**Лабораторная работа №5 (2 часа)**

**Тема: Получение чистой культуры посевного материала**

**Цель занятия:** изучить методику получения чистой культуры посевного материала.

**Материалы и оборудование:** споры микроорганизмов, пробирки скошенной агаризованной средой, крахмал, вазелиновое масло, картофельно-мальтозный агар, глицерин.

**Теоретическое обоснование работы**

Посевным материалом называют чистую культуру микроорганизма, которая получается путем ее последовательного пересева из пробирки в колбу, а затем в аппараты увеличивающегося объема, вплоть до большого посевного аппарата, из которого она передается в производство при вводе в работу очередного ферментатора, или в работающий ферментатор для поддержания в нем роста основной культуры продуцента.

Приготовление посевного материала производится по стадиям:

1 – получение культуры микроорганизма в микробиологической лаборатории;

2 – выращивание дрожжей в малом посевном аппарате;

3 – выращивание дрожжей в большом посевном аппарате;

4 – накопление культуры микроорганизма в малом ферментаторе (который также называют большим инокулятором);

5 – накопление культуры микроорганизма в промышленном ферментаторе (для заводов большой производительности)

Первая стадия выращивания посевного материала осуществляется в заводской микробиологической лаборатории. При этом ставится задача сохранить исходный штамм в неизменном состоянии.

Споры микроорганизмов, которые образованы неполовым путем, представляют собой наилучшую форму сохранения исходной, музейной культуры продуцента биологически активных веществ. Однако при длительном хранении даже совершенно однородных клеток и спор могут возникнуть спонтанные нерегулируемые мутации. Поэтому необходимо не только соблюдать правила хранения и поддержания исходной культуры, но и периодически проводить рассев культуры проверку ее однородности как по морфологическим, так и по физиологическим признакам. При рассеве из колонии, давшей наилучшие показатели на диагностирующей среде, делают новый рассев в 30-40 пробирок. Затем из каждых 5-6 пробирок отбирают одну и проверяют находящийся в ней микроорганизм на способность образовывать то вещество, продуцентом которого он является, например белок или липиды. Проведение такой непрерывной селекции позволяет сохранить в активной форме исходную культуру продуцента.

Однородный штамм микроорганизма высевают в пробирки на скошенные агаризованные среды оптимального для каждого штамма состава и выращивают его до определенного возраста в оптимальных условиях.

Готовую культуру в пробирках помещают в холодильник и хранят при температуре 3-4°С. Пересевы культур проводят через определенные промежутки времени с таким расчетом, чтобы наилучшим образом сохранить физиолого-биохимические свойства штамма. Длительные промежутки между пересевами недопустимы, так как микроорганизм в процессе роста и хранения потребляет из среды питательные вещества и накапливает продукты обмена, вредно влияющие на его свойства. При пересевах следует переносить только споры или небольшие кусочки мицелия без питательной среды, чтобы в свежую питательную среду не вносить продукты метаболизма. Для длительного хранения некоторых штаммов целесообразно использовать бедные сахарами крахмальные среды.

Более длительное время можно хранить культуру под слоем вазелинового масла. Для этого целесообразно использовать вазелиновое масло медицинского назначения. Оно не должно содержать токсических и окисленных продуктов. Слой масла должен быть на 1 см выше агарового среза. Слишком большой слой масла может повлечь за собой гибель культуры из-за недостатка кислорода.

Культуру заливают стерильным маслом после того, как она достигнет полной физиологической зрелости. Для этого способа хранения наилучшей средой считается картофельно-мальтозный агар.

Известны способы хранения культур при температурах -11-14°С. в этих условиях многие культуры полностью сохраняют активность в течение 10-16 мес.

Грибные и дрожжеподобные культуры успешно хранят в замороженном состоянии в атмосфере жидкого азота при температурах -165-196°С. культуры замораживают в 10%-ном водном растворе глицерина и помещают в ампулы, которые запаивают. Ампулы хранят в контейнере с жидким азотом. По данным микробиологов, даже после 5-летнего хранения микроорганизмы сохраняют все физиолого-биохимические свойства.

Перспективным следует признать способ хранения культур в лиофилизированном состоянии. Культуру микроорганизма помещают в защитную среду, замораживают и подвергают вакуумной лиофильной сушке. В качестве защитной среды можно использовать сахаро-желатинную среду. Клетки микроорганизма помещают в стерильные ампулы, закрывают стерильными ватными тампонами и быстро замораживают при температурах -35 -78 °С. Затем ампулы переносят в вакуум-сушильный аппарат и высушивают при комнатной температуре и остаточном давлении 1,0 - 10,0 Па в течение 25-30 ч. Лиофильно высушенные культуры могут сохраняться до 5-6 лет без потери способности к быстрому росту и накоплению целевого продукта. Этот способ считается наиболее эффективным.

Штамм можно хранить длительное время в стерильной почве. Для этого почву стерилизуют и вносят в нее культуру продуцента. При возобновлении культуры смыв с почвы высевают на чашки Петри и выделяют на косой питательный агар.

Часто штамм хранят на зерне, например, на пшене. Для этого пшено, очищенное от примесей, кипятят в минимальном количестве воды до полного поглощения влаги (на 1 кг пшена 800 мл воды), распаривают в течение 30 мин, высыпают на чистый стол, разбирают образовавшиеся комки и остывшее пшено по 15-16 г засыпают в стерильные флаконы объемом 250 мл, которые затем стерилизуют при давлении 0,1 МПа в течение 40 мин. На стерильное распаренное пшено наносят 2 мл густой взвеси конидий или 2 мл двухсуточной вегетативной биомассы продуцента, выращенного в колбах на качалках. Культуру продуцента выращивают при периодическом встряхивании при температуре 25-35 °С. Выросшую культуру высушивают в вакууме при температуре 25 °С в течение 60-70 ч до влажности пшена 7-8 %.

Хранящиеся в заводской микробиологической лаборатории чистые культуры микроорганизмов по мере необходимости подаются в производство. Для этого штамм микроорганизма из пробирки переносят в конические колбы с питательной средой, состав которой соответствует составу среды, используемой в производстве. Колбы помещают на качалки в оптимальные условия и контролируют развитие в них микроорганизмов. Затем разводку чистой культуры, находящейся в стадии интенсивного роста, задают в малый посевной аппарат с подготовленной питательной средой (вторая стадия выращивания посевного материала).

Третья стадия культивирования посевного материала осуществляется в посевных аппаратах, а четвертая стадия – в ферментаторах. И если предприятие имеет очень большую производительность, то в схему приготовления посевного материала вводится пятая стадия, т.е. еще один ферментатор, в 4-5 раз больший по объему ферментатора четвертой ступени.

**Порядок выполнения лабораторной работы**

1. Изучить стадии приготовления посевного материала.

2. В условиях заводской микробиологической лаборатории пронаблюдать все стадии приготовления посевного материала.

3. Занести в тетрадь все данные об условиях культивирования и технологических режимах приготовления посевного материала.

**Контрольные вопросы:**

1. Сколько существует стадий приготовления посевного материала?
2. Охарактеризуйте каждую стадию приготовления посевного материала.
3. Опишите основные параметры приготовления питательных сред.