2. Классификация культур животных клеток	60
5.3. Среда для культивирования изолированных клеток животных	64
5.4. Условия, приборы и посуда для культивирования изолированных клеток животных	67
5.5. Стадии роста культуры клеток животных	70
5.6. Пассирование культур животных клеток.....	71
5.7. Оценка жизнеспособности клеточной культуры.	73
5.8. Разделение и сортировка клеток.....	75
5.9. Культивирование клеток беспозвоночных	76
5.10. Криоконсервация животных клеток.....	77
Глоссарий	79
Список литературы	81
Приложение 1	84
Приложение 2.....	86
Приложение 3.....	87

ВВЕДЕНИЕ

Выращивание различных биологических объектов в искусственных контролируемых условиях называют культивированием. Объектами культивирования могут быть различные как многоклеточные, так и одноклеточные организмы. Кроме того, существуют методы для культивирования вирусов, а также изолированных клеток многоклеточных организмов. Под термином «культура микроорганизмов» понимают совокупность (популяцию) микроорганизмов, которые выращиваются *in vitro* (в лабораторных условиях вне естественной среды обитания). Культуры микроорганизмов, которые включают организмы одного вида, называют чистыми культурами; культуры микроорганизмов, включающие представителей разных видов, носят название смешанных культур. Культурой клеток называют совокупность клеток, изолированных из многоклеточного организма и выращиваемых *in vitro*.

Микробные и клеточные культуры в настоящее время находят все большее применение в разных областях биологии, медицины, биотехнологии и сельского хозяйства. Они служат удобными моделями для научных исследований, являются объектами для генетической модификации и селекции. Их применение актуально для решения ряда общебиологических задач, таких как взаимодействие клеток со средой, адаптация клеток и организмов к различным условиям, клеточная дифференциация, сохранение генофонда растений и животных и т.п.; медицинских задач, в частности для тестирования биологически активных веществ, изучения злокачественной трансформации, получения и тестирования клеток из различных тканей, диагностики и лечения наследственных заболеваний и др. С точки зрения биотехнологии культуры микроорганизмов и клеток являются продуцентами целевых продуктов и используются в широком спектре производств от вакцин до пластиков.

Для успешного культивирования микроорганизмов и изолированных клеток многоклеточных организмов *in vitro* необходимо соблюдение ключевых условий: в первую очередь наличие питательной среды, которая должна обеспечить рост клеток, оптимальные показатели физических факторов, а также стерильность (асептические условия), которая необходима почти во всех случаях.

В представленном пособии описаны различные методы и приемы создания, выращивания и поддержания культур различных микроорганизмов и изолированных клеток растений и животных. Кроме того, подробно рассматриваются условия культивирования, посуда и оборудование, необходимые для выращивания различных типов клеток. Особое внимание уделено питательным

средам и их отдельным компонентам, которые рассматриваются в связи с особенностями разнообразных микроорганизмов и изолированных клеток. В тексте приведена подробная характеристика фаз роста, а также описаны основные параметры, характеризующие рост культур клеток и микроорганизмов, и методики их оценки. В пособии описаны вспомогательные методы, с помощью которых осуществляется разделение, сортировка, консервация клеток. Подробно изложены современные аспекты применения культур микроорганизмов и изолированных клеток растений и животных в различных отраслях практической деятельности человека.

1. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ БАКТЕРИЙ

1.1. Микроорганизмы. Особенности микроорганизмов

К микроорганизмам относят представителей разных таксономических групп, основной отличительной чертой которых является размер (как правило, микроорганизмы невозможно увидеть невооруженным глазом). Микроорганизмы имеют как клеточное, так и неклеточное (Вирусы) строение. По типу строения клеток микроорганизмы могут быть как прокариотическими (Бактерии, Археи), так и эукариотическими (Эукариоты). К последним относятся грибы, простейшие и водоросли (в современной литературе часто называемые микроскопическими эукариотными фотосинтетиками). Большинство объектов микробиологии являются одноклеточными, но также встречаются мицелиальные и многоклеточные формы (актиномицеты, микроскопические грибы, цианобактерии).

1.2. Среда для культивирования микроорганизмов

Питательная среда – это субстрат, содержащий все необходимые для роста организмов вещества и используемый для их выращивания в лабораторных и производственных условиях.

По составу питательные среды подразделяют следующим образом:

1. Синтетические – водные растворы химически чистых соединений в известных концентрациях. Состав этих сред полностью известен, но, как правило, они пригодны для выращивания узкого спектра нетребовательных к питанию микроорганизмов.

2. Натуральные (естественные) – изготавливаются на основе продуктов растительного или животного происхождения. Химический состав таких сред сложен, точно не определен и не постоянен, но их можно применять для выращивания разнообразных микроорганизмов, в том числе неспособных самостоятельно синтезировать некоторые биологические молекулы. К натуральным средам и их компонентам относят экстракты и отвары, полученные из организмов различных биологических объектов – животных, растений и грибов, растительные соки, солодовое сусло, обезжиренное и гидролизованное молоко, яйца, животные ткани, кровь и сыворотка крови и т.п. Кроме того, в качестве среды могут использоваться эмбрионы живых организмов. В частности, для культивирования вирусов применяют куриные эмбрионы.

3. Полусинтетические среды – представляют собой смесь из химически чистых соединений в известной концентрации и компонентов с неопределенным составом биологического происхождения. Полусинтетическая среда может

представлять собой синтетическую среду с добавкой незначительного количества компонента натуральной среды в качестве источника факторов роста. В других случаях основой полусинтетической среды может являться натуральная среда с добавкой одного или нескольких химически чистых соединений, необходимых для роста определенной группы микроорганизмов. Любые полусинтетические среды являются средами с неопределенным составом.

По консистенции среды подразделяют на жидкие, полужидкие, плотные и сыпучие. Полужидкие и плотные среды готовят на основе жидких питательных сред за счет добавления гелеобразователей, которые могут быть органическими (агар, желатин, каррагенан) или неорганическими (силикагель). Наиболее часто используют агар, при добавке которого в концентрации 0,3–0,7 % можно получить полужидкие среды, а при внесении 1,5–2 % – плотные среды. Введение в состав среды 1,5–2 % силикагеля, 2 % каррагенана или 17–20 % желатина также позволяет получить плотные среды. Минеральные среды на силикагеле используют для выделения автотрофных микроорганизмов, поскольку такие среды не содержат органического источника углерода и развитие на них гетеротрофных микроорганизмов невозможно. Сыпучие среды представляют собой массу измельченного и увлажненного сырья разного происхождения.

По целевому назначению среды для культивирования подразделяют следующим образом:

1. Основные – применяются для выращивания широкого спектра микроорганизмов с целью наработки биомассы. Данные среды являются основой для приготовления сред для культивирования отдельных групп микроорганизмов и сред специального назначения.

2. Элективные – применяются для выделения и культивирования определенных групп микроорганизмов. Состав такой среды обеспечивает рост конкретных групп микроорганизмов и подавляет рост других групп (сопутствующей микробиоты). В качестве ингибиторов роста сопутствующей биоты в состав среды вводят антибактериальные препараты, фунгициды, красители, желчные кислоты и т.п. Добавка в среду желчных кислот ингибирует рост многих грамположительных организмов и не препятствует развитию кишечных и колиформных бактерий. Бриллиантовый зеленый активен в отношении грамположительных микроорганизмов, присутствие висмута подавляет рост грамотрицательных организмов, за исключением сальмонелл. Получить элективные среды можно также за счет изменения их осмолярности (например, за счет изменения концентрации хлорида натрия) и рН. Например, для выделения холерного вибриона применяют щелочной агар (рН = 8...8,5), а среды, содержащие 7,5 % хлорида натрия, – для выделения стафилококков.

3. Дифференциально-диагностические – предназначены для идентификации и выделения определенных групп микроорганизмов на основании особенностей их обмена веществ. Часто такие среды содержат красители и индикаторы, которые изменяют свой цвет в ответ на изменение свойств среды (в результате жизнедеятельности микроорганизмов). Например, рН.

Многие специальные среды сочетают в себе свойства селективных и диагностических сред. Например, среда МакКонки, в состав которой входят питательные вещества, соли желчных кислот, хлорид натрия, кристаллический фиолетовый и нейтральный красный, предназначена для выделения и дифференциации грамотрицательных бактерий кишечной группы. Наличие кристаллического фиолетового и желчных кислот подавляет рост грамположительных микроорганизмов, что обеспечивает селективные свойства среды. Дифференцирующие свойства среды основаны на определении наличия у микроорганизмов способности разлагать лактозу. В процессе ферментации лактозы происходит закисление среды, а при снижении рН среды ниже 6,8 цвет нейтрального красного изменяется с желтого (в щелочной среде) на красный. За счет этого лактозоферментирующие бактерии образуют на агаре МакКонки розовые и красные колонии, а колонии бактерий, неспособных разлагать лактозу, остаются неокрашенными.

Универсальной питательной среды, пригодной для роста любого вида микроорганизмов, не существует, поскольку метаболические процессы разных групп микроорганизмов различны.

Автотрофные микроорганизмы особо требовательны к наличию в среде углекислого газа. Для обеспечения достаточного количества углекислоты в состав среды вводят карбонат кальция, гидрокарбонат кальция и другие карбонаты. Также с этой целью через среду продувают воздух, обогащенный углекислотой (1–5 %).

Гетеротрофные организмы развиваются на средах, содержащих источники углерода в виде органических соединений, которые чаще всего являются также источником энергии. В качестве источника углерода и энергии разные микроорганизмы способны использовать разнообразные соединения: углеводы, спирты, органические кислоты, ароматические соединения, углеводороды. В лабораторной практике в качестве основного источника углерода и энергии для культивирования различных микроорганизмов применяют глюкозу. Некоторые микроорганизмы не способны использовать глюкозу в качестве единственного источника углерода, поскольку у них отсутствуют метаболические пути синтеза определенных соединений, необходимых для протекания их жизнедеятельности. Такие соединения (факторы роста) должны быть добавлены в среду культивирования в готовом виде.

Некоторые организмы (азотфиксаторы) способны использовать молекулярный азот воздуха. Для выращивания большинства микроорганизмов в среду необходимо добавлять дополнительные источники азота – азотсодержащие органические соединения, соли аммония (чаще сульфаты и хлориды) или нитраты (чаще натрия или калия).

Потребность микроорганизмов в сере удовлетворяется внесением в среду сульфатов, фосфора – добавкой солей фосфорной кислоты. Ионы металлов вводятся в среду в виде солей. В частности, многие среды содержат в составе сульфат магния, хлорид натрия, хлорид или карбонат кальция.

Для выращивания микроорганизмов, неспособных синтезировать некоторые аминокислоты, в питательную среду добавляют гидролизаты белка животного или растительного происхождения. Источником белка служат мясо, рыба, молоко, семена сои, подсолнечника и кукурузы. В лабораторной практике в качестве источника аминокислот часто применяют казаминовые кислоты – смесь аминокислот и коротких пептидов, полученных в результате кислотного гидролиза белка молока казеина. В качестве источника аминокислот также используют триптон – гидролизат белка казеина, полученный за счет обработки протеолитическим ферментом трипсином. При обработке казеина комплексом протеолитических ферментов поджелудочной железы или ее тканями получают пептон казеина, который также может быть использован в качестве компонента питательных сред.

Для удовлетворения потребностей микроорганизмов в других веществах (азотистые основания, витамины, жирные кислоты, микроэлементы) в состав среды вводят экстракты и гидролизаты биомассы. Довольно часто применяют дрожжевые и кукурузные экстракты и перевары (гидролизаты) тканей животных. При обработке тканей протеолитическими ферментами получают пептоны, при обработке отдельно ферментом трипсином – триптоны.

Микроскопические грибы, в том числе дрожжи, можно выращивать как на богатых средах, состоящих из переваров и экстрактов (риса, картофеля, дрожжей), с добавлением источника углерода и энергии, так и на минимальных средах, состоящих из неорганических соединений, также с добавкой органического источника углерода. Чаще всего в качестве источника углерода и энергии в питательную среду для выращивания дрожжей добавляют глюкозу (декстрозу). Также дрожжи могут использовать другие гексозы и пентозы, а в аэробных условиях источником углерода могут являться спирты и органические кислоты. Универсальным источником азота для дрожжей являются соли аммония, хотя некоторые дрожжи способны использовать нитраты (дрожжи рода *Saccharomyces* нитраты ассимилировать не способны). Наиболее подходящими для роста большинства дрожжей являются среды с рН ниже нейтрального значения (рН =

4...6), щелочные условия среды ($\text{pH} \geq 8$) ингибируют рост этих микроорганизмов. Среди синтетических сред наиболее часто используется среда Чапека и ее модификации. Среда Чапека представляет собой водный раствор неорганических солей, в том числе нитрата натрия, с добавлением глюкозы или сахарозы и используется для выращивания микроскопических грибов, способных потреблять неорганический азот. Из сред неизвестного состава для культивирования грибов часто применяют среду Сабуро, в состав которой входят пептон животной ткани, гидролизат казеина и глюкоза.

Прокариотические микроорганизмы обладают наиболее широким разнообразием возможных путей энергетического и конструктивного обменов. Свободно живущие прокариоты, как правило, способны расти на средах простого состава, симбионтные (паразитические) формы нуждаются в присутствии в составе среды различных факторов роста. Наиболее универсальной средой для культивирования прокариотических микроорганизмов считаются мясопептонные бульоны, в частности среда ГРМ, состоящая из пептона животных тканей (5 г/л), мясного экстракта (1,5 г/л), дрожжевого экстракта (1,5 г/л) и хлорида натрия (5 г/л). Другим примером является среда LB, представляющая смесь растворенных в воде триптона (10 г/л), дрожжевого экстракта (5 г/л) и хлорида натрия (0,5–10 г/л). Концентрация хлорида натрия в среде зависит от группы микроорганизмов, например, энтеробактерии культивируют в присутствии 10 г/л соли.

Для выращивания кишечной палочки (*Escherichia coli*) и некоторых других микроорганизмов в лабораторной практике часто используют минеральную среду М9 с добавкой глюкозы (прил. 2).

Специально для выращивания актиномицетов разработана среда *Actinomycetes broth*, состоящая из настоя мышцы бычьего сердца, гидролизата казеина, дрожжевого экстракта, глюкозы, крахмала и неорганических солей. Также для культивирования актиномицетов применяют среды, похожие по составу на среду Чапека или среду Сабуро с добавлением мальтозы. Для культивирования актиномицетов часто используют глицерин в качестве источника углерода и энергии, а также различные углеводы и органические кислоты.

Культивирование цианобактерий и микроскопических водорослей, которые являются автотрофами, проводят на средах, состоящих из неорганических солей, удовлетворяющих потребности организмов в макроэлементах и микроэлементах. Среди цианобактерий встречаются азотфиксаторы, не нуждающиеся в дополнительных источниках азота в среде. В некоторых случаях в состав среды могут добавляться пептон, глюкоза, дрожжевой экстракт. Для культивирования микроскопических фотосинтетиков часто используют среду Болда (BBM), среду Дрю, среду Бристоль, среду Чу10.

1.3. Размножение и рост микроорганизмов

Способность к росту является одним из базовых свойств живой материи. Рост отдельной клетки или организма связан с увеличением размеров. Термин «рост» также применим к популяции организмов и характеризует изменение количества особей. Из-за малых размеров микроорганизмов сложно отследить изменение параметров отдельного индивида. Более простой и имеющей важное практическое значение задачей является оценка роста популяции / культуры микроорганизмов.

В обычных условиях клетки микроорганизмов размножаются путем деления материнской клетки на две дочерние (прокариотные микроорганизмы размножаются путем прямого бинарного деления, эукариотные – митоза). В оптимальных условиях время, необходимое для протекания процесса деления (удвоения исходного количества клеток), t_d является постоянной для определенного биологического вида величиной.

Принимая во внимание эти два факта, отметим, что по истечении времени $t = t_d$ от начального момента времени t_0 количество клеток N будет в два раза больше по сравнению с количеством клеток в начальный момент времени N_0 . После каждого последующего деления или, другими словами, при каждой последующей генерации количество клеток будет удваиваться (рис. 1).

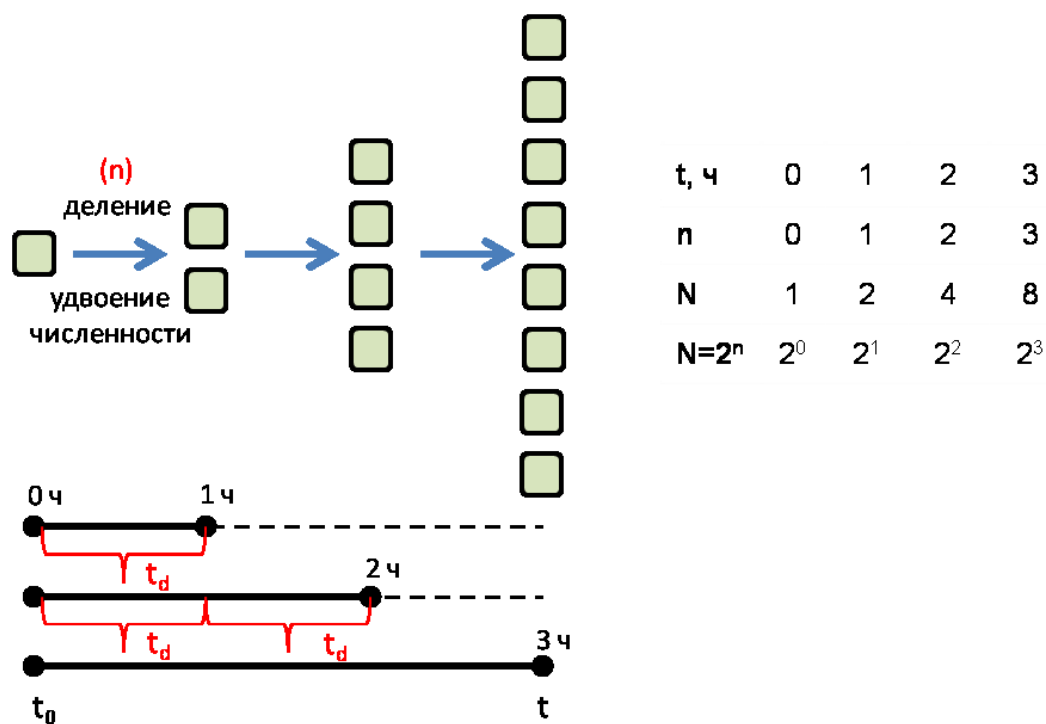


Рис. 1. Схема роста культуры клеток: N – количество клеток в культуре; n – количество делений / генераций; t – общее время культивирования; t_0 – время начала культивирования; t_d – время удвоения количества клеток / время генерации

Количество делений или новых генераций, которые состоялись за определенный интервал времени, обозначают символом n (см. рис. 1).

$$N = 2^n. \quad (1)$$

Поскольку время удвоения при оптимальных условиях культивирования является постоянной величиной, за определенный интервал времени может произойти определенное количество делений:

$$n = t/t_d. \quad (2)$$

Рост культуры может стартовать с любого произвольного количества клеток, поэтому уравнение (1) будет иметь вид

$$N = N_0 \cdot 2^{t/t_d}. \quad (3)$$

В биологических науках для описания подобных зависимостей принято использовать экспоненциальные функции с основанием e ($e = 2,718\dots$). Представив число 2 как $2 = e^{\ln 2}$, получим уравнение (3) в следующей форме:

$$N = N_0(e^{\ln 2})^{t/t_d} = N_0 e^{(\ln 2/t_d)t}. \quad (4)$$

Поскольку время удвоения в условиях нелимитированного роста является видоспецифичной, фиксированной величиной, можно ввести константу μ :

$$\mu = \ln 2/t_d = 0,693/t_d. \quad (5)$$

Константа μ носит название *удельной скорости роста*, измеряется в единицах времени в -1 -й степени (мин^{-1} , ч^{-1} и т.п.) и применима для культур, растущих в оптимальных условиях и характеризующихся экспоненциальным ростом.

Введение данной константы позволяет получить уравнение роста (3) в следующей форме:

$$N = N_0 e^{\mu t}. \quad (6)$$

Математически обоснованное выведение уравнений, описывающих рост культуры микроорганизмов, можно найти в рекомендованных источниках информации.

1.4. Параметры для характеристики роста культуры микроорганизмов

Рост культуры микроорганизмов представляет собой увеличение количества клеток во времени. Следовательно, для оценки роста необходимо определить численность клеток в культуре в момент начала наблюдения (t_0) и в определенные последующие моменты времени ($t_1, t_2...$). Помимо этого, рост культуры может характеризоваться изменением ее оптической плотности, биомассы, содержания белка, содержания углерода, количества колониеобразующих единиц и т.п.

На практике часто невозможно подсчитать число клеток N (или определить другие параметры, характеризующие рост) в общем объеме культуры V , поэтому из культуры отбирается небольшой объем ($V_{\text{проба}}$), в котором определяется количество клеток ($N_{\text{проба}}$), и принимается, что

$$N_{\text{проба}}/V_{\text{проба}} = N/V. \quad (7)$$

Количество клеток, приходящееся на единицу объема, отражает концентрацию клеток в культуре или, другими словами, **плотность культуры**. Аналогичным образом могут быть измерены концентрация биомассы, концентрация белка, концентрация углерода и т.п.

Прямой подсчет количества клеток

Методы прямого визуального подсчета позволяют наиболее точно определить число микроорганизмов в культуре, а также дают возможность получить информацию о размерах и морфологии клеток. Дополнительное окрашивание специальными красителями позволяет определить количество живых клеток в культуре или количество клеток в определенной фазе клеточного цикла (для эукариотных микроорганизмов).

Подсчет клеток микроорганизмов производят под микроскопом в специальных счетных камерах (Горяева, Бюркера, Тома – Цейсса), в фиксированных микробиологических мазках или на мембранных фильтрах.

Наиболее часто для подсчета количества микробных клеток в заданном объеме жидкости применяют камеру Горяева (рис. 2).

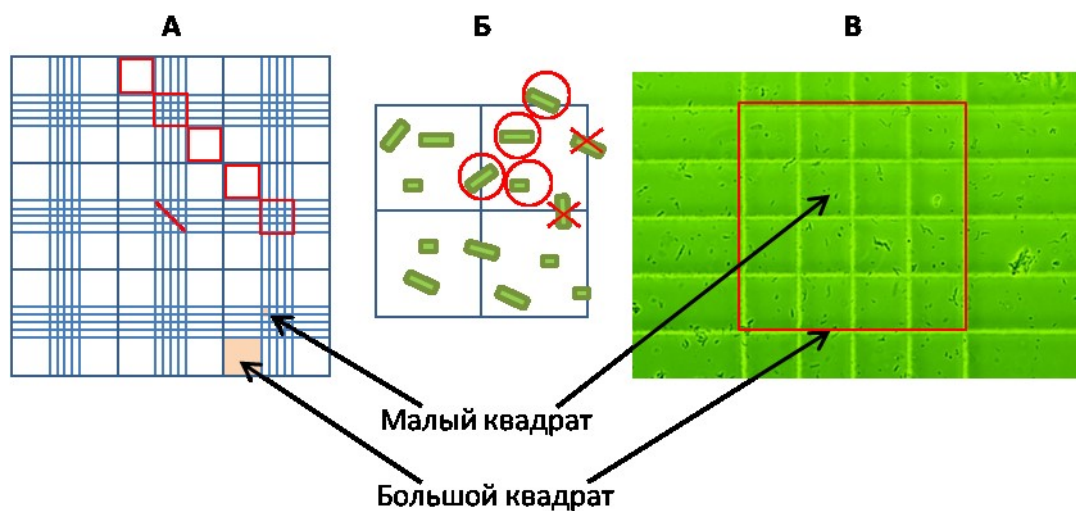


Рис. 2. Подсчет количества клеток с применением камеры Горяева: А – схема строения сетки камеры Горяева; Б – правило учета клеток в пределах квадрата камеры Горяева; В – микрофотография клеток *Mycobacterium smegmatis* в камере Горяева (фото И. В. Цыганова)

Камера Горяева представляет собой предметное стекло с углублениями и нанесенными линиями сетки. Линии сетки образуют большие и малые квадраты. Большие квадраты располагаются в 15 рядов по 15 штук и имеют размеры $0,2 \times 0,2$ мм. Двадцать пять квадратов разделены на 16 малых квадратов, размер которых составляет $0,05 \times 0,05$ мм. Объем жидкости в пределах большого квадрата равен $0,004$ мкл (мм^3), малого – $0,00025$ мкл. Камеру накрывают покровным стеклом, аккуратно притирают его и заполняют камеру суспензией микроорганизмов. Под микроскопом считают количество клеток в не менее чем пяти больших квадратах (обычно в пяти больших квадратах, расположенных по диагонали). Подсчитывается количество всех клеток, расположенных в квадрате, а также клеток, пересекающих линии левой и верхней границ. Затем рассчитывается количество клеток в 1 мл жидкости по формуле

$$X = (a/N/4)10^6, \quad (8)$$

где X – концентрация клеток, клеток/мл; a – количество клеток в обчисленных квадратах; N – количество квадратов; 4 и 10^6 – коэффициенты для пересчета на 1 мл.

Измерение оптической плотности культуры

Плотность культуры микроорганизмов можно оценить по степени ее мутности, измерив оптическую плотность (ОП), которая, как правило, пропорциональна количеству клеток в культуре.

Для измерения оптической плотности суспензий клеток используют фотоэлектроколориметры и (спектро)фотометры. Также для оценки плотности культуры применяют метод визуального сравнения ее мутности со стандартными образцами мутности. Применительно к суспензиям микроорганизмов наиболее часто используют международные стандартные образцы (СО) мутности Всемирной организации здравоохранения в международных единицах (МЕ) мутности и стандарты мутности по МакФарланду.

Следует учитывать, что интенсивность светорассеяния и, следовательно, оптическая плотность культуры зависят от длины волны света. Можно выбрать любую длину волны, но одинаковая длина волны должна быть использована для всех связанных измерений. Обычно для неокрашенных микроорганизмов выбирают длину волны в диапазоне 540–630 нм. Длина волны, при которой проводились измерения, должна быть указана в виде нижнего индекса (например, ОП₆₀₀).

Поскольку задачей является измерение ОП клеток, следует исключить любое поглощение света, вызванное средой. Если цвет окрашенной среды не изменяется в процессе культивирования, стерильную среду можно использовать в качестве нулевого контроля (фона).

Важно знать, что прямая линейная зависимость ОП от плотности культуры наблюдается на определенном интервале значений. Считается, что прямая зависимость данных показателей наблюдается до $ОП \leq 0,4$ (данная граница может изменяться в зависимости от объекта и должна быть определена в предварительных экспериментах). Соответственно, пробы с более высокой плотностью нуждаются в дополнительном разведении перед измерением. В качестве разбавителя можно использовать стерильную среду культивирования или физраствор (раствор с оптимальной для данного объекта осмолярностью). Фактор разбавления (d) должен быть зафиксирован в процессе ведения протокола эксперимента и учтен при вычислении значений ОП.

Изменение оптической плотности культуры во времени может быть использовано для учета роста микроорганизмов и расчета кинетических параметров.

Кроме того, измерив оптическую плотность культуры, можно рассчитать количество клеток или концентрацию биомассы, зная, как взаимосвязаны данные параметры. Можно построить собственную калибровочную кривую, отражающую зависимость концентрации клеток, КОЕ или биомассы от оптической плотности культуры, или воспользоваться известными данными. В частности, суспензия клеток, мутность которой соответствует СО 10 МЕ мутности, содержит приблизительно $0,93 \cdot 10^9$ клеток энтеробактерий в 1 мл, $2,2 \cdot 10^9$ клеток хо-

лерного вибриона в 1 мл, $11 \cdot 10^9$ клеток бактерий коклюшной группы в 1 мл. Оценка плотности суспензии бактериальных клеток по шкале МакФарланда представлена в табл. 1.

Таблица 1

Соответствие плотности бактериальной культуры
стандартам мутности по МакФарланду

Значение по шкале МакФарланда	КОЕ/мл	ОП ₆₂₅	ОП ₆₀₀
0,5	$1,5 \cdot 10^8$	0,08–0,10	0,063
1	$3 \cdot 10^8$	–	0,123
2	$6 \cdot 10^8$	–	0,242
3	$9 \cdot 10^8$	–	0,431
4	$1,2 \cdot 10^9$	–	0,653
5	$1,5 \cdot 10^9$	–	0,867

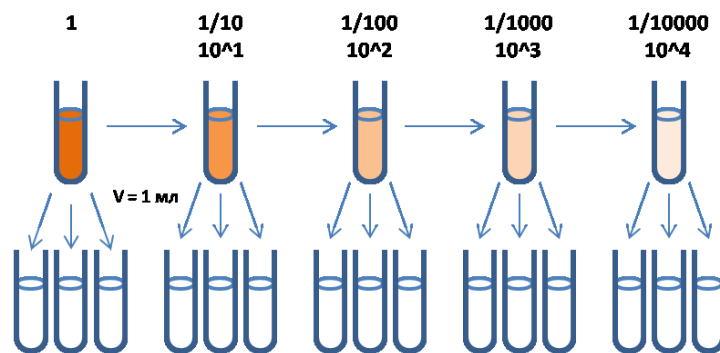
Определение количества колониеобразующих единиц

Количество колониеобразующих единиц (КОЕ) определяют путем высева небольших объемов культуры в/на твердые питательные среды в чашках Петри, инкубации и подсчета сформировавшихся колоний. Считается, что каждая отдельная колония является результатом размножения одной жизнеспособной клетки. Зная объем культуры, нанесенной на поверхность агара, и количество образовавшихся колоний, рассчитывают количество КОЕ на единицу объема (например, КОЕ/мл культуры). Культуры с высокой плотностью нуждаются в предварительном разведении в стерильной питательной среде или физрастворе. Фактор разбавления должен быть учтен при вычислении концентрации КОЕ в культуре. Суспензии клеток с низкой плотностью требуют предварительного концентрирования. Например, для этих целей определен объем суспензии клеток фильтруют через мембранный фильтр (размер пор 0,22 или 0,45 мкм), который затем помещают на поверхность твердой питательной среды. После инкубации в оптимальных для исследуемых микроорганизмов условиях подсчитывают сформировавшиеся на фильтре колонии. Для увеличения контрастности фильтр может быть окрашен (например, 0,01%-ным водным раствором оксалата малахитового в течение 8–10 с). Количество колоний будет соответствовать количеству КОЕ в объеме фильтрованной суспензии, что позволяет вычислить концентрацию КОЕ в определенных единицах объема, например, в 1 л.

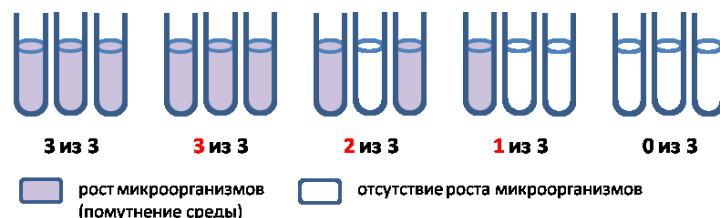
Количество колониеобразующих единиц не равно общему количеству клеток в культуре, а отражает число клеток, способных к размножению (образованию скоплений клеток – колоний). Как правило, количество КОЕ в активно растущей культуре пропорционально общему числу клеток.

Определить количество клеток, способных к размножению, можно также методом предельных разведений (рис. 3, прил. 1). Этот метод позволяет оценить количество жизнеспособных клеток в культуре микроорганизмов, неспособных образовывать колонии на твердых средах. Для определения количества жизнеспособных клеток этим методом готовят ряд последовательных разведений культуры и определенный объем полученных суспензий вносят в пробирки, содержащие питательную среду. Суспензией каждого разведения засевают 3–5 пробирок (повторности). После инкубации определяют пробирки, в которых наблюдается рост микроорганизмов (помутнение среды). Далее, используя таблицу МакКреди, вычисляют наиболее вероятное количество микроорганизмов в пробирках. Для этого составляют «числовую характеристику», которая состоит из трех цифр. Первая цифра представляет число пробирок последнего разведения, в котором еще обнаруживается рост микроорганизмов во всех засеянных пробирках (повторностях). Следующие две цифры соответствуют числу пробирок двух последующих разведений, в которых наблюдается рост. Если рост микроорганизмов обнаружен более чем в двух последующих разведениях, число этих пробирок прибавляется к последней цифре. По числовой характеристике в таблице МакКреди находят вероятное число микроорганизмов в объеме соответствующего разведения. Умножив значение концентрации клеток на коэффициент разведения, получают концентрацию клеток в культуре (см. рис. 3, прил. 1).

1. Получение кратных разведений исходной культуры микроорганизмов и перенос определенного объема (V) полученных суспензий в пробирки с питательной средой



2. Инкубация засеянных пробирок и последующий анализ результатов



Числовая характеристика – 321

Вероятное число микроорганизмов в пробирке по таблице Мак-Креди = 15 (разведение 1/10)

Концентрация микроорганизмов в пробе = $(15 \times 10^1)/V = 1,5 \times 10^2$ клеток/мл

Рис. 3. Определение количества микроорганизмов методом предельных разведений

Определение биомассы

Биомасса является интегральным показателем, учитывающим изменение в культуре количества микробных клеток и размеров (массы) отдельных клеток. Соотношение двух этих параметров в общем значении биомассы культуры зависит от вида микроорганизма и характера его роста. Прирост биомассы одноклеточных прокариотных микроорганизмов, имеющих сравнительно малые размеры тела, в основном связан с увеличением их количества в культуре. Для крупных, в особенности мицелиальных, микроорганизмов доля увеличения массы отдельных клеток в общем приросте биомассы более значительна.

Измеряют вес влажной биомассы и сухой биомассы. Чтобы измерить вес микроорганизмов, их необходимо отделить от компонентов среды. Для этого культуру фильтруют или осаждают центрифугированием и осадок клеток промывают водой или физраствором. Для определения веса абсолютно сухой биомассы отделенные от среды культивирования микроорганизмы высушивают при температуре 105 °С.

Концентрация биомассы в микробной культуре (X) представляет собой общий вес микроорганизмов в пересчете на определенный объем культуры (единицы измерения: г/л, мг/мл).

Измерение концентрации биомассы позволяет рассчитать продуктивность культуры по биомассе (P) за определенный период времени:

$$P = (X_1 - X_0) / (t_1 - t_0), \quad (9)$$

где P – продуктивность; X_1 – концентрация биомассы в момент времени t_1 , г/л; X_0 – концентрация биомассы в начале культивирования, г/л; t_1 – произвольный момент времени; t_0 – время начала культивирования.

В зависимости от задач может быть измерена концентрация отдельных составляющих биомассы, таких как белок, углерод, азот.

1.5. Кривые роста и стадии роста культуры микроорганизмов

Рост культуры микроорганизмов отражает график зависимости изменения плотности культуры (зависимая переменная, ось ординат) от времени (независимая переменная, ось абсцисс). Данный график обозначают термином «кривая роста».

График роста микроорганизмов может быть представлен в линейном или полулогарифмическом масштабе (рис. 4). Для построения полулогарифмического графика по оси ординат откладывают логарифмы величины (например, значений оптической плотности), а по оси абсцисс – значения времени в линей-

ном масштабе. График в полупологарифмической форме позволяет представить экспоненциальную функцию в виде прямой, что является необходимым для дальнейшего анализа и расчета кинетических параметров.

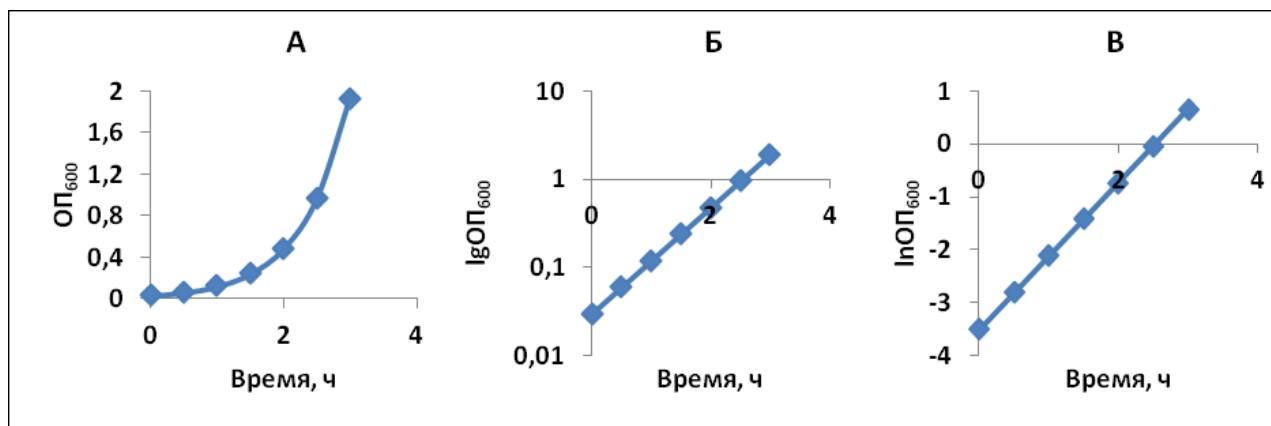


Рис. 4. График экспоненциального роста микроорганизмов в линейном (А) и полупологарифмическом масштабе (Б, В)

Экспоненциальное увеличение количества микроорганизмов в популяции наблюдается лишь в оптимальных условиях существования. При отклонении от оптимума скорость роста микроорганизмов может замедляться или рост может полностью останавливаться. Замедление и остановка роста может быть обусловлена истощением питательных субстратов, свободного пространства, изменением физико-химических параметров среды (температуры, рН, осмолярности), накоплением в среде ингибирующих рост веществ (продуктов метаболизма), накоплением сигнальных молекул до критических концентраций (например, аутоиндукторов системы кворум-сенсинг).

В процессе периодического культивирования рано или поздно условия существования отклоняются от оптимальных показателей, что приводит к замедлению скорости роста и далее к его остановке и последующему снижению численности популяции. После переноса микроорганизмов в новую питательную среду культура проходит несколько последовательных стадий развития: лаг-фазу (фазу задержки роста), экспоненциальную (логарифмическую) фазу, стационарную фазу и фазу отмирания (рис. 5). Помимо четырех основных фаз роста также выделяют фазу ускорения роста (положительного ускорения) при переходе от лаг-фазы к стадии экспоненциального роста и фазу замедления роста (отрицательного ускорения) при переходе из экспоненциальной в стационарную фазу.

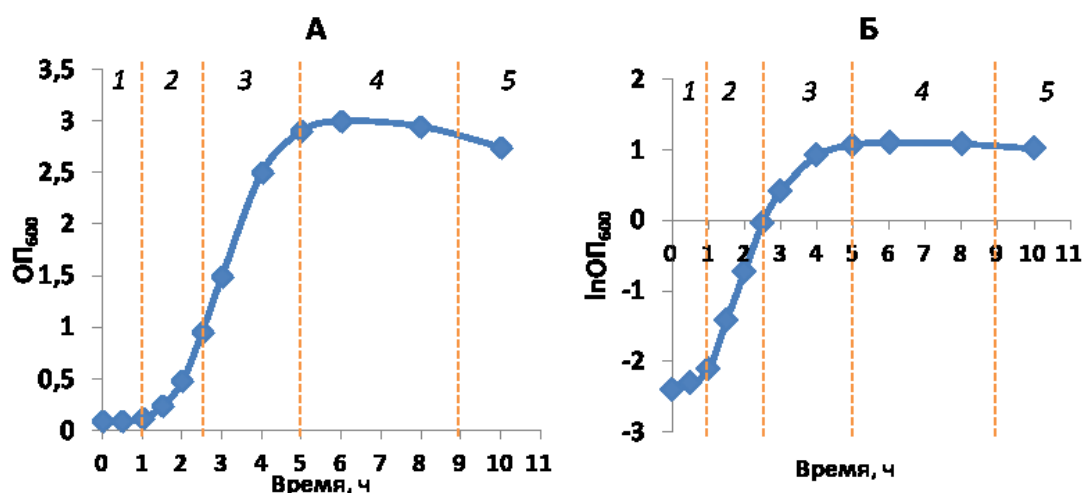


Рис. 5. Кривая роста периодической культуры микроорганизмов в линейном (А) и полулогарифмическом масштабе (Б): 1 – лаг-фаза; 2 – фаза экспоненциального роста; 3 – фаза замедления роста; 4 – стационарная фаза; 5 – фаза отмирания

Лаг-фаза – период между посевом микроорганизмов в новую среду и началом размножения. В этот период скорость роста популяции равна нулю. На данной стадии происходит адаптация микроорганизмов к новым условиям среды, меняется профиль экспрессии генов, увеличивается количество РНК и рибосом, синтезируются необходимые белки, в том числе ферменты для утилизации имеющихся в среде источников питательных веществ и компоненты системы репликации. Продолжительность лаг-фазы составляет от нескольких минут до нескольких часов и зависит от состояния инокулюма, состава среды и других факторов. В частности, клетки, находящиеся в стадии экспоненциального роста, будут быстрее переходить к росту после переноса на свежую среду по сравнению с клетками из стационарной фазы роста. Чем ближе по составу среды, используемые при пересевах, тем короче будет лаг-фаза, поскольку клетки изначально будут содержать необходимые для существования в этих условиях белки.

Экспоненциальная фаза роста характеризуется максимальной постоянной скоростью деления клеток. При экспоненциальном росте удвоение биомассы / количества клеток происходит за равные временные интервалы. Клетки характеризуются высокой метаболической активностью и относительно низкой устойчивостью к действию неблагоприятных факторов среды, в том числе дезинфектантов и антибактериальных препаратов.

Со временем скорость образования новых клеток снижается, и прирост биомассы замедляется. Когда количество клеток перестает увеличиваться, культура переходит в **стационарную фазу** роста. В стационарной фазе скорость роста культуры равна нулю, а количество клеток / биомассы максимально и постоянно. Клетки в стационарной фазе роста относительно более устойчивы

к действию неблагоприятных факторов среды. Если во время активного роста клетки синтезируют первичные метаболиты – вещества, необходимые для собственного роста, развития и размножения, в стационарной фазе роста синтезируются вещества, выполняющие специальные функции, – вторичные метаболиты (антибиотики, пигменты, алкалоиды).

Фаза отмирания (гибели) наступает, когда количество живых клеток в культуре начинает снижаться. При этом количество биомассы может оставаться на постоянном уровне.

В некоторых случаях наблюдается явление двуциклического роста – диауксия (рис. 6).

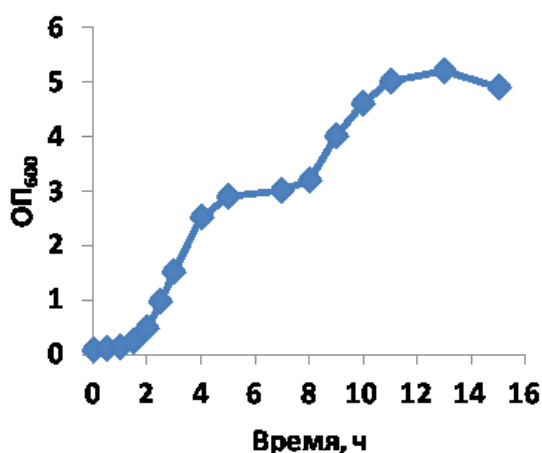


Рис. 6. Кривая двустадийного роста культуры микроорганизмов (диауксия)

В данном случае происходит повторение последовательности смены фаз роста при культивировании в одной и той же среде. Как правило, такая среда содержит несколько альтернативных источников питания, и диауксия обусловлена поочередным их использованием. Вторая лаг-фаза наступает после исчерпания первого субстрата и нужна для индукции ферментов для утилизации второго питательного субстрата.

1.6. Удельная скорость роста микроорганизмов

Скорость роста культуры микроорганизмов – изменение количества клеток / биомассы за определенный интервал времени. Абсолютную скорость роста можно вычислить как

$$\Delta N / \Delta t = (N_2 - N_1) / (t_2 - t_1). \quad (10)$$

Количество вновь образующихся клеток (ΔN) за определенный момент времени (Δt) пропорционально имеющемуся (фактическому) количеству клеток в культуре (N):

$$\Delta N / \Delta t \sim N. \quad (11)$$

Если скорость роста постоянна, можно ввести в выражение упомянутую выше константу удельной скорости роста (μ). Кроме того, вновь образующиеся клетки прибавляются к общему числу клеток популяции, что приводит к постоянному изменению фактической плотности, поэтому для вычисления скорости роста берут как можно меньшие интервалы времени, что ведет к необходимости применения дифференциальных уравнений:

$$dN/dt = \mu N. \quad (12)$$

Удельная скорость роста (μ) – это изменение количества клеток / биомассы за определенный интервал времени с учетом фактической плотности популяции. Удельная скорость роста будет постоянна для определенного микроорганизма, растущего в определенных условиях. Стоит подчеркнуть, что удельная скорость роста (μ) рассчитывается только для экспоненциально растущих культур (когда скорость роста постоянна).

Решением уравнения (12) будет

$$N = N_0 e^{\mu t}. \quad (13)$$

Для обработки экспериментальных данных используют логарифмическую форму уравнения (13):

$$\ln N - \ln N_0 = \mu t, \text{ или } \ln N / N_0 = \mu t. \quad (14)$$

Уравнение (14) позволяет вычислить удельную скорость роста, используя значения любых двух точек на кривой роста:

$$\mu = (\ln N_2 / N_1) / (t_2 - t_1), \text{ или } \mu = 2,303(\lg N_2 / N_1) / (t_2 - t_1). \quad (15)$$

Необходимо отметить, что расчеты производят на основе значений математических точек, лежащих на линии тренда, а не конкретных значений полученных в эксперименте данных. Это позволяет повысить точность расчетов, минимизировав влияние случайных ошибок при измерении. Один из возмож-

ных способов расчета удельной скорости роста на основе экспериментальных данных представлен в примере.

Пример

Задание: по данным, представленным в таблице, определите удельную скорость роста (μ) *Escherichia coli*.

Время, ч	0	0,5	1	1,5	2	3	4	5
ОП ₅₅₀	0,11	0,15	0,34	0,62	1,12	1,80	2,62	3,30

Решение:

1. Определяем, что экспоненциальный рост культуры наблюдается в интервале времени 0,5–2 ч (рис. 7).

2. Находим значения натурального логарифма для N/N_0 .

Время, ч	0	0,5	1	1,5	2	3	4	5
ОП ₅₅₀	0,11	0,15	0,34	0,62	1,12	1,80	2,62	3,30
$\ln(\text{ОП}/\text{ОП}_0)$		0	0,818	1,419	2,01			

3. Строим график зависимости $\ln(\text{ОП}/\text{ОП}_0)$ от времени, проводим линию тренда (линейное приближение) и определяем μ как тангенс угла α (или как множитель уравнения) (рис. 8).

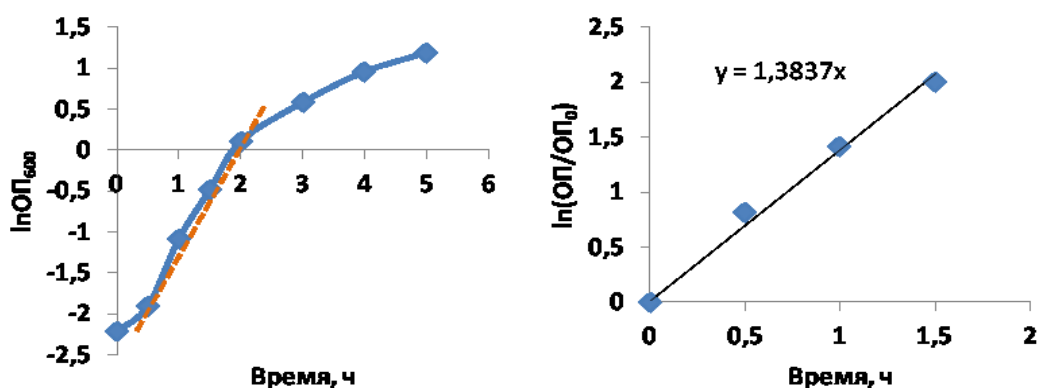


Рис. 7. Графическое представление данных для расчета значения удельной скорости роста

1.7. Определение длительности лаг-периода

Длительность лаг-фазы (L) удобно определять методом Лоджа и Хиншельвуда. Для этого на полулогарифмическом графике зависимости показателя плотности культуры (оптической плотности, биомассы) от времени следует

экстраполировать прямую линию до уровня начальной биомассы и провести перпендикулярную линию из точки пересечения к оси абсцисс (рис. 8). Отрезок, отсекаемый при этом на оси абсцисс, будет соответствовать L .

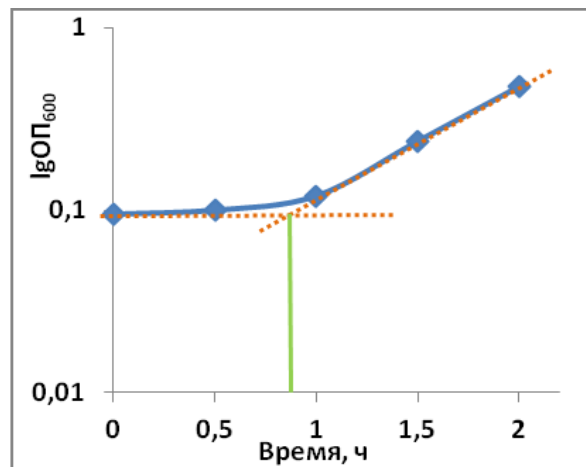


Рис. 8. Графический метод определения продолжительности лаг-фазы

Соответственно, уравнение для роста культуры имеет вид

$$\ln X = \mu(t - L) + \ln X_0,$$

где X – биомасса в определенный момент времени; X_0 – биомасса в начальный момент времени; μ – удельная скорость роста; t – время; L – длительность лаг-фазы.

2. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ И ФОТОТРОФНЫХ ПРОКАРИОТ

2.1. Общая характеристика микроводорослей

Водоросли – это экологическая группа различных по происхождению организмов, определяемая преимущественно водным образом жизни (или жизни во влажных условиях), облигатным кислородным типом фотосинтеза и наличием цикла Кальвина, отсутствием органов и в большинстве случаев настоящих тканей. В систематическом отношении они относятся к различным отделам (и даже царствам), различающимся строением клетки (и ее органоидов), набором пигментов, типом митоза, типом морфологической организации таллома, особенностями жизненного цикла, а также рядом других признаков организмов. В данном учебном пособии под термином «микроводоросли» будут рассматриваться только одноклеточные эукариотические водоросли монадного, пальмеллоидного и коккоидного типов организации таллома.

Монадная организация характеризуется активной подвижностью с помощью жгутиков. Она присуща прежде всего одноклеточным жгутиконосцам, которые являются начальными звеньями эволюции многих отделов водорослей. Разновидность монадной организации – подвижные (с помощью жгутиков) колонии и ценобии, т.е. колонии, в которых число клеток определяется на ранних стадиях развития и не меняется до следующей репродуктивной фазы.

Пальмеллоидный тип организации отличается сочетанием неподвижного образа жизни с наличием клеточных органелл, свойственных монадным клеткам (сократительные вакуоли, стигма, жгутики или их производные).

Коккоидный тип встречается у одноклеточных и колониальных представителей, у которых отсутствуют жгутики и которые чаще всего неподвижны в вегетативном состоянии (исключение – десмидиевые и диатомовые).

У большинства микроводорослей протопласт окружен клеточной стенкой. Как и у высших растений, клеточная стенка микроводорослей образуется снаружки от плазмалеммы и является прочным наружным каркасом клетки, обеспечивающим надежную защиту. В состав клеточной стенки обязательно входят целлюлоза и пектиновые вещества. Помимо целлюлозы для построения фибрилл оболочки у микроводорослей могут использоваться другие полисахариды в зависимости от таксона.

Цитоплазма у большинства водорослей расположена тонким постенным слоем, окружающим большую центральную вакуоль с клеточным соком. В цитоплазме эукариотных водорослей хорошо различимы элементы эндоплазматиче-

ческой сети, рибосомы, митохондрии, аппарат Гольджи (диктиосома), клеточные ядра, хлоропласты.

Для клеток микроводорослей характерны все основные органеллы, встречающиеся у эукариот. Кроме того, как и высшие растения, они содержат хлоропласты или хроматофоры. Традиционно хроматофорами называли крупные фотосинтезирующие органеллы, находящиеся чаще всего по одной в клетке (как у хламидомонады или хлореллы), а хлоропластами – отдельные мелкие органоиды. Однако нередко какой-либо из этих двух терминов применялся для обозначения всех фотосинтезирующих органелл водорослей. В последнее время термин «хлоропласт» практически полностью вытеснил термин «хроматофор». Хлоропласты обеспечивают процесс фотосинтеза.

Особой внутриклеточной структурой у микроводорослей является пиреноид. Это место конгломерации внутри хлоропласта фермента рибулозобисфосфаткарбоксилаза (рубиско) и некоторых запасных полисахаридов. Форма, количество и расположение пиреноидов важны для установления систематической принадлежности водоросли.

У водорослей встречается вегетативное, бесполое и половое размножение.

2.2. Техника сбора и получения накопительных культур микроводорослей

Сбор планктонных форм. Фитопланктон – совокупность свободно плавающих в толще воды микроскопических водорослей. Для сбора планктонных форм используют батометры.

Сбор почвенных микроводорослей. Отбор почвы или аэрофильного субстрата производится стерильным шпателем. Инструмент стерилизуется непосредственно в полевых условиях: протирается 96%-ным спиртом и обжигается в пламени спиртовки, либо многократно втыкается в исследуемую почву. Отобранные пробы используются для получения смешанных накопительных культур в течение 1–2 суток с момента отбора. Для длительного хранения образцы почв или аэрофильных субстратов высушивают в стерильных условиях до воздушно-сухого состояния и сохраняют для дальнейшей обработки до 6 месяцев.

Получение смешанных накопительных культур:

1. Метод «стекло обростания». Основные условия культивирования: освещение 1500–3000 лк, фотопериод свет/темнота составляет 16/8 ч, температура – 25–28 °С. Свежеотобранную почву (20 г) помещают в чашку Петри и увлажняют дистиллированной водой. На поверхность почвы кладут и плотно прижимают несколько покровных стекол и культивируют при вышеописанных усло-

виях. С периодичностью в несколько дней стекла исследуют под микроскопом для выявления микроводорослей.

2. *Водно-почвенные культуры.* Преимущество этого метода – олиготрофность получаемой среды культивирования, что минимизирует бактериальную контаминацию субстрата. Навеску почвы помещают в коническую колбу и заливают 100 мл дистиллированной воды. Культивируют при вышеописанных условиях без перемешивания. На стенках колбы появляются зеленые пленки, которые дальше отбирают петлей и микроскопируют. Необходимые для исследования микроводоросли отбирают микропипеткой из исследуемого препарата.

3. *Жидкие и агаризованные культуры.* Этот способ позволяет получить наиболее концентрированную культуру. Для этого навеску почвы (1 г) помещают в колбу и заливают стерильной питательной средой (либо универсальная среда, например среда Прата, Громова или Тамия; либо селективные среды для получения массового развития определенной группы микроводорослей). Далее суспензию культивируют в конических колбах с ватно-марлевой пробкой в стандартных условиях. При появлении визуально заметных зеленых образований и пленок их отбирают микробиологической петлей и готовят препараты для микроскопирования. Все инструменты обязательно стерилизуются любым физическим способом. Для получения культур на агаризованных средах небольшое количество материала (смыв со стекол обрастания, разбавленная почвенная суспензия) наносят на слой питательного агара (агар обычно готовят в концентрации 1–2 %) шпателем Дригальского. Чашка Петри затем оборачивается парафильмом, переворачивается и культивируется при стандартных условиях.

4. *Способ Лукешевой на скошенном агаре.* Этот способ позволяет выделить разные экологические группы микроводорослей. Для этого в стерильных условиях в пробирки разливают стерильный агар под углом не более 45°. После застывания агара в пробирку доливают стерильную питательную среду, чтобы уровень жидкости не превышал половины скошенного агара. В пробирку засевают необходимый материал (смыв со стекол обрастания или водно-почвенную суспензию). Пробирки закрывают воздухопроницаемыми пробками и культивируют при стандартных условиях. При этом за счет разнообразия условий почвенные виды постепенно разрастаются на поверхности агара выше края воды, гидрофильные и амфибиальные виды – в жидкой части культуры.

5. *Культивирование внутри агара.* Некоторые водоросли не растут на поверхности агара, но очень хорошо растут внутри него. Для получения погруженных в агар колоний клетки из полевого образца или обогащенной культуры

смешивают с жидким агаром и потом разливают в чашки Петри. Агар должен быть прохладным – чуть выше температуры застывания. Для этих целей лучше использовать агар с низкой температурой застывания. После этого чашки нужно остудить. Затем колонии нужно инкубировать при нужной температуре и освещенности до появления колоний водорослей. Потом можно выделить нужные водоросли с помощью микропипетки и поместить в жидкую питательную среду. С помощью этой методики можно поддерживать культуру достаточно длительное время.

2.3. Метод получения чистых культур микроводорослей

Выделение микроводорослей в культуру с помощью традиционных методов является хорошо разработанной процедурой. Основные и самые доступные методы получения чистой культуры микроводорослей – это посев штрихом, выделение с помощью микропипетки и использование фототаксиса.

Посев штрихом. Этот способ предпочтителен для выделения многих коккоидных и большинства почвенных водорослей. Микробиологической петлей набирается небольшое количество накопительной культуры и переносится в новую стерильную чашку Петри. На свежем стерильном питательном агаре (1–2 %) делается зигзагообразный штрих, плотный вначале и истончающийся к концу. Затем новые чашки, обернутые парафильмом, инкубируются в стандартных условиях. Через несколько суток на конце штриха располагаются изолированные колонии, которые в дальнейшем пересевают в нужную питательную среду. Следует учитывать, что некоторые микроводоросли лучше растут на «мокрой» желеобразной среде с концентрацией агара 0,3–0,6 %, поэтому накопительную культуру лучше пересевать штрихом на несколько чашек с питательным агаром разной концентрации.

Выделение с помощью микропипетки. Этот способ позволяет выделить из накопительной культуры и изолировать в свежей питательной среде отдельную клетку, которая при дальнейшем размножении даст чистую моноклональную культуру. Выделение клетки производится с использованием микроскопа в стерильном боксе. Для этого каплю накопительной культуры помещают на чистое обезжиренное предметное стекло, готовой микропипеткой извлекают клетку микроводоросли, контролируя процесс непрерывным микроскопированием. Изолированную клетку помещают в каплю стерильной воды, расположенной по центру чашки Петри. Затем производят контрольное микроскопирование капли, чтобы убедиться в присутствии выделенной микроводоросли. При положительном результате в чашку добавляют необходимую питательную сре-

ду и инкубируют в стандартных условиях. Диаметр капилляра должен быть в 2 раза больше диаметра клетки. При меньшем диаметре есть риск повредить клетку, при большем – отобрать из среды вместе с клеткой загрязнители.

Выделение с использованием фототаксиса. Методика является удобной для очистки зеленых водорослей, размножающихся с помощью зооспор. Для этого на поверхность агаризованной питательной среды в чашке Петри наносят 300 мкл стерильной воды и равномерно распределяют шпателем. В центр чашки помещают 100–200 мкл накопительной культуры. Чашку переворачивают и инкубируют в стандартных условиях. В течение первых суток образуются подвижные репродуктивные клетки, радиально распространяющиеся по поверхности агара. Одиночные клетки образуют колонии, которые можно использовать для дальнейшего пересева.

Для получения чистых культур микроводорослей можно применять классический микробиологический **метод предельных разведений**, с помощью которого можно получить не только отдельные клетки, но и очистить культуру водорослей от нежелательных контаминационных элементов, таких как бактерии и грибы. Для этого в используемый в серии разведений раствор добавляется необходимый антибиотик или фунгицид. Часто используемыми антибиотиками являются гентамицин, тетрациклин, хлорамфеникол и канамицин. Из фунгицидов наиболее предпочтительны нистатин и амфотерицин. Конечная концентрация антибиотика или фунгицида в растворе не должна превышать 100 мкг/мл. Еще одним из способов деконтаминации является центрифугирование культуры микроводорослей 3–5 мин при 3000 об. При более длительном центрифугировании на дно пробирки оседают не только водоросли, но и бактерии. Осадок из центрифужной пробирки пересевает на стерильную воду и снова центрифугируют. Рекомендуется проводить не менее трех циклов.

При дальнейшем культивировании микроводорослей рекомендуется проверять среду культивирования на присутствие бактерий. Для этого часть среды с микроводорослями переносится в стерильный 0,25%-ный мясной бульон: при развитии бактерий бульон быстро мутнеет.

Иногда возникает необходимость избавиться от диатомовых водорослей в накопительной культуре, так как они быстро размножаются и вытесняют другие виды. Для этого следует в питательную среду с накопительной культурой добавить диоксид германия (10 мг/л).

2.4. Культивирование хлореллы

Один из самых распространенных объектов культивирования в лаборатории – это хлорелла.

Систематическая принадлежность:

Отдел: Зеленые водоросли (*Chlorophyta*).

Класс: Требуksiофициевые (Требуksiевые) водоросли (*Trebouxiophyceae*).

Порядок: Хлорелловые (*Chlorellales*).

Род: Хлорелла (*Chlorella*).

Это преимущественно одноклеточные коккоидные формы. Род – Хлорелла (*Chlorella*). Виды рода – одноклеточные водоросли. Клетки одиночные, мелкие (от 2 до 12 мкм в диаметре), шаровидные или овальные. Хлоропласт в виде глубокой чаши, цельный, с одним пиреноидом или без него. Ядро одно, без окраски невидимо. Размножение только бесполое, автоспорами (неподвижные споры, которые уже внутри материнской клетки приобретают все отличительные черты вегетативной клетки). Хлореллы широко распространены в пресных и морских водах, на сырой земле и на коре деревьев, а также как симбионты в клетках пресноводных беспозвоночных (гидры, губки, различные простейшие).

Хлорелла легко культивируется в искусственных условиях и давно используется в качестве объектов физиологических и биохимических исследований, особенно при изучении фотосинтеза. Она служит и объектом массового культивирования для практического использования. Хлорелла привлекла также внимание и как источник пищи для человека, сельскохозяйственных животных и как техническое сырье. Пластичность метаболизма хлореллы позволяет выращивать клетки, содержащие в зависимости от условий культуры до 88 % белков и до 75 % жиров. Эта микроводоросль служит исходным сырьем для получения витаминов, хлорофилла и стероидов, необходимых для синтеза некоторых лечебных препаратов.

Лучшая среда для культивирования хлореллы в лаборатории – среда Тамия с добавлением селенита натрия 2,5–5 мг/л. Перед началом культивирования чистую культуру хлореллы высевают на чашки с агаризованной питательной средой и инкубируют несколько суток. Затем выбирают наиболее крупные колонии и каждую переносят в отдельную пробирку с жидкой питательной средой аналогичного состава, инкубируют не менее 7 суток при стандартных условиях. Пробирки, в которых жидкость мутнеет, отбраковывают. В остальных суспензию микроскопируют и, убедившись в отсутствии контаминации, используют для дальнейшего культивирования. Допустимо измерять плотность

суспензии на спектрофотометре и использовать для дальнейшей работы пробирку, в которой она максимальна. Такая подготовка обеспечивает быстрый дальнейший рост и хорошее накопление биомассы хлореллы. Оптимальная исходная плотность посевного материала составляет 2–5 млн клеток/мл, что составляет примерно 20 мг хлореллы в литре.

Самым простым способом выращивания хлореллы в лаборатории является культивирование в конических колбах объемом 250 мл (высота слоя жидкости не должна превышать 8 см). Все манипуляции необходимо производить в стерильных условиях. Посевной материал добавляют в свежую питательную среду (1 мл инокулята / 100 мл среды) и культивируют при интенсивном освещении при 28 °С. Поскольку хлорелла неподвижна, колбы должны перемешиваться при 50–70 об/мин. Такое перемешивание обеспечивает хорошую освещенность каждой клетки и оптимальный газообмен. Поскольку процесс размножения кокковых водорослей сравнительно прост, в хороших условиях хлорелла быстро размножается и за сутки увеличивает свою биомассу в 3–5 раз.

Водоросли могут расти при невысокой интенсивности освещения. При увеличении светового потока скорость роста может падать, но через некоторое время хлорелла адаптируется к возрастающей интенсивности света. При выборе интенсивности светового потока, используемого при культивировании, нужно учитывать размер слоя жидкости и оптическую плотность культуры. Для лучшего прироста биомассы начать культивирование можно при 1000 лк и постепенно увеличивать до 90 000 лк. Если такая возможность отсутствует, можно использовать оптимальную освещенность 40–50 000 лк и не изменять ее на протяжении всего периода культивирования. Для выращивания водоросли лучше использовать газоразрядные лампы (ДНАТ, ННS). Фотопериод свет / темнота должен составлять 16/8, но в некоторых случаях используют непрерывное освещение.

Если необходимо в короткие сроки получить высокоурожайную культуру хлореллы, можно использовать метод выращивания с аэрацией и интенсивным перемешиванием. Для этого используются вертикальные сосуды (можно использовать лабораторные мерные цилиндры или стаканы объемом 1 л и более). Сосуд помещается на магнитную мешалку, жидкость перемешивается при помощи магнита и дополнительно аэрируется газовой смесью с содержанием 2 % углекислого газа. В таких условиях скорость прироста биомассы увеличивается в 5 раз по сравнению с выращиванием в конических колбах.

Отслеживать рост клеток можно спектрофотометрически, определять жизнеспособность – дифференциальным окрашиванием метиленовым синим. Метиленовый синий (рН = 4,6) благодаря дыхательной активности клеток

быстро восстанавливается и обесцвечивается, поэтому мертвые клетки окрашиваются, а живые остаются неокрашенными. Для этого 1 мл суспензии клеток растворяют в 9 мл свежей питательной среды, 1 мкл разбавленной суспензии смешивают с метиленовым синим (1:5000) и вносят в камеру Гаряева. Подсчитывают соотношение мертвые / живые клетки.

Методы культивирования цианобактерии спирулины (*Arthrospira platensis*) не отличаются от культивирования хлореллы, но в этом случае используется питательная среда Заррука (состав описан в соответствующем разделе).

2.5. Культивирование пурпурных и зеленых бактерий

Пурпурные (подпорядок *Rhodospirillindeae*) и зеленые бактерии (подпорядок *Chlorobiineae*) – грамотрицательные прокариоты, осуществляющие аноксигенный тип фотосинтеза, относятся к порядку *Rhodospirillales*.

В качестве терминальных доноров в фотосинтетической цепи переноса используют либо восстановленные соединения серы (серные), либо органические кислоты (несерные) бактерии. Серные бактерии, как пурпурные, так и зеленые, являются облигатными анаэробами и очень плохо растут в присутствии даже низких концентраций кислорода; несерные – факультативные анаэробы, поэтому относительно легко культивируются в лабораторных условиях.

Культивирование несерных пурпурных и зеленых бактерий. Бактерии удобнее всего культивировать в вертикальных цилиндрических сосудах с притертыми пробками объемом 25–50 мл. Состав среды культивирования указан в соответствующем разделе. Инокулят вносится в сосуд с питательной средой и первые сутки культивируется в аэробных условиях (сосуд закрывается ватно-марлевой пробкой) при температуре 25–28 °С в темноте. В этот момент клетки используют дыхательную цепь для поддержания энергетического баланса. При исчерпании кислорода (через 24–48 ч) сосуды герметично закрываются (капроновыми или стеклянными притертыми пробками) и переносятся на свет. В качестве источника освещения можно использовать лампу накаливания 60–100 Вт. Освещение должно быть непрерывным. Следует отметить, что в некоторых случаях у пурпурных и зеленых бактерий может наблюдаться продолжительная лаг-фаза (до 7–10 дней). Клетки можно хранить в описанных условиях до полугода, затем следует сделать пересев на свежую питательную среду.

2.6. Питательные среды для культивирования микроводорослей и фототрофных прокариот

Среда Кнопа (г/л): $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ – 0,25; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,06; KH_2PO_4 – 0,06; KCl – 0,08; Fe_2Cl_6 – одна капля 1%-ного раствора.

Среда Прата (г/л): KNO_3 – 0,10; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,01; K_2HPO_4 – 0,01; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,001. (Данную питательную среду в основном используют для хранения, поэтому добавляют агар-агар – 12 г. Агар обычно готовят в концентрации 1–2 %.)

Среда Громова (г/л): KNO_3 – 1,0; K_2HPO_4 – 0,2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2; CaCl_2 – 0,15; NaHCO_3 – 0,2; микроэлементы – 1 мл исходного раствора, pH – 7,0. Раствор микроэлементов (г/л): $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,022; MnSO_4 – 1,81; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,079; $\text{NaBO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 2,63; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 1,0; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 9,3; CaCl_2 – 1,2; $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 0,02; ЭДТА – 10,0. (Эта среда также подходит для культивирования цианобактерий.)

Среда Бристоль в модификации М. М. Голлербаха (г/л): NaNO_3 – 0,25; KH_2PO_4 – 0,25; MgSO_4 – 0,15; CaCl_2 – 0,05; NaCl – 0,05; FeCl_3 – Fe_2Cl_6 – одна капля 1%-ного раствора.

Среда Тамия (г/л): KNO_3 – 5,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 2,5; K_2HPO_4 – 1,25; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,003; раствор микроэлементов – 1 мл. Раствор микроэлементов (г/л): $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,022; MnSO_4 – 1,81; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,079; $\text{NaBO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 2,63; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 1,0; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 9,3; CaCl_2 – 1,2; $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 0,02; ЭДТА – 0,037.

Среда Гиндака (г/л, применяется в разведении 1/4 и 1/8 для интенсивного культивирования микроводорослей): $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ – 3,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0,3; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 5; KH_2PO_4 – 2,5; H_3BO_3 – 0,06; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,04; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,04; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,025; $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,006; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,005; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,008; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,002; ЭДТА – 0,37.

Среда для культивирования несерных пурпурных бактерий (г/л): NH_4Cl – 0,4; KH_2PO_4 – 0,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2; NaCl – 0,4; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,05; ацетат, бутират, пропионат или сукцинат – 1; дрожжевой экстракт – 0,2; Fe-цитрат (0,1 %) 5,0 мл; микроэлементы по Хогланду – 1,0 мл; Витамин B_{12} (0,01 %) – 1,0 мл; L-цистеин – 0,3.

Микроэлементы по Хогланду (мг/л): ЭДТА – 500; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 2; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 100; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 30; H_3BO_3 – 300; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 200; CuCl_2 – 10; $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 20; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 20;

Среда для культивирования серных пурпурных бактерий (г/л): KH_2PO_4 – 0,5; NaCl – 30; NH_4Cl – 0,5; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,2; ацетат – 1; $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ – 0,5; $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ – 0,5; NaHCO_3 – 5; Na_2CO_3 – 5; дрожжевой экстракт – 0,1; витамин B_{12} – 0,01; раствор микроэлементов по Хогланду – 1 мл.

Раствор солей $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, Na_2CO_3 продувается азотом для создания анаэробных условий и автоклавируется при 121 °С в течение 15 мин. Витамин B_{12} стерилизуется фильтрацией. Смесь остальных солей автоклавируется при указанной температуре. После остывания все компоненты смешиваются с соблюдением стерильности. Конечный уровень pH среды должен составлять 9,0–9,5.

Среда для культивирования несерных зеленых бактерий (г/л): ЭДТА – 0,02; $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,06; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,10; NaCl – 0,008; Na_2HPO_4 – 0,11; NH_4Cl – 0,2; раствор FeCl_3 (100 мг/1л) – 3,0 мл; раствор микроэлементов по Хогланду – 0,5 мл; глицинглицил – 0,8; NaHCO_3 – 1; ацетат – 1; $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ – 0,5; раствор витаминов – 1 мл.

Раствор витаминов (на 100 мл воды): тиамин хлорид – 10 мг, биотин – 0,5 мг, рибофлавин – 3 мг, фолиевая кислота – 5 мг. Витамины стерилизуются отдельно фильтрацией. Инкубировать в анаэробных условиях!

Среда для культивирования цианобактерий № 1 (г/л): NaHCO_3 – 16,8; K_2HPO_4 – 0,5; NaNO_3 – 2,5; K_2SO_4 – 0,5; NaCl – 1 г/л; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2; CaCl_2 – 0,04; FeSO_4 – 0,01; ЭДТА – 0,08; раствор микроэлементов по Хогланду – 1 мл.

Среда для культивирования цианобактерий № 2 (г/л): KNO_3 – 20; NaCl – 10; фосфат аммония – 1; FeSO_4 – 0,01; MgSO_4 – 1; K_2SO_4 – 5; CaCO_3 – 1; раствор микроэлементов по Хогланду – 1 мл.

Среда Заррука для культивирования спирулины (г/л): NaHCO_3 – 16,8; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ – 1; NaNO_3 – 2,5; K_2SO_4 – 1; NaCl – 1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,04; Fe + ЭДТА – 1 мл; раствор микроэлементов 1 – 1 мл; раствор микроэлементов 2 – 1 мл.

Приготовление специального раствора FeSO_4 и ЭДТА: в 134 мл 1N КОН растворить 30,2 г ЭДТА. Раствор разбавить водой, внести 24,9 г $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ и долить водой до 1 л. Продуть раствор воздухом без CO_2 в темноте в течение

12 ч. Чтобы избавиться от CO_2 , необходимо пропустить воздух через раствор щелочи.

Раствор микроэлементов 1 (г/л): H_3BO_3 – 2,86; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 1,81; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,22; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,08; MoO_3 – 0,015.

Раствор микроэлементов 2 (г/л): NH_4VO_3 – 0,023; $\text{K}_2\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_4 \cdot 24\text{H}_2\text{O}$ – 0,096; $\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,048; $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,018; $\text{Ti}_2(\text{SO}_4)_3$ – 0,040; $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,044.

Микроэлементы и раствор Fe + ЭДТА стерилизуют фильтрацией через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм.

Примечание! При автоклавировании всех описанных питательных сред соли кальция и магния стерилизуются отдельно и после остывания добавляются в общую смесь (чтобы избежать выпадения солей в осадок)!

3. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ПРОТИСТОВ

В современной зоологии беспозвоночных термин «протисты» не относится к систематике и не является конкретной таксономической категорией, объединяя лишь парафилетическую группу (это группа, объединяющая не всех потомков одного предка) одноклеточных эукариотических организмов.

В настоящее время перспектива культивирования протистов имеет четыре направления:

1) получение животного белка более экономичными (по энергетическому балансу) способами, чем при использовании многоклеточных животных; получение биологически активных веществ;

2) культура паразитических протист для обеспечения биологических методов борьбы с вредителями и паразитами хозяйственно ценных организмов;

3) получение клонов протист с заданными фенотипическими характеристиками для обогащения активного ила на очистных сооружениях;

4) использование протистов в качестве тест-объектов в биологическом тестировании;

5) создание технологических схем непрерывного культивирования инфузорий в качестве основной кормовой базы для молоди рыб в индустриальном рыбоводстве.

3.1. Техника сбора и определение количества клеток протистов

Исследование биологии протистов ведется исключительно на живых культурах, так как любая манипуляция с клетками может их деформировать. Ввиду этого в лаборатории поддерживаются культуры протист, регулярно пополняемые из природных источников.

В отличие от классического микробиологического понятия «штамм», в протистологии используется термин «клон», подразумевающий фенотипические отличия культур одного и того же вида протиста. Такие отличия возникают при взятии клеток из разных природных источников, а также из-за изменения физиологических свойств организма с возрастом культуры.

В связи с этим для сравнения результатов, полученных разными исследователями, необходимо указывать: 1) вид клона; 2) место, из которого была выделена клетка, давшая начало клону; 3) дату выделения клетки из природной популяции или получения экспериментально (например, в генетических экспериментах) среды, на которой культивируется клон; 4) вид используемого пищевого объекта; 5) температуру культивирования; 6) принадлежность к определенным внутривидовым группам.

Для выделения клона, в дальнейшем культивируемого в лаборатории, необходимо знать биотопы, где обитает максимальное количество разнообразных протистов. Такими биотопами являются стоячие водоемы и органогенные горизонты почвы. Лучшие места для взятия проб в водоемах – это пологие берега с гниющими растительными остатками. Здесь происходит обильный рост бактерий, служащих основной пищей для многих протистов. В воде пробы лучше брать с глубины не более нескольких сантиметров от поверхности дна, где условия для жизни изучаемых объектов более оптимальны. Пробы из водоемов берут планктонным сачком, проводя им вблизи поверхности ила. Можно также опустить в воду четырехугольную аквариумную банку, быстро поворачивая ее отверстием кверху. Входящий воздух взмучивает достаточное количество ила, который зачерпывается сосудом.

Обилие протист в почве сильно зависит от ее влажности, вида и качества гумуса, наличия подстилки или дерновости, так как много одноклеточных организмов обитает в ризосферном (прикорневом) пространстве. Для получения простейших из влажных субстратов (почвы, мха) используют выжимки из них. Верхние части (органогенный горизонт, подстилка, мох) отжимают рукой, прополаскивают в отжатой жидкости и снова отжимают. В отстоявшемся остатке этой жидкости обнаруживаются простейшие.

3.1.1. Методы подсчета протист в почвенной суспензии

Подсчет простейших в почвенной суспензии проводят методами количественного учета, принятыми в микробиологии. Наиболее прост следующий метод. Почву, смешанную с небольшим количеством воды, помещают на предметное стекло с лункой и сразу же микроскопируют. Для замедления движениядвигающихся форм и их подсчета добавляют 1–2%-ный раствор желатина или 0,001 % агара. Недостатком этого метода является то, что с его помощью учитывают только свободноплавающих простейших и не учитывают всю массу организмов, оставшуюся среди почвенных частиц. Необходимо иметь в виду, что некоторые простейшие при смачивании быстро (через несколько минут) выходят из цист, и, следовательно, для обнаружения активных форм пробу почвы нужно просматривать незамедлительно.

Для учета амеб используют микроскопирование водной суспензии почвы. Для этого к навеске почвы (0,1 г) добавляют 20–25 мл воды, оставляют на несколько часов до размокания почвенных частиц и взбалтывают в течение 10 мин.

Дно стерильной чашки Петри расчерчивают по трафарету на квадраты 1×1 см. В приготовленную чашку выливают полученную суспензию. Крупные комочки почвы разрушают препаровальной иглой. Взвесь микроскопируют с

объективами $\times 8$ или $\times 40$. Число клеток подсчитывают по диагонали в четырех квадратах, расположенных крестообразно. Общее количество амеб (M) в навеске определяют по формуле

$$M = (N/14) - S, \quad (16)$$

где N – число раковин в 14 квадратах; S – площадь дна чашки.

Метод проращивания почвенного мелкозема во влажных камерах на агаризованных покровных стеклах. Для этого метода необходимо приготовить водную почвенную вытяжку (1 г почвы / 100 мл воды), которую затем кипятят 1 ч, отстаивают в течение суток и фильтруют. К полученному фильтрату добавляют 1 % агара и наносят тонким слоем на обезжиренные покровные стекла. Стекла помещают на влажную фильтровальную бумагу в чашки Петри. Почву размельчают и просеивают через сито 0,25 мм. Почвенный мелкозем через трубку, один конец которой закрыт сеткой, равномерно высевают на поверхность агара на стекле. Чашки инкубируют при 20–24 °С в течение 7–10 суток. Этот метод позволяет наблюдать за развитием и активным движением простейших *in situ*, а также выделять их в чистую культуру.

Метод предельных разведений. Навеску почвы разводят в жидкой питательной среде (зависит от изучаемой группы, например: почвенно-древесный настой, отвар рисовых зерен, навозный настой и др.). Далее проводится математическая обработка полученных результатов по таблице МакКреди. Метод используется для количественного учета активно двигающихся простейших. Увлажняют 10 г почвы до пастообразного состояния стерильной питательной средой из сенного отвара с почвенной вытяжкой 1:1 и растирают 5 мин в фарфоровой ступке резиновым напалечником. Затем готовят ряд последовательных десятикратных разведений (не менее пяти). Для каждого разведения берут по три пробирки с 9 мл среды. Исходную суспензию готовят, помещая навеску почвы в колбу с 90 мл жидкой питательной среды (остальное количество среды идет на смачивание почвы). Суспензию взбалтывают в течение 10–15 мин, затем оставляют на 30 с для осаждения крупных почвенных частиц и готовят из нее второе разведение. Культивирование осуществляют при 22–24 °С, проводя микроскопический контроль в течение месяца. Для количественного учета простейших с помощью таблицы МакКреди подсчитывают число пробирок, в которых они размножились. На основании полученных результатов составляют числовую характеристику, состоящую из трех цифр. На первом месте отмечают число пробирок того разведения, где во всех повторностях развилась культура

простейших (обычно это три пробирки). Следующие две цифры обозначают пробирки с развившейся культурой из двух последовательных разведений. По таблице МакКреди находят вероятное число, соответствующее числовой характеристике (см. прил. 1). Для пересчета количества протист на 1 г почвы полученное число умножают на разведение, в котором во всех пробирках был отмечен рост простейших. При анализе свежей почвы необходимо учитывать влажность субстрата, для определения которой можно использовать формулу

$$m = (a - b)100 / (a - c), \quad (17)$$

где a – масса влажной земли и тары; b – масса высушенной земли и тары; c – масса тары; m – влажность почвы, %.

3.2. Методы культивирования отдельных групп протистов

Культивирование протистов в периодической культуре имеет определенное сходство с выращиванием клеток прокариот. Клетки помещают в замкнутый сосуд при определенной температуре, газовом режиме и выбранном субстрате. В таких условиях выделяют лаг-фазу (адаптационную), фазу экспоненциального роста (достаточное количество субстрата и отсутствие ингибирования продуктами метаболизма), стационарную фазу и фазу отмирания. Для оптимального поддержания периодической культуры необходимо инокулят для пересева в свежую среду культивирования брать из экспоненциальной фазы, таким образом в новой периодической системе будет сокращено время лаг-фазы и минимизирован стресс для клеток. Следует отметить, что для создания оптимального кислородного режима для аэробов необходимо либо выращивать клетки с принудительной продувкой воздухом при помощи компрессора, либо растущих протистов помещать в конические колбы Эрленмейера и культивировать при постоянном перемешивании в орбитальном шейкере.

Существует классический полунепрерывный метод, когда часть суспензии отводится и в сосуд культивирования добавляется свежая питательная среда, но при таком способе скорость деления клеток ниже, так как в оставшейся среде культивирования могут присутствовать бактерии и метаболиты самих выращиваемых простейших.

Еще одним из методов культивирования протист служит так называемое массовое периодическое культивирование. При таком методе используют сосуды большого объема (от литра), куда помещается первичный субстрат: сенной отвар (наиболее оптимальный субстрат), навоз, почвенная вытяжка, банановые корки, добавляется вода, где и развиваются бактерии разных видов, служащие

кормом для культивируемых простейших. Такой способ известен как «нестерильный», в отличие от другого способа, моноксенного, когда в сосуд культивирования заселяют только один вид бактерий. Аксенный способ массового культивирования подразумевает питание только путем пиноцитоза, без внесения бактериальной фракции.

Следует отметить, в научно-исследовательских лабораториях чаще используется периодическое культивирование в случае поддержания чистой культуры. Нестерильный способ массового культивирования подойдет для учебной лаборатории, так как обеспечивает наибольшее видовое разнообразие.

3.2.1. Культивирование парameций

Инфузория туфелька (*Paramecium caudatum*) – один из основных лабораторных эукариотических организмов, поэтому для нее определены оптимальные режимы выращивания и основные факторы, влияющие на скорость роста. К таким факторам относятся количество и качество корма, температура, кислородный режим, рН среды, накопление продуктов метаболизма. Согласно литературным данным, лучшим кормом для *Paramecium caudatum* являются бактерии *Bacillus subtilis*, *Aerobacter aerogenes*, а также смесь бактерий и дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Следует отметить, что при кормлении водорослями следует избегать попадания прямых солнечных лучей, так как кислород, выделяемый только что проглоченными водорослями, может разорвать клетку инфузории. Хорошие результаты получены при выращивании инфузории туфельки на сухих пекарских дрожжах, лейкоцитарном масле, сухом молоке и других кормах.

Оптимальная температура для выращивания культуры *Paramecium caudatum* составляет 26–28 °С, уровень рН – 6,8–7,0; обязательно наличие хорошей аэрации. При выращивании в сосудах с большой поверхностью жидкости, например в чашках Петри, достаточно кислорода, поступающего через поверхность жидкости. При увеличении соотношения объема жидкости к ее поверхности ухудшается кислородный режим, культура без аэрации развивается плохо.

Разработаны различные методики выращивания *Paramecium caudatum* в лабораторных условиях. Наиболее простым является способ периодического культивирования, так как он не требует специальных микробиологических сред, а следовательно, данную методику можно использовать в любой лаборатории.

Исходный материал для культуры инфузории туфельки можно получить в лабораториях, работающих с этим видом, однако, если доставка инфузории туфельки затруднена, можно выделить культуру из местного водоема. При этом

нужно помнить, что видовую принадлежность организма может определить только протозоолог, так как существуют другие представители рода *Paramecium*, морфологически мало отличимые от *Paramecium caudatum*.

Для отделения парамеций от других инфузорий можно воспользоваться следующим приемом. Каплю с инфузориями из сырой культуры помещают на предметное стекло. Рядом на более освещенное место наносят каплю свежей воды и соединяют обе капли водной перемычкой с помощью остро заточенной спички. Туфельки быстрее других переберутся в чистую каплю. Затем их с помощью пипетки переносят в сосуд для разведения.

Для культивирования инфузории туфельки необходимы дрожжи пищевые сухие (можно хранить в закрытой емкости в течение нескольких месяцев); среда Лозина-Лозинского (Л-Л) следующего состава (г/л дистиллированной воды): NaCl – 0,1; KCl – 0,01; MgSO₄ – 0,01; CaCl₂ – 0,01; NaHCO₃ – 0,02. Среда может стоять в течение суток. Концентрат среды (десятикратный) можно хранить до недели. При выращивании культуры в чашках Петри в чашку вносят 20 мл стерильной среды Л-Л, 20 мг сухих пекарских дрожжей и посевной материал, обеспечивающий плотность посева 200 клеток/мл. Контроль за ростом концентрации клеток ведут ежедневно, проверяя культуральный бульон на наличие избыточной бактериальной контаминации. При переходе культуры в стационарную фазу производят пересев на свежую питательную среду. При данных условиях культивирования стационарная фаза наступает на вторые-третьи сутки при достижении плотности культуры 500–1000 клеток/мл.

Вместо чашек Петри можно использовать колбы, химические стаканы и другую посуду, главное требование при этом – не заполнять емкость на большую высоту (при большом столбе жидкости снижается аэрация). Наилучшим способом достижения оптимального кислородного режима является выращивание инфузорий в конических колбах с ватно-марлевыми пробками в термостатируемых орбитальных шейкерах.

Некоторыми исследователями используются стеклянные кольца, помещенные в расплавленный питательный агар до автоклавирования, которые после охлаждения образуют микроаквариумы с питательным дном, куда высеивают бактерии. После того как бактерии вырастают, в микроаквариумы добавляют минеральную среду и помещают инфузорий.

Очень важно следить за стерильностью используемой посуды, сред и лабораторного помещения, так как избыточное количество бактерий в среде может привести к исчерпанию кислорода и гибели культуры *Paramecium*.

При несоблюдении стерильности культура часто зарастает посторонними мелкими организмами (простейшими, жгутиконосцами и др.). Для того чтобы выделить чистую культуру, можно использовать следующий прием: отлавли-

вают одну инфузорию туфельку пастеровской пипеткой под биноклем и проводят (пересаживают) ее через серию чистых сред, контролируя под микроскопом результат отмывания. Когда посторонние микроорганизмы визуально не обнаруживаются, инфузорию туфельку оставляют в колбе на сутки. Если через сутки в колбе присутствуют только парамеции, их используют для дальнейшего разведения культуры. Для ускорения процесса получения массовой культуры обычно отмывают не одну клетку, а сразу десяток и более. Через сутки их пересаживают в одну колбу, кормя и пересаживая (сливая) во все большие объемы среды. Таким образом, получают чистую культуру, достаточную для нового посева.

Для сохранения посевного фонда культуру хранят на среде Л-Л с добавлением одного-двух зерен сырого риса на 10–20 мл среды. В таких условиях культура сохраняется до двух недель. Затем тонкой пастеровской пипеткой клетки отлавливаются (обычно они концентрируются вокруг зерен риса) и пересаживаются на свежую среду вместе с зернами.

Культуру можно хранить в холодильнике в условиях низких положительных температур, оборачивая засеянные чашки Петри парафильмом. При этом скорость деления может составлять одно деление в 16–18 суток.

3.2.2. Культивирование амёб

Необходимо учитывать, что поддержание культуры амёб в лаборатории представляет большую сложность, чем размножение инфузорий.

Самый простой способ культивирования амёб (*Amoeba proteus*) производится в пробирках (20–25 мл) в штативах под углом 45° при комнатной температуре на универсальной среде Прескотта и Джеймса (состав представлен в следующем разделе). Для сохранения культуры при комнатной температуре обеспечивать питание клеткам можно крахмалом (одна петля измельченного крахмала на пробирку с амёбами каждые 10–12 суток). Пробирки следует аккуратно встряхивать раз в сутки. В этом случае жизнеспособные амёбы сохраняются в одной пробирке 5–7 месяцев.

Для поддержания чистой (индивидуальной) культуры отдельная клетка помещается в микроаквариум (часовые стекла с каплей среды (5 мл), помещенные во влажную камеру в стерильных условиях), а затем через сутки одна из дочерних клеток снова помещается в микроаквариум со свежей средой и кормом. В дальнейшем делается 3–5 пересевов. Клетки из последнего посева вновь помещаются в пробирку.

Многие рода амёб можно легко содержать в виде моноксенических культур с бактериями в качестве источника пищи. Таким образом можно поддерживать штаммы следующих родов: *Echinamoeba*, *Filamoeba*, *Glaeseria*, *Mayorella*,

Nuclearia, *Paraflabellula*, *Platyamoeba*, *Rosculus*, *Saccamoeba*, *Stachyamoeba*, *Vannella*, *Vexillifera*. Клетки лучше всего культивировать внутри стеклянных колец на агаре, как было описано в предыдущем разделе, но представители данных родов хорошо чувствуют себя и в жидкой культуре. Сообщалось, что только штаммы одного из вышеуказанных родов, *Nuclearia*, могут культивироваться в аксеническом состоянии. На данный момент попытки аксенизации большинства родов амёб не предпринимались.

Для культивирования пресноводных амёб можно использовать следующий протокол:

1) приготовление питательного агара (г/л дистиллированной воды): солодовый экстракт – 0,1; дрожжевой экстракт – 0,1; бактериологический агар – 10;

2) все компоненты смешиваются и стерилизуются 20 мин в автоклаве при температуре 121° С;

3) простерилизованный питательный агар остужается на водяной бане при 50 °С;

4) в стерильных условиях 40 мл агара разливается в чашки Петри размером 15×100 мм и остужается до комнатной температуры;

5) на подготовленные остывшие чашки стерильной петлей засеваются полосками любые аэробные хемоорганотрофные бактерии с расстоянием в 5 мм и инкубируются в термостате при 30 °С 24 ч;

6) цисты амёб (полученные из природного источника или из коллекции протистов) помещаются на чашки Петри, подготовленные в п. 5;

7) чашки Петри оборачиваются парафильмом и культивируются в течение нескольких дней (от пяти) при комнатной температуре;

8) для поддержания культуры амёб стерильным ножом вырезают кусок агара 5×5 мм с чашки, приготовленной в п. 7, и помещают его на свежую чашку Петри с бактериями (как в п. 5), чтобы край блока, обсемененный амёбами, соприкасался с новым питательным агаром.

9) шаги 5–8 повторяют с интервалом в 14–21 день.

3.2.3. Культивирование автотрофных жгутиконосцев (эвглен)

Тривиальным видом пресноводных эвглен, доступным для культивирования в лаборатории, является *Euglena viridis* (филум *Euglenozoa*, класс *Euglenida*). В природе они часто встречаются в стоячих эвтрофированных водоемах.

Многие виды фотосинтезирующих эвглен можно легко выращивать в аксенической культуре. Для большинства штаммов культивирование при температуре 22–25 °С приводит к хорошему росту, если обеспечить соответствующую интенсивность освещения и цикл свет / темнота.

Протокол культивирования в жидкой среде:

- 1) приготовление питательной среды (г/л дистиллированной воды): K_2HPO_4 – 0,02; цитрат калия – 0,04; $\text{MgSO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ – 0,02; триптиказный соевый бульон (TSB) – 0,2. *TSB может быть заменен следующей смесью: дрожжевой экстракт (0,4 г), тиамин хлорид (0,4 мг) и витамин B_{12} (0,5 г);
- 2) готовая питательная среда стерилизуется в автоклаве 20 мин при температуре 121°C и разливается по 5 мл в стерильные пробирки с ватно-марлевыми пробками;
- 3) клетки эвглен вносят в пробирки и культивируют при $20\text{--}25^\circ \text{C}$ около лампы накаливания (100 Вт) с фотопериодом свет / темнота 10/14 ч.

Протокол культивирования (или хранения) на агаризованной среде:

- 1) приготовление питательной среды: (г/л дистиллированной воды): дрожжевой экстракт – 1; говяжий экстракт (или питательная среда LB) – 1; триптиказный соевый бульон (TSB) – 2; FeSO_4 – 0,001 (следовые количества); глюкоза – 10; агар – 5;
- 2) довести pH приготовленной среды до 7,2 с помощью 20 % NaOH
- 3) готовая питательная среда стерилизуется в автоклаве 20 мин при температуре 121°C ;
- 4) охлажденную до $40\text{--}50^\circ \text{C}$ питательную среду (5 мл) разливают в стерильные пробирки с ватно-марлевыми пробками, расположенными под углом не более 45° ;
- 5) готовый посевной материал эвглен стерильной петлей распределяют по агаризованной среде и культивируют при $20\text{--}25^\circ \text{C}$ около лампы накаливания (100 Вт) с фотопериодом свет / темнота 10/14 ч. Для поддержания влажности пробирки хранят в прозрачном стерильном боксе, на дно которого установлена чашка Петри с дистиллированной водой;
- 6) культура пересеивается на свежую питательную среду каждые четыре недели.

3.3. Среда для культивирования протист

3.3.1. Основные питательные среды для инфузорий

Сенной настой. Берут луговое сено, измельчают его и кладут в стеклянный сосуд с дождевой водой. Через три дня к полученному настою добавляют полстакана воды из водоема, богатого разлагающейся органикой.

Молочный раствор. На 150–200 мл водопроводной воды прибавляют по две-три капли сырого молока и взбалтывают. В емкость запускают 10–20 пара-

мечий и неплотно закрывают. Через 5–7 дней инфузории сильно размножаются и могут жить в этой среде месяцами, питаясь молочнокислыми бактериями. Два раза в месяц в культуру следует добавлять по одной капле молока. В молочном растворе успешно размножаются также брюхохресничные инфузории – стилонихии и разноресничные – спиростомумы.

Настой салата. В стеклянный сосуд с кипяченой водой опускают предварительно прокипяченный мешочек из тюля с листьями салата. Сосуд закрывают стеклянной пластинкой. В таком настое развивается особенно благоприятная для туфельек бактериальная флора.

Морковный настой. Кусочек моркови помещают в банку с водой (1 г на 1 л воды) и ставят в темное теплое место (22°–26°). Через несколько дней (от двух) сформируются благоприятные для заселения инфузорий условия. Настой фильтруют (или центрифугируют), стерилизуют автоклавированием 20 мин при 0,5 атм.

Настой на сухих дрожжах. В стеклянный сосуд с водой добавляют несколько крупинок сухих дрожжей и запускают парameций.

Среда Лозина-Лозинского для культивирования *Paramecium* (г/л дистиллированной воды): NaCl – 0,1; KCl – 0,01; MgSO₄ – 0,01; CaCl₂ – 0,01; NaHCO₃ – 0,02.

Щелочной агар. Агар-агара – 0,5–1,0 г, водопроводной воды – 90 см³ (90 мл), щелочного питательного бульона – 10 г. После кипячения разливают в чашки Петри и стерилизуют.

Экстракт свиного мозга. Позволяет получить богатую и почти чистую культуру *Paramecium*. 120 г свиного мозга нарезают на кусочки и раздавливают в воде; смесь оставляют стоять на полдня и затем продавливают ее через чистую салфетку. Полученный бульон разбавляют водой до 1 л и разливают в банки, куда прибавляют по 1 мл сенного настоя.

Среда Френкеля для культивирования инфузорий рода *Balantidium*. Аспарагин – 4,0 г, *ammonium lacticum* – 6,0 г, K₂HPO₄ – 2,0 г, NaCl – 5,0 г (на 1 л дистиллированной воды). Среда стерилизуется в автоклаве в течение 20 мин при 120 °С, 1 атм. Затем к ней добавляют стерильные лошадиная сыворотка в разведении 1:10 и две-три капли крахмала (pH = 7,2...7,4).

3.3.2. Основные питательные среды для амёб

Почвенно-древесный настой. Готовится заливкой 1/4 по объему почвы и 3/4 сырой воды. Выдерживается 7–10 дней. В течение такого же срока настаивается сырая вода на молодых ветках лиственных деревьев (лучше березы). После сливания равных частей этих настоев среда готова для заражения через 5–7 дней.

Отвар рисовых зерен. Для этого круто отваривают рис, несколько десятков отдельных рисовых зерен помещают в чашки Петри и заливают кипяченой водой. Через несколько дней, когда вокруг зерен разовьется бактериальная флора, производится заражение амёбами.

3.3.3. Основные питательные среды для жгутиконосцев

Автотрофные и гетеротрофные жгутиконосцы могут быть получены вместе с амёбами на сенных настоях и в «навозных» культурах.

Навозный настой. Небольшое количество слегка перепревшего конского навоза заливается на 2/3 водой. Через несколько дней наблюдается массовое развитие различных простейших, в том числе животных жгутиконосцев рода *Vodo*. Наиболее подходящие сосуды для культивирования зоофлагеллят – чашки Петри и плоскодонные колбы.

Среда Кноппа для эвглен: вода дистиллированная – 1000 г; $MgSO_4$ – 0,25; $Ca(NO_3)_2$ – 1,0; KH_2PO_4 – 0,25; KCl – 0,12; $FeCl_3$ – следы.

Среда Бенекке: вода дистиллированная – 1500 г; NH_4NO_3 – 0,3; $CaCl_2$ – 0,15; K_2HPO_4 – 0,15; $MgSO_4$ – 0,15; $FeCl_3$ – следы.

Среда Пратта: KNO_3 – 0,1; $MgSO_4$ – 0,01; K_2HPO_4 – 0,01; $FeCl_3$ – 0,001 г/л.

Почвенный навар для вольвоксов: 3 кг сухой темногумусовой почвы кипятят в 2 л воды, а затем настаивают в течение двух дней и фильтруют. Профильтрованную жидкость уваривают до 500 мл и добавляют в нее немного хлористого железа ($FeCl_3$). Навар для приготовления среды разбавляют в 40 раз дистиллированной водой.

3.3.4. Универсальные питательные среды

Универсальная среда Прескотта и Джеймса (*Cerophyl – Prescott infusion*): $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,433 г; KCl – 0,162 г; K_2HPO_4 – 0,512 г; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,28 г (г/л дистиллированной воды).

Универсальная среда Чокли (г/л дистиллированной воды): NaCl – 0,08; Na_2HPO_4 – 12; H_2O – 0,001; NaHCO_3 – 0,004; KCl – 0,002; CaHPO_4 (следовые количества).

Универсальная среда Принсгейма (г/л дистиллированной воды): $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 0,2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,02; KCl – 0,026; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,002; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,02.

4. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ

4.1. Особенности растений

Растения – эукариотные многоклеточные фотосинтезирующие организмы. Растительные клетки имеют ряд специфических черт строения, отличающих их от клеток других эукариотных организмов. Клетки растений содержат пластиды – двумембранные органоиды, имеющие собственную ДНК и 70S рибосомы и размножающиеся путем деления. Пластиды бывают трех типов. Хлоропласты, основной функцией которых является осуществление фотосинтеза. Два других типа пластид образуются из хлоропластов, в которых происходит дегенерация структур, ответственных за фотосинтез. Если в стареющих хлоропластах накапливаются пигменты из группы каротиноидов, образуются окрашенные в желто-красные цвета хромопласты; если крахмал – бесцветные лейкопласты. Отличительными особенностями растительной клетки являются наличие крупных вакуолей и сравнительно более высокое общее содержание воды. Также снаружи от цитоплазматической мембраны располагается клеточная стенка, состоящая в основном из целлюлозы, а также гемицеллюлозы, пектина и лигнина. Данная структура придает форму клетке, обеспечивает механическую защиту, регулирует транспорт и участвует в процессе деления.

Новообразование растительных клеток, приводящее к росту или обновлению их популяции, происходит за счет размножения делением. В растущей культуре клетка проходит все этапы митотического клеточного цикла. Из периода G1 клетка может переходить в следующие последовательные этапы митотического цикла, давая начало новым клеткам, или претерпевать дифференцировку. Дифференцированные клетки не способны активно делиться, для восстановления способности к делению им необходимо вернуться в менее дифференцированное состояние, т.е. претерпеть дедифференцировку.

Дифференцировка и специализация клеток сопряжены с формированием тканей и органов. Клетки растений образуют ткани шести основных типов: образовательная (меристема), покровная, проводящая / сосудистая (флоэма, ксилема), механическая, основная (паренхима) и выделительная.

С точки зрения культивирования изолированных клеток и тканей растений особый интерес представляет образовательная, или меристематическая ткань, клетки которой сохраняют способность к делению и образованию новых клеток. Зародыш растения полностью состоит из образовательной ткани, а у взрослого растения образовательная ткань представлена апикальной меристемой (верхушки побегов, окончания корней), латеральной меристемой (распола-

гается цилиндрическими слоями в корнях и стеблях) и вставочными меристемами (основания листьев, междоузлия). Клетки меристемы являются недифференцированными, и за счет их деления и последующей дифференцировки образуются клетки всех других типов тканей растительного организма. У взрослых организмов при делении меристематической клетки одна из дочерних клеток дифференцируется, а вторая остается в составе меристемы, пополняя пул клеток образовательной ткани.

Особым типом образовательной ткани является раневая меристема, которая образуется из специализированных клеток в районе повреждения растительного организма. Специализированные клетки, пройдя процесс дедифференцировки, приобретают способность делиться и давать начало новым клеткам, из которых затем может формироваться покровная ткань (пробка), закрывающая место повреждения, либо может образовываться рыхлая паренхиматозная ткань (*каллус*), на основе которой могут формироваться новые органы растения и, при определенных условиях, целый организм. Таким образом, еще одной особенностью растительных организмов является сохранение у соматических клеток взрослых особей свойства тотипотентности.

4.2. Виды культур клеток растений

Чаще в культуру вводят клетки семенных растений, что связано с их значением в практической деятельности человека. Наиболее удобными объектами считаются двудольные и однодольные травянистые. Сложнее подобрать условия для культивирования клеток древесных форм, особенно голосеменных растений.

Начало любой культуре дает группа клеток, отделенная от целого организма, – *эксплант*. Эксплант помещается в питательную среду, и в случае, если эксплант состоит из специализированных клеток, происходит их дедифференцировка (образование каллуса) и последующее размножение клеток делением и рост культуры. В дальнейшем, варьируя условия, из культуры клеток можно получить культуру тканей, органов или целый организм.

Стоит учитывать, что ткани растения могут быть заселены микроорганизмами и служить источником контаминации (заражения). Микроорганизмы могут находиться на внешних поверхностях растительного организма (эпифитная микрофлора) или в его тканях (внутренняя инфекция). Ввиду этого перед переносом экспланта на питательную среду следует провести его стерилизацию. Обычно обработка экспланта включает три основных этапа: мытье в мыльном растворе, кратковременное погружение в 70%-ный этанол, погружение в стерилизующий раствор (время экспозиции и состав раствора зависят от

типа экспланта). В качестве стерилизующего раствора используют спирты, растворы антибактериальных и фунгицидных препаратов. После каждой стадии обработки эксплант тщательно промывают водой.

Выделяют три основных типа культур изолированных клеток растений: 1) каллусная культура на твердой среде, 2) суспензионная культура, 3) культура протопластов.

Культура клеток каллусных тканей

В природных условиях не все растения способны образовать каллусную ткань. *In vitro* можно подобрать условия для каллусообразования большинства растений. Клетки каллусной ткани можно культивировать на поверхности твердых питательных сред (каллусная культура) и в виде суспензий в жидких питательных средах.

Каллусная ткань представляет собой неорганизованную пролиферирующую ткань, состоящую из недифференцированных клеток. Она аморфна, не имеет строгой анатомической структуры.

Каллусные культуры могут различаться по цвету (беловатые, бежевые, зеленые, коричневые, бурые; бурый и коричневый цвета являются признаком стареющих каллусов), по составу (гомогенные – состоят из клеток одного типа, гетерогенные – состоят из клеток разных типов), по консистенции (рыхлые, среднеплотные, плотные).

Получение первичного каллуса, готового для пересадки (пассирования, субкультивирования), занимает, в зависимости от вида организма, 3–8 недель от момента помещения экспланта в питательную среду.

Далее каллус может быть полностью или частями перенесен на свежую питательную среду любой консистенции.

Суспензионная культура

Суспензионная культура – культура клеток, выращиваемых в жидкой питательной среде во взвешенном состоянии. Суспензионная культура может состоять как из отдельных клеток, так и из их агрегатов. Суспензионные культуры получают из эксплантов, непосредственно помещенных в питательную среду, или каллусных культур (среднее минимальное количество равно 2–3 г на 60–100 мл). Суспензионные культуры требуют более частого субкультивирования, чем культуры, выращиваемые на твердой среде. Для роста суспензионных культур важную роль играет тщательное перемешивание и эффективная аэрация.

Культура изолированных протопластов

Протопласт – клетка, лишенная клеточной стенки. Протопласты получают за счет обработки клеток ферментами, разрушающими клеточную стенку (целлюлаза, гемицеллюлаза, пектиназа). Ферментативный метод, предложенный Коккингем, позволяет получать протопласты непосредственно из тканей растения, каллусных и суспензионных культур.

Для культивирования протопластов используют те же среды, что и для выращивания растительных клеток, характеризующиеся в 2–4 раза более высокой концентрацией ионов кальция и более высокой осмолярностью (добавка маннита, сорбита). Протопласты можно культивировать в толще агара или в виде суспензионной культуры.

Со временем происходит регенерация клеточной стенки и возможен переход клеток к каллусообразованию. Культуры протопластов используют для генетических манипуляций (введение чужеродной ДНК, слияние содержимого клеток).

4.3. Среда и добавки для культивирования клеток и тканей растений

Среды, применяемые для культивирования изолированных клеток растений, должны включать все необходимые макроэлементы (N, P, S, Mg, K, Ca, Mg, Fe) и микроэлементы (B, Mn, Zn, Cu, Mo и др.) в доступной форме. Поскольку питание большинства культивируемых клеток и тканей является гетеротрофным, обязательным компонентом питательной среды является источник углерода и энергии. Для этих целей чаще всего используют сахарозу или глюкозу, обычно в концентрации 20–40 г/л.

В состав большинства сред входят витамины: тиамин, пиридоксин, пантотеновая кислота, рибофлавин, биотин, аскорбиновая кислота.

В состав сред часто входят регуляторы роста растений – фитогормоны (ауксины, цитокинины, гиббереллины, абсцизовая кислота). Фитогормоны и их синтетические аналоги добавляют в зависимости от способности клеток синтезировать их самостоятельно. Большинство клеток нуждаются для роста в добавке ауксинов и цитокининов. Опухолевые клетки способны расти на средах без добавки фитогормонов. Способность образовывать гормоны может возникать у клеток спонтанно при последовательных пересевах. Культуры, вновь приобретшие способность синтезировать гормоны, называют «привыкшими» и культивируют на средах без добавки данных соединений.

Ауксины и цитокинины добавляют с целью стимуляции деления клеток и каллусогенеза. Ауксины запускают процесс дедифференцировки специализи-

рованных клеток, а цитокинины ускоряют последовательный переход от одной фазы клеточного цикла к другому и к митозу. Основной природной формой ауксина является гетероауксин – β -индолил-3-уксусная кислота (ИУК). Также применяют обнаруженную у некоторых растений индолил-3-масляную кислоту (ИМК) и синтетические α -нафтил-1-уксусную кислоту (НУК) и 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4-Д). Цитокинины являются N-замещенными производными аденина и представлены кинетином, зеатином, 6-бензиламинопурином (БАП) и др.

Для поддержания роста суспензионных культур в среду также могут вносить гиббереллины, в частности гибберелловую кислоту.

При работе с протопластами в среду могут добавлять абсцизовую кислоту, являющуюся антагонистом ауксинов и цитокининов.

В состав питательной среды могут входить растительные экстракты (например, эндоспермы семян и соки деревьев). Культивирование некоторых клеток и тканей возможно только на средах с добавкой растительных экстрактов сложного состава.

Питательные среды могут включать антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота и глутатион.

Для ингибирования роста микроорганизмов в среду вносят противомикробные препараты.

Для приготовления плотных питательных сред добавляют агар-агар (в концентрации 6–10 г/л) или используют другие биогели.

Оптимальное значение кислотности среды для культивирования растительных клеток находится в интервале $\text{pH} = 5,0 \dots 6,2$.

В условиях промышленного культивирования к питательной среде добавляют пеногасители.

Основные питательные среды для культивирования растительных клеток: среда Мурасиге и Скуга, среда Гамборга и Эвелега, среда Уайта, среда Нича и Нич, среда Као и Михайлюка, среда Шенка – Хильдебрандта. В промышленности чаще всего применяют среду Мурасиге – Скуга (прил. 3) и среду Шенка – Хильдебрандта.

4.4. Условия культивирования изолированных клеток и тканей растений

Для успешного культивирования культур клеток растений значение имеет соблюдение температурных режимов. Оптимальной температурой для роста большинства культур является $+26 \pm 1$ °С, для культур клеток и тканей тропических растений – $+29 \pm 1$ °С.

Другим важным фактором, оказывающим влияние на развитие культур растительных клеток, является свет (интенсивность излучения, длина волны, фотопериодизм). Культивирование меристемных тканей и их микроразмножение происходит на свету. Свет необходим для культивирования фотосинтезирующих культур (например, каллусов мандрагоры), хотя и в этом случае в среду дополнительно вносят источники органического углерода. Большинство каллусных культур не имеет хлоропластов, питается гетеротрофно и не нуждается в свете как источнике энергии. В некоторых случаях свет может выступать в качестве сигнала к синтезу вторичных метаболитов и началу морфогенеза. Длина волны света оказывает влияние на синтез некоторых соединений (например, флавоноидов).

Оптимальный уровень влажности воздуха равен 60–70 %. Показано, что состав атмосферы может оказывать влияние на ростовые показатели культур растительных клеток, но конкретный эффект пока мало изучен.

Для поддержания оптимальных условий для культивирования используют специальные климатические камеры – фитотроны.

4.5. Метод получения и культивирования каллусных тканей

Каллусы можно получать из различных частей растений, в том числе из кончиков корней. Для эффективного каллусообразования важен размер экспланта. Оптимальная величина экспланта равна 5–10 мм³ и его масса – 20–100 мг. Многие растительные ткани имеют физиологическую полярность. Кончики корней легче образуют каллус, если они помещены на среду горизонтально.

Для культивирования на питательных средах важна стерильность экспланта, поэтому лучше использовать корешки семян, полученные при проращивании стерилизованных семян в стерильных условиях. Подготовка семян проводится следующим образом: 10–15 семян помещают в чашку Петри, содержащую 6%-ный раствор хлорамина, до их полного погружения и оставляют на 20 мин; семена трижды промывают стерильной дистиллированной водой, стерильные семена заливают стерильной водой и оставляют для набухания на 24 ч, жизнеспособные семена стерилизуют в 6%-ном растворе хлорамина 20 мин повторно, семена промывают стерильной дистиллированной водой трижды. Помещают семена в стерильные чашки Петри. Проращивают семена. Стерильными инструментами (скальпель, препаровальная игла, пинцет) изолируют корешки из пророщенных семян, отделяют кончики корешков (2–3 мм) и переносят в чашки Петри со стерильной дистиллированной водой. Затем фрагменты корешков помещают на поверхность питательной среды и слегка вдавливают

в нее. Чашку Петри запечатывают парафильмом и помещают в термостат при температуре 25 °С на 3–4 недели.

Перенос фрагмента каллусной ткани на свежую питательную среду носит название «пассирование», или «субкультивирование тканей». Пассировать ткань можно практически неограниченное число раз. Однако после многократных пересевов способность каллусных тканей дифференцироваться в целый организм снижается. В процессе культивирования каллус пассируют каждые 4–6 недель. Масса транспланта (фрагмента ткани, который пассируют на свежую питательную среду) составляет 60–100 мг на 20–40 мл среды. Пассирование включает разделение каллусов на фрагменты размером примерно 1×1 см и перенос на поверхность свежей среды с последующим культивированием в описанных ранее условиях.

Суспензионную культуру получают из рыхлой каллусной ткани, помещая фрагмент каллуса в жидкую питательную среду того же состава, что применялась для выращивания каллуса. Культивирование проводят в колбах, которые помещают на качалки со скоростью вращения 100–120 об/мин. Объем суспензии должен составлять не более 10–20 % от объема колбы для культивирования. Для инициации суспензионной культуры необходимо 2–4 г свежей рыхлой массы каллусных клеток на 60–100 мл жидкой питательной среды. Время нарастания биомассы может варьировать от 2 до 10 недель.

4.6. Параметры роста культуры клеток растений

Рост культуры (накопление биомассы) изолированных клеток растений происходит за счет увеличения количества клеток путем деления, а также за счет увеличения размера клеток (роста растяжением). *Ростовой цикл* – период от помещения инокулюма на свежую питательную среду до следующего субкультивирования или отмирания.

Основным параметром оценки роста культуры является изменение количества клеток, количества биомассы и количества ДНК / белка. Как правило, при культивировании растительные клетки образуют агрегаты, что затрудняет прямой подсчет количества клеток под микроскопом с использованием камеры Горяева. Предварительно агрегаты должны быть диспергированы для получения отдельных клеток.

Как и в случае микроорганизмов, при периодическом культивировании рост культуры изолированных клеток растений описывает кривая роста, на которой выделяют несколько фаз: лаг-фазу, фазу экспоненциального роста, фазу замедления роста, стационарную фазу и фазу отмирания.

Лаз-фаза характеризуется отсутствием роста, клетки не размножаются и не увеличиваются в размерах. По мере прохождения этой фазы в клетках активируется метаболизм, увеличивается объем цитоплазмы и количество органоидов, начинается синтез ДНК. В **фазу экспоненциального роста** увеличение количества биомассы происходит главным образом за счет увеличения количества клеток вследствие их интенсивного деления. В клетках увеличивается объем цитоплазмы, уменьшается вакуоль, растет число митохондрий. В конце фазы скорость деления клеток снижается, а количество биомассы растет, в том числе за счет увеличения размера клеток (рост растяжением). Далее прирост биомассы происходит как за счет увеличения количества клеток, так и за счет увеличения их размеров. Переход в **фазу замедления роста** связан с истощением среды и накоплением продуктов обмена. На этом этапе роста культуры количество клеток не изменяется, но их размер продолжает увеличиваться. Также растет морфологическая гетерогенность клеток. Индуцируются ферменты, катализирующие синтез вторичных метаболитов. Затем наступает **стационарная фаза**, характеризующаяся максимальным количеством биомассы. В клетках уменьшается объем цитоплазмы, вакуоль достигает максимально возможной величины, разрушаются органоиды, снижается интенсивность дыхания, происходит активный синтез вторичных метаболитов.

Для культур растительных клеток рассчитывают **индекс роста (I)** по следующей формуле:

$$I = (X_t - X_0) / X_0, \quad (18)$$

где X_t – количество биомассы в определенный момент времени ростового цикла; X_0 – количество биомассы в момент начала ростового цикла.

Для количественных расчетов параметров роста культуры изолированных клеток растений применяют те же математические модели, что и в случае культивирования микроорганизмов. По изменению количества клеток или концентрации биомассы за определенный период времени экспоненциального роста можно рассчитать **константу удельной скорости роста (μ)**:

$$\mu = (\ln X_2 - \ln X_1) / (t_2 - t_1), \quad (19)$$

где X_1 – количество биомассы в момент времени t_1 ; X_2 – количество биомассы в момент времени t_2 .

Во многих случаях данный способ расчета малоприменим на практике, поэтому часто определяют **удельную скорость роста (V)**:

$$V = (X_t - X_0) / X_0 t, \quad (20)$$

где X_t – количество биомассы в момент окончания ростового цикла; X_0 – количество биомассы в момент начала ростового цикла; t – продолжительность ростового цикла.

Также часто требуется вычислить *время удвоения (M)*:

$$M = \ln 2 / V, \quad (21)$$

и произвести расчет *экономического коэффициента (Y)*:

$$Y = (X - X_0) / (S_0 - S), \quad (22)$$

где X – концентрация биомассы в момент окончания ростового цикла; X_0 – концентрация биомассы в момент начала ростового цикла; S – концентрация субстрата в момент окончания ростового цикла; S_0 – концентрация субстрата в момент начала ростового цикла.

4.7. Области применения культивирования изолированных клеток и тканей растений

Технологии культуры изолированных клеток растений находят широкое применение в области науки и индустрии.

С использованием культур клеток проводят исследование биохимии, физиологии и генетики растений. Культуры клеток и тканей используют в качестве модельных объектов для изучения метаболизма растений, клеточного деления и дифференцировки, регуляции морфогенеза, механизмов адаптации к неблагоприятным факторам среды, взаимодействия с патогенами.

Растения продуцируют широкий спектр веществ, обладающих полезными свойствами и применяемых в медицине, сельском хозяйстве, при производстве фармпрепаратов и косметических средств. Культуры клеток используют в качестве эффективных продуцентов этих ценных веществ (алкалоидов, стероидов, гликозидов, гормонов, эфирных масел и др.). Кроме того, культуры клеток применяют в качестве биокатализаторов в процессах биотрансформации. Использование культур клеток и тканей для производства целевых веществ имеет ряд преимуществ по сравнению с традиционным культивированием растений. Процесс на основе культур изолированных клеток не зависит от климата, сезона, погодных условий. Культура изолированных клеток может сверхпродуцировать целевое вещество, в то время как целый организм будет производить все

необходимые ему типы молекул. У клеточных технологий выше продуктивность, особенно в случае медленно растущих и сложно культивируемых растений. Кроме того, с использованием генно-модифицированных клеток можно получать новые вещества.

Биотехнологическое производство вторичных метаболитов осуществляют преимущественно с использованием каллусных тканей в суспензионной культуре.

Развитие технологий культуры изолированных клеток и тканей растений имеет значение для развития агропромышленного комплекса. В частности, обеспечивает клональное размножение растений и оздоровление посевного материала, повышает эффективность селекционного процесса, в том числе с применением методов клеточной и генной инженерии. Известно, что некоторые свойства растений сохраняются у их отдельных клеток и наоборот (в частности, устойчивость к гербицидам, засухе, засолению, способность к продукции определенных веществ). Исходя из этого, селекцию можно проводить на клеточном уровне (клеточная селекция), получая, например, устойчивые клеточные линии путем последовательного пересева с ужесточением условий, которые затем можно использовать для получения целых растительных организмов, обладающих признаком устойчивости.

Клеточные технологии позволяют проводить оплодотворение *in vitro*, регенерацию растений из тканей бесплодных гибридов, получать новые сорта путем гибридизации соматических клеток и отдаленной гибридизации, а также получения трансгенных растений путем введения в их геном чужеродных генов.

Еще одним важным направлением использования культур клеток и тканей растений является сохранение генофонда. Для этих целей используют протопласты, суспензионные культуры, каллусные культуры, культуры меристем, зародыши. Биологические объекты сохраняют либо в виде растущих коллекций, либо в замороженном виде (криоконсервирование). Растущие коллекции содержат биологические объекты в живом виде на/в питательных средах. Для замедления скорости роста хранение проводят при сниженных температурах, также с этой целью в среду добавляют абсцизовую кислоту и маннит / сорбит. В таком виде объект может храниться около года. Замораживание и хранение при температуре, равной $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$, позволяет сохранять биологические объекты более продолжительный период времени. Чтобы замораживание и оттаивание не вызвало повреждение и гибель клеток из-за кристаллизации внутриклеточной воды, применяют специальные вещества – криопротекторы. В качестве криопротекторов используют диметилсульфоксид, сахара, глицерин, этиленгликоль.

5. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ ЖИВОТНЫХ

5.1. Клетки животных как объект культивирования

Клетки животных относятся к эукариотическому типу. В отличие от растительных, они не имеют клеточной стенки и пластид, а также не содержат крупных вакуолей. Клеточная мембрана клеток животных достаточно эластичная, что позволяет им приобретать различные формы и размеры. Клетки в животном организме существуют в неразрывной связи друг с другом и формируют ткани различных типов и органы, выполняющие определенные функции. Ткани животных, как правило, имеют сложное строение и состоят из разных типов клеток, которые соединены внеклеточным матриксом, содержат нервы и кровеносные сосуды. В условиях организма при нарушении нормальных связей с окружением запускается процесс программируемой клеточной смерти (апоптоз), и клетка погибает. Однако при создании благоприятных условий отдельные клетки, выделенные из органов и тканей, могут сохранять жизнеспособность и делиться, формируя культуру клеток.

Животные клетки для культивирования могут быть получены практически из любой ткани организма. В составе органов и тканей клетки окружены внеклеточным матриксом, который образован специальными белками (коллаген, фибронектин, эластин и др.). Для выделения отдельных клеток ткань измельчают и обрабатывают ферментативными препаратами, разрушающими внеклеточный матрикс (коллагеназа, трипсин). В некоторых случаях клеточную культуру можно получить, поместив небольшой участок ткани (эксплант) в питательную среду. Для выделения клеток крови подобных процедур не требуется, поскольку они не связаны с матриксом.

Одной из особенностей клеток животных является то, что большинство из них, за исключением клеток крови, способны расти в искусственных условиях только в прикрепленном состоянии. В качестве субстрата для прикрепления используются пластик, стекло, желатин и коллаген. При отделении от субстрата клетки останавливают рост, размножение и гибнут. Эта особенность животных клеток обуславливает необходимость использования для их культивирования специальной посуды: культуральные флаконы (плоские и круглые), культуральные пробирки со скошенным дном, культуральные чашки Петри и многоруночные планшеты.

5.2. Классификация культур животных клеток

Культуры клеток различают по их источнику (вид животного, тип ткани, орган), состоянию ткани на момент выделения (нормальная или опухолевая), способу выращивания и способу получения (происхождению). По способу выращивания различают монослойные, суспензионные и культивируемые на микроносителях культуры. Культуры клеток животных в большинстве случаев являются субстрат-зависимыми и способны расти только в прикрепленном состоянии. Для их культивирования используют пластик или стекло, поверхность которых в некоторых случаях модифицируют, покрывая их элементами внеклеточного матрикса. Такие культуры чаще всего выращивают в виде монослоя (2D-культура). Клетки прикрепляются к поверхности, распластаются на ней и начинают деление, пока не образуется сплошной слой, занимающий всю поверхность. После образования сплошного монослоя, в котором клетки плотно прилегают друг к другу, их деление останавливается (контактное торможение).

Некоторые виды клеток, например клетки крови, в естественных условиях существуют во взвешенном состоянии. Существуют также искусственно измененные линии клеток, которые не могут прикрепляться к поверхности. Это свойство является полезным при масштабировании процесса культивирования или для наработки высокой биомассы клеток, получение которой возможно только при культивировании суспензионной культуры в ферментерах и культиваторах. Получение большого количества клеток, в частности, необходимо при культивировании вирусов, получении вакцин и диагностикумов.

Разработан способ культивирования поверхностно зависимых клеток в суспензии, предусматривающий использование микроносителей, в качестве которых используют силикагель, сефадекс и другие подобные материалы. В процессе культивирования клетки прикрепляются к твердым частицам носителя и формируют монослой. Такой метод культивирования широко используется в клеточной биотехнологии.

Многие клетки при монослойном культивировании быстро теряют свои функциональные и дифференцировочные свойства. Для ряда культур удалось добиться перехода к 3D-культивированию, которое сопровождается морфологическими и функциональными изменениями клеток, приводящими к образованию сфероидов. Сформировавшиеся микросферы в течение длительного культивирования способны сохранять постоянный размер, жизнеспособность и обладают повышенной плюрипотентностью по сравнению с клетками монослойной культуры, что создает новые перспективы для регенеративной медицины.

Клетки для культивирования можно выделять из различных тканей и органов животных различных видов. По способу получения культуры животных

клеток подразделяют на: непереживаемые (первичные) – культуры клеток, изолированных непосредственно из организма, до первого пассирования; переживаемые (постоянные) – культуры клеток, способных к размножению *in vitro* неопределенно длительное время; полупереживаемые (диплоидные) – культуры клеток, сохраняющие исходный диплоидный набор хромосом в течение 50 пересевов.

Основную часть клеток организма животных составляют дифференцированные клетки, которые приобрели свою конечную специализацию и редко вступают в процесс деления. Они очень востребованы для исследований, поскольку являются главными структурно-функциональными единицами всех органов и тканей и служат мишенью большинства лекарств и других биологически активных соединений. Такие клетки в культуре можно получить путем направленной дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток в нужный тип клеток. Однако данный способ сопряжен со значительными техническими сложностями, а при использовании человеческих клеток еще и с этическими проблемами.

В тех случаях, когда необходимо работать с дифференцированными клетками, часто используют первичные клеточные культуры – клетки, выделенные из зрелой ткани и не пассированные *in vitro*. Для них характерна гетерогенность клеточного состава и низкая пролиферативная активность. Число возможных делений таких клеток при культивировании невелико и сильно зависит от условий. Исключением являются стволовые и некоторые специализированные клетки, например Т- и В-лимфоциты. Первичные культуры обладают значительными преимуществами по сравнению с иммортализованными и раковыми клетками, поскольку значительно лучше соответствуют клеткам в живом организме (макрофаги фагоцитируют бактерии, нейроны проводят электрические импульсы, гепатоциты секретируют альбумин и т.д.). Недостатками первичных культур являются трудоемкость их получения, ограничение количества клеточных делений, а также в ряде случаев ограниченная доступность материала для их получения. Клетки первичной культуры, которые способны сохранять диплоидный кариотип при последовательных пересевах, называют диплоидной культурой или линией диплоидных клеток. Количество делений, в течение которого диплоидные культуры способны сохранять жизнеспособность при последовательных пересевах, определяется лимитом Хейфлика, хотя конкретное число делений зависит от вида организма. В среднем человеческие клетки могут претерпеть 50–60 делений. Эта характеристика в значительной степени зависит от возраста индивидуума, от которого были получены клетки. Клетки новорожденных, например, делятся 70–90 раз, а 70-летнего человека 20–30 раз. Основ-

ным параметром, определяющим число делений, является длина теломер – концевых участков хромосом, которые защищают хромосомы от деградации. При каждом акте репликации теломеры укорачиваются. Существует фермент теломеразы, способный удлинять теломерную ДНК. Индукция экспрессии гена каталитического компонента теломеразы (естественная или искусственная) дает клетке способность к неограниченному делению, т.е. делает клеточную линию бессмертной. Примером таких клеток могут служить раковые клетки. На способность клеток к делению, помимо возраста донора, влияют условия культивирования, в первую очередь состав питательной среды, возможная токсичность ее компонентов и т.д.

С точки зрения выделения первичных культур клетки животных легко доступны при наличии объекта. Доступность человеческих клеток зависит от типа ткани. Широко используются, например, культуры эндотелиальных клеток человека из пуповинной вены (HUVEC) и мезенхимальных стромальных клеток из жировой ткани. Их источниками служат побочные продукты акушерства и хирургии. Эти культуры имеют набор генов донора и могут использоваться для изучения причин патологий конкретного пациента. В настоящее время к культивированию доступен обширный перечень: эпителиальные клетки, фибробласты (элементы соединительной ткани), мышечные клетки, нервные клетки (нейроны и глиальные клетки), клетки кости и хряща и др. Данные культуры используются для оценки морфологических, биохимических и физиологических особенностей клеток организма, а также тестирования различных фармакологических продуктов. Первичные культуры опухолевых клеток в последнее время активно используются для изучения чувствительности опухолевых клеток к химиопрепаратам.

Наиболее часто из культур дифференцированных клеток человека используют фибробласты. Фибробласты являются клеточным элементом соединительной ткани, которая составляет значительную часть массы тела человека. Эти клетки обладают целым рядом особенностей, которые позволяют использовать их как удобный объект исследований, в частности они легко культивируются. Фибробласты *in vitro* сохраняют важнейшие черты, свойственные клеткам в организме человека. Они содержат рецепторы к гормонам, в том числе инсулину и нейромедиаторам.

В последнее время широкое распространение получило культивирование стволовых клеток. Стволовые клетки – это клетки живых организмов, которые способны впоследствии дифференцироваться, т.е. получать специализацию и далее развиваться как клетка какой-либо ткани. Они способны асимметрично делиться, из-за чего при делении образуется клетка, подобная материнской (са-

мовоспроизведение), а также новая клетка, которая способна дифференцироваться. Стволовые клетки размножаются путем деления, как и все остальные клетки. Отличие стволовых клеток состоит в том, что они могут делиться неограниченно, в отличие от зрелых клеток. В различных органах и тканях взрослого организма существуют бластные клетки – частично созревшие стволовые клетки, готовые быстро дозреть и превратиться в клетки нужного типа. Например, частично созревшие клетки мозга – это нейробласты, кости – остеобласты. Дифференцировка может запускаться под действием как внутренних, так и внешних факторов. Эмбриональные стволовые (ES – embrionic stem) клетки являются наиболее универсальными. Их получают на самой ранней стадии развития плода из той его части, которая в норме дает начало трем разным зародышевым листкам более позднего эмбриона, а затем всем органам и тканям. Большинство доступных для использования ES-клеточных линий человека получены от эмбрионов, созданных в результате искусственного оплодотворения. Характерными чертами таких клеток являются: теломеразная активность – способность достраивать теломеры при репликации, что приводит к увеличению количества возможных циклов деления; плюрипотентность – способность образовывать любую из тканей организма; хоуминг – способность при введении в организм находить зону повреждения и фиксироваться там, восполняя утраченную функцию.

Значительно более удобными для культивирования, чем первичные линии дифференцированных клеток, являются постоянные (перевиваемые) клеточные линии. Такие линии могут возникнуть при случайной трансформации клеток первичных культур, однако возможно и их искусственное получение с использованием методов генной инженерии. Перевиваемые линии клеток в отличие от первичных культур адаптированы к условиям *in vitro* и сохраняют жизнеспособность в течение нескольких десятков пассажей. Кроме того, они обладают высокой скоростью роста, могут достигать при культивировании более высокой плотности и, следовательно, обеспечивать более высокий выход биомассы, могут расти на более дешевых средах, часто способны к суспензионному росту. Некоторые трансформированные культуры становятся иммортализованными (бессмертными), однако не приобретают признаков злокачественности. В качестве примеров трансформации можно назвать широко используемые в производстве биологических препаратов линии клеток: 4647 (почки зеленой мартышки), СНО (клетки почки сирийского хомячка), MDCK (клетки почки собаки).

Наиболее распространенными в лабораторной практике среди перевиваемых культур являются культуры раковых клеток, главным преимуществом ко-

торых является отсутствие предела числа делений. У некоторых опухолевых линий такая трансформация происходит в результате развития патологического процесса *in vivo*. Одной из самых известных среди множества клеточных линий является HeLa – культура клеток эндотелия матки Генриетты Лакс (Henrietta Lacks). Начало этой клеточной линии дали клетки, полученные в 1951 году, до сих пор способные к делению, несмотря на то, что десятки лет находились в замороженном состоянии. Они неприхотливы в культивировании, хорошо переносят консервацию и сохраняют на своей поверхности достаточно универсальный набор рецепторов. К недостаткам постоянных клеточных линий относятся повышенная хромосомная нестабильность, утрата специфических маркеров, отклонение от исходного фенотипа, недостаточная гетерогенность по сравнению с первичными культурами.

Культуры клеток человека, мыши, крысы, кролика и других животных собраны в коллекциях, которые хранятся в жидком азоте при температуре –196 °С. Наиболее полной является коллекция ATCC (American Type Culture Collection) в США, которая насчитывает более 4000 клеточных культур эукариот. В настоящее время в России формируется и пополняется несколько коллекций. Среди них коллекция ИБХ РАН, коллекция Института вирусологии им. Ивановского, Проект МГУ «Ноев ковчег» и др.

В настоящее время существуют коллекционные, детально охарактеризованные линии клеток почти для каждого типа опухоли и здоровой ткани, что позволяет подбирать наиболее подходящие для конкретного исследования линии и сравнивать результаты с полученными ранее в своей или в других лабораториях.

5.3. Среды для культивирования изолированных клеток животных

Питательная среда для культивирования животных клеток должна поддерживать их жизнеспособность и обеспечивать условия, с одной стороны, близкие к условиям в организме, с другой стороны, оптимальные с точки зрения продуктивности или проведения исследования. В отличие от дрожжей и бактерий клетки животных не имеют клеточной стенки и окружены только мембраной, что обуславливает их высокую чувствительность к составу питательных сред. Изменение состава среды может вызвать остановку деления, нарушение дифференцировки и в конечном итоге гибель клеток. С учетом этого вопрос о выборе среды для культивирования животных клеток является крайне важным.

Одним из важных параметров, который при культивировании необходимо поддерживать на определенном уровне, является осмолярность среды, поскольку она определяет водный баланс клеток. Поддержание осмолярности осуществляется за счет присутствия в составе среды сбалансированной смеси солей. Помимо этого, соли обеспечивают поддержание рН среды, нейтрализуя продукты метаболизма клеток, и служат источником необходимых для клеток элементов (натрий, калий, кальций, магний, железо, цинк и др.). В большинстве сред в качестве главного компонента системы, поддерживающей рН, используется бикарбонатный буфер (подобно буферной системе крови). Для контроля рН в среду добавляют индикатор (феноловый красный), который меняет цвет при изменении этого параметра. Пожелтение среды свидетельствует о закислении ($\text{pH} < 6,5$), появление фиолетовой окраски – о ее защелачивании ($\text{pH} > 7,5$). При росте культуры, как правило, происходит закисление среды и появление желтой окраски, свидетельствующее о необходимости замены среды. Наличие индикатора в то же время служит контролем ее стерильности. Изменение цвета среды, в которую не засеивались клетки, свидетельствует о ее контаминации бактериями или грибами. Для предотвращения роста микроорганизмов в питательные среды часто добавляют антибиотики и противогрибковые препараты.

В качестве источника энергии питательные среды для культивирования животных клеток обычно содержат глюкозу, однако иногда используют пирuvat или ацетат натрия.

Для нормального метаболизма и пролиферации клеткам животных необходимы такие компоненты, как аминокислоты, липиды, нуклеотиды и микроэлементы. Все животные клетки нуждаются в незаменимых аминокислотах, однако некоторые клеточные линии утратили способность к синтезу некоторых заменимых аминокислот, которые необходимо вносить в среду. Обязательным компонентом питательных сред является незаменимая аминокислота L-глутамин, которая достаточно легко разрушается при повышении температуры (термолабильна). Ее разрушение вызывает появление в среде ионов аммония, которые могут повреждать мембрану и являются токсичными для некоторых клеток. Учитывая это, L-глутамин обычно добавляют в питательную среду непосредственно перед посевом.

В питательных средах должны присутствовать также витамины, которые выполняют функции коферментов и необходимы для нормального протекания процессов метаболизма в клетках. Ростовые факторы, которые необходимы для роста и пролиферации клеток, как правило, вносятся в питательную среду в составе сыворотки крови животных. Сыворотка, кроме того, является источником гормонов, липидов и минералов. Ее добавляют к среде в количестве 5–20 об. %.

В большинстве случаев используется сыворотка крови крупного рогатого скота, новорожденных телят, лошадей и других животных. Однако сыворотка может быть источником заражения культур микоплазмами, вирусами или прионами, что существенно ограничивает ее применение при производстве биомедицинских продуктов. Использование сыворотки нежелательно также при исследовании действия на клетки гормонов, факторов роста, цитокинов, поскольку данные вещества могут присутствовать в ее составе. В этих случаях используют малосывороточные или бессывороточные среды. Более предпочтительным, однако более дорогостоящим вариантом для этих целей является использование рекомбинантных белковых препаратов стандартного состава, очищенных ростовых факторов и заменителей сыворотки.

В 1950 году была разработана одна из первых сред для культивирования клеток животных питательная среда 199, которая включала более 60 компонентов и предназначалась для поддержания культуры первичных эксплантов. В настоящее время среда 199 применяется для продукции вакцин, культивирования первичных эксплантов и тканей хрусталика. Позже Гари Иглом была создана минимальная среда Игла (MEM), которая содержит 13 аминокислот, 6 водорастворимых витаминов, холин и инозит в качестве углеводородного субстрата.

Помимо этого, существуют ее модификации, разработанные Дульбекко (DMEM) и Исков (IDMEM (IMDM)). Эти среды отличаются по набору и концентрации аминокислот, витаминов, углеводов, микроэлементов и других компонентов и используются в зависимости от необходимых индивидуальных условий для выращивания различных клеток. В частности, среда DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) содержит в четыре раза больше аминокислот и витаминов, чем среда MEM (Minimum Essential Medium), а также различные добавки, улучшающие рост клеток. Эта среда, наряду с MEM, является наиболее распространенной средой для культивирования клеток. Среда IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) – модификация среды DMEM, содержит селенит натрия, добавочные аминокислоты и витамины, пируват натрия, ХЕПЕС и нитрат калия вместо нитрата железа. Среда IMDM используется для поддержания культур клеток В-лимфоцитов, В-клеток, стимулированных полисахаридами, Т-лимфоцитов и гибридов.

Позднее были разработаны специальные среды для культивирования лимфобластов и производства моноклональных антител (RPMI-1640); для выращивания стволовых, мало дифференцированных и некоторых дифференцированных клеток (DMEM/F12); для выращивания клеток насекомых (среда Грейса, среда Шнейдера) и др. В связи с широким применением питательные

среды выпускаются в готовом к использованию виде многими производителями. Обычно они поставляются стерильными во флаконах различного объема со специальными добавками или без них.

5.4. Условия, приборы и посуда для культивирования изолированных клеток животных

Для культивирования клеток животных используется специальная посуда, большая часть которой предназначена для культивирования клеток в монослое. Чаще всего культивирование проводят с использованием флаконов, чашек Петри, матрасов, планшетов, роллерных сосудов, колб, изготовленных из стекла или пластика. Каждый материал имеет свои преимущества. Стеклопосуда может использоваться многократно, химически и биологически инертна, термостойка, имеет хорошие адгезионные свойства поверхности, которые способствуют прикреплению клеток. В последнее время, однако, чаще используется одноразовая пластиковая посуда, изготовленная из прозрачного материала полистирола. Она проста в применении, выпускается в стерильном виде и готова к использованию без предварительной обработки. В процессе производства стерилизация посуды осуществляется различными методами: физическим (облучение ультрафиолетовым светом или гамма-лучами), химическим (обработка газами: окись этилена, жидкостями: этанол, перекиси). Данная посуда обязательно проходит контроль на нетоксичность для клеток. При монослойном культивировании клетки оседают на поверхности сосуда, где прикрепляются и распластаются. Для улучшения адгезионных свойств полистироловой поверхности ее часто подвергают специальной обработке для придания ей отрицательного заряда. При культивировании мышечных, нервных, некоторых видов эпителиальных клеток и в некоторых других случаях поверхность полистирола обрабатывают компонентами внеклеточного матрикса, такими как полилизин, коллаген, желатин, для придания ей положительного заряда. Для монослойного культивирования в зависимости от задач используют разные по размеру сосуды: от многолуночных планшетов с площадью поверхности отдельных лунок в несколько квадратных миллиметров до флаконов с площадью 180 см². С целью контроля аэрации используют крышки разного типа, которые могут пропускать или не пропускать газовую среду. Культивирование субстрат-зависимых клеток в специальных роллерных системах позволяет выращивать их на большой площади флакона с использованием минимального количества питательной среды. В этом случае используется вся поверхность роллерной бутылки, и питательная среда поступает к клеткам благодаря ее постоянному вращению.

Важнейшими параметрами для культивирования животных клеток являются температура, влажность и газовый состав среды. Клеточные культуры животных и человека культивируются при температуре 37 °С, влажности 70–100 % и содержании в атмосфере 5 % CO₂.

Оптимально такие условия соблюдаются в специальных CO₂-инкубаторах. В инкубационных камерах таких приборов поддерживается необходимый уровень влажности, концентрация кислорода и углекислого газа с помощью дозированного или непрерывного поступления нужного газа. Контроль этих параметров осуществляется с определенной периодичностью с помощью специальных датчиков, которые реагируют на любые изменения. Помимо этого, инкубаторы оснащены системой равномерного распределения подаваемого газа по камере, что необходимо для обеспечения восстановления гомогенности среды при ее нарушении, например при открытии инкубатора. Инкубатор, помимо поддержания температуры, влажности и определенного газового состава, должен предохранять клеточные культуры от контаминации. Его камера должна легко дезинфицироваться. Современные приборы снабжены системой активной деконтаминации, которая позволяет эффективно и быстро провести обеззараживание камеры перед использованием путем нагрева до +160 °С. Для повышения эффективности культивирования клеток используют принудительное перемешивание питательных сред, что обеспечивает газообмен. С этой целью используются лабораторные встряхиватели, которые обеспечивают перемешивание в ротационном или линейном режиме.

Для культивирования клеток могут использоваться роллерные установки, которые позволяют эффективно культивировать клетки в цилиндрических сосудах с небольшим количеством питательной среды. С их помощью круглые в сечении сосуды вращаются в горизонтальном положении с небольшой скоростью, обеспечивая постоянное перемешивание питательной среды, что способствует интенсивному росту клеток. В условиях массового культивирования такие установки снабжают системой, которая позволяет удалять старую среду и вводить новую без остановки вращения. Для масштабирования процесса используют многоэтажные флаконы и роллеры.

При выращивании субстрат-независимых или суспензионных культур используются приборы, которые обеспечивают перемешивание культуральной среды. Для массового суспензионного культивирования клеточных культур используются специальные биореакторы. Биореактор состоит из сосуда для культивирования, системы для подачи питательной среды, газов и инокулята, а также устройства для отбора продуктов, включающего насосы и соединительные трубопроводы, систем управления температурой, pH, окислительно-восстано-

вительным потенциалом и другими параметрами. В лабораторных условиях используются сосуды небольшого объема (1–20 л), при технологическом культивировании объем сосудов значительно больше (30–400 л). Общим правилом является заполнение сосудов не более чем на 75 %. В биореакторе присутствует система аэрации, которая часто сочетает продувку газов и механическое перемешивание среды. При суспензионном культивировании в биореакторах большее значение имеет перемешивание клеток. Для каждого типа клеток подбираются скорость и способ перемешивания, которые не позволяют клеткам оседать, однако не оказывают на них значительного механического воздействия.

С целью контроля состояния клеток в процессе их роста к биореактору подключают систему с программой контроля, которая обеспечивает оптимальные условия масштабного культивирования клеток. Подобные системы используют при производстве вакцин, моноклональных антител или рекомбинантных препаратов.

В ряде случаев культивирование клеток проводят при мягком волновом перемешивании. Покачивание установки вызывает волновое перемешивание среды и клеток, не позволяющее клеткам оседать, а также обеспечивает поступление к ним питательной среды. Данная система может быть использована как при культивировании субстрат-зависимых клеток, так и клеток, прикрепленных к микроносителям.

Важнейшим условием работы с культурами клеток является строгое соблюдение стерильности. При несоблюдении асептических условий на любом этапе культивирования может произойти контаминация среды микроорганизмами. Вирусы, грибы, различные бактерии, в том числе внутриклеточные паразиты микоплазмы, могут попасть в культуру из первичного материала, из воздуха, среды, добавок, с рабочей поверхности, посуды или от человека, который работает с культурой. Работа должна проводиться в чистой одежде и стерильных перчатках. Работы с клеточными культурами проводят в ламинарном боксе II класса защиты. Это устройство защищает и рабочее пространство с клеточным материалом, и оператора за счет постоянного вертикального потока стерильного воздуха. Воздух, выходящий из рабочего пространства, проходит через специальный фильтр, что предотвращает выброс в среду инфицированного материала. Воздух в ламинарном боксе и рабочая поверхность стерилизуются с использованием ультрафиолета. Все среды, добавки, сыворотку, растворы необходимо контролировать на отсутствие микроорганизмов, о наличии которых может свидетельствовать помутнение, появление осадка, изменение цвета. Для предотвращения контаминации в среду для культивирования клеток добавляют антибиотики и противогрибковые препараты. Все, что вносится в рабочее

пространство ламинарного бокса (флаконы со средой, сыворотками, добавками, посуда и т.д.), обязательно следует обрабатывать 70%-ным этанолом. Для переноса среды и добавок используются одноразовые пипетки или дозаторы с одноразовыми наконечниками с фильтром. Для исключения перекрестного загрязнения культур следует использовать разные бутылки со средой и другими компонентами при работе с разными культурами. В отличие от контаминации большинством бактерий и грибов заражение культуры микоплазмой нельзя заметить визуально. Оно выявляется посевом на специальную среду или методом флуоресцентного окрашивания.

5.5. Стадии роста культуры клеток животных

После выделения из тканей либо посева из культуры или замороженных образцов клетки восстанавливаются от стресса (устраняют повреждения в мембране, восстанавливают отрезанные ферментами рецепторы) и начинают приспособляться к новым условиям (прикрепляются к доступным поверхностям, переходят на новый режим метаболизма, изменяют форму и экспрессию генов и т.д.). Эта стадия развития клеточной культуры называется *лаг-фазой* и продолжается 2–24 ч.

Растущие клетки делятся примерно один раз в 24 ч. При отсутствии каких-либо ограничений клетки равномерно распределены по клеточному циклу, и если количество клеток удваивается через равные промежутки времени, то говорят, что культура находится в экспоненциальной фазе роста (*логарифмическая фаза*). Обычно после короткого периода экспоненциального роста тот или иной фактор становится лимитирующим, что может происходить в результате истощения какого-либо компонента среды или в результате того, что культивируемые клетки полностью покроют поверхность, на которой растут. После этого скорость роста замедляется, и количество клеток в культуре достигает насыщения. Когда деление клеток прекращается, наступает *стационарная фаза роста* культуры, за которой следует фаза снижения количества и *гибели клеток*.

Эти фазы характерны для всех клеточных линий и позволяют получить индивидуальные характеристики культур: продолжительность лаг-фазы, время удвоения популяции, а также насыщающую плотность клеток в монослое. Воспроизводимость данных характеристик возможна только в культурах с постоянными условиями культивирования. В процессе роста каждая клетка проходит все фазы клеточного цикла, характерные для эукариотических клеток в тканях.

Иногда необходимо получить синхронную культуру, в которой клетки находятся в одной и той же фазе клеточного цикла. Это возможно осуществить

с использованием разных подходов. Можно блокировать развитие клеток, чтобы они накапливались на определенной стадии цикла. С этой целью может быть применена химическая или физиологическая блокировка, однако в этом случае клетки подвергаются неблагоприятному воздействию и могут стать аномальными по некоторым параметрам.

Еще один подход связан с отбором клеток на определенной стадии клеточного цикла. Наиболее заметными событиями в растущих клетках являются деление и синтез ДНК. Эти явления могут служить маркерами для определения фазы клеточного цикла. В начале митоза клетки округляются, и начинается их подготовка к делению. На стадии метафазы клетки слабо прикреплены к субстрату, и их легко отделить встряхиванием или мягкой обработкой раствором трипсина. Это свойство лежит в основе метода синхронизации клеточных культур путем отбора митотических клеток.

В некоторых случаях в процессе жизнедеятельности первичных клеточных культур происходит трансформация, которая заключается в изменении ростовых свойств культивируемых клеток. Как правило, трансформация – необратимый процесс, сопровождающийся генетическими изменениями, которые лежат в основе появления нового фенотипа. Общими чертами трансформированных клеток являются: укорочение клеточного цикла, уменьшение зависимости от добавки в среду сыворотки, изменение морфологических параметров (размеров клеток), увеличение количества возможных делений, возрастание потенции к образованию опухолей. Такое изменение свойств, вероятно, связано с адаптацией животных клеток к условиям ограничения роста и размножения. Трансформированные клетки способны расти в условиях менее благоприятного соотношения площади поверхности прикрепления к объему среды. В некоторых случаях трансформированные клетки приобретают способность расти в суспензионных культурах.

5.6. Пассирование культур животных клеток

При постоянном росте клеток место на поверхности сосуда для культивирования или в объеме культуры заканчивается, в результате чего происходит контактное ингибирование роста. В связи с этим время от времени клетки необходимо пересевать (пассировать). Для этого необходимо открепить клетки от поверхности, разбить клеточные скопления и засеять клетки в меньшей плотности в другую посуду со свежей средой, что даст им возможность размножаться дальше. Возраст культуры обычно определяется числом таких пересевов. Помимо недостатка места при постоянном делении клеток может проис-

ходить накопление токсичных продуктов выделения и мертвых клеток в питательной среде, что также негативно влияет на рост и деление клеток.

Клетки животных необходимо пассировать каждые 3–4 дня. При пассировании клеток обязательно указывается количество пассажей, культуры клеток после ее получения. Ограничение на использование клеток по числу пассажей имеет место при применении культуры клеток в производстве вакцин или других медицинских иммунобиологических препаратов. Диплоидные клетки обычно используют в пределах 15–40 пассажей, при которых гарантируется биобезопасность и сохранность характеристик клеток.

Для отделения клеток субстрат-зависимых культур от субстрата обычно используют смесь раствора Версена, содержащего ЭДТА и 0,25 % раствора трипсина. Если культура растет медленно или активно меняет рН, периодически производят замену среды без переноса клеток в другой сосуд (обычно раз в 2–3 дня), удаляя часть использованной среды и добавляя свежую.

Пассаж иногда называют субкультивированием, подразумевая при этом процедуру переноса части активно пролиферирующей клеточной культуры в другой культуральный сосуд со свежей питательной средой. Субкультивирование обычно включает: удаление истощенной питательной среды, диссоциацию клеток монослоя при помощи трипсина или других гидролитических ферментов, разведение клеток в новом сосуде и свежей среде. Для культивирования и субкультивирования используется полная питательная среда, которую готовят, добавляя в основную питательную среду (например, MEM) глутамин, эмбриональную телячью сыворотку и при необходимости антибиотики. Культивирование можно проводить, используя разные виды посуды, однако в настоящее время для адгезивных культур часто используют флаконы с разной площадью поверхности для прикрепления клеток. Пассирование производят в обеззараженном УФ-излучением пространстве ламинарного шкафа. Дозаторы, флаконы, бутылки со средой и растворами перед пересевом обязательно протирают ватным тампоном, смоченным в 70%-ном этаноле, и только после этого помещают их в ламинарный бокс. Старую среду из флакона с клеточной культурой аккуратно удаляют дозатором. Клетки дважды промывают раствором PBS. Для этого заливают небольшой объем раствора в культуральный флакон, покачивают несколько раз и сливают. Клетки с поверхности снимают раствором трипсина. Для этого вносят во флакон небольшой объем раствора трипсина, распределяют его по дну флакона покачиванием и инкубируют при 37 °С 4–5 мин. Отделение клеток фиксируют по помутнению раствора. Реакцию трипсинизации останавливают добавлением во флакон двойного объема ростовой среды. Клетки аккуратно собирают со дна флакона пипетированием и переносят клеточную суспензию

пензию в центрифужную пробирку и центрифугируют в течение 5 мин при 200g. После центрифугирования аккуратно сливают надосадочную жидкость, добавляют 2 мл полной питательной среды, тщательно перемешивают пипетированием до образования гомогенной суспензии клеток. После этого определяют концентрацию клеток в суспензии с использованием камеры Горяева (подсчитывают количество клеток в пяти больших квадратах камеры и вычисляют количество клеток в 1 мл, используя формулу (8)).

На основании полученных результатов рассчитывают объем суспензии, содержащей заданное количество клеток с учетом площади дна культурального флакона (в новый флакон необходимо перенести столько суспензии, чтобы в нем содержалось $2 \cdot 10^4$ клеток/см²), и переносят необходимое количество клеток в новый культуральный флакон. Затем добавляют необходимое количество новой культуральной среды и помещают культуральный флакон в СО₂-инкубатор.

5.7. Оценка жизнеспособности клеточной культуры

В настоящее время клеточные культуры активно используются для тестирования биологически активных веществ и лекарственных препаратов как альтернативная замена животных моделей, что позволяет снизить количество тестируемого вещества, ускоряет анализы и в последующем снижает общую стоимость лекарственного средства. Одним из основных цитологических тестов является определение жизнеспособности (предназначен для прогнозирования выживаемости) и пролиферации (определение динамических свойств клеточной культуры), которое применяется для большого количества химических веществ.

Существует множество методов анализа жизнеспособности, основанных на различных процессах, протекающих в клетках, таких как активность ферментов, проницаемость клеточной мембраны, адгезия клеток, продукция АТФ, производство коэнзимов и активность поглощения нуклеотидов. Однако в связи с трудоемкостью и/или большой погрешностью измерения не все перечисленные методы широко применяются в практике работы с культурами клеток.

Для оценки состояния клеточных культур часто используются красители, которые могут проникать в клетки и связываться с различными клеточными структурами. Для наблюдения за клетками в культуре и определения их состояния часто применяют витальную (прижизненную) окраску. Одним из красителей, который используют, чтобы отличить клетки с поврежденными мембранами, является трипановый синий. При кратковременной инкубации неповрежденные мембраны непроницаемы для этого высокомолекулярного вещества. Краситель проникает в клетку и адсорбируется на ядерных белках только при

значительных повреждениях мембраны, так что даже слабое окрашивание ядра свидетельствует о значительном повреждении клетки и ее гибели. О жизнеспособности культуры при окрашивании трипановым синим можно судить по соотношению количества окрашенных (мертвых) и неокрашенных (живых) клеток. При этом подсчет общего числа клеток и количества окрашенных клеток осуществляют в камере Горяева. Количество клеток считают в 25 больших квадратах. Жизнеспособность культуры (ЖК) определяют по формуле

$$\text{ЖК} = (1 - (\text{K1} / \text{K2})) \cdot 100 \%, \quad (23)$$

где ЖК – жизнеспособность культуры, %; K1 – количество окрашенных клеток; K2 – общее количество клеток.

Популярным подходом для оценки жизнеспособности являются микротитрационные тесты, которые проводятся на многолуночных, чаще всего 96-луночных, планшетах. Данный подход обладает ощутимыми преимуществами: позволяет одновременно проводить исследование большого количества образцов, экономичен, позволяет быстро проводить эксперименты и прост в использовании. Наиболее широко используемым микротитрационным тестом является оценка жизнеспособности клеток при помощи МТТ. МТТ – это желтый водорастворимый краситель на основе тетразолия, который под действием сукцинатдегидрогеназы и некоторых других ферментов дыхательной цепи митохондрий превращается в сине-фиолетовый водонерастворимый кристаллический формазан, кристаллизующийся внутри клетки. Количество образовавшегося формазана пропорционально числу клеток с активным метаболизмом. Перевод формазана в раствор с помощью подходящих органических растворителей, таких как диметилсульфоксид (ДМСО) или изопропиловый спирт, и последующая фотометрия позволяют точно сопоставить изменение оптической плотности раствора по отношению к контролю с изменением количества жизнеспособных клеток, а в цитотоксических исследованиях оценить специфическую гибель клеток, индуцированную тем или иным цитотоксическим агентом. Ограничением для использования МТТ-теста может послужить влияние исследуемого агента на работу митохондрий. В этом случае использование данного метода некорректно. МТТ-тест позволяет сравнить токсическое действие на культуру клеток различных соединений или токсичность одного и того же соединения в различных условиях и на различных культурах. Результаты МТТ-теста позволяют построить кривые «доза – эффект», по которым возможно рассчитать концентрацию препарата, ингибирующую жизнеспособность культуры клеток на 50 % – IC50.

Резазурин представляет собой водорастворимый краситель, который используется в лабораторной практике с 1950-х гг. для оценки дрожжевой и бактериальной контаминации молока. В отличие от МТТ, резазурин восстанавливается более широким спектром ферментов. Кроме митохондриальных дегидрогеназ, его способны восстанавливать также цитохромы и дегидрогеназы, локализованные в цитоплазме клеток. Резазурин проникает в живые клетки и практически не флуоресцентен. При попадании в клетки он восстанавливается до резоруфина благодаря активности клеточных дегидрогеназ ферментов, принимая электроны от NADPH, FADH₂, FMNH₂, NADH и цитохромов. Данная реакция сопровождается изменением цвета от синего индиго до яркого флуоресцентного красного. Образующееся соединение диффундирует из клеток в культуральную среду. Жизнеспособные клетки с активным метаболизмом могут преобразовать резазурин в резоруфиновый продукт, который является розовым или красновато-фиолетовым и флуоресцентным и может быть количественно измерен. Основными преимуществами использования резазурина являются относительная дешевизна и более высокая чувствительность по сравнению с МТТ-тестом.

Метод, который использует содержание АТФ в качестве маркера, также широко распространен в практике оценки жизнеспособности клеток. Когда клетки теряют целостность мембраны, они не способны синтезировать АТФ, а эндогенные АТФазы быстро истощают любую оставшуюся АТФ из цитоплазмы. Как правило, для проведения подобных исследований используются коммерческие наборы, включающие фермент люциферазу, который катализирует монооксигенацию люциферина в присутствии Mg²⁺, АТФ и молекулярного кислорода. Анализ АТФ является самым быстрым в использовании при определении жизнеспособности клеток, а также наиболее чувствительным и стабильным. Люминесцентный сигнал достигает устойчивого состояния и стабилизируется в течение 10 мин после добавления реагента. Преимущество анализа АТФ заключается в отсутствии необходимости длительно инкубировать популяцию жизнеспособных клеток для превращения субстрата (такого как тетразолий или резазурин) в окрашенное соединение.

5.8. Разделение и сортировка клеток

При работе с клеточными культурами в некоторых случаях требуется сортировка клеток по различным параметрам. Крупные клетки можно отделить от мелких путем центрифугирования в градиенте плотности фиколла, перколлы или сахарозы. Таким же способом отделяют легкие клетки от плотных.

Часто используется разделение клеток по иммунофенотипу. В данном случае разделение основано на обнаружении определенных маркеров-антигенов на поверхности или в цитоплазме клеток, которые свидетельствуют о принадлежности клеток к той или иной субпопуляции клеток, выполняющих определенную функцию или находящихся на определенной стадии развития. Чаще всего такой метод используют в работе с лейкоцитами. Клетки метят с помощью флуоресцентных антител, специфичных для определенных антигенов. Затем меченые клетки отделяют в клеточном сортере с помощью метода проточной цитометрии. Этот метод также позволяет разделить клетки по размеру, жизнеспособности и другим признакам. В ходе сортировки клетки с потоком буферного раствора вводят в проточную вибрирующую камеру с форсункой. Клетки в жидкости проходят через световой пучок одного или нескольких лазеров. Рассеяние света клетками измеряется под разными углами, что позволяет определить наличие включений, размеры, соотношение объема ядра и цитоплазмы, жизнеспособность. Таким же способом отделяются клетки, меченные флуоресцентными антителами. Данный метод позволяет сортировать клетки с высокой скоростью (>1000 клеток/с) и высокой точностью, отделяя даже одну меченую клетку из тысячи.

Отделение клеток, несущих определенный антиген, возможно проводить методом магнитной сепарации с применением иммуномагнитных частиц. Метод подразумевает использование парамагнитных микросфер, несущих антитела к поверхностному антигену нужных клеток. Размер микросфер очень мал, и для удержания меченых клеток необходимо наличие высокоградиентного магнитного поля. В процессе разделения суспензию клеток переносят на колонки, клетки с магнитными частицами отделяют с помощью магнита, а остальные вымывают. Меченые клетки отмывают и используют для дальнейшего культивирования. При использовании данного метода возможен и другой подход, когда метятся и отделяются ненужные для культивирования клетки. При этом нужные клетки не подвергаются дополнительному воздействию, остаются неповрежденными, что является предпочтительным при использовании клеток для дальнейшего культивирования.

5.9. Культивирование клеток беспозвоночных

В большинстве случаев существует необходимость в культивировании клеток теплокровных животных и человека. Вместе с тем к настоящему моменту известно около 200 перевиваемых линий клеток беспозвоночных животных, в первую очередь насекомых. Развитие культивирования клеточных культур беспозвоночных связано в первую очередь с развитием исследований по полу-

чению энтомопатогенных препаратов в сельском хозяйстве. Для культивирования энтомопатогенных вирусов необходимо наличие живых клеток насекомых, а использование клеточных культур позволяет решить эту проблему. Культивирование таких клеток проводят на специальных средах, которые сильно варьируют по составу и включают компоненты, характерные для гемолимфы. Эти среды отличаются от сред для культивирования клеток млекопитающих значительно более высоким содержанием аминокислот, органических кислот и более высоким осмотическим давлением. Гемолимфа разных видов членистоногих значительно различается по составу, вследствие этого универсальных сред для культивирования всех клеточных линий членистоногих не существует. Так же как и при культивировании клеток теплокровных животных, первичные культуры служат источником для получения длительно пересеваемых линий клеток беспозвоночных. Клетки беспозвоночных имеют очень длительный период адаптации к условиям культивирования. От момента помещения экспланта в питательную среду до получения первичной культуры проходит от 3 до 10 месяцев. В настоящее время существуют линии клеток беспозвоночных из различных тканей, взятых на разных стадиях развития. Источниками таких клеток служат имагинальные диски, эмбрионы с удаленной оболочкой и отдельные органы.

5.10. Криоконсервация животных клеток

Для хранения музейных культур, сохранения уникальных, впервые полученных культур клеток, а также сохранения клеток определенного уровня дифференцировки используют метод криоконсервации клеток. Важным в этом процессе является создание оптимальных условий заморозки и разморозки, при которых достигается минимальное повреждение клеток от образования внутриклеточных кристаллов льда. Для защиты клеток от повреждений в процессе заморозки используют специальные вещества – криопротекторы в концентрации 2–10 %. В качестве криопротекторов обычно используют глицерин или ДМСО (диметилсульфоксид), которые при заморозке не образуют кристаллов, повреждающих мембраны. Применение этих веществ способствует сохранению жизнеспособности клеток и их морфофункциональных свойств. Сыворотка крови тоже обладает криопротекторными свойствами, в связи с чем в среду для криоконсервирования добавляют сыворотку крови животных в концентрации 10–20 %. Помимо специального состава среды при замораживании клеточных культур необходимо соблюдать оптимальный режим охлаждения – около 1 °С/мин. Для этой цели используют программируемые замораживатели или специальные контейнеры, которые при помещении в низкотемпературный хо-

лодильник ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$) создают необходимую скорость замораживания. Наилучшие условия для хранения клеток создаются при замораживании до температуры жидкого азота ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) и хранении их в специальных криохранилищах, куда клетки помещают после замораживания при $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. В таких условиях клетки могут храниться неопределенно долгое время. Клетки для криоконсервирования обычно отбирают в экспоненциальной фазе роста. Жизнеспособность клеток из замороженного образца зависит и от проведения процедуры отогрева. Чаще всего используют способ быстрого оттаивания на водяной бане при $40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Помимо этого, необходимо соблюдать методику удаления криопротектора из клеток. Для этого свежую среду по каплям вносят в клеточную суспензию, что позволяет медленно выводить криопротектор из органелл и клеток, способствуя сохранению их жизнеспособности.

ГЛОССАРИЙ

Аксеническая культура – лабораторная культура, состоящая из клеток одного вида. По способу получения представляет собой потомство (клон) одной клетки.

Батометр (*греч.* bathos – глубина и metron – мера) – гидрологический прибор, пробоотборник для взятия проб воды с различных глубин водоема.

Биореактор – емкость для масштабного производственного культивирования клеток в суспензии или на микроносителях.

Дифференцировка – стойкое структурно-функциональное преобразование клеток (затрагивающее размер, форму, набор органоидов, метаболическую активность клетки) за счет изменения профиля экспрессии генов, направленное на специализацию клеток на выполнение определенных функций.

Инокулят (*лат.* inoculatio – прививка): 1) определенная по объему и массе доза материала (культуры клеток, вакцины, патологического субстрата и др.), которая вводится в биологическую систему (животный организм, питательную среду, культуру клеток и др.); 2) суспензия клеток, являющаяся исходной для наращивания клеточной культуры и используемая для первоначального посева на питательную среду.

Контаминация – заражение культуры микроорганизмов или эукариотических клеток посторонним биологическим материалом (вирусами, бактериями, грибами, микоплазмами и др.).

Орбитальный шейкер – термостат с вращающейся платформой, на которую крепятся колбы.

Парафильм – это укрывной материал нового поколения, тонкая пленка из воскообразных парафинов, которую можно применять в лабораториях вместо крышек и пробок.

Пассирование клеток – это отбор небольшого количества клеток и перенос их в свежую порцию питательной среды для выращивания в другом культуральном флаконе.

Плюорипотентность – способность дифференцироваться в множество специализированных типов клеток.

Стигма (*от греч. stigma – метка, пятно*) – внутриклеточный органоид одноклеточных водорослей. Стигма обычно выглядит как пятнышко ярко-красного цвета и представляет собой скопление пигмента.

Эвтрофикация (*от греч. Eutrophya – хорошее питание*) – наполнение водоемов биогенными элементами, сопровождающееся ростом биологической продуктивности водных бассейнов. Эвтрофикация может быть результатом как естественных изменений в водоеме, так и антропогенных воздействий.

Эксплант – группа клеток, отделенная от материнского организма. При культивировании клеток используется для получения первичных культур.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Алешина Е. С., Дроздова Е. А., Романенко Н. А. Культивирование микроорганизмов как основа биотехнологического процесса / Оренбург. гос. ун-т; ООО ИПК «Университет». Оренбург, 2017. 191 с.

Биология стволовых клеток и клеточные технологии / под ред. М. А. Пальцева. М.: Медицина: Шико, 2009. Т. 1. 272 с.

Биология стволовых клеток и клеточные технологии / под ред. М. А. Пальцева. М.: Медицина: Шико, 2009. Т. 2. 456 с.

Биотестовый анализ – интеграционный метод оценки качества объектов окружающей среды / А. Г. Бубнов, С. А. Буймова, А. А. Гуцин, Т. В. Извекова; Иванов. гос. хим.-технол. ун-т. Иваново, 2007. 112 с.

Бирюков В. В. Основы промышленной биотехнологии. М.: КолосС, 2004. 296 с.

Блажевич О. В. Культивирование клеток: курс лекций / БГУ. Минск, 2004. 78 с.

Бутенко Р. Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. М.: ФБК-Пресс, 1999. 160 с.

Варфоломеев С. Д., Калюжный С. В. Биотехнология: кинетические основы микробиологических процессов: учеб. пособие для биол. и хим. спец. вузов. М.: Высш. шк., 1990. 296 с.

Вестхайде В., Ригер Р. Зоология беспозвоночных в двух томах: пер. с нем. Т. 1. От простейших до моллюсков и артропод / под ред. проф. А. В. Чесунова. М.: Товарищество научных изданий КМК, 2008. 512 с.

Виноградова А. В., Козлова Г. А. Культивирование микроорганизмов: учеб. пособие / Перм. гос. нац. исслед. ун-т. Пермь, 2012. 97 с.

Водорості ґрунтів України (історія та методи дослідження, система, концепт флори) / І. Ю. Костіков, П. О. Романенко, Е. Н. Демченко [та ін.]; Фітосоціо-центр. К., 2001. 300 с.

Выбор оптимального метода детекции жизнеспособности клеточных культур для тестов на пролиферативную активность и цитотоксичность / А. Н. Афанасьева, В. Б. Сапарова, Т. А. Сельменских, И. Е. Макаренко // Лабораторные животные для научных исследований. 2021. № 2.

Гайсина Л. А., Фазлутдинова А. И., Кабиров Р. Р. Современные методы выделения и культивирования водорослей: учеб. пособие. Уфа: Изд-во БГПУ, 2008. 152 с.

Дьяков Ю. Т. Ботаника: Курс альгологии и микологии: М.: Изд-во МГУ, 2007. 559 с.

Евдокимов Е. В. Динамика популяций в задачах и решениях: учеб. пособие / Томск. гос. ун-т. Томск, 2001. 73 с.

Жизнеспособные простейшие в вечной мерзлоте Арктики / А. В. Шатилов, Л. А. Шмакова, С. В. Губин, Д. А. Гиличинский // Криосфера Земли. 2010. Т. XIV, № 2. С. 69–78.

Зеликман А. Л. Практикум по зоологии беспозвоночных. 2-е изд. М.: Высш. шк., 1965.

Зенова Г. М., Штина Э. А. Почвенные водоросли: учеб. пособие. М.: Изд-во МГУ, 1990. 80 с.

Зухрабова Л. М., Галиева А. М. Оптимизация биотехнологии выращивания хлореллы в лабораторных условиях // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н. Э. Баумана. 2014. Т. 217, № 1. С. 99–102.

Иванов А. В., Полянский И. Ю., Стрелков А. А. Большой практикум по зоологии беспозвоночных: учеб. пособие. М.: Высш. шк., 1981. 504 с.

Клеточная биотехнология / Г. П. Пинаев, М. И. Блинова, Н. С. Николаенко, Г. Г. Полянская, Т. Н. Ефремова, Н. С. Шарлаимова, Н. А. Шубин. СПб.: Изд-во Политехн. ун-та, 2011. 224 с.

Кокова В. Е. Непрерывное культивирование беспозвоночных. Новосибирск: Наука, 1982. 132 с.

Кокова В. Е., Лисовский Т. М. Непропорционально-проточная культура простейших. Новосибирск: Наука, 1976. 75 с.

Колокольцова Т. Д., Сабурова И. Н., Кубатиев А. А. Культуры клеток человека и животных: выделение, культивирование, криоконсервация и контроль: учеб. пособие / РМАПО. 2015. Т. 13, № 2. С. 50–65.

Культура животных клеток. Методы / под ред. Р. Фрешни. М.: Мир, 1989. 318 с.

Молекулярная биология клетки / Б. Албертс, Д. Брей, Дж. Льюис [и др.]. М.: Мир, 1994. Т. 1. 515 с.

Пиневиц Г. Д., Верзилин Н. Н., Михайлов А. А. Изучение *Spirulina platensis* – нового объекта высокоинтенсивного культивирования // Физиология растений. 1970. Т. 17, вып. 5. С. 1037–1046.

Практикум по микробиологии: учеб. пособие для студ. вузов / И. А. Нетрусов, М. А. Егорова, Л. М. Захарчук [и др.]. М.: Академия, 2005. 608 с.

Репин В. С., Сабурова И. Н. Клеточная биология развития. М.: И.С.К.Ч., 2010. 200 с.

Сальникова М. Я. Хлорелла – новый вид корма. М.: Колос, 1977. 96 с.

Симакова А. В., Панкова Т.Ф. Культивирование протистов. Томск: Изд-во Томск. гос. ун-та, 2015. 67 с.

Современные методы выделения, культивирования и идентификации зеленых водорослей (*Chlorophyta*) / А. Д. Темралеева, Е. В. Минчева, Ю. С. Букин, А. М. Андреева. Кострома: Костромской печатный дом, 2014. 215 с.

Фрешни Р. Культура животных клеток: практ. рук-во. М.: Бином: Лаборатория знаний, 2014. 691 с.

Халиуллина Л. Ю. Альгология: учеб. пособие. Казань: ИПК «Бриг», 2018. 86 с.

Хаусман К., Хюлбсман Н., Радек Р. Протистология. М.: Товарищество научных изданий КМК, 2010. 495 с.

Шарова И. Х. Зоология беспозвоночных: учеб. для студ. вузов. М.: Гуманит. изд. центр ВЛАДОС, 2002. 592 с.

IPPAS – коллекция культур микроводорослей Института физиологии растений им. К. А. Тимирязева АН СССР / М. Г. Владимирова, Е. Д. Барцевич, И. А. Жолдаков, О. О. Епифанова, А. Г. Маркелова, И. П. Маслова, Е. С. Купцова // Каталог культур коллекций СССР. М., 1991. С. 8–61.

Adan A., Kiraz Y., Baran Y. Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays // Curr. Pharm. Biotechnol. 2016. Vol. 17, no. 14. P. 1213–1221.

Bold H. C. Some aspects of the taxonomy of soil algae // Annals of the New York Acad. Sci. 1970. Vol. 175. P. 601–616.

Bristol B. M. On the alga-flora of some desiccated English soils: an important factor in soil biology // Annals Bot. 1920. Vol. 34, iss. 1. P. 35–80.

Deason T. R. The genera *Spongiococcum* and *Neospongiococcum* (*Chlorophyceae*, *Chlorococcales*). New species, biochemical characteristics and a summary key // Phycologia. 1976. Vol. 15, no. 2. P. 197–214.

Lee J. J., Soldo A. T. Protocols in Protozoology. Society of Protozoologists. Allen Press, Lawrence Kansas, 1992. 655 p.

Models and Methods for *In Vitro* Toxicity / A. K. Jain, D. Singh, K. Dubey, R. Maurya, S. Mittal, A. K. Pandey // *In Vitro* Toxicology. Elsevier, 2018. P. 45–65.

Revisions to the Classification, Nomenclature, and Diversity of Eukaryotes / Sina M. Adi [et al.] // Journal of Eukaryotic Microbiology. 2019. Vol. 66. P. 4–119.

Use of methylene violet staining procedures to determine yeast viability and vitality / K. A. Smart, K. M. Chambers, I. Lambert, C. Jenkins, C. A. Smart // Journal of the American Society of Brewing Chemists. 1999. Vol. 57. P. 18–23.

Widdel F. Theory and measurement of bacterial growth. Universität Bremen, 2010. 11 p.

Приложение 1

Наиболее вероятное число микроорганизмов в определенном объеме
(по МакКреди) для учета результатов концентрации микроорганизмов
методом предельных разведений

Числовая характеристика	Наиболее вероятное число микроорганизмов при параллельных посевах			Числовая характеристика	Наиболее вероятное число микроорганизмов при параллельных посевах		
	2	3	4		2	3	4
001	0,5	0,3	0,2	241			3,0
002			0,5	300		2,5	1,1
003			0,7	301		4,0	1,4
010	0,5	0,3	0,2	302		6,5	2,0
011	0,9	0,6	0,5	303			2,5
012			0,7	310		4,5	1,6
013			0,9	311		7,5	2,0
020	0,9	0,6	0,5	312		11,5	3,0
021			0,7	313		16,5	3,5
022			0,9	320		9,5	2,0
030			0,7	321		15,0	3,0
031			0,9	322		20,0	3,5
040			0,9	323		30,0	
041			1,2	330		25,0	3,0
100	0,6	0,4	0,3	331		45,0	3,5
101	1,2	0,7	0,5	332		110,0	4,0
102		1,1	0,8	333		140,0	5,0
103			1,0	340			3,5
110	1,3	0,7	0,5	341			4,5
111	2,0	1,1	0,8	350			
112			1,1	400			2,5
113			1,3	401			3,5
120	2,0	1,1	0,8	402			5,0
121	3,0	1,5	1,1	403			7,0
122			1,3	410			3,5
123			1,6	411			5,5
130		1,6		412			8,0
131			1,4	413			11,0
132			1,6	414			14,0
140			1,4	420			6,0

Числовая характеристика	Наиболее вероятное число микроорганизмов при параллельных посевах			Числовая характеристика	Наиболее вероятное число микроорганизмов при параллельных посевах		
	2	3	4		2	3	4
141			1,7	421			9,5
200	2,5	0,9	0,6	422			13,0
201	5,0	1,4	0,9	423			17,0
202		2,0	1,2	424			20,0
203			1,6	430			11,5
210	6,0	1,5	0,9	431			16,5
211	13,0	2,0	1,3	432			20,0
212	20,0	3,0	1,6	433			30,0
213			2,0	434			35,0
220	25,0	2,0	1,3	440			26,0
221	70,0	3,0	1,6	441			40,0
222	110,0	3,5	2,0	442			70,0
223		4,0		443			140,0
230		3,0	1,7	444			160,0
231		3,5	2,0				
232		4,0					
240			2,0				

Приложение 2

Состав синтетической минимальной среды М9

№ п/п	Компонент	Количество
1	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	15,13 г
2	KH_2PO_4	3 г
3	NH_4Cl	1 г
4	NaCl	0,5 г
5	CaCl_2	1,1 г
6	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	24,6 г
7	H_2O	1 л
8	Глюкоза	0,4 %

В случае стерилизации автоклавированием раствор солей кальция и магния готовится отдельно от остальных компонентов среды. Глюкоза может быть заменена на другие органические источники углерода и энергии. Раствор глюкозы готовится и стерилизуется отдельно.

Приложение 3

Состав среды Мурасиге и Скуга (МС)

№ п/п	Компонент	Концентрация, мг/л
1	NH_4NO_3	1650
2	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440
3	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370
4	KH_2PO_4	170
5	KNO_3	1900
6	H_3BO_3	6,2
7	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025
8	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025
9	$\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	22,3
10	KI	0,83
11	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25
12	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,6
13	NaFe-ЭДТА ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ / Na_2 -ЭДТА)	5,57 / 7,45
14	Инозитол	100
15	Никотиновая кислота	0,5
16	Пиридоксин • HCl	0,5
17	Тиамин • HCl	0,1
18	Глицин	2
19	Гидролизат лактальбумина	0 / 1
20	Гетероауксин	1–30
21	Кинетин (цитокинин)	0,04–10
22	Сахароза	0 / 20 000–40 000

Учебное издание

Нестерова Лариса Юрьевна
Ахова Анна Викторовна
Ушаков Вадим Юрьевич

**Культивирование бактерий, одноклеточных эукариот
и изолированных клеток**

Учебное пособие

Редактор *Е. Б. Денисова*
Корректор *Д. Е. Булатова*
Компьютерная верстка: *В. Ю. Ушаков*

Объем данных 2,27 Мб
Подписано к использованию 15.08.2024

Размещено в открытом доступе
на сайте www.psu.ru
в разделе НАУКА / Электронные публикации
и в электронной мультимедийной библиотеке ELiS

Управление издательской деятельности
Пермского государственного
национального исследовательского университета
614068, г. Пермь, ул. Букирева, 15