

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ТОМСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ

МЕЖДУНАРОДНЫЙ ФАКУЛЬТЕТ СЕЛЬСКОГО
ХОЗЯЙСТВА, ПРИРОДОПОЛЬЗОВАНИЯ И ОХРАНЫ
ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Е.В. ЕВДОКИМОВ, С.Ю. СЕМЕНОВ

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ

Учебно-методическое пособие

Томск 2005

УЧЕБНАЯ ПРОГРАММА

Структура курса: лекции - 24 часа, семинары - 20 часов.

Цель курса: Обучение студентов кинетике и стехиометрии размножения клеток, теоретическим основам культивирования клеток в лабораторных и промышленных масштабах с достижением профессионального уровня знаний по составлению кинетических и балансовых уравнений и их решению, составлению сред культивирования, планированию экспериментов, обработки и интерпретации их результатов.

Содержание курса:

Лабораторные методы культивирования микроорганизмов. Питательные среды. Оборудование. Методы стерилизации. Инокуляция и рост. Методы определения концентрации клеток.

Деление клеток в нелимитированных условиях. Описание кинетики деления клеток показательным уравнением с основанием два. Время удвоения. Каноническое дифференциальное уравнение размножения клеток в нелимитированных условиях. Удельная скорость роста. Понятие о периодической культуре клеток. Лаг-фаза, фаза экспоненциального роста, стационарная фаза, фаза деструкции. Постановка эксперимента по измерению удельной скорости роста клеток.

Лимитирование роста, принцип Либиха в аспекте клеточного роста. Зависимость удельной скорости роста клеток от концентрации лимитирующего субстрата, уравнение Моно. Какие характеристики клеток отражают параметры уравнения Моно. Постановка экспериментов по измерению параметров уравнения Моно.

Траты субстрата на клеточный рост. Экономический коэффициент. Траты на поддержание и ростовой экономический коэффициент. Корректировка уравнения экспоненциального роста: удельная скорость роста как функция концентрации клеток.

Ингибирование роста клеток. Уравнение Иерусалимского. Ингибирование субстратом. Зависимость роста клеток от температуры, pH и т.п.

Непрерывное (проточное) культивирование клеток. Хемостат как система с постоянным протоком. Система уравнений Моно для

хеостата. Анализ стационарного состояния хеостата. Явление аутостабилизации концентрации субстрата. Зависимость стационарной концентрации клеток от величины протока. Постановка экспериментов по определению экономического коэффициента, затрат на поддержание, кинетических параметров роста клеток.

Турбидостат как система с управляемым протоком, обеспечивающая нелимитированные условия роста. Генетическая гетерогенность популяции микроорганизмов, наблюдаемая в экспериментальных условиях. Система уравнений Эйгена, их решение, автоселекция клеток в турбидостате. Кинетический критерий отбора при автоселекции в нелимитированных условиях. Вывод основной теоремы естественного отбора Фишера.

Стехиометрия клеточного роста. Понятие биомоля, примеры биомолей для различных микроорганизмов. Использование биомоля и экономического коэффициента при расчетах потребности клеток в кислороде и в минеральных компонентах, примеры расчетов. Расчет питательных сред для культивирования клеток.

Базовое устройство для культивирования клеток - ферментер, его составляющие. Типы ферментеров. Принципы подбора ферментеров для решения конкретных биотехнологических задач.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Методы культивирования клеток микроорганизмов.
2. Среды для культивирования.
3. Методы определения концентрации клеток.
4. Деление клеток в нелимитированных условиях. Описание кинетики деления клеток показательным уравнением с основанием два. Время удвоения.
5. Каноническое дифференциальное уравнение размножения клеток в нелимитированных условиях. Удельная скорость роста.
6. Понятие о периодической культуре клеток. Лаг-фаза, фаза экспоненциального роста, стационарная фаза, фаза деструкции.
7. Постановка эксперимента по измерению удельной скорости роста клеток.
8. Лимитирование роста, принцип Либиха в аспекте клеточного роста.
9. Зависимость удельной скорости роста клеток от концентрации лимитирующего субстрата, уравнение Моно. Какие характеристики клеток отражают параметры уравнения Моно.
10. Постановка экспериментов по измерению параметров уравнения Моно.
11. Траты субстрата на клеточный рост. Экономический коэффициент.
12. Траты на поддержание и ростовой экономический коэффициент.
13. Ингибирование роста клеток. Уравнение Иерусалимского. Ингибирование субстратом.
14. Зависимость роста клеток от температуры, pH и т.п.
15. Непрерывное (проточное) культивирование клеток.
16. Хемостат как система с постоянным протоком. Система уравнений Моно для хемостата. Анализ стационарного состояния хемостата. Явление аутостабилизации концентрации субстрата.
17. Зависимость стационарной концентрации клеток от величины протока в хемостате.
18. Постановка экспериментов по определению экономического коэффициента, трат на поддержание, кинетических параметров роста клеток.
19. Турбидостат как система с управляемым протоком, обеспечивающая нелимитированные условия роста.

20. Генетическая гетерогенность популяции микроорганизмов, наблюдаемая в экспериментальных условиях. Система уравнений Эйгена, их решение, автоселекция клеток в турбидостате.

21. Кинетический критерий отбора при автоселекции в нелимитированных условиях. Вывод основной теоремы естественного отбора Фишера.

22. Стехиометрия клеточного роста. Понятие биомоля, примеры биомолей для различных микроорганизмов.

23. Использование биомоля и экономического коэффициента при расчетах потребности клеток в кислороде и в минеральных компонентах, примеры расчетов. Расчет питательных сред для культивирования клеток.

ЗАДАЧИ

Тема 1. Зависимость удельной скорости роста популяции клеток от концентрации лимитирующего субстрата

Задача 1.1

Условия. С целью определения кинетики размножения популяции бактерий кишечной палочки (*Escherichia coli*) изучали рост и размножение клеток данных бактерий при различных концентрациях лимитирующего субстрата – глицерина. Клетки выращивали при оптимальных условиях и через каждые полчаса измеряли оптическую плотность культуры (показатель, отражающий численность популяции). Полученные в результате эксперимента данные представлены в табл. 1.1.

Таблица 1.1

Время, час	Оптическая плотность культуры E_x при различной концентрации субстрата				
	50 мг/л	100 мг/л	200 мг/л	400 мг/л	800 мг/л
0,00	0,11	0,11	0,07	0,12	0,09
0,50	0,11	0,11	0,07	0,12	0,09
1,00	0,12	0,12	0,09	0,14	0,10
1,50	0,16	0,15	0,12	0,19	0,17
2,00	0,17	0,20	0,18	0,27	0,26
2,50	0,24	0,24	0,24	0,42	0,36
3,00	0,29	0,34	0,31	0,59	0,48
3,50	0,34	0,44	0,49	0,82	0,75
4,00	0,40	0,59	0,61	1,32	1,06
4,50	0,53	0,82	0,94	1,81	1,75
5,00	0,63	1,04	1,36	2,41	2,35
5,50	0,78	1,34	1,79	3,62	3,96

Вопросы. Определить на основе представленных экспериментальных данных кинетические параметры размножения клеток ки-

шечной палочки (параметры уравнения Моно, m_{\max} и K_S).

Тема 2. Лимитированный рост популяции клеток. Экономический коэффициент. Траты на поддержание

Задача 2.1

Условия. Культуру клеток кишечной палочки *E.coli* выращивали в аэробных условиях на бедной минеральной среде с глюкозой, содержащей в качестве единственного источника азота хлорид аммония в лимитирующих рост концентрациях. В ходе опыта измеряли концентрацию биомассы клеток и концентрацию лимитирующего субстрата, хлорида аммония. Данные представлены в табл. 2.1.

Таблица 2.1

Концентрация хлорида аммония S , г/л	Концентрация биомассы клеток X , г/л	$S_0 - S$, г/л	$X - X_0$, г/л
0,70	0,08	0,00	0,00
0,55	0,22	0,15	0,14
0,40	0,32	0,30	0,25
0,30	0,43	0,40	0,35
0,20	0,49	0,50	0,41
0,10	0,59	0,60	0,51

Вопросы. Определить по представленным данным экономический коэффициент Y для хлорида аммония у исследуемой популяции.

Задача 2.2

Условия. С целью определения кинетических параметров K_S и m_{\max} и экономического коэффициента Y , характеризующих рост популяции кишечной палочки *E.coli* на глюкозе, проводили периодическое культивирование клеток *E.coli* на бедной минеральной среде с лимитированием по данному субстрату до выхода популяции в стационарную фазу. В ходе эксперимента измеряли концентрацию

биомассы клеток и концентрацию глюкозы.

Результаты (в интервале от начала экспоненциальной фазы роста до фиксирования стационарного состояния) представлены в табл. 2.2

Таблица 2.2

Время t , час	Концентрация биомассы X , мг/л	Концентрация глюкозы S , мг/л
0	20	2000
0,5	30,52	1976
1	46,6	1940
1,5	71,1	1886
2	108,5	1803
2,5	165,5	1676
3	252,5	1483
3,5	385	1188
4	587	740
4,33	773	326
4,5	885	77
4,56	918	4,4
4,564	919	2,2
5	920	0
5,5	920	0

Вопросы. Определить по представленным данным значения кинетических параметров K_S и m_{\max} и экономического коэффициента Y , характеризующих рост популяции кишечной палочки *E.coli* на глюкозе.

Задача 2.3

Условия. Исследовали кинетику роста популяции бактерий *Pseudomonas fluorescens* в хемостате при различных значениях протока D и концентрации лимитирующего субстрата, глюкозы, в подаваемой питательной среде S_0 . В каждом случае при достижении стационарного состояния хемостата измерялась концентрация био-

массы клеток X и концентрация глюкозы S . Данные измерений представлены в табл. 2.3.

Таблица 2.3

Концентрация субстрата в подаваемой питательной среде S_0 , мМ	Проток D , час ⁻¹	Стационарная концентрация биомассы \bar{X} , г/л	Стационарная концентрация субстрата \bar{S} , мМ
4	0,1	1,903	0,025
4	0,2	1,822	0,056
4	0,4	1,812	0,168
4	0,6	1,67	0,49
4	0,75	1,041	1,858
8	0,1	1,921	0,025
8	0,2	1,892	0,056
8	0,7	1,67	1,04
8	0,75	1,417	1,875
8	0,8	0,27	7,198
16	0,2	1,882	0,057
16	0,4	1,89	0,169
16	0,7	1,728	1,038
16	0,75	1,685	1,883
16	0,8	1,093	7,095

Вопросы. Определить по представленным данным значения кинетических параметров K_S и m_{\max} и экономического коэффициента Y , характеризующих рост в хемостате популяции бактерий *Pseudomonas fluorescens* в указанных условиях.

Задача 2.4

Условия. Исследовали кинетику потребления энергетического субстрата, глюкозы, при росте популяции кишечной палочки *E. coli* в хемостате в стационарных условиях. Опыты проводили при различных начальных концентрациях глюкозы и значениях протока. В ходе эксперимента измеряли стационарные концентрации биомассы и глюкозы. Данные представлены в табл. 2.4.

Таблица 2.4

Начальная концентрация глюкозы S_0 , мМ	Проток D , час ⁻¹	Стационарная концентрация биомассы \bar{X} , г/л	Стационарная концентрация глюкозы \bar{S} , мМ
4	0,1	1,74	0,03
4	0,2	1,93	0,06
4	0,4	2	0,18
4	0,6	1,88	0,49
4	0,75	1,13	1,91
8	0,1	1,96	0,03
8	0,2	2,08	0,06
8	0,7	1,92	1,02
8	0,75	1,68	1,88
8	0,8	0,28	6,98
16	0,2	2,16	0,06
16	0,4	2,18	0,17
16	0,7	2,08	1,01
16	0,75	1,96	1,86
16	0,8	1,26	6,94

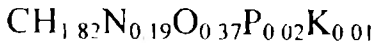
Вопросы. Определить по представленным данным значения ростового экономического коэффициента $Y_{\text{рост}}$ и трат на поддержание m , характеризующих кинетику потребления энергетического субстрата, глюкозы, при росте популяции бактерий *E.coli* в хемостате в указанных условиях.

Тема 3. Биомоль. Расчет потребности культуры клеток в субстратах

Задача 3.1

Рассчитать потребность (грамм на грамм биомассы) в кислороде, аммиаке, фосфате и калии при росте клеток дрожжей на этаноле, если экономический коэффициент равен 0.43

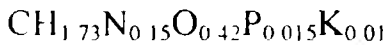
Для расчетов использовать следующий биомоль:



Задача 3.2

Рассчитать потребность (грамм на грамм биомассы) в кислороде, аммиаке, фосфате и калии при росте клеток *Methanomonas* sp. на метаноле, если экономический коэффициент равен 0.35

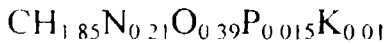
Для расчетов использовать следующий биомоль:



Задача 3.3

Рассчитать потребность (грамм на грамм биомассы) в кислороде, нитрате, фосфате и калии при росте клеток *Pseudomonas* sp. на глицерине, если экономический коэффициент равен 0.51

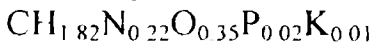
Для расчетов использовать следующий биомоль:



Задача 3.4

Рассчитать потребность (грамм на грамм биомассы) в кислороде, нитрате, фосфате и калии при росте клеток *Methylococcus* sp. на метане, если экономический коэффициент равен 1.1

Для расчетов использовать следующий биомоль:



Тема 4. Кинетика ингибирования роста клеток

Задача 4.1

Условие. Исследовали кинетику ингибирования роста популяции бактерий *E. coli* ионами серебра Ag^+ . С этой целью в пять колб с питательной средой (минеральной с глюкозой) и различной концентрацией нитрата серебра было добавлено одинаковое количество клеток бактерий. Культивирование клеток проводили при оптимальной температуре 37°C и необходимом уровне аэрации. В ходе опыта измеряли оптическую плотность культуры. Данные представлены в табл. 4.1.

Таблица 4.1

Время t , час	Оптическая плотность культуры клеток $E. coli$				
	$[Ag^+] = 0$	$[Ag^+] = 0,02\text{мМ}$	$[Ag^+] = 0,04\text{мМ}$	$[Ag^+] = 0,06\text{мМ}$	$[Ag^+] = 0,08\text{мМ}$
2	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
4	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
6,5	0,011	0,012	0,012	0,011	0,011
7	0,021	0,016	0,014	0,013	0,013
8,5	0,065	0,033	0,024	0,02	0,018
9,8	0,173	0,062	0,039	0,029	0,024
10,4	0,271	0,083	0,048	0,034	0,028
11,5	0,619	0,142	0,071	0,047	0,036

Вопросы. Определить по представленным данным значения константы K_i и коэффициента нелинейности n ингибирования роста бактерий *E. coli* ионами серебра.

Тема 5. Автоселекция и отбор в проточных популяциях микроорганизмов

Задача 5.1

Условия. В ферментере в условиях нелимитированного культивирования выращивали популяцию бактерий *Pseudomonas sp.* при использовании формальдегида в качестве субстрата, единственного источника углерода и энергии. Применяемый штамм бактерий в условиях эксперимента имел удельную скорость роста $m = 0,25 \text{ час}^{-1}$.

Вопросы. Рассчитать примерное время вытеснения исходного штамма бактерий мутантным, клетки которого являются более резистентными к формальдегиду и имеют более высокую удельную скорость роста $m = 0,43 \text{ час}^{-1}$, если известно, что частота появления таких мутаций равна $x_{\text{мут}}/x_{\text{исх}} = 2,3 \cdot 10^{-6}$ на одну генерацию. За критерий вытеснения взять соотношение концентраций клеток исходного штамма к мутантному $x_{\text{мут}}/x_{\text{исх}} = 1000/1$.

Задача 5.2

Условия. В исследованиях по автоселекции, микроэволюции популяции дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* при их нелимитированном культивировании в турбидостате в течение 100 часов регистрировались данные о динамике конкуренции трех штаммов клеток, отличающихся по форме колоний. Для этого в ходе эксперимента путем высева образцов культуры клеток на чашки Петри определялось среднее количество клеток каждого штамма в расчете на 1000 клеток. Данные представлены в таблице 5.1.

Таблица 5.1

Время, час	Штамм 1 x_1	Штамм 2 x_2	Штамм 3 x_3
0	990,00	9,50	0,50
10	979,58	18,93	1,49
20	958,34	37,29	4,37
30	915,70	71,76	12,54
40	834,07	131,62	34,31
50	693,79	220,47	85,74
60	497,22	318,18	184,60
70	293,77	378,57	327,66
80	143,98	373,62	482,41
90	61,38	320,76	617,86
100	23,94	251,98	724,08

Вопросы. Провести анализ представленных данных и определить удельные скорости роста клеток штамма 2 и штамма 3, если известно, что штамм 1 (базовый) имеет удельную скорость роста $m = 0,28 \text{ час}^{-1}$.

Литература

Основная

1. Перт С. Основы культивирования микроорганизмов и клеток. М.: Мир, 1978. - 331 с.

Дополнительная

1. Дж. Бейли, Д. Оллис. Основы биохимической инженерии. Т.1. М.:Мир,1989. – 692 с. Главы 5(5.10) и 7.
2. Евдокимов Е.В. Динамика популяций в задачах и решениях. Томск: Томский государственный университет. 2001. - 73 с.
3. Печуркин Н.С. и др. Популяционные аспекты биотехнологии. Новосибирск. Наука. 1990.- 173 с.
4. Варфоломеев С.Д., Гуревич К.Г. Биокинетика: Практический курс.- М.: ФАИР-ПРЕСС, 1999. – 720 с.

Отпечатано на участке оперативной полиграфии
Редакционно-издательского отдела ТГУ
Лицензия ПД №00208 от 20 декабря 1999 г.

Заказ № 27 от "10" 02 2005 г. Тираж 50 экз.