



Казахский национальный университет им. аль-Фараби
Факультет биологии и биотехнологии
Кафедра биотехнологии

ЛЕКЦИЯ 3.
ОСНОВНЫЕ МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ
ЧИСТЫХ КУЛЬТУР
МИКРОВОДОРОСЛЕЙ ИЗ ОБЪЕКТОВ
ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ.

Сандыбаева Сандуғаш

Симбиоз водорослей с простейшими и беспозвоночными

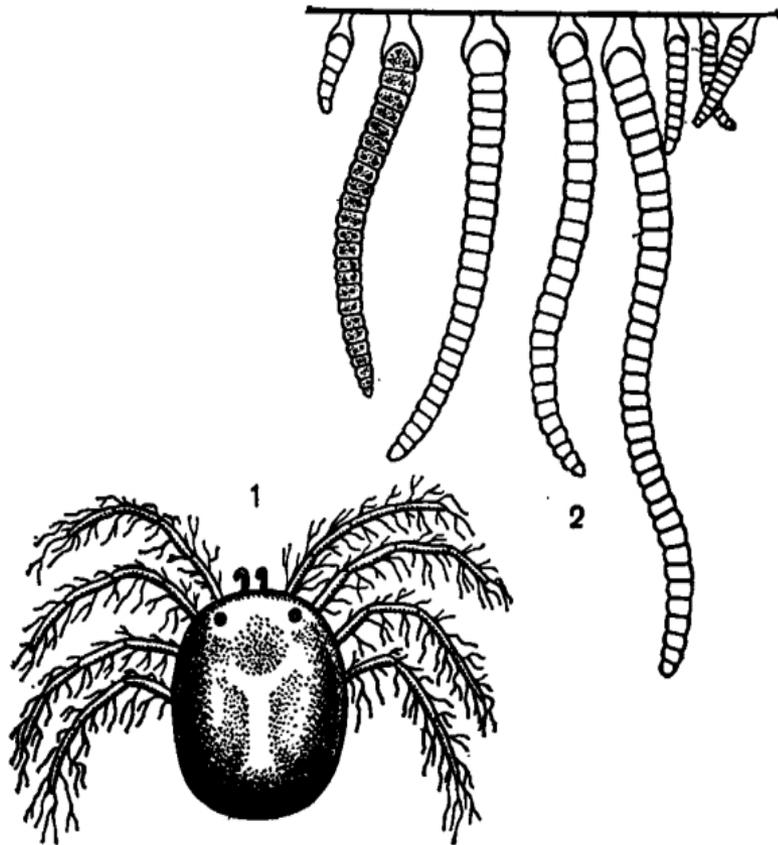


Рис. 46. Эпифитизм сине-зеленой водоросли *Sokolovia neumaniae* на ножках водяного клещика *Neumania triangularis*:

1 — клещик с конечностями, густо покрытыми эпифитирующей водорослью в виде тонких волосков; 2 — окончание щетинки на ножке клещика с нитями водоросли.

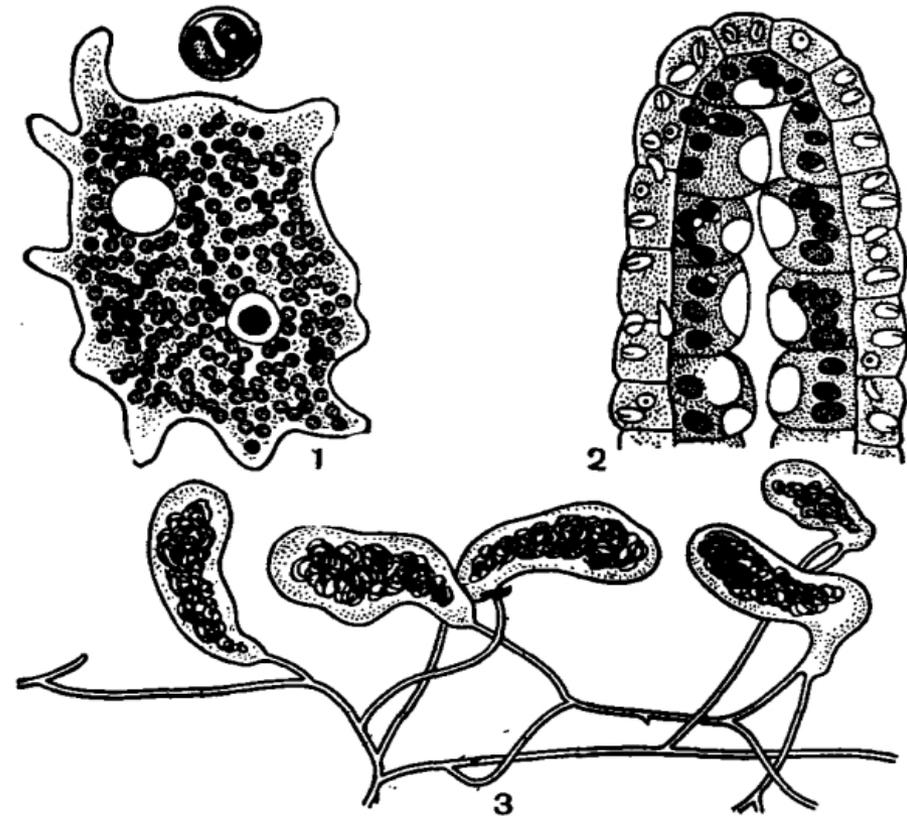


Рис. 48. Внутриклеточный симбиоз:

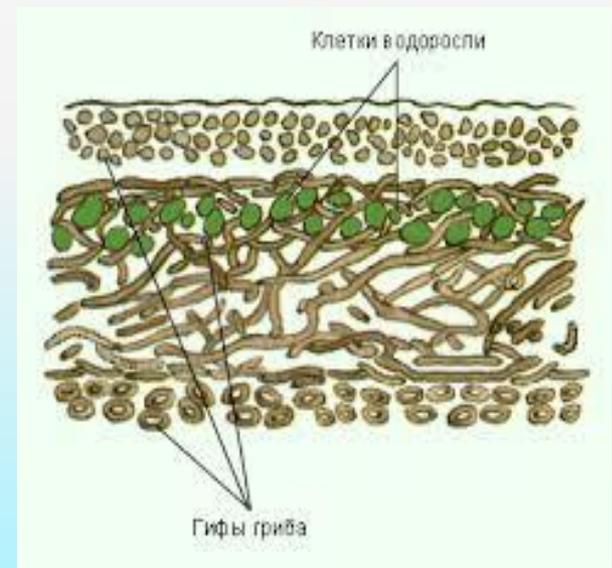
1 — амеба с клеточками зеленой водоросли зоохлореллы внутри, сверху — отдельная клетка зоохлореллы при большом увеличении; 2 — продольный разрез через конец щупальца пресноводной зеленой гидры (*Hydra viridis*) с клетками зоохлореллы (темные тельца) в клетках внутреннего слоя гидры; 3 — часть таллома обесцветившейся зеленой водоросли геосифона (*Geosiphon*); разветвленные нити заканчиваются крупными пузырями, в протоплазме которых живет сине-зеленая водоросль носток.

АЛЬГОБАКТЕРИАЛЬНЫЕ АССОЦИАЦИИ

• Циано-бактериальные маты



Лишайники



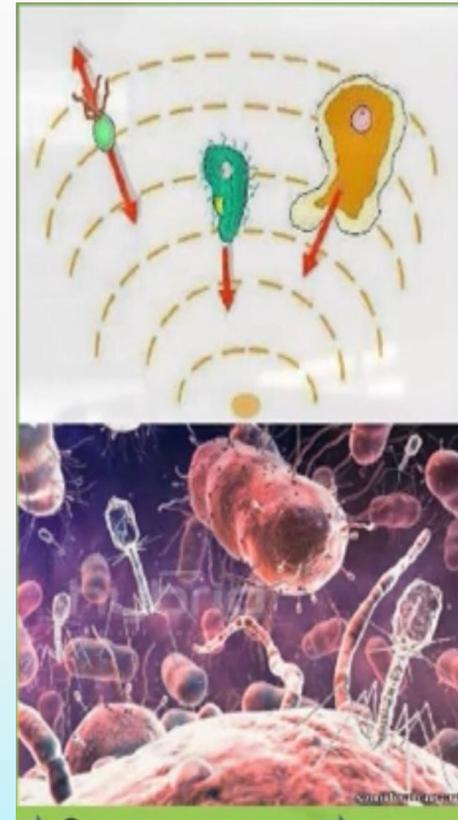
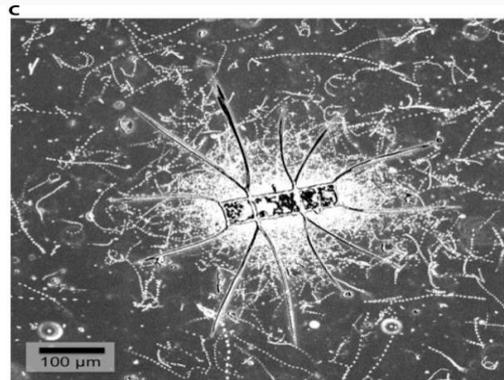
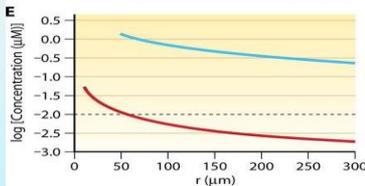
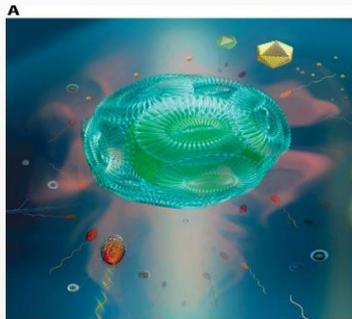
МЕХАНИЗМЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ АВТОТРОФНОГО И ГЕТЕРОТРОФНОГО КОМПОНЕНТОВ В АЛЬГОБАКТЕРИАЛЬНЫХ СООБЩЕСТВАХ

Ценозообразующая роль водорослей

- во-первых, образованием слизистых чехлов или колониальной слизи, которые способны поглощать и удерживать большое количество воды;
- во-вторых, выделением внеклеточных органических веществ различной химической природы, которые используются микроорганизмами-спутниками как источники питания. В итоге, поверхность талломов или отдельных клеток водорослей представляет собой идеальную экологическую среду для многих микроорганизмов, находящих здесь оптимальные условия для своего существования.

АССОЦИАТИВНЫЙ СИМБИОЗ ВОДОРΟΣЛЕЙ И БАКТЕРИЙ

Фикосфера – область с внешней стороны клеток водорослей, цепочек или колоний клеток в которой находятся внеклеточные выделения водорослей

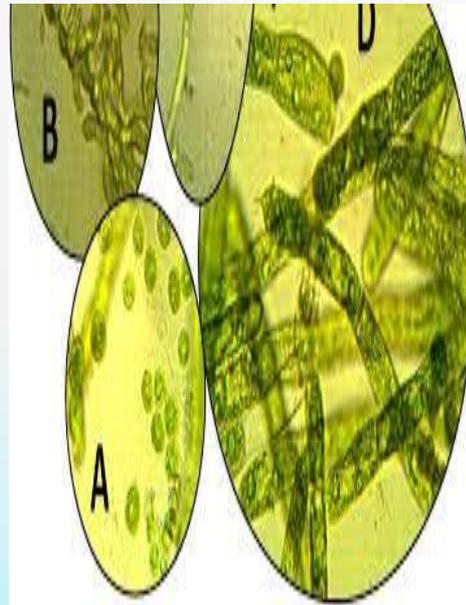


Подвижность → Прикрепление → Сигналинг → Взаимодействие

ЭКЗОМЕТАБОЛИТЫ ВОДОРОСЛЕЙ

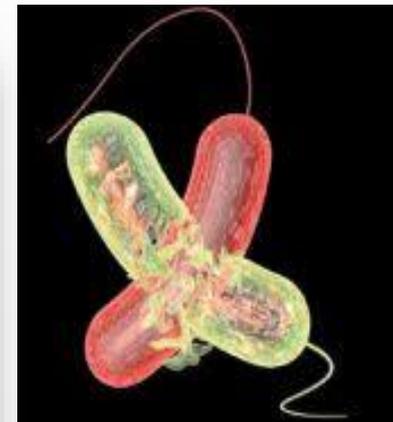
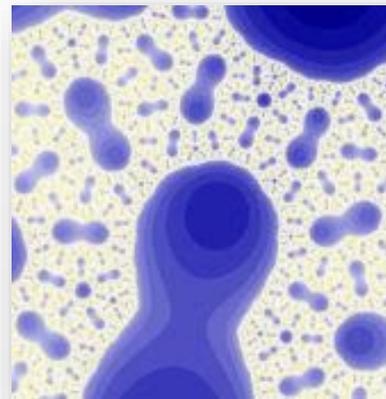
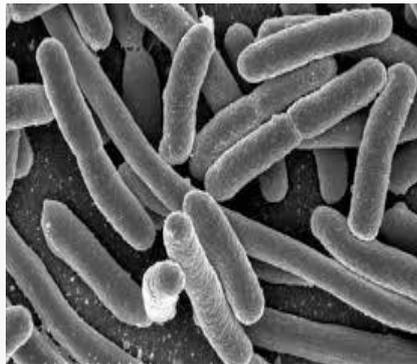
К настоящему времени среди экзометаболитов водорослей выделено и идентифицировано более 300 веществ, относящихся к различным классам химических соединений.

- Углеводы
- Липиды
- Полипептиды
- Органические кислоты
- Аминокислоты
- Витамины



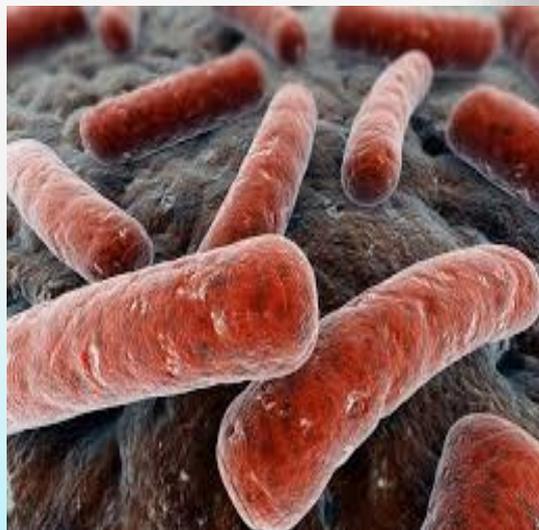
АССОЦИАТИВНЫЕ ФОРМЫ СИМБИОЗА

- Метабиоз



- Мутуализм

- Синергизм



- Комменсализм

ВЛИЯНИЕ ВОДОРΟΣЛЕЙ НА ВИДОВОЕ РАЗНООБРАЗИЕ И ЧИСЛЕННОСТЬ БАКТЕРИАЛЬНЫХ СПУТНИКОВ

**Azotobacter,
Pseudomonas,**

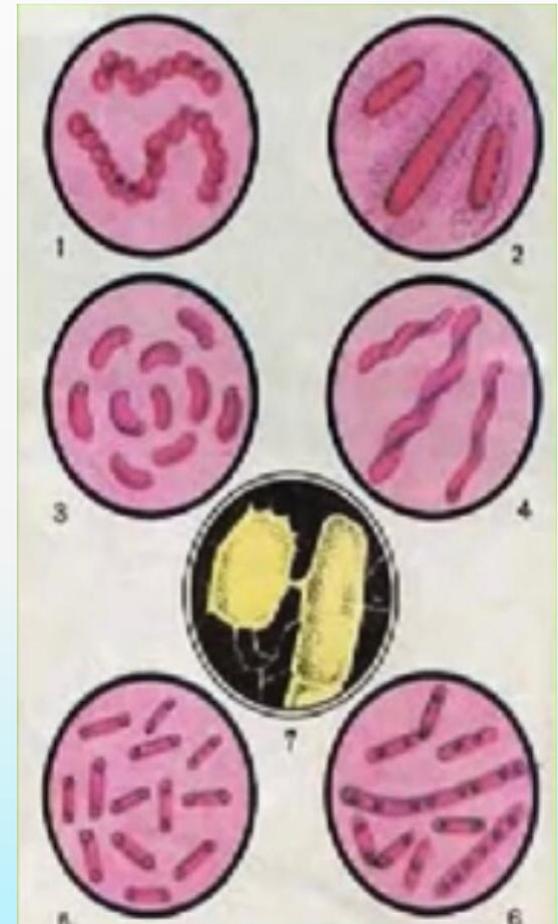
**Flavobacterium,
Acinetobacter,
Bacillus,**

**Rhodococcus,
Erwinia,
Hyphomicrobium,
Sarcina**

**Azomonas,
Aeromonas,
Agrobacterium,**

**Micrococcus,
Arthrobacter,**

**Microbacterium,
Rhodococcus,
Flavobacter,**



ВОЗДЕЙСТВИЕ БАКТЕРИЙ СПУТНИКОВ НА ВОДОРОСЛИ

- **Обеспечивают более доступными источниками питательных веществ бактерии – спутники превращают высокомолекулярные (органические) соединения в низкомолекулярные (неорганические), доступные для водоросли**
- **Обезвреживание побочных продуктов жизнедеятельности: Водоросли являются продуцентами токсичной перекиси водорода (субстрат), в разложении которой принимает участие каталаза (фермент) сопутствующих микроорганизмов.**
- **Повышают концентрацию углекислого газа в среде и снижают уровень кислорода**
- **Способны синтезировать биологически активные вещества**
- **Бактерии-спутники снабжают водоросли биологически доступными формами железа и азота**

АНТАГОНИСТИЧЕСКИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ВОДОРΟΣЛЕЙ НА МИКРООРГАНИЗМЫ

- **Антибактериальное действие метаболитов водорослей (белково-хлорофильный комплекс)**
- **Выделение жирных кислот и эфиров (гексадекатетраеновая, октадекатетраеновая, пальмитолеиновая, эйкозапентаеновая кислоты (ЭПК), эфир (Е)-фитол)**
- **Продукция активных форм кислорода (АФК) – перекись водорода**
- **Бактерицидная активность лизоцима**

АНТАГОНИСТИЧЕСКИЕ ВЛИЯНИЕ БАКТЕРИЙ НА ВОДОРОСЛИ

Ингибирующее влияние бактерий на водоросли действием бактериальных метаболитов :

- Антибиотики
- Лизоцимы
- Протеазы
- Фибриллярные белки

Неблагоприятные условия для роста и развития водорослей:

- истощение среды
- закисление среды культивирования
- накопление продуктов метаболизма
- изменение температурного режима

КОНКУРЕНТНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ

Конкуренция развивается за дефицитные питательные вещества таких как азот, фосфор, железо, углерод или микроэлементов.



Очистка водорослей от бактерий (по Больду)



Основная масса бактерий находится в слизи, для ликвидации ее используют посевы водорослей на плотном агаре (4,5 и 6,0%) против обычного (1,5-2,0%).



Для обнаружения выросших на агаре колоний их просматривают под микроскопом.

Готовят ч.Петри со средами двух видов: агаризованная минеральная среда и агаризованная среда с глюкозой

Одновременно проводят прямое микроскопирование культуры, что помогает обнаружить микроорганизмы-спутники.

На нижней поверхности этих чашек по стеклу тушью делают 6-8 кружков.

Для проверки на чистоту культуры рекомендуется делать посевы на стерильный 0,25%-ный мясной бульон: при развитии бактерий бульон быстро мутнеет.

Выбранную колонию водорослей петлей переносят на агар в один из обозначенных кружков.

Посевы делают параллельно на обеих средах и повторяют их до прерращения роста бактерий.

Химическая стерилизация культур водорослей

Н.С. Гаевская предложила способ стерилизации водорослей с применением риванола и брома (протококковые водоросли):

готовят свежий 0,1%-ный раствор риванола на дис. воде



разбавление раствора до концентрации 0,5-20 мг/л стерильной питательной средой



водоросли необходимо хорошо отмыть



высевают водоросль



При больших концентрациях риванола водоросль выдерживают 4-5 ч, при маленьких – до трех суток.

Для стерилизации от бактерий морских диатомовых водорослей используют йод. Водоросли помещают на 1-2 мин в раствор йода (1-2 капли на 50 мл стерильной среды).



Часто для стерилизации водорослей используют антибиотики (левомицетин и стрептомицин для очистки хлореллы).

Химическая стерилизация культур водорослей

И.В. Максимова и М.Н. Пименова предлагают пользоваться **антибиотиками** для получения альгологически и бактериологически чистых культур водорослей, а также для подавления сопутствующих бактерий при выращивании культур.



Чувствительность водорослей к антибиотикам изменяется в широких пределах в зависимости от биологических особенностей организмов.

Полимиксин в концентрации 5 мкг/мл не влияет на рост *Chlorella vulgaris*. Полное подавление роста хлореллы происходит при концентрации 25 мкг/мл.

Scenedesmus obliquus при 100 мкг/мл полимиксина растет хорошо, но увеличение содержания антибиотика в среде всего в 1,5 раза ведет уже к гибели клеток.

Антибиотики

Концентрации, не оказывающие токсического действия на рост водорослей, являются зачастую бактериостатическими для ряда микроорганизмов.

Широкое распространение для очистки водорослей от сопутствующих бактерий получил **актидион**.



Этот антибиотик успешно используют для очистки от бактерий культур зеленых, синезеленых и диатомовых водорослей.



Степень действия антибиотиков зависит от состава среды и условий выращивания, поэтому выбор антибиотиков и их рабочая концентрация индивидуальны для различных водорослей.

Антибиотики

Пенициллин

- подавляет рост *Chl. vulgaris* при 1515 мкг/мл, а *Scenedesmus obliquus* и *A. falcatus* при концентрациях, превышающих 3030 мкг/мл.

Аурантин

- в концентрации 10 мкг/мл не влияет на рост хлореллы и сценедесмуса. Полное подавление роста происходит при 30 и 100 мкг/мл соответственно.

Левомецетин

- в концентрации 50 мкг/мл не влияет на скорость размножения хлореллы, в то время как рост многих грамотрицательных бактерий полностью подавляется.

Колимицин

- полная гибель клеток хлореллы при 200 мкг/мл, анкистродесмуса – 50 мкг/мл. Отмирание грам «-» бактерий отмечено при более низких концентрациях.

Окситетрациклин

- малотоксичный по отношению к водорослям антибиотик. Оказывает лишь бактериостатическое действие и быстро разлагается при щелочных рН.

Очистка водорослей от бактерий (по Мак-даниелу, Мидлеброку, Боуману)

50 мл суспензии водорослей обрабатывают двумя каплями детергента



1%-ный фенол (соотношение 1 суспензия : 4 фенол)



Встряхивание



Центрифугирование



Промывание выпавших в осадок клеток дис. водой (стерильной)



Водоросли помещают на агаровые пластинки (2% агара+0,5% глюкозы)



Выросшие колонии несколько раз пересевают, пока не убедятся в их бактериальной чистоте

Получение бактериологически чистых культур сине-зеленых водорослей (по Гусеву, Телитченко, Федорову)

Сложность бактериальной очистки зеленых, диатомовых и синезеленых водорослей объясняется наличием неспороносных, слизиобразующих бактерий, оболочка которых обладает способностью крепко прилипать к оболочке водорослей.

Очень важно для очистки культур синезеленых водорослей от бактерий получить **свободные от слизи** гормогонии или обрывки нитей, а затем обрабатывать их антибактериальными агентами.

Культуру водорослей на жидкой среде фильтруют под вакуумом через стеклянные фильтры №1 и №2.

Дальнейшую стерилизацию можно производить с помощью:

5-7-минутного прогрева в кипящей воде

обработки суспензии смесью стрептомицина и пенициллина

10-минутного облучения УФ-светом ртутно-кварцевой лампы

Через поры фильтров проходят только гормогонии, споры и короткие обрывки нитей, большинство которых свободно от слизи.

Для проверки чистоты полученных культур проводят высевы из жидких культур водорослей на ряд контрольных сред.

В качестве контрольных сред используют:

исходную минеральную среду + 0,5% глюкозы;

исходную среду + 1% суслу;

МПА, МПБ;

среду Эшби для азотобактера;

среду Виноградского для нитрифицирующих бактерий;

среду Хатчинсона для целлюлозных бактерий;

среду Ларсена для фотосинтезирующих бактерий.