ПОЛУЧЕНИЕ НАКОПИТЕЛЬНОЙ КУЛЬТУРЫ МИКРООРГАНИЗМОВ BACILLUS SUBTILIS (КАРТОФЕЛЬНОЙ ПАЛОЧКИ) МЕТОДОМ НАКОПИТЕЛЬНЫХ КУЛЬТУР

OBTAINING A CUMULATIVE CULTURE OF BACILLUS SUBTILIS (POTATO STICK) MICROORGANISMS BY THE METHOD OF ACCUMULATIVE CULTURES

УДК 579.66

Попова Анна Андреевна, бакалавр, Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, г. Москва.

Popova A.A. popovstvo@gmail.com

Аннотация

В статье рассматривается суть метода накопительных культур, благодаря которому возможно увеличить популяцию микроорганизмов. Подбирается участок окружающей среды или объект, содержащий необходимое стартовое количество целевых микроорганизмов. Из данного участка для исследования берется проба биологического материала, предполагается, что нужный микроорганизм содержится в данной пробе, опираясь на среду обитания объекта. Подбирая специфические условия, становится возможным вырастить устойчивый штамм исследуемых микроорганизмов. В статье описано исследование, в ходе которого была получена накопительная культура картофельной палочки, описан характер роста микроорганизмов. В результате исследования готовится препарат фиксированных клеток и проводится микроскопия.

Annotation

The article considers the essence of the method of accumulative cultures, thanks to which it is possible to increase the population of microorganisms. A section of the environment or an object containing the required starting number of target microorganisms is selected. A sample of biological material is taken from this site for research, it is assumed that the desired microorganism is contained in this sample, based on the habitat of the object. By selecting specific conditions, it becomes possible to grow a stable strain of the studied microorganisms. The article describes a study during which a cumulative culture of potato sticks was obtained, the nature of the growth of microorganisms is described. As a result of the study, a fixed cell preparation is prepared and microscopy is performed.

Ключевые слова: накопительные культуры, bacillus subtills, картофельная палочка, микроорганизмы, патогенность, питательная среда, микроскопирование.

Keywords: accumulative cultures, bacillus subtilis, potato stick, microorganisms, pathogenicity, nutrient medium, microscopy.

Для выделения микроорганизмов определенных физиологических групп Виноградским и Бейеринком была предложена техника так называемых «накопительных культур». Техника накопительных культур основана на использовании элективных методов культивирования, т.е. создания таких условий при культивировании (наличие определенного источника углерода и энергии, азота, pH, температуры, аэрации, освещенности, питательных элементов и т.д.),[1] которые обеспечат благоприятное развитие микроорганизмов определенной физиологической группы. Другие организмы в этих условиях не могут размножаться или их рост будет незначителен.[2]

Так, подбирая определенный состав питательной среды и параметры культивирования и инокулируя среду какими-либо природными субстратами (почва, ил, вода) или техногенными (активный ил, сточные воды и т.п.), содержащими разнообразные микроорганизмы, можно получить накопительную

культуру микроорганизмов, характеризующихся определенными физиолого-биохимическими свойствами, например, способных окислять определенные органические субстраты, развиваться при pH и температуре, способных фиксировать азот атмосферы и окислять неорганические соединения и др., в результате преимущественного развития микроорганизмов, приспособленных к данным условиям. Последовательные частые пересевы на такую же элективную жидкую среду предотвращают рост сопутствующих микроорганизмов, которые могли бы использовать продукты метаболизма или даже автолиза первичной культуры и, таким образом, позволяют получить обогащенную накопительную культуру. [4]

Во время получения накопительных культур лучшим материалом инокуляции служат субстраты, в которых происходит процесс «естественного обогащения». Так, например, для выделения микроорганизмов, нефтепродукты, — это почвы, загрязненные нефтью, а для выделения микроорганизмов, способных использовать органические соединения, загрязняющие сточные воды химических производств, — пробы сточных вод этих же производств или почвы, загрязненные этими стоками и т. п.[3]

О получении накопительных культур судят визуально, основываясь на проявление признаков роста микроорганизма: помутнению среды, появлению пленки, осадка, пигментов, выделению газообразных веществ.

Из накопительных культур выделяется чистая культура микроорганизмов.

В данной статье как объект исследования взята картофельная палочка. На этом микроорганизме проведены испытания метода накопительных культур.

Картофельная палочка широко распространена в природе, особенно на поверхности картофеля, куда она попадает из почвы. Картофельная палочка является вредоносным микроорганизмом в том случае, когда ее споры попадают на зерно, выращиваемое для применения в приготовлении пищи. Микроорганизм является возбудителем картофельной болезни, которой может заразиться мука при несоблюдении санитарных норм хранения и обработки. Бактерия всегда находится в почве, поэтому найти место, где предположительно

есть целевой микроорганизм не трудно. Картофельная палочка образует очень стойкие центральные споры, которые выдерживают нагревание при 100 °С в течение 6 ч. [5]

Картофельная палочка не является патогенным микроорганизмом для человека, то есть серьезный урон здоровью она не принесет. Употребление зараженных продуктов может вызвать некоторые кишечные расстройства, а также спровоцировать аллергическую реакцию. B. subtilis используется в промышленности, являясь важным продуцентом протеаз, амилаз, аминокислот и некоторых полисахаридов, а также других соединений. Также является продуцентом полипептидных антибиотиков. Также картофельная палочка используется в биозащите растений, она обладает антагонистическими свойствами против целого ряда возбудителей, в том числе фитопатогенов. [6][7]

Для накопления культуры картофельной палочки были использованы картофельные очистки, содержащие на себе остатки почвы, в которой был пророщен картофель.

Накопительную культуру картофельной палочки получено следующим образом: картофельные очистки были помещены в чашки Петри и прогреты в течении 10 минут при 100 °С в стерилизаторе (инактивируются все вегетативные клетки микроорганизмов), после чего помещены в термостат на 2—3 дня при 25—300 °С. Данная среда содержит в себе естественную концентрацию макро и микроэлементов, необходимую бля роста. Уровень pH выбран нейтральный – в районе 7. Также картофельные очистки служат естественным источником углерода для накопления микроорганизмов. На очистках были пророщены споры и образовалась крепкая морщинистая пленка, которая визуально свидетельствовала о том, что процесс накопления культуры прошел успешно.[8]

Для того чтобы убедиться в наличии достаточного количества картофельной палочки, образовавшегося в результате метода накопительных культур и убедиться в отсутствии посторонних микроорганизмов проводилось микроскопирование. Путем микроскопирования определяется гомогенность культуры и этап окончания накопления целевых микроорганизмов. Для забора

препарата использовалась микробиологическая петля, которой на предметное стекло помещалась проба. После просушивания проба окрашивается фуксином для того, чтобы бактерии приобрели окраску и стали более заметны при микроскопировании. Использовался объектив с увеличительной способностью 100х. В окуляр микроскопа видны подвижные палочки длиной до 4-5 мкм, часто соединенные в цепочки. Это соответствует внешнему виду картофельной палочки. Сторонних культур микроорганизмов не наблюдалось, колонии бактерий были гомогенными.

Из проведенного исследования можно сделать вывод, что метод накопительных культур работает для накопления культуры Bacillus subtilis, в выбранном нами образце действительно содержится целевой штамм картофельной палочки, подобранные нами условия полностью благоприятны для накопления культуры картофельной палочки, что было подтверждено микроскопированием.

Литература

1. Семенов С.М. Лабораторные среды для актиномицетов и грибов. Справочник. – М: Агропромиздат, 1990. – 240 с.
2. Методы почвенной биохимии и микробиологии / Под ред. Д.Г. Звягинцев. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 1991. – 304 с.
3. Warrior P., Konduru K., Vasudev P. Formulation of biological control agents for pest and disease management // Biological control of crop diseases / Ed. by S.S. Gnanamanickam. – N. Y.: Marcel Dekker, 2002. – P. 421–442.
4. Хилько Т.В. Оптимизация питательных сред для роста и спорообразования бактерий Bacillus subtilis и Bacillus licheniformis // Микробиол. журн. – 2004. – Т. 66, № 1.- С. 36–41.
5. Мулюкин А.Л., Луста К.А., Грязнова М.Н., Козлова А.Н., Дужа М.В., Дуда В.И, Эль-Регистан Г.И. Образование покоящихся форм Bacillus cereus и Micrococcus luteus // Микробиол. – 1996. – № 6. – С. 782–789.

6. Смирнова И.Э. Целлюлолитические бактерии в защите сельскохозяйственных растений от фитопатогенных грибов // Микол. и фитопатол.. – 2004. – Т. 38, Вып. 2. –С. 89–93.
7. Сираева З.Ю., Захарова Н.Г., Егоров С.Ю. Использование бактерий из рода Bacillus // Вестн. РАСХН. – 2004. – № 5. – С. 71–75.
8. Габдуллин В.Р. Наращиваем объемы производства // Защита и карантин растений. –2003. – № 6. – С. 19–20.

Literature

1. Semenov S. M. Laboratory media for actinomycetes and fungi. Reference book. - M: Agropromizdat, 1990. - 240 p.
2. Methods of soil biochemistry and microbiology / Ed. by D. G. Zvyagintsev. - M.: Publishing house of Moscow. un-ta, 1991 – - 304 p.
3. Warrior P., Konduru K., Vasudev P. Formulation of biological control agents for pest and disease management // Biological control of crop diseases / Ed. by S.S. Gnanamanickam. – N. Y.: Marcel Dekker, 2002. – P. 421–442.
4. Khilko T. V. Optimization of nutrient media for the growth and spore formation of bacteria Bacillus subtilis and Bacillus licheniformis / / Microbiol. Sib. – 2004. – Vol. 66, № 1.- S. 36-41.
5. Mulyukin A. L., Lusta K. A., Gryaznov, M. N., Kozlov A. N., Duzha M. V., Duda, V. And El-Registan G. I. Education of resting forms of Bacillus cereus and Micrococcus luteus // Microbiology. – 1996. – No. 6. – P. 782-789.
6. Smirnova I. E. Cellulolyticus bacteria to protect crops against phytopathogenic fungi // Michal. and phytopathol.. - 2004. - Vol. 38, Issue 2. - pp. 89-93.
7. Siraeva Z. Yu., Zakharova N. G., Egorov S. Yu. The use of bacteria from the genus Bacillus / / Vestn. RASKHN. - 2004. - No. 5. - pp. 71-75.
8. Gabdullin V. R. We are increasing production volumes / / Protection and quarantine of plants. -2003. - No. 6. - pp. 19-20.