

**О. В. Блажевич**

# **КУЛЬТИВИРОВАНИЕ КЛЕТОК**

**Курс лекций**

**Для студентов специальности G 31 01 01 «БИОЛОГИЯ»**

**(направление «БИОТЕХНОЛОГИЯ» G 31 01 01-03)**

**МИНСК  
БГУ  
2004**

УДК 57.085(042)  
ББК 28.03с.я.73  
Б68

**Р е ц е н з е н т ы:**  
член-корреспондент НАН Беларуси,  
доктор биологических наук, профессор *Н. И. Астапович*;  
кандидат биологических наук, доцент *М. А. Титок*

*Печатается по решению  
Редакционно-издательского совета  
Белорусского государственного университета*

**Блажевич О. В.**

Б68      **Культивирование клеток: Курс лекций / О. В. Блажевич – Мн.: БГУ, 2004. – 78 с.**  
ISBN 985-485-293-8.

В курсе лекций приведены основные методы культивирования клеток микроорганизмов, растений и животных, способы подготовки к эксперименту, принципы составления и основные типы питательных сред, типовые приборы, используемые при культивировании клеток.

Предназначен для студентов биологического факультета специализации 1-31 01 01-03 «Биология (биотехнология)».

**УДК 57.085(042)  
ББК 28.03с.я.73**

**ISBN 985-485-293-8**

© Блажевич О. В., 2004  
© БГУ, 2004

## СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	3
1. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ КЛЕТОК.....	4
1.1. Культивирование клеток микроорганизмов.....	4
1.2. Культивирование растительных клеток .....	34
1.3. Культивирование животных клеток.....	49
2. СУБСТРАТЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ БИООБЪЕКТОВ.....	64
3. ОБОРУДОВАНИЕ, ИСПОЛЬЗУЕМОЕ ПРИ РАБОТЕ С КЛЕТОЧНЫМИ КУЛЬТУРАМИ .....	66
4. КУЛЬТУРАЛЬНАЯ ПОСУДА.....	75
ЛИТЕРАТУРА.....	77

## **ВВЕДЕНИЕ**

Клеточные культуры с каждым годом находят все большее применение в самых разнообразных областях биологии, медицины и сельского хозяйства. Их используют при решении таких общебиологических проблем, как выяснение механизмов дифференцировки и пролиферации, взаимодействия клеток со средой, адаптации, старения, биологической подвижности, злокачественной трансформации и многих других.

Важная роль отводится клеточным культурам в биотехнологии при производстве вакцин и биологически активных веществ. Они являются исходным материалом для создания клеток-продуцентов, используются в целях повышения продуктивности сельскохозяйственных животных и для выведения новых сортов растений. Культуры клеток применяются для диагностики и лечения наследственных заболеваний, в качестве тест-объектов при испытании новых фармакологических веществ, а также для сохранения генофонда исчезающих видов животных и растений.

Задачей данного лекционного курса являлось формирование у студентов-биотехнологов понятия культивирования клеток как сложного и многопланового технологического процесса, состоящего из ряда последовательных этапов. Это особенно важно, поскольку в основе любого биотехнологического производства лежит та или иная клеточная культура. Студенты-биотехнологи должны представлять весь процесс выращивания клеток – с момента инокуляции ими среды культивирования до отбора клеток по достижении ими заданной стадии роста или для отбора целевого продукта. Помимо этого они должны знать, как правильно организовать работу в культуральной лаборатории, какое оборудование существует для достижения этих целей и как его правильно применять, чем руководствоваться при выборе клеточных линий и питательных сред, как бороться с клеточными контаминациями, какие этапы работы предшествуют собственно процессу культивирования. Только в этом случае можно рассчитывать на эффективное применение полученных знаний.

Надеемся, что представленный материал окажется полезным для студентов и будет способствовать успешному решению поставленных перед ними биотехнологических задач.

# 1. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ КЛЕТОК

---

## 1.1. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ КЛЕТОК МИКРООРГАНИЗМОВ

Исследование культивирования микроорганизмов начинается с 1830 г., когда Ш. Каньяр де Латур, К. Кютцинг и Т. Шванн открыли причину брожения вина (наличие клеток дрожжей).

В дальнейшем в области культивирования клеток не было никакого прогресса вплоть до 1850-х гг., когда Л. Пастер начал свои фундаментальные исследования: изучение физиологии дрожжей и бактерий, введение асептических методов, минимальных сред и исследование пищевых потребностей микроорганизмов и роли кислорода в процессах их жизнедеятельности. Работами Л. Пастера и его ученика М. Ролэна была установлена потребность в главных и второстепенных компонентах среды и в источниках энергии. Первая полная среда определенного состава была получена М. Ролэном в 1869 г. для культивирования грибов рода *Aspergillus*. Работа вызывает интерес еще и тем, что Ролэн определил пищевые потребности грибов не только качественно, но и количественно.

Говоря о замечательных работах Л. Пастера и М. Ролэна, необходимо отметить, что в их распоряжении не было метода чистых культур, предложенного Р. Кохом несколько позже (в 1870-е гг.) и дающего значительные преимущества выращивания микроорганизмов. Начиная с изящных работ Коха, методы культивирования стали основной заботой микробиологов.

Потребность микроорганизмов в сложных органических веществах – факторах роста – впервые была обнаружена Вильдье в 1901 г., когда он открыл витамин В, или «факторы биос», необходимые для роста дрожжей.

В 1930-е гг. с введением метода колб на качалках началось развитие аппаратуры культивирования. Это дало возможность применять лабораторный метод для аэрации глубинных культур, особенно глубинных культур аэробных грибов, которые раньше выращивались только на поверхности твердых или жидких сред. В поверхностных культурах окружение организма гетерогенно, а в глубинных – гомогенно, что проще для изучения и контроля. Впоследствии глубинные культуры аэробных грибов сыграли значительную роль в развитии промышленного производства антибиотиков. Возрастающее технологическое значение культуры микроорганизмов значительно стимулировало интерес к этой области и привело в 40–50-е гг. к созданию ферментеров с автоматической регуля-

цией условий среды. С этого времени благодаря активному развитию теории непрерывного культивирования хемостатного типа открылись широкие горизонты не только теоретического развития, но и практического применения культур клеток.

### **Классификация процессов культивирования**

Выбор процесса культивирования зависит не только от потребностей организма, но и от того, для чего будет использована культура, т. е., от конечной цели эксперимента. Известно много процессов культивирования микроорганизмов. Они различаются по:

- 1) состоянию питательной среды (поверхностные и глубинные);
- 2) наличию или отсутствию перемешивания (динамические или статические);
- 3) содержанию кислорода (аэробные или анаэробные);
- 4) способу действия (закрытые, чаще периодические, и открытые, чаще непрерывные);
- 5) количеству ферментеров (одно-, дву- и многостадийные);
- 6) способу управления (хемостатные, турбидостатные, оксигенные, рН-статные и другие).

Культуры микроорганизмов можно подразделять на открытые и закрытые системы. Открытая система – это система, в которую все компоненты могут поступать или покидать ее. Закрытой называют такую систему, в которой хотя бы один из существующих компонентов не может ни поступать в систему, ни покидать ее. Следовательно, все непрерывные культуры, в которых происходит, с одной стороны, приток питательной среды, с другой – отток биомассы и других продуктов, являются открытыми системами. Простая периодическая культура, содержащая ограниченное первоначальное количество питательного субстрата, служит примером закрытой системы. В закрытой системе скорость роста биомассы должна стремиться к нулю либо из-за недостатка субстрата, либо из-за непереносимости токсичного продукта при его дальнейшем накоплении. Следовательно, такие системы находятся в неустойчивом состоянии. В отличие от этого в открытых системах всегда есть возможность установления стабильного состояния.

### **Получение накопительных и чистых культур**

В условиях естественного обитания чистые культуры микроорганизмов встречаются довольно редко. Тем не менее основная часть современных представлений о свойствах микроорганизмов, а также их взаи-

моотношениях получена при изучении чистых культур. Поэтому часто возникает необходимость выделить в виде чистых культур различные виды микроорганизмов, которые сосуществуют в естественных условиях. Получение *накопительных культур* представляет собой основной этап процесса, который позволяет получить чистые культуры. Оно также дает возможность оценить различные воздействия факторов окружающей среды на смешанную микробную популяцию, благодаря которым может происходить отбор микроорганизмов, способных взаимодействовать со специфическими субстратами или хорошо расти в необычных условиях.

Выделение чистой культуры данного микроорганизма будет успешным, если он присутствует в смешанной популяции в достаточно высокой концентрации, т. е. количественно преобладает. Разработанные методы накопления имеют целью добиться увеличения относительного количества данного организма благодаря созданию лучших условий для его роста и выживания по сравнению с другими или путем пространственного отделения его от других членов популяции.

К физическим методам накопления следует относить регуляцию роста температурой, тепловую и ультразвуковую обработку, ультрафиолетовое облучение, приводящие к гибели или подавлению роста других организмов, присутствующих в популяции, но существенно не затрагивающих выделяемые клетки. Можно также использовать преимущества в некоторых физических свойствах изучаемого микроорганизма, таких как его размеры и подвижность; это позволяет в значительной мере отделить данный организм от других в популяции.

В основе действия химических методов лежит использование токсичных веществ, которые подавляют рост оставшейся части популяции, не оказывая влияния на выделяемый микроорганизм. Кроме того, это могут быть вещества, служащие источниками питания, используемыми преимущественно отдельными микроорганизмами в смешанной популяции.

Биологические методы включают использование специфических хозяев для выделяемого организма, а также преимуществ некоторых патогенных свойств микроорганизма (например, его инвазивность), которыми не обладают другие представители популяции. Во многих случаях для получения максимального эффекта накопления сочетают физические, химические и биологические методы.

Как правило, накопительные культуры получают в закрытых системах, т. е. микроорганизмы выращивают в обычных периодических (стационарных) условиях на чашках Петри, в колбах или пробирках, где в среде культивирования концентрация питательных веществ и продуктов

метаболизма постоянно изменяется в процессе роста клеток. Для получения накопительных культур используются также открытые хеMOSTатные системы, позволяющие контролировать концентрацию питательных веществ, лимитирующих рост клеток, что, в свою очередь, может избирательно влиять на скорость роста различных организмов в смешанной культуре, в результате чего какой-то микроорганизм начинает количественно преобладать.

Из накопительных культур бактерии обычно выделяют путем их пространственного отделения от других форм на твердой среде, где они растут в виде колоний. Для микроорганизмов, не растущих на твердых средах, можно использовать метод предельного разведения, последовательно перенося клетки в отдельные пробирки с жидкой средой. Поскольку обычные методы выделения не дают абсолютной гарантии чистоты получаемых культур, некоторые исследователи применяют более сложные приемы, с помощью которых отдельную бактериальную клетку выделяют из смешанной популяции, используя для получения клона микроскопический контроль.

Для выделения микроорганизмов в виде *чистых культур* известно сравнительно мало методов. Чаще всего используют способ изолирования отдельных клеток на твердой питательной среде, применяя при этом метод посева штрихом или разлива по чашкам небольшого количества жидкой культуры (метод предельных разведений). Однако получение отдельной колонии не всегда гарантирует чистоту культуры, поскольку колонии могут вырасти не только из отдельных клеток, но и из их скоплений. Если микроорганизмы образуют слизь, то к ней часто прикрепляются посторонние формы. Например, в случае выделения видов *Bacillus* или актиномицетов контаминирующие микроорганизмы могут быть опутаны соответственно цепочками клеток или гифами этих бактерий. Для очистки предпочтительнее использовать неселективную среду, поскольку на ней лучше растут контаминирующие микроорганизмы и их легче обнаружить. Но даже на неселективной среде не следует очень быстро отбирать колонии, поскольку за данный отрезок времени могут не вырасти медленно растущие контаминирующие организмы.

Из чистой культуры обычно вырастают одинаковые колонии, и при микроскопировании выявляются схожие клетки, в частности по морфологии и результатам окраски по методу К. Грама. Однако возможны исключения, например, колонии, вырастающие из чистой культуры, могут быть гладкие (S) и шероховатые (R). Кроме того, в чистых культурах различных микроорганизмов могут появиться морфологически различ-



ные клетки, цисты и споры. Наконец, некоторые микроорганизмы проявляют грамвариабельность. Тем не менее указанные критерии широко используются при определении чистоты культур.

## **Методы культивирования на твердых средах**

### **Массовая культура на твердой поверхности**

Выращиванием колоний на твердой поверхности получают максимальную плотность клеток, поскольку в данном случае жидкость находится только в промежуточном (межклеточном) пространстве и составляет от 20 до 30 % общего объема (27 % от плотно упакованных тел независимо от их размера). Если инокулят сильно разбавлен, каждая клетка в результате деления дает начало отдельной колонии. Это может быть полезным для массовой культуры, если отбор колонии ведут по какому-то одному признаку (например, если необходимо вырастить вариант, который образует только «гладкие» колонии). Чаще инокулят бывает не разбавлен, и его равномерно распределяют по всей поверхности среды. В этом случае микроорганизмы растут в виде сплошного газона. Твердую поверхность обычно получают после добавления в среду агара или другого отвердителя. Известен также ряд методов, при которых колонии растут на мембране, помещенной на поверхности жидкой среды в сосуде.

Массовая культура бактерий на твердой среде имеет ряд преимуществ по сравнению с культурой, выращиваемой в жидкой среде.

1. В случае культур, выращенных на твердой среде, нет необходимости использовать центрифугу или другие средства для сбора клеток, поскольку в этих культурах клетки находятся уже в сконцентрированном состоянии. Особенно следует избегать центрифугирования при получении большого количества патогенных или других вредных микроорганизмов, поскольку при этом образуются аэрозоли. Для сгущения клеток и сбора биомассы на поверхность агаризованной среды пипеткой наносят небольшое количество стерильного солевого раствора или буфера и суспендируют в нем выросшие колонии с помощью стерильного стеклянного шпателя. Таким способом можно получить большое количество клеток с поверхности агаровых сред в чашках Петри, в больших плоских культуральных матрасах и в больших плоских чашках, покрытых крышками из пирекса.

2. Твердые культуры относительно свободны от макромолекулярных компонентов и полностью свободны от частиц питательной среды, так как последние обычно находятся внутри агарового геля. Более того,

твердые культуры относительно свободны от низкомолекулярных питательных веществ и продуктов метаболизма микроорганизмов, поскольку для их растворения необходимы значительно большие объемы среды. Следовательно, культуры, выращенные на твердой среде, особенно полезны для экспериментов (приготовления антигенов или для других целей), когда важна чистота клеточной суспензии.

3. На твердых средах можно получать результаты, которые невозможно достичь другим путем. Например, плодовые тела миксобактерий и эндоспоры определенных видов *Bacillus* образуются только при росте культур на твердой среде. Это объясняется тем, что лишь в данных условиях бактерии сохраняют между собой физические связи, а также тем, что в данном случае обеспечивается максимальное снабжение клеток кислородом атмосферы и вымывание продуктов метаболизма (например, кислот) из клеточного окружения. Если этого не происходит, рост культуры может подавляться.

Вместе с тем выращивание микроорганизмов на твердых средах по сравнению с культивированием в жидкой среде имеет определенные недостатки.

1. Твердая культура имеет ограничения при выращивании больших количеств биомассы. Она дает возможность легко получать граммы клеток; десятки граммов выращивать уже затруднительно, а сотни граммов или килограммы клеток на твердой среде в лаборатории вырастить невозможно.

2. Твердые культуры не обеспечивают однородность популяции клеток, т. е. культура гетерогенна в физиологическом отношении. Например, клетки в верхней части твердой аэробной среды (слой глубиной до 1000 клеток) могут находиться в условиях низкого содержания питательных веществ, но высокого содержания кислорода, в то время как в нижних слоях среды условия могут быть противоположными. Гетерогенна культура и в техническом смысле, так как клетки микроорганизмов и питательная среда распределены неравномерно.

3. Твердые культуры характеризуются небольшим числом клеток в пересчете на данное количество среды.

## **Процессы суспензионного или глубинного культивирования**

Простейшая классификация процессов суспензионного или глубинного культивирования:

- 1) периодическое культивирование;

- 2) продленное оптимизированное периодическое культивирование с подпиткой или без нее;
- 3) многоциклическое культивирование;
- 4) полунепрерывное культивирование;
- 5) непрерывно-синхронное культивирование;
- 6) непрерывное культивирование.

## **Периодическое культивирование**

Культивирование бактерий представляет собой процесс увеличения концентрации некоторых или всех компонентов популяции. Обычно характеристики этого процесса устанавливаются путем измерений тех или иных его показателей.

Ранее более широкое применение находило культивирование микроорганизмов на поверхности плотных питательных сред. Применение жидких питательных сред позволило избежать некоторых недостатков, связанных с культивированием поверхностным способом, требуя постоянного перемешивания культуры с целью выравнивания условий роста организма в различных частях рабочего объема сосуда. Эту систему можно уже назвать динамической в отличие от описанной выше статической при стационарном культивировании.

Периодический метод культивирования предусматривает внесение посевного материала в питательную среду (инокуляция клетками среды) в начале процесса и получение культуры по достижении заданной фазы развития популяции. Концентрация микроорганизмов в периодической культуре нарастает и останавливается либо из-за лимитирования субстратом, либо из-за ингибирования токсичными продуктами жизнедеятельности. Для этого типа культивирования характерно непрерывное изменение физиологического состояния клеток, вызванное изменениями условий, производимыми жизнедеятельностью самих клеток. Отсюда следует, что периодическая система может поддерживать размножение клеток только в течение ограниченного времени. После фазы экспоненциального (логарифмического) роста популяция начинает испытывать недостаток элементов питания и угнетается продуктами метаболизма, что ведет к нарушению физиологического состояния клеток. Периодические культуры находятся в неустойчивом состоянии, что является серьезным недостатком, особенно когда их применяют при изучении свойств микроорганизмов.

Практически все системы периодического культивирования являются закрытыми, поскольку микроорганизмы в них размножаются и проходят

все фазы развития без притока питательной среды и оттока культуральной жидкости.

При изучении динамики роста культур микроорганизмов необходимо строго соблюдать некоторые условия:

- 1) жизнеспособность засева;
- 2) наличие в среде культивирования всех необходимых питательных веществ;
- 3) отсутствие в среде ингибиторов, подавляющих рост клеток;
- 4) поддержание в среде оптимальными всех физико-химических условий.

В простой гомогенной периодической культуре можно выделить несколько фаз роста (рис. 1).

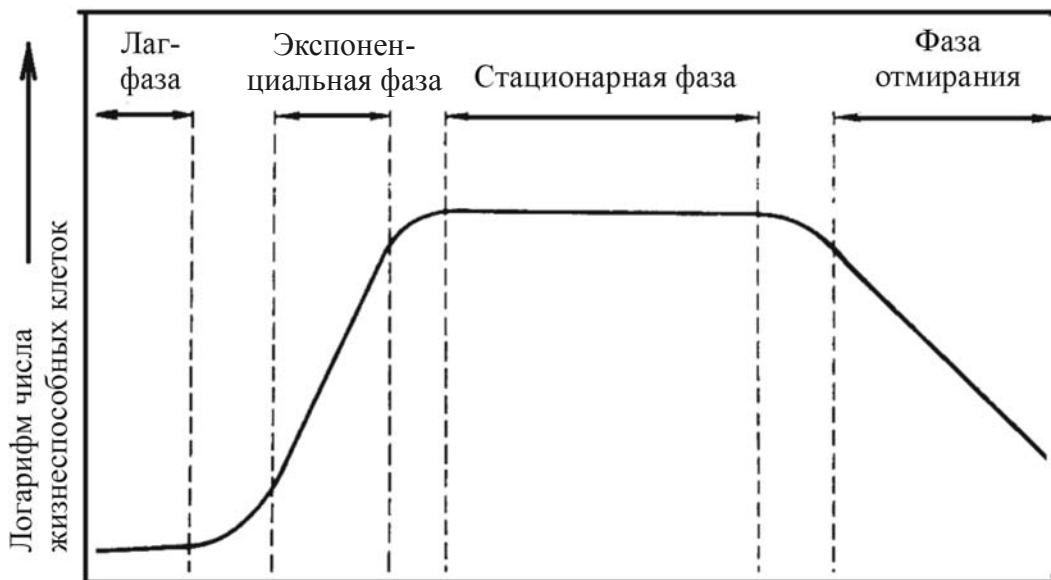


Рис. 1. Основные фазы кривой роста периодической культуры микроорганизмов

**1. Лэг-фаза.** При внесении клеток из культуры, находящейся в стационарной фазе, в свежую среду того же состава они приобретают способность к возобновлению роста только после определенного периода, в течение которого происходит изменение их химического состава. Продолжительность периода адаптации может быть различной, но обычно она прямо пропорциональна длительности предшествующей стационарной фазы. В свежей среде длительность лэг-фазы зависит от количества и возраста посевного материала, а также от изменений состава и концентрации питательных компонентов при внесении инокулята. Внесение не-

большого количества инокулята в большой объем свежей среды может привести к диффузии из клеток витаминов, кофакторов и ионов, которые необходимы для поддержания активности многих внутриклеточных ферментов. Если клетки инокулируют из богатой среды в минимальную, то продолжительность лаг-фазы значительно зависит от объема инокулята, поскольку он содержит микроэлементы, попадающие при инокуляции в ростовую среду. Длительность лаг-фазы зависит также и от возраста инокулята. Это связано с тем, что в процессе развития в клетках накапливаются токсические вещества и недостаточно питательных веществ, необходимых для первоначального роста. Как правило, при переносе клеток из бедной среды в богатую с увеличением возраста инокулята лаг-фаза удлиняется. Наконец, изменения состава питательных компонентов, а также их концентрации при переносе инокулята в свежую среду могут оказывать воздействие на длительность лаг-фазы, влияя на регуляцию активности ферментов и морфологическую дифференцировку клеток. Если клетки переносят с бедной среды в богатую, то питательные компоненты и время расходуются на повышение активности ферментов, необходимых для повышения активности метаболизма в целом. Если же клетки переносят с богатой среды на среду с более низким уровнем питательных веществ, то они способны немедленно, хотя и с низкой скоростью, вступить в экспоненциальную фазу роста.

**2. Фаза экспоненциального роста.** Экспоненциальный рост с высокими скоростями обычно не поддерживается в микробной популяции длительное время. В норме он ограничивается вследствие исчерпания доступных источников питания, или накопления токсичных продуктов обмена веществ в ростовой среде, или из-за некоторых изменений в физических свойствах среды. В результате этого скорость роста снижается и, в конечном счете, рост прекращается.

**3. Стационарная фаза.** Изменения в физическом и химическом составе среды приводят к переходу культуры в стационарную фазу, в которой увеличения количества клеток не происходит, но клетки еще нуждаются в источниках энергии для поддержания своей жизнедеятельности. Переход из экспоненциальной фазы в стационарную включает период несбалансированного роста, когда разные клеточные компоненты синтезируются с разными скоростями. Поэтому в стационарной фазе химический состав клеток отличается от их состава в экспоненциальной фазе. Клетки меньше по размеру и менее чувствительны к физическим и химическим воздействиям. В стационарной фазе количество биомассы остается постоянным.

4. **Фаза отмирания.** К гибели клеток приводит ряд факторов, важнейшим из которых является исчерпание запасов энергии в клетке. Наблюдается резкое экспоненциальное уменьшение числа жизнеспособных клеток. Скорость отмирания зависит от видовых особенностей организма.

Для некоторых целей вполне достаточно качественной характеристики роста, т. е. простого наблюдения, имеет ли место вообще рост культуры. Но для того чтобы иметь дальнейшую более полную информацию, необходимо измерять рост количественно. Если рост периодической культуры прослеживается по увеличению бактериальной массы, то для получения точной информативной картины роста культуры клеток анализируются разные количественные параметры роста: скорость роста, экономический коэффициент, выход бактериальной биомассы, время генерации и другие.

При определении параметров роста исследуют рост простой гомогенной периодической культуры. Предполагается, что такая система состоит из хорошо перемешиваемой, засеянной питательной среды.

### Параметры кривой роста

Под **урожаем клеток** ( $X$ ) понимают разность между максимальной и исходной массой бактерий:  $X = X_{max} - X_0$ . Эту величину выражают в весовых единицах, чаще в граммах.

Особенно важно отношение урожая клеток к количеству потребленного субстрата ( $X/S$ ). Если обе эти величины выражают в весовых единицах, то отношение  $X/S$ , называемое **экономическим коэффициентом**, обозначают через  $Y$ :

$$Y = dX/dS,$$

где  $dX$  – увеличение биомассы, соответствующее потреблению субстрата в количестве  $dS$ . Более строго экономический коэффициент определяется пределом, к которому стремится данное соотношение при  $dS$ , стремящейся к нулю. Важность экономического коэффициента состоит в том, что он выражает количественные потребности организма в пище. Впервые экономический коэффициент был использован М. Ролэном для выражения пищевых потребностей микроскопических мицелиальных грибов ( $Y = -dX/dS$ ). Знак « $-$ » здесь вводился, поскольку значения изменяются в разных направлениях. В настоящее время принято использовать величину  $Y$ , обратную предложенной М. Ролэном.

Если же урожай (в граммах) относят к числу молей потребленного субстрата, то экономический коэффициент, называемый в этом случае **молярным экономическим коэффициентом**, обозначают через  $Y_m$ . Мо-

лярный экономический коэффициент  $Y_m$  позволяет связать урожай клеток с полученным из какого-либо источника энергии (т. е. какого-либо субстрата) количеством АТФ (макроэргические эквиваленты).  $Y_{\text{АТФ}}$  – **энергетический коэффициент**, выражаемый в граммах клеточной массы на 1 моль АТФ. Этот коэффициент можно вычислить, если известен путь расщепления данного субстрата и выход АТФ в результате этого расщепления.

Скорость потребления субстрата культурой в данный момент времени выражается соотношением:

$$dS/dT = qX,$$

где  $X$  – биомасса, а коэффициент  $q$  известен как **метаболический коэффициент**, или удельная скорость метаболизма. Метаболический коэффициент аналогичен ферментативной активности. Метаболический коэффициент можно выразить также через экономический коэффициент и удельную скорость роста и представить еще в таком виде:

$$q = \mu/Y.$$

Если удовлетворены все необходимые требования, то предполагается, что в течение единицы времени  $dt$  увеличение биомассы  $dX$  должно быть пропорционально количеству биомассы  $X$  и интервалу времени, т. е.:

$$dX = \mu X dt,$$

откуда

$$dX/dt = \mu X \quad \text{или} \quad \mu = dX/dt \cdot 1/X.$$

Дифференциальное отношение  $dX/dt$  выражает **скорость роста популяции клеток**. Параметр  $\mu$ , обозначающий скорость роста единицы биомассы ( $1/X$ ) ( $dX/dt$ ), называется **удельной скоростью роста** и измеряется в единицах, обратных времени ( $1/t$ ). Этот параметр аналогичен сложным процентам. Так, например, удельная скорость роста 0,1 ч эквивалентна скорости 10 % в 1 час.

Если  $\mu$  постоянна, то интегрирование уравнения дает:

$$\text{Ln } X = \text{Ln } X_0 + \mu t,$$

где  $X_0$  – биомасса в начальный момент времени  $t = 0$ .

Рост популяции клеток, подчиняющийся этому закону, называется **экспоненциальным, или логарифмическим, ростом**.

Для того чтобы рассчитать время генерации клеток, можно использовать уравнение, учитывая геометрическую прогрессию роста:

$$N = N_0 \cdot 2^n, \quad \text{откуда} \quad \lg N = \lg N_0 + n \lg 2,$$

где  $N$  – число клеток.

Отсюда **число клеточных делений** ( $n$ ) составит:

$$n = \lg N - \lg N_0 / \lg 2.$$

**Константу скорости деления**, или число клеточных делений в единицу времени,  $t-t_0$  можно вычислить по формуле:

$$v = n/t,$$

**а время одной генерации** ( $g$ ), по формуле:

$$g = t/n = 1/v.$$

## **Глубинное периодическое культивирование**

Жидкие питательные среды даже без перемешивания позволили избежать недостатков, связанных с примесями агара в смываемой суспензии, и увеличили выход процесса за счет использования больших емкостей для культивирования (бутыли, ферментеры). Применение же для культивирования клеток жидких питательных сред с принудительным перемешиванием культуры с целью выравнивания условий роста в различных частях рабочего объема культивационного сосуда привело к появлению динамических систем глубинного культивирования, оснащенных специальным оборудованием.

Для выращивания больших количеств микроорганизмов способом периодического культивирования наиболее часто применяется глубинное выращивание в ферментере с принудительной аэрацией и перемешиванием.

Глубинное культивирование в ферментерах по сравнению со статическим и поверхностным ускорило рост и развитие микроорганизмов за счет устранения «голодной зоны» вокруг микробной клетки и позволило получать гомогенную культуру «идеального смешения». Клетки в такой системе равномерно распределены по объему ферментера и в каждый момент времени находятся в одинаковых условиях, т. е. питательные субстраты и продукты метаболизма распределены также равномерно. «Идеальное смешение» особенно важно для изучения процессов роста и развития микробной популяции в целом.

Применение динамических глубинных систем культивирования позволило более рационально получать не только биомассу и эндометаболиты, но и экзопродукты микробного синтеза, выделяемые клеткой в окружающую среду.

Получивший первоначальное распространение в производстве дрожжей и антибиотиков в дальнейшем метод глубинного культивирования зарекомендовал себя как наиболее пригодный для промышленного и лабораторного выращивания микроорганизмов.



Периодические процессы культивирования находят применение в технической микробиологии при получении продуктов второй фазы роста и при культивировании патогенных бактерий в производстве вакцин и анатоксинов.

Дальнейшее усовершенствование процесса глубинного культивирования было направлено на разработку систем контроля условий культивирования.

### **Продленное периодическое культивирование**

Продленный периодический процесс культивирования, как и периодический, предусматривает одноразовую загрузку и разгрузку ферментера. Однако цикл развития микроорганизмов в продленном периодическом процессе удлиняется либо за счет подпитки (периодической или непрерывной), либо за счет длительного удержания клеток в системе (диализная культура).

Известно, что зависимость концентрации микроорганизмов и удельной скорости роста от времени в продленном периодическом процессе более растянута во времени по сравнению с таковыми в периодическом процессе. При этом продлевается как экспоненциальная фаза, так и в особенности фаза линейного роста.

Культура с добавлением источников питания – это один из методов получения роста, лимитированного субстратом. При этом экономический коэффициент в культуре с подпиткой выше по сравнению с простой периодической культурой. Подпитка переводит периодический процесс в продленный периодический и используется в основном для получения продуктов биосинтеза, что существенно увеличивает производительность процесса.

В периодической культуре, как известно, постепенно накапливаются продукты метаболизма, которые приостанавливают рост. Для увеличения выхода продуктов или с целью повышения концентрации биомассы применяют **процесс диализа**. Суть этого метода заключается в том, что культура развивается в пространстве, ограниченном полупроницаемой мембраной, а продукты диффундируют во внешний раствор. Наиболее простым диализным методом является культивирование в целлофановых мешках, погруженных в питательную среду. Метод был разработан рядом авторов для получения экзотоксинов и позволил получать высокоактивные препараты, но не нашел широкого практического применения из-за сложности осуществления его в производственных масштабах и невозможности получения токсина в больших количествах.

К продленным периодическим процессам можно отнести культивирование микроорганизмов в диализной системе с протоком среды, поскольку проток удлиняет период роста и развития микробной популяции, но система не является непрерывной из-за отсутствия оттока биомассы. В диализной системе с протоком среды общая биомасса увеличивается до тех пор, пока плотность культуры не станет такой, что дальнейшее перемешивание биомассы будет невозможным. Таким образом, метод дает возможность выращивать культуру до достижения высокой плотности биомассы.

Диализные культуры применяют в основном в трех случаях: 1) для концентрирования недиффундирующего продукта; 2) для уменьшения концентрации диффундирующего продукта, ингибирующего рост, и повышения выхода биомассы; 3) для накопления и отделения от клеток диффундирующего продукта.

### **Многоциклическое культивирование**

Многоциклическими процессами культивирования называют такие, в которых цикл выращивания культуры повторяется многократно без многократной стерилизации емкости.

Зависимость концентрации микроорганизмов и удельной скорости роста от времени в каждом цикле многоциклического процесса имеет характер, аналогичный таковому в периодическом процессе.

Многоциклическое культивирование может быть различным. Его можно вести в одном ферментере, многократно повторяя полный цикл развития культуры без перерыва на стерилизацию. В одном ферментере можно повторять и укороченный цикл, заканчивая его, например, экспоненциальной фазой роста. Процессы, осуществляемые в одном ферментере, называются одностадийными. Возможны и многостадийные многоциклические процессы, основанные на принципе повторного и последовательного периодического культивирования, протекающего в нескольких ферментерах, соединенных в «батарею», с целью длительного использования культуры. Существует несколько вариантов многоциклического многостадийного культивирования. Один из них заключается в следующем: культура выращивается в одном реакторе; в то время, когда она проходит в своем развитии экспоненциальную фазу, из нее берется инокулят для засева следующего реактора. В первом реакторе культура дорастивается до необходимой фазы роста. Когда культура во втором реакторе достигает экспоненциальной фазы, из нее также делается пересев в третий реактор и т. д. Поскольку культура все время пересевается в экспоненциальной фазе, не происходит ее старения и вырождения. Кро-

ме того, отмечается выигрыш во времени, так как одновременно работают несколько ферментеров.

Многоциклические процессы культивирования микроорганизмов применяют как для получения биомассы, так и продуктов микробного синтеза – токсинов, антибиотиков, внеклеточных ферментов, аминокислот. Применение подобного метода позволяет сократить в несколько раз затраты труда на производство продукта по сравнению с получением его периодическим способом.

### **Полунепрерывное культивирование**

В полунепрерывных системах полная загрузка и разгрузка ферментера осуществляются однократно, однако в процессе роста культуры часть ее сливается, а освободившийся объем заливается свежей питательной средой. Таким образом, функционирует сливно-доливная система. Следовательно, полунепрерывное культивирование характеризуется частотой и объемом сливаемой выросшей культуры и добавлением свежей питательной среды в рабочую емкость ферментера.

Установившиеся режимы полунепрерывного культивирования характеризуются колебанием концентрации микроорганизмов около одной и той же постоянной величины и постоянством средней удельной скорости роста популяции.

Полунепрерывное культивирование микроорганизмов осуществляется в открытой динамической гомогенной одностадийной системе в любом ферментере для периодического культивирования, оснащенном системой перемешивания и аэрации.

Различные варианты полунепрерывных систем используются в производстве дрожжей, водорослей, антибиотиков, лимонной кислоты и др.

### **Непрерывное культивирование**

В отличие от периодического культивирования в непрерывных процессах питательная среда подается непрерывно, удаление биомассы и продуктов ее жизнедеятельности также осуществляется непрерывно.

Установившиеся режимы непрерывного культивирования характеризуются постоянством концентрации микроорганизмов и удельной скорости роста популяции.

Непрерывное культивирование проводится в открытой динамической системе, которая может быть как гомогенной, так и гетерогенной. Эта система способна к длительной работе в постоянном установившемся режиме.

**Гомогенные системы идеального смешения.** В системе идеального смешения микроорганизмы растут в культуральной среде, постоянной по своему составу, и, следовательно, в каждый данный момент времени находятся в одном и том же физиологическом состоянии, т. е. в состоянии установившегося динамического равновесия, которое называют «steady state».

По количеству ферментеров (стадий, ступеней) гомогенные системы могут быть одностадийными, двухстадийными и многостадийными.

Основным аппаратом для выращивания непрерывной гомогенной культуры является ферментер идеального смешения с устройством для потока среды и слива культуры, поддерживающим постоянный уровень среды. Питательная среда подается в ферментер обычно с помощью насоса. Концентрация всех продуктов внутри ферментера и в вытекающей жидкости одинакова, а скорость разбавления равна удельной скорости роста в состоянии установившегося равновесия.

Указанные процессы имеют технологические преимущества по сравнению с периодическими, поскольку теоретически их можно осуществлять неограниченно длительное время. На практике они обычно прерываются в связи с инфицированием культуры посторонней микрофлорой.

Любой периодический процесс можно перевести в непрерывно-проточный. Непрерывно-проточное культивирование открывает возможности для поддержания постоянных условий роста путем создания такого состава питательной среды, чтобы только один желаемый фактор лимитировал рост. Если в таком процессе плотность популяции определяется химическим составом среды (концентрацией лимитирующего рост фактора), его называют **хеостатным культивированием**. Изменяя концентрацию лимитирующего рост фактора, можно изменять плотность популяции. Изменяя скорость разбавления, можно получать режимы, обеспечивающие различную скорость роста популяции. При медленном протоке среды, т. е. при медленном росте, культура испытывает сильную лимитацию, глубокое голодание по данному субстрату. При быстром протоке среды, т. е. при быстром росте, степень голодания слабая, приближающаяся к условиям экспоненциального роста. Хеостатный способ культивирования в строго контролируемых условиях является основным для изучения физиологии, биохимии и вообще всех свойств микробных клеток и культур (рис. 2).

Хеостат имеет аналоги в природе. Аналогия заключается в том, что подобные устройства – это открытые непрерывные системы, через которые постоянно идут потоки энергии и веществ. Поэтому при непрерывном культивировании в лаборатории можно моделировать природные условия (например, в водоеме, в пищеварительном тракте), что поможет

изучению вопросов экологии. При этом за короткое время можно наблюдать явления, происходящие в природе длительное время, и выявить экологические закономерности.

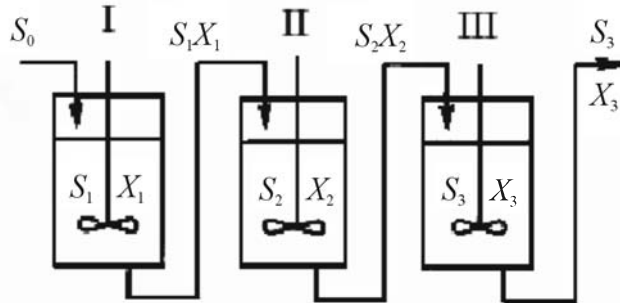


Рис. 2. Схема функционирования трехстадийного хемостата:

I, II, III – номера ферментеров;

$S_0$  – концентрация субстрата в подаваемой среде;

$S_1, S_2, S_3$  – концентрация субстрата в ферментерах;

$X_1, X_2, X_3$  – концентрация клеток в ферментерах

Другой широко известный принцип управления процессом – турбидостат (рис. 3). В нем подача питательной среды осуществляется по команде фотоэлектрического элемента, регистрирующего оптическую плотность культуры. Скорость разбавления сама устанавливается в соответствии с заданной плотностью популяции. Этим турбидостат отличается от хемостата, в котором фиксируется скорость разбавления, соответственно которой устанавливается концентрация биомассы. Хотя теоретически взаимосвязь между концентрацией биомассы и скоростью разбавления подчиняется одним и тем же закономерностям в хемостате и

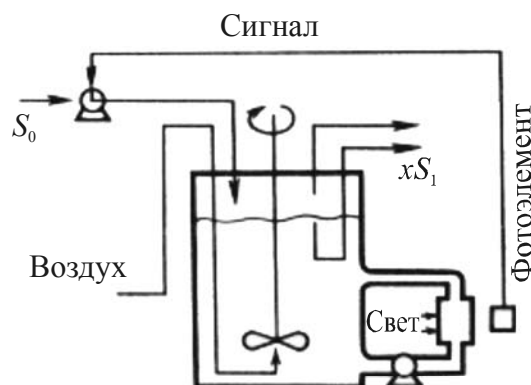


Рис. 3. Схема работы турбидостата:

$S_0$  – концентрация субстрата в подаваемой среде;

$S_1$  – концентрация субстрата в вытекающей культуре;

$X$  – концентрация клеток

турбидостате, методы управления процессами различны. Турбидостат позволяет получать скорости роста, равные максимальной скорости, которые применяются при изучении культур, фиксированных в стадии экспоненциального роста. Хемостаты же применяют при скоростях разбавления от самой низкой до только приближающейся к максимальной удельной скорости роста. Поскольку в турбидостате скорость роста не фиксирована, при избытке субстрата и постоянных условиях среды в культуре могут отбираться быстро растущие мутанты. Турбидостат также может использоваться для получения мутантов, более устойчивых к ингибирующим рост факторам.

В случае длительного культивирования применение турбидостата связано с определенными трудностями, обусловленными прилипанием клеток к поверхности оптического элемента.

В настоящее время разработаны различные варианты непрерывного культивирования микроорганизмов, работающие по принципу турбидостата – рН-стат, оксистат, СО<sub>2</sub>-стат, теплостат, вискозистат и т. д., названия которых соответствуют задаваемому параметру. Любой параметр, который изменяется в периодической культуре и на который существует датчик, может быть использован для управления ростом по типу турбидостата.

Необходимо отметить, что управляющими параметрами могут быть комплексные параметры, например содержание кислорода и углекислоты в отходящем воздухе, характеризующее дыхательный коэффициент.

Непрерывно-проточное культивирование может осуществляться в одном ферментере (одностадийный процесс) или в двух и более ферментерах (многостадийный, многоступенчатый процесс).

В промышленности одностадийный процесс культивирования применяется для получения микробной массы или тех продуктов, кинетика накопления которых повторяет кинетику роста биомассы.

Для получения высоких концентраций биомассы могут быть использованы одностадийные системы с возвратом клеток, в которых клетки, отделенные от культуральной жидкости с помощью насоса, возвращаются обратно в ферментер. Возврат клеток (рециркуляция) имеет значение в тех процессах, в которых за время пребывания в ферментере клетки не успевают реализовать свои потенциальные возможности в отношении синтеза целевого продукта.

Применение многостадийных систем позволяет получать культуру при любой скорости роста – от лаг-фазы до экспоненциальной и стацио-

нарной. Многостадийные системы обычно используются для получения вторичных продуктов микробного синтеза, накопление которых в той или иной степени отстает от кинетики роста биомассы. Многостадийное культивирование с успехом применяется при получении молочной кислоты, этилового спирта и т. д. «Батарей» ферментеров применяется также для переработки высоких концентраций субстрата при получении продуктов как первой, так и второй фазы роста.

**Системы культивирования полного вытеснения.** Этот способ культивирования используется для анаэробных условий. Открытая система полного вытеснения отличается от системы идеального смешения тем, что культура в ней не перемешивается и представляет собой поток жидкости через трубку. Наиболее распространенным аппаратом является трубчатый реактор (рис. 4). Он может иметь различную форму (прямую, S-образную, спиральную) и устанавливается горизонтально или вертикально. Система полного вытеснения представляет собой пространственный, проточный вариант периодической культуры. Такая культура за время от посева до выгрузки проходит через все стадии периодической культуры, т. е. фазы роста распределены не во времени, а в пространстве, причем каждой части ферментера в установившемся режиме соответствует определенный отрезок кривой роста. Засев осуществляется

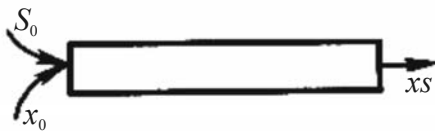


Рис. 4. Трубчатый ферментер полного вытеснения:

$S_0$  – концентрация субстрата в поступающей среде;  $S$  – концентрация субстрата в вытекающей среде;  $X_0$  – начальная концентрация биомассы;  $X$  – концентрация вытекающей биомассы

непрерывно на входе в ферментер одновременно с подачей среды. По такому принципу ведут стадию брожения при производстве пива в башенных проточных емкостях.

Необходимо отметить, что в настоящее время появились ферментационные аппараты, обеспечивающие процессы с режимом, приближающимся к полному вытеснению и при аэробном культивировании. Это вращающиеся трубчатые реакторы с насадкой или внутренними аэрирующими элементами, а также многосекционные колоночные аппараты.

**Системы твердожидкостного типа.** К системам твердожидкостного типа относят многофазные системы, в которых культура растет на границе разных фаз: жидкость – твердая фаза, жидкость – твердая фаза – газ. В этих системах клетки удерживаются путем прилипания к

твердой основе – наполнителю и размножаются на нем, образуя пленку биомассы. Типичным примером является производство уксуса в стружечных аппаратах.

В процессах аэробного роста лимитирующими факторами, вероятно, являются кислород и субстрат. В тонких пленках биомассы каждая из прикрепленных к поверхности микробных клеток полностью обеспечена питательной средой и способна расти и размножаться с максимальной экспоненциальной скоростью. По мере того как клетки образуют более толстую пленку биомассы, рост их лимитируется диффузией субстрата и кислорода внутрь этой пленки.

Культивирование микроорганизмов, образующих пленки из биомассы, осуществляется в ферментере типа колонки с наполнителем. В качестве наполнителя может использоваться макроноситель (кокс, прутья, стружка, стеклянные шарики и т. д.) или микроноситель (амберлитовые смолы, частички сефадекса и т. д.). Клетки, культивируемые таким образом, называются иммобилизованными.

В промышленной микробиологии системы твердожидкостного типа нашли применение в «оросительных фильтрах» при очистке сточных вод, в производстве органических растворителей и кислот, в сбраживании гидролизатов древесины на спирт и т. д.

Культивирование на твердом носителе используется также при изучении метаболической активности природных микробных популяций. При пропускании различных растворов через колонку из образца почвы, служащего носителем, получают модели условий, близких к природным. Широкое применение нашли многофазные системы в производстве пива.

К многофазным системам твердожидкостного типа относятся и такие, в которых твердой фазой является сама культура, образующая пленки на поверхности жидкой протекающей питательной среды. Рост микроорганизмов в этом случае осуществляется в специальной горизонтальной емкости. Эта система используется, например, для получения винного уксуса в горизонтально лежащих бочках и лимонной кислоты при выращивании пленки в кюветах.

Таким образом, между периодическим и непрерывным культивированием существует большое разнообразие типов процессов культивирования (рис. 5). Каждый из промежуточных типов можно использовать в зависимости от задачи исследования или цели производства.





Рис. 5. Основные методы культивирования микроорганизмов

### **Синхронно делящиеся культуры микроорганизмов**

Культуры микроорганизмов, даже взятые в один и тот же срок от посева, представляют собой совокупность клеток, находящихся на разных стадиях своего индивидуального развития.

Изучение физиологических свойств и метаболической активности таких культур приводит к получению средних результатов. А модель изолированной живой клетки не может быть использована для изучения ее биологии не только из-за малых количеств биомассы, но и потому, что не отражает свойств клетки, находящейся обычно в условиях популяции.

Стремление получить культуры, все клетки которых в данный момент находятся в одной фазе развития, привело исследователей к разработке метода синхронизации деления микроорганизмов. Этот метод позволяет отдельно и поэтапно изучать физиологические и биохимические процессы, протекающие на разных стадиях развития клетки.

Сущность метода синхронизации заключается в том, что путем различных воздействий микробная популяция искусственно приводится в однородное физиологическое состояние. Наиболее легко определяемым показателем такого состояния популяции является одновременное (синхронное) деление почти всех клеток культуры.

Синхронизации деления подвергались различные объекты: грибы, бактерии, простейшие, водоросли, а также клетки культуры ткани и т. п. Среди бактерий синхронное размножение изучалось главным образом на популяциях *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Corynebacterium diphtheriae* и других.

**Периодическое синхронное культивирование.** Для синхронизации деления обычно применяют популяции в фазе экспоненциального роста, когда клетки наиболее однородны по продолжительности периода генерации.

Степень участия клеток популяции в синхронном делении называют степенью синхронизации. Она выражается значениями индекса синхронизации, который характеризует степень однородности популяции и позволяет сравнить эффективность различных синхронизирующих воздействий. Для определения степени синхронизации наибольшее распространение получил «индекс синхронизации» Шербаума ( $I_s$ ), вычисляемый по формуле:

$$I_s = (N_1/N_0 - 1) \cdot (1 - T/g),$$

где  $N_0$  – число клеток непосредственно перед взрывом синхронного деления;

$N_1$  – число клеток после синхронного деления;

$T$  – время, в течение которого происходит синхронное деление;

$g$  – продолжительность одной генерации.

Способы, вызывающие синхронное деление, весьма разнообразны и многочисленны. В зависимости от характера воздействия их можно разделить на 3 большие группы: 1) механический отбор (селективные методы); 2) действие физических факторов и 3) химико-биологические воздействия.

Методы, основанные на механическом отборе однородных по некоторым признакам клеток из асинхронно делящейся популяции, называются естественными, или селективными. Некоторые из них получили наиболее широкое распространение в микробиологических исследованиях, например фракционное фильтрование и дифференциальное центрифугирование.

К этой же группе методов можно отнести исследования J. Yongg и Ph. Fitts-James, получивших синхронное размножение *Bacillus cereus* за счет развития популяции из отобранных спор.

Таким образом, первая группа методов синхронизации заключается в механическом отборе клеток из популяции в зависимости от их объема, массы или определенной формы существования, как это имеет место в

случае отбора спор. Применение селективных методов основано на предположении, что такие свойства, как объем и масса клеток, отражают в известной мере определенное физиологическое состояние. Эти методы имеют то преимущество, что не создают никакого препятствия в обмене веществ у отдельных клеток, как это бывает при использовании других методов.

Вторая группа методов связана с физическими воздействиями, также ведущими популяцию к синхронному размножению. В этом направлении наибольшее распространение получили температурные воздействия. Синхронизация популяций с помощью изменения температуры культивирования достигается однократным (шок) или многократным (сдвиги температуры между двумя уровнями) действием более высокой или более низкой температуры по сравнению с оптимальной для данного вида микроорганизмов. Такое температурное воздействие, блокируя процесс деления, не останавливает роста и развития клеток, что в конечном итоге приводит популяцию в однородное состояние. После снятия шока от 70 до 90 % клеток делится синхронно. Этот вид воздействия в основном применяется для синхронизации бактерий, простейших и клеток культуры ткани.

Одним из методов физического воздействия, применяемых для синхронизации деления, является обработка клеток сублетальными дозами рентгеновских лучей.

К физическому типу воздействий можно отнести также периодическую смену света и темноты, использованную для получения синхронного деления *Euglena gracilis* и хлореллы. Этот метод считается наиболее естественным, так как основан на цикличности развития водорослей в связи с суточной фотопериодичностью.

Третья группа факторов, вызывающих синхронное размножение, основана на изменениях питательной среды путем введения ингибиторов или лишения среды веществ, необходимых для деления.

Одним из наиболее распространенных методов синхронизации этой группы является так называемый метаболический шок.

Можно получить эффект синхронизации, применяя «голодные» среды, из которых полностью удалены важнейшие компоненты или снижено их содержание. Последующее добавление недостающего вещества или перенесение клеток в полноценную среду вызывает синхронное деление.

Несмотря на разнообразие методов, могущих привести культуру к синхронному размножению, не всегда удается в достаточной степени синхронизировать деление клеток. В таких случаях принято сочетать различные методы.

**Непрерывно-синхронное культивирование.** Общим и весьма существенным недостатком периодических синхронных культур является быстрая потеря синхронности, наступающая через 2–3 генерации.

Причина подобного явления может заключаться в том, что не все клетки популяции делятся, достигнув одного и того же размера, возраста или момента времени, прошедшего после предыдущего деления. Принято считать, что решающая роль принадлежит фазе развития исходной синхронизируемой культуры. Десинхронизация наступает быстрее при воздействии на культуру синхронизирующим агентом в фазе замедления скорости размножения, т. е. более гетерогенную в отношении продолжительности генерации отдельных клеток.

С середины 60-х гг. XX в. началась разработка методов получения синхронизированных культур на протоке. Такой способ известен как непрерывно-синхронный, или фазовый, метод культивирования, гарантирующий поддержание синхронного деления клеток неограниченно долгое время.

Метод основан на периодическом сливе из ферментера половины объема выросшей культуры через промежутки времени, равные одной генерации, и одновременном добавлении такого же количества свежей питательной среды, что обеспечивает импульсную подачу источников питания. Состав среды подбирается таким образом, чтобы при удвоении биомассы происходило исчерпание питательных веществ, вследствие чего рост культуры должен быть приостановлен. Добавление свежей среды приводит к восстановлению роста, т. е. синхронизация деления достигается голоданием клеток по какому-либо лимитирующему рост субстрату. Лимитирующими факторами могут служить источники азота, углерода, минеральных солей и т. д.

Имеются также данные, свидетельствующие о том, что синхронное деление клеток может быть индуцировано изменением рН, температуры и других условий культивирования, оказывающих воздействие на ряд метаболических процессов клеток.

## **Методы получения протопластов микроорганизмов**

Выбор метода получения протопластов определяется видовыми особенностями организмов и в первую очередь строением их клеточных стенок, потому что даже внутри прокариот есть существенные различия в строении клеточных стенок, не говоря уже о различиях в структуре прокариотических и эукариотических организмов.

Тем не менее методы получения протопластов у трех различных групп микроорганизмов – бактерий, дрожжей и грибов – могут быть объединены в две основные группы:

- 1) ферментативный лизис ригидного слоя клеточной стенки;
- 2) использование факторов, подавляющих нормальный синтез основных полимеров стенки.

### **Получение протопластов у бактерий**

В 1800 г. А. Фишер впервые показал явление «плазмолиза» – выхода содержимого клеток в окружающую среду при их помещении в гипертонический раствор – для бактерий *Bacillus subtilis* и *Vibrio proteus*. При этом протоплазма обособлялась в виде шарообразных тел, очень быстро исчезающих.

Основная работа по получению протопластоподобных тел у бактерий началась в начале 1950-х гг. В эти годы с использованием гипертонических растворов различных солей было обнаружено влияние условий культивирования клеток на выход шарообразных форм. Было установлено значение концентрации шаров (чем гуще суспензия, тем интенсивнее образование шаров) и влияние рН среды (слабокислая и нейтральная реакции способствовали образованию шаров, в то время как при кислой и щелочной реакции шары не образовывались). Однако целостность полученных шарообразных форм сохранять не удавалось, они быстро лизировались.

Следующим шагом в получении протопластоподобных структур явилось ферментативное растворение бактериальной клеточной стенки при помощи гидролитического фермента лизоцима. Толчком к этому послужил установленный М. Сальтоном (M. Salton) факт растворения под действием лизоцима клеточных стенок грамположительных бактерий. Однако и в этих экспериментах протопластоподобные тела оказывались очень неустойчивыми.

Этого удалось избежать К. Вейбулу (C. Weibull), который обрабатывал бактериальные клетки лизоцимом в гипертоническом растворе сахарозы. Полученные им сферические тела долгое время сохраняли свою целостность при условии помещения их в среду со стабилизатором осмотического давления. К. Вейбул назвал полученные сферические образования протопластами, употребив термин, применявшийся ранее в цитологии растений.

Установлено, что на активность лизоцима могут оказывать влияние вещества, используемые в качестве стабилизаторов осмотического дав-

ления. Например, использование 0,5 % NaCl тормозит действие лизоцима на клетки. Лучшими стабилизаторами для получения бактериальных протопластов считаются углеводы. Чаще всего применяют 0,1–0,6 М растворы сахарозы, глюкозы, раффинозы, мелибиозы, трегалозы. Иногда используют и более высокие концентрации сахаров.

Для получения протопластов грамположительных бактерий достаточно простая обработка клеток лизоцимом в гипертоническом растворе. Под действием этого фермента растворяется ригидный пептидогликановый слой клеточной стенки. При этом чувствительность к лизоциму неодинакова не только у разных видов бактерий, но и среди разных штаммов.

Для получения протопластов грамотрицательных бактерий простая обработка лизоцимом малоэффективна. В клеточных стенках этих бактерий тонкий слой пептидогликана окружен внешним слоем, состоящим из лигопротеинов, фосфолипидов, липополисахаридов, что делает его недоступным действию лизоцима. Для проникновения фермента к субстрату необходимо нарушение поверхностных слоев клеточной стенки.

Подготовка клеток грамотрицательных бактерий для воздействия лизоцимом проводится с помощью различных методов, повышающих чувствительность клеток: путем предварительной инкубации бактерий в жидкой питательной среде при щелочном рН или в присутствии высоких концентраций сахарозы; обработка клеток хелатирующими соединениями (например, Na-ЭДТА) или одно- и дивалентными катионами; применение предварительного замораживания-оттаивания.

Наиболее удачным оказался метод, предложенный Р. Репаске и до сих пор применяемый для получения протопластов у разных видов грамотрицательных бактерий. Автор показал возможность получения протопластов при совместном действии лизоцима и ЭДТА в среде с рН 7,6–8,0.

В 1976 г. Р. Вейсс предложил ускоренный метод получения протопластов кишечной палочки с использованием ЭДТА, модифицировав метод Репаске. Он применил не совместное действие на клетки лизоцима и ЭДТА, а последовательное.

Вместо лизоцима в качестве факторов, лизирующих клеточные стенки бактерий, можно использовать также литические ферменты микробного происхождения.

Вторая группа методов получения протопластов у бактерий предусматривает не разрушение готовых клеточных стенок, а ингибирование их синтеза (методы «несбалансированного роста»). Метаболические нарушения при синтезе клеточных стенок происходят в двух случа-

ях: 1) в результате мутации может возникнуть генетический блок в цепи реакций, ведущих к синтезу полимеров клеточной стенки; 2) при нарушении синтеза клеточной стенки под действием агентов, предотвращающих образование ригидного мукополимера.

Целостность клеточных стенок у некоторых бактерий зависит от наличия в ростовой среде мукополимерных аминокислот: ДАП, цистеина, аланина, лизина, глицина, орнитина и глутаминовой кислоты. Когда они исчерпываются в процессе роста клеток, синтез клеточных стенок приостанавливается (*Streptococcus faecalis*).

Одним из широко распространенных методов получения протопластов у грамотрицательных бактерий является так называемый пенициллиновый метод, основанный на свойстве пенициллина нарушать синтез пептидогликана. (Впервые предложен К. Ледермейстером и Е. Келленбергером в 1956 г.) Пенициллиновый метод неэффективен в тех случаях, когда в клетках подавлен синтез активных цитоплазматических компонентов, например при воздействии на клетки хлорамфениколом, стрептомицином или хлортетрациклином. Действие пенициллина на активно растущие клетки сводится к торможению реакции транспептидирования на последней стадии синтеза пептидогликана, после того как этот полимер почти построен.

Для получения протопластов грамположительных бактерий пенициллиновый метод непригоден. Объясняется это тем, что мукополимерный слой в клеточной стенке этих бактерий не защищен дополнительными слоями, как у грамотрицательных бактерий, и при культивировании с антибиотиком клетки претерпевают лизис. Однако имеются отдельные сообщения об успешном применении метода для получения протопластов у *Corynebacterium glutamicum*, для которых другие методы были неэффективны.

Помимо указанных способов, протопласты у бактерий могут быть получены и другими методами: под влиянием глицина, фагового литического фермента, нормальной и иммунной сывороток, комплимента, методом автолиза и т. д.

Протопласты, полученные из грамотрицательных и грамположительных бактерий, по качеству оставшихся поверхностных структур различаются между собой. У протопластов грамположительных бактерий клеточная стенка отсутствует полностью, и их сферические тела окружены лишь цитоплазматической мембраной. Сферические тела грамотрицательных бактерий сохраняют значительную часть сложноорганизованной клеточной стенки и называются сферопластами.

## Получение протопластов у грибов

Первой в данной области явилась работа Дж. Таджи (J. Giaja), который показал, что пищеварительный сок виноградной улитки способен растворять клеточные стенки дрожжей. Анализ химического состава выявил наличие целого комплекса ферментов: глюканаз, маннаназ, протеаз, липазы, хитиназы, полигалактуроназы и др. Первые дрожжевые протопласты под действием улиточного сока были получены Л. Эдди и В. Р. Вильямсоном в 1957 г.

При воздействии на клеточную стенку литических ферментов образуется пора, через которую затем протоплазма выходит в окружающую среду и в присутствии стабилизатора осмотического давления благодаря поверхностному натяжению мембраны приобретает сферическую форму – образуется протопласт. У дрожжевых клеток пора обычно образуется на одном из полюсов клетки или в экваториальной зоне.

Большинство исследователей считает, что основную роль при лизисе грибных клеточных стенок играют глюканазы. В этом явлении нет ничего необычного, так как именно глюканы являются одними из главных компонентов клеточных стенок дрожжей. Однако для быстрого и эффективного лизиса сложной в плане химического состава и структуры грибной стенки необходимо также присутствие в литическом комплексе и других ферментов. При совместном воздействии нескольких ферментов проявляется синергический эффект.

Для получения грибных протопластов широко и успешно применяется литический комплекс *Streptomyces spp.* и некоторые другие. Для лизиса клеточных стенок при помощи ферментов микробного происхождения применяют или культуральную жидкость после инкубирования микроорганизма, или энзимный препарат, полученный осаждением комплекса ферментов сульфатом аммония или ацетоном. Перед употреблением в смесь ферментов вносят стабилизатор осмотического давления и стерилизуют фильтрацией через мембранный фильтр. Процесс растворения клеточных стенок под действием литического комплекса может продолжаться от нескольких часов до 2 суток.

На образование протопластов, особенно у грибов и дрожжей, сильно влияет возраст культуры. Поэтому рекомендуется использовать молодые дрожжевые клетки и мицелий. По мнению многих авторов, различная возрастная чувствительность грибных клеток к действию литических ферментов объясняется скорее количественными изменениями в клеточной стенке, чем качественными.



Для облегчения процесса получения грибных протопластов можно использовать воздействие редуцирующих веществ (меркаптоэтанола, цистеина-HCl, сульфида натрия). Хотя механизм их действия на клетки полностью не выяснен, предполагается, что эти соединения разрывают дисульфидные связи в поверхностном маннан-протеиновом слое, облегчая этим доступность глюконовой матрицы действию литических ферментов.

Лизис грибных клеточных стенок может быть облегчен также обработкой клеток хелатирующими соединениями (Na-ЭДТА) или применением таких приемов, как замораживание-оттаивание. Лучшими стабилизаторами осмотического давления оказались 1 М раствор хлористого натрия и смесь 1 М раствора хлористого натрия с 1 М раствором маннита в соотношении 1:1.

**В процессе культивирования** протопласты и сферопласты способны увеличиваться в размерах, иногда даже на треть своей величины, и делиться. Деление протопластов может быть как равновеликое, так и неравновеликое, в виде почкования. Дочерние протопласты обычно меньшего размера. Протопласты, полученные из микробных клеток, сохраняют большинство их свойств. Они жизнеспособны в изотонической питательной среде при близких величинах осмотического давления среды и содержимого протопласта, способны метаболизировать и продуцировать различные вещества, поддерживать развитие бактериофагов, расти и делиться. Отсутствие оболочки исключает один из важных барьеров нескреживаемости микроорганизмов, создает возможность объединения геномов и цитоплазмы для получения гибридного потомства даже у отдаленных форм микроорганизмов.

### **Регенерация клеточной стенки и реверсия к клеточным формам**

Исследование реверсии протопластов бактерий и грибов выявило сходство протекания у них данного процесса. Условно он может быть разделен на три этапа: 1) регенерация клеточной стенки; 2) реверсия, появление клеток-ревертантов; 3) восстановление нормального цитокинеза и появление клеток исходной формы.

Вместе с тем каждой группе микроорганизмов присущи свои особенности протекания реверсии протопластов, связанные со строением клеток и клеточных стенок, характером метаболизма и цитокинеза.

**Реверсия бактериальных протопластов.** Если при обработке лизоцимом или пенициллином в изотонической среде клеточная стенка с бактериальной клетки полностью не удалена, то при исключении этих агентов из среды происходит быстрое восстановление клеток. Если же клеточная стенка удалена полностью, образовавшийся истинный протопласт неспособен в обычных условиях ее регенерировать. Одним из условий, позволяющих таким формам ревертировать к исходному состоянию, является наличие в среде культивирования твердой или полутвердой основы. Ею могут быть желатин (5–30 %), агар (0,7–2 %), мембранные фильтры, убитые бактериальные клетки или клеточные стенки. Причем использование твердого субстрата предпочтительнее.

**Реверсия протопластов мицелиальных грибов.** Реверсия к мицелиальным формам у грибных протопластов происходит как в жидкой, так и на поверхности твердой среды, или в слое полужидкого агара. Многие исследователи показали, что реверсия грибных протопластов может проходить тремя способами, различающимися характером формирования первичного мицелия. *При первом способе* протопласты первоначально образуют цепочку из дрожжеподобных клеток (до 20 клеток). Затем терминальная, уже осмотически устойчивая, продуцирует первичную гифу, образующую мицелий. *Второй способ* реверсии начинается с регенерации протопластами клеточной стенки, вследствие чего они становятся резистентными к осмотическому шоку. После чего протопласт образует зародышевую трубку. *Третий способ* реверсии грибных протопластов необычен. Протопласт, сохраняя сферическую форму, формирует новую оболочку в виде полочки, затем туда переносится содержимое материнского протопласта. Если появляется цепочка таких оболочек, то цитоплазма передвигается по этой цепочке, оставляя позади себя «тени» из клеточных стенок. Последняя клетка цепочки образует первичную гифу. Грибные протопласты могут ревертировать одним из трех способов, или у одного вида наблюдается все три способа реверсии. Трудно сказать, что влияет на выбор способа реверсии, возможно, видовые особенности организма, тип его цитокинеза, метод получения и условия инкубации протопластов или состав регенерационной среды.

Растущие и ревертирующие протопласты – хорошая модель для изучения биосинтеза клеточной стенки и взаимоотношений между ростом и ядерным делением клетки.

## 1.2. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК

Идея возможности культивирования клеток вне организма была высказана еще в конце XIX в. Период с 1892 по 1902 г. можно считать предысторией развития метода культуры клеток и тканей растений. В это время немецкие ученые Х. Фехтинг, К. Рехингер, Г. Габерландт предпринимали попытки выращивать изолированные из растений кусочки тканей, группы клеток, волоски. Не достигнув экспериментальных успехов, эти первые исследователи, однако, высказали ряд идей, реализованных позднее.

В последующие 20 лет были получены первые результаты по культивированию тканей животных на питательных средах с добавлением сывороток. Но в растительном мире каких-либо значительных успехов достигнуть не удалось, несмотря на попытки создания оптимальных питательных сред, способных обеспечивать длительное существование и размножение клеток растений *in vitro*.

В 1922 г. В. Роббинс и Котте независимо друг от друга показали возможность культивирования на синтетических питательных средах клеток меристемы кончика корня томатов и кукурузы. Эти опыты положили начало применению метода культивирования изолированных клеток и органов растений.

В 30–60-е гг. XX в., благодаря работе большого числа ученых (Ф. Уайт, Р. Готре и другие) число видов растений, клетки и ткани которых выращивали *in vitro*, достигло значительного количества (более 150). Были описаны составы питательных сред, определены потребности культур в витаминах и стимуляторах роста, разработаны методы получения и выращивания больших масс клеточных суспензий, а также культивирования отдельной, выделенной из суспензии клетки. Ф. Стюард, работая с культурой изолированной флоэмы моркови, получил из нее в 1958 г. целые растения. Значительный вклад в развитие культуры клеток и тканей растений внесли исследования Р. Г. Бутенко и ее сотрудников, использовавших эти методы для изучения физиологии растительных клеток и морфогенеза растений.

В последующие годы были предложены методы получения изолированных протопластов из растительных тканей, найдены условия культивирования, при которых они способны образовывать новую клеточную стенку, делиться и давать начало клеточным линиям. С использованием изолированных протопластов были разработаны методы гибридизации соматических клеток путем слияния протопластов с помощью ПЭГ (по-

лиэтиленгликоля) и введения в них вирусных РНК, клеточных органелл, клеток бактерий. С помощью метода культуры меристем были получены безвирусные экономически важные растения с высоким коэффициентом размножения.

В настоящее время активно продолжается разработка методов глубинного культивирования клеток, методов электрослияния изолированных протопластов и т. д.

Использование методов получения соматональных вариантов, экспериментальных гаплоидов, скрининга биохимических мутантов привело к появлению более продуктивных и приспособленных к условиям культивирования клеточных штаммов, используемых для создания новых форм и сортов сельскохозяйственных, лекарственных, декоративных и других растений.

### **Методы создания клеточных культур растений**

Основным типом культивируемой растительной клетки является каллусная. Значительно реже культивируют клетки опухолей растений различного происхождения. Культуры опухолевых клеток независимо от способа культивирования на уровне морфологии мало отличаются от культур каллусных клеток. Значительным физиологическим отличием между ними является гормонезависимость опухолевых клеток, позволяющая им делиться и расти на питательных средах без добавок фитогормонов или их аналогов. Однако опухолевые клетки лишены способности давать начало нормально организованным структурам. В некоторых случаях они способны образовывать тератомы (уродливые органоподобные структуры), нормальное развитие которых не происходит.

Каллусные клетки в пересадочной культуре могут спонтанно приобрести гормонезависимость. Природа такой независимости к ауксину и цитокинину, чаще всего применяемым при выращивании клеточных культур растений, может быть генетической (результат мутации) или эпигенетической (результат экспрессии генов, определяющих гормонезависимость клетки). При генетической гормонезависимости каллусные клетки ведут себя как опухолевые, при эпигенетической они теряют признак в ряду превращений клетка – растение – клетка.

Каллусная клетка, в результате деления которой возникает каллусная ткань, или каллус, представляет один из типов клеточной дифференцировки, присущей высшему растению. Для растения кал-

лус является тканью, возникающей при исключительных обстоятельствах (обычно при травмах) и функционирующей непродолжительное время. Эта ткань защищает травмированное место, накапливает питательные вещества для анатомической регенерации или генерации утраченного органа.

Для получения культивируемых каллусных клеток *in vitro* фрагменты тканей разных органов высших растений (экспланты) помещают на искусственную питательную среду в пробирки, колбы, чашки Петри. Процесс получения первичного каллуса и поддержание пересадочной культуры требует строго стерильных условий. Для этого с помощью стерильных растворов, содержащих хлор или ртуть (гипохлориты, сулема, диацид), к которым для лучшего смачивания добавлены детергенты, стерилизуют экспланты, тщательно отмывая их затем от используемого раствора стерильной водой. Питательные среды, растворы, инструменты, материалы, необходимые для работы, стерилизуют в автоклавах или сухожаровых шкафах. Все манипуляции с культурами проводят в микробиологических боксах, облучаемых перед работой ультрафиолетом, или ламинар-боксах, где стерильность достигается постоянной подачей стерильного воздуха в рабочий объем.

Особенности дедифференцировки клеток экспланта и каллусогенеза зависят от эпигенетических характеристик составляющих его тканей. Клетки специализированных тканей, эксплантированных на питательную среду, содержащую минеральные соли, источники углерода, витамины и гормоноподобные вещества, должны дедифференцироваться, т. е. потерять структуры, характерные для их специфической функции в растении, и вернуться к состоянию делящейся клетки. Часто эксплант, используемый для получения каллуса, является фрагментом органа и включает ткани, клетки которых различно дифференцированы. Различное тканевое происхождение первичных каллусных клеток является одной из причин гетерогенности культуры каллусной ткани, так как некоторые функциональные особенности исходных дифференцированных клеток передаются в ряду клеточных поколений как стойкие модификации или эпигенетически наследуемые признаки.

В клетках экспланта, состоящего из неделиющихся специализированных клеток, в самом начале культивирования могут наблюдаться изменения в метаболизме, вызываемые и травматическими синтезами, и дедифференцировкой, и подготовкой к процессу деления. Для разделения этих процессов можно применять прединкубацию эксплантов на среде без гормонов в течение нескольких суток (3–6). Это позволяет исключить не только

изменения, связанные с травмой, но и возможное неконтролируемое влияние эндогенных гормонов эксплантата на изучаемые процессы.

В готовящейся к делению клетке стимулируется синтез всех типов РНК, исчезают тканеспецифические белки-антигены и появляются белки, специфичные для делящихся клеток и каллусной ткани. Это свидетельствует об изменении активности генов и белкового аппарата клеток при дедифференцировке.

Образование каллуса не во всех случаях связано с травматическим воздействием. Каллус может возникнуть в результате пролиферации внутренних тканей экспланта без связи с поверхностью среза. Растущий каллус разрывает слои ткани и развивается на поверхности. Образование каллуса при эксплантировании фрагмента ткани в условиях *in vitro* свойственно двудольным и однодольным покрытосеменным и голосеменным растениям, папоротникам, мхам, печеночникам.

Первичный каллус, возникший на эксплантах через 4–6 недель (в зависимости от скорости роста клеток), переносится на свежую питательную среду (субкультивируется). Размер транспланта (переносимого кусочка) при культивировании на агаризованной питательной среде обычно составляет от 60 до 100 мг массы ткани на 30–40 мл питательной среды.

Таким образом, техника культивирования тканей растений позволяет получить длительную пересадочную каллусную культуру из любых живых тканевых клеток интактного растения. Клетки различно дифференцированные (в том числе и меристематические) переходят *in vitro* к сложному процессу дедифференциации, теряют присущую им структурную организацию и специфические функции и индуцируются к делению, образуя первичный каллус.

В процессе субкультивирования формируется штамм, характеризующийся индивидуальными генетическими и физиологическими особенностями.

При культивировании растительных клеток и при выращивании культуры тканей применяются среды Мурасиге – Скуга, Нагата – Такебе, Хеллера, Нича–Нича, Кнудсона и другие в различных модификациях.

Основными компонентами питательных сред для культуры клеток и тканей растений являются минеральные соли (макро- и микроэлементы), источник углеродного питания (обычно сахароза или глюкоза), витамины, регуляторы роста. Иногда в состав питательных сред включают комплексные органические добавки (гидролизат казеина или смесь аминокислот, дрожжевой экстракт, экстракты из разных органов растений).

## **Методы выращивания культуры каллусных тканей**

### **Поверхностное культивирование**

Культура каллусных тканей выращивается поверхностным способом на полужидкой агаризованной среде (концентрация агара – 0,6–1 %), среде с применением других желирующих полимеров либо на мостиках из фильтровальной бумаги или дисках из пенополиуретана, погруженных в жидкую питательную среду.

Каллусная ткань, выращиваемая поверхностным способом, представляет собой аморфную массу тонкостенных паренхимных клеток, не имеющую строго определенной анатомической структуры. Цвет массы может быть белым, желтоватым, зеленым или красным; пигментированным полностью или зонально.

В зависимости от происхождения и условий выращивания каллусные ткани бывают: 1) рыхлыми, сильно обводненными, легко распадающимися на отдельные клетки; 2) средней плотности, с хорошо выраженными меристематическими очагами; 3) плотными, с зонами редуцированного камбия и сосудов.

Как правило, в длительной пересадочной культуре, на средах, включающих ауксины, особенно синтетический аналог ауксина – 2,4-дихлорфеноксисукусную кислоту (2,4-Д), каллусные ткани теряют пигментацию и становятся более рыхлыми.

В цикле выращивания каллусные клетки после ряда делений проходят обычный для клетки растений онтогенез: они приступают к росту растяжением, затем дифференцируются как зрелые каллусные клетки и, наконец, деградируют.

Каллусные клетки, выращиваемые поверхностным способом, часто применяют для сохранения в растущем состоянии коллекций разных штаммов, линий, мутантов, для регенерации растений, из них также получают суспензии клеток, культивируемых в жидкой питательной среде.

### **Суспензионное культивирование**

Культуры клеток растений, выращиваемые в жидкой питательной среде, обычно называют *суспензионными культурами*. Термин этот не является строго научным и точным, так как не объясняет основной особенности поведения клеток при таком выращивании.

Получено еще сравнительно мало культур клеток высших растений, по своим параметрам полностью удовлетворяющих требованиям суспен-

зионного (глубинного) культивирования. В значительной мере это объясняется трудностями получения культуры клеток, состоящей преимущественно из отдельных клеток или небольших их агрегатов. Представляется целесообразным поэтому сначала рассмотреть методы получения клеточной суспензии, а также обсудить само понятие суспензионной (глубинной) культуры применительно к растительным клеткам.

Безусловно, выращивание клеточных суспензий в жидкой питательной среде имеет ряд преимуществ перед выращиванием каллусных клеток поверхностным способом. Здесь легче и более воспроизводимо влиять на метаболизм и рост клеточных популяций экзогенными факторами. Суспензионные культуры удобнее для проведения биохимических и молекулярно-биологических экспериментов – изучения индукции ферментов и связи их с событиями клеточного цикла, экспрессии и репрессии определенных генов, изолирования и характеристик мутантов.

Суспензионную культуру можно получить из фрагментов органа растения (диски запасающей паренхимы мясистых корней моркови, петрушки, клубней картофеля и др.), однако этот путь более трудоемкий и требует большего времени. Клетки экспланта должны при этом образовывать первичный каллус, и только после этого поверхностные каллусные клетки, попавшие в жидкую среду и размножившиеся в ней, дадут начало линии, способной расти в суспензии.

Обычно для получения культуры клеток используется культура каллусной ткани. Рыхлые обводненные культуры каллусных тканей более пригодны для перевода в суспензию, чем структурированные плотные каллусы. Оптимальными подходами для получения суспензии являются выращивание каллусов на среде с 2,4-Д, исключение из среды ионов кальция, обработка пектиназой транспланта, предназначенного для выращивания в суспензионной культуре. Для получения культуры клеток берется наиболее жизнеспособная (пролиферирующая) часть каллусной ткани, а ее количество должно быть в 15–20 раз больше в расчете на объем питательной среды, чем при серийном культивировании на агаре. При этом может использоваться питательная среда того же состава, что и для поверхностного культивирования, но в некоторых случаях увеличивают количество ауксинов и (или) уменьшают количество цитокининов. Режим перемешивания и аэрации при инициации культуры клеток обычно такой же, как и при дальнейших серийных субкультивированиях культур клеток на роллерах и качалках (круговая качалка – 10–12 оборотов/мин).



Образование первичной суспензии растительных клеток можно считать результатом трех процессов: 1) распада каллусной ткани на клетки и небольшие клеточные агрегаты в момент внесения в жидкую питательную среду; 2) отделения клеток и клеточных агрегатов с поверхности кусочков ткани в течение первых субкультивирований; 3) деления и роста клеток, образовавшихся по первым двум способам, и распада разрастающихся клеточных агрегатов на более мелкие агрегаты и клетки. Последний процесс является типичным для роста стабилизированной перевиваемой культуры клеток высших растений.

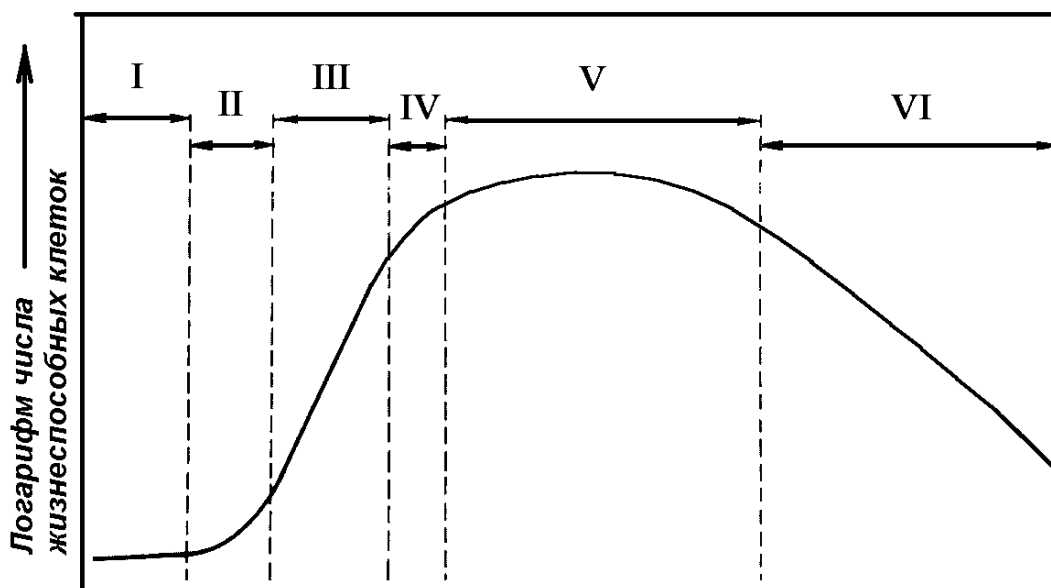
Первичную суспензию перед субкультивированием либо в специальном цилиндре разделяют на фракции по скорости седиментации (используют верхнюю фракцию), либо фильтруют через 1–2 слоя марли, нейлоновые или металлические сита, чтобы избавиться от крупных плотных кусков каллусной ткани, остатков экспланта и очень крупных агрегатов.

Фильтрация рекомендуется и в нескольких последующих субкультивированиях до приобретения клеточной суспензией желательных характеристик. Однако агрегированность суспензии зависит не только от характеристик начальной линии, но и от условий культивирования.

Для глубинного культивирования растительных клеток применяют способы, разработанные для микробиологических целей. Используют закрытые или открытые системы в периодическом или проточном режимах. Хотя при глубинном выращивании растительных клеток принцип турбидостата практически не применяется. Одной из причин этого является разрушения части клеток при отводе их к оптическому прибору. Выращивание суспензии клеток растений в установках непрерывного культивирования по принципу хемостата применяется как для изучения метаболизма клеток, стабильно поддерживающихся в разных фазах клеточного цикла, так и при промышленном выращивании клеточной биомассы с целью получения экономически важных продуктов.

Однако до настоящего времени наиболее изученным и распространенным режимом глубинного культивирования клеточных суспензий является закрытая периодическая система. В этом случае для аэрации и перемешивания суспензии используют роллеры, качалки (обычно круговые), ферментеры с механическими и магнитными мешалками или ферментеры барботажного типа, где аэрация и перемешивание осуществляется воздушным потоком.

Критериями роста в цикле выращивания служит увеличение числа клеток, их сырой и сухой массы. Модельная ростовая кривая имеет типичную S-образную форму (рис. 6). На ней различают:



*Рис. 6.* Фазы кривой роста популяции растительных клеток:  
 I – лаг-фаза; II – экспоненциальная фаза; III – фаза линейного роста;  
 IV – фаза замедленного роста; V – стационарная фаза; VI – фаза отмирания

1) латентную (лаг) фазу, в которой видимый рост инокулята не наблюдается ни по одному из критериев. При этом наблюдается высокая интенсивность дыхания, максимальные значения энергетического уровня, интенсивный синтез ДНК, РНК, белков и других компонентов клетки, но низкий митотический уровень. Длительность периода адаптации зависит от количества и физиологического состояния инокулята и условий культивирования;

2) экспоненциальную фазу, характеризующуюся ростом с максимальной скоростью, максимальными величинами митотической активности, а также преобладанием мелких клеток меристематического типа;

3) линейную, в течение которой скорость роста постоянна;

4) фазу замедленного роста, связанного с субстратным лимитированием и ингибированием продуктами обмена, характеризующуюся несбалансированным ростом популяции по основным критериям, снижением уровня дыхания, переходом части клеток в дифференцированное состояние, увеличением доли крупных вакуолизированных клеток, увеличением синтеза вторичных метаболитов (сердечных гликозидов, антрахинона, диосгенина);

5) стационарную фазу, характеризующуюся еще малой скоростью деградации клеток, которая уравнивается делением клеток, высокими биосинтетическими и биотрансформирующими потенциями жизнеспособных дифференцированных клеток, низким уровнем дыхания и появлением чрезвычайно крупных вакуолизированных клеток;

6) фазу деградации клеток с удельной скоростью роста, принимающей отрицательное значение.

Форма реальных ростовых кривых может значительно отличаться продолжительностью фаз от модельной. Процессы ростового цикла зависят от вида растения, количества внесенного материала и условий культивирования (состав питательной среды, температура, начальное значение рН, состав газовой фазы, скорость перемешивания). Первичный и вторичный метаболизм культивируемых клеток растений видоспецифичен, зависит от типа дифференцировки исходных клеток растения и регулируется условиями выращивания. Генетическая изменчивость клеток как следствие их культивирования вне организма, исчезновение одних и появление других стойких признаков, передающихся в ряду клеточных поколений, приводит к возникновению из первичной каллусной ткани генетически и фенотипически различающихся линий клеток. Это позволяет отобрать или создать экспериментально линии, сохраняющие биосинтетические системы, характерные для исходного растения, и линии, синтезирующие принципиально новые вещества.

### **Культивирование отдельных клеток**

Источником отдельных (одиночных) клеток являются клеточные суспензии в жидкой питательной среде, мацерация тканей растений, изолированные протопласты после восстановления ими клеточной стенки. Причем изолированные протопласты являются идеальными отдельными клетками.

Культивирование отдельных клеток позволяет получать клоны и исследовать генетическую и физиологическую стабильность или изменчивость при выращивании клонового материала. Отдельные клетки важны для клоновой селекции мутантных, гибридных, трансформированных линий. Обычно в эти клетки вводят маркерные гены или создают маркерные признаки для обеспечения селективных условий отбора.

Мацерированные клетки ткани растения являются хорошей моделью для сравнительного изучения физиологических процессов в ткани и отдельной клетке. Вместе с тем при культивировании этих клеток на среде, стимулирующей деление клеток, они дифференцируются и образуют колонии каллусных клеток. Для получения отдельных мацерированных клеток используют специальные мацерирующие ферментативные препараты, содержащие мацеразу (полигалактуроназу), пектиназу, поливинилпирролидон, сульфат калия, сорбит (маннит), 2-N-морфолиноэтансульфоновую кислоту. Данная процедура производится в ламинар-боксе в условиях строгой стерильности.

Отдельные клетки также могут быть получены из суспензий с использованием микроманипулятора, проточного цитофлюориметра или путем последовательных разбавлений. В этом случае суспензии готовятся разными способами: 1) 1–2 мл суспензии отбирают из супернатанта после оседания основной массы клеток; 2) суспензию фильтруют через фильтры с уменьшающимся диаметром пор. Для последовательных разведений используют платы для микротитрований, что позволяет микроскопически контролировать клеточный состав при последовательных разведениях.

Индукция делений отдельных клеток возможна при применении очень богатой питательной среды, причем объем среды должен быть минимальным. Однако даже при соблюдении всех этих условий процент разделившихся клеток остается очень низким. Более эффективны методы «кормящего слоя» или «ткани-няньки». Для создания «кормящего слоя» берут суспензию клеток того же вида растения. Клеточная суспензия должна находиться в ранней стадии ростового цикла. Каллусная культура, служащая «тканью-нянькой», также должна быть в стадии активного роста. При достижении колонией, выросшей из отдельной клетки, размера 0,5–1 мм, она может быть перенесена для дальнейшего выращивания на агаризованную питательную среду непосредственно либо на фильтр, помещенный на поверхность питательного агара. Использование «кормящего слоя», «ткани-няньки» или минимального объема среды, в которую помещается отдельная клетка, связано с явлением, называемым «действие фактора кондиционирования». Несмотря на многочисленные попытки определить природу веществ, индуцирующих деление отдельной клетки, и механизм действия фактора кондиционирования, данный вопрос окончательно не решен.

Изучение механизма взаимодействия клеток при размножении их в популяции – важная научная проблема, которая решается на уровне культивирования отдельных клеток.

## **Протопласты растительных клеток**

### **Способы выделения растительных протопластов**

Протопласты растений – это ограниченные мембраной цитоплазматические образования, несущие внутриклеточные органоиды, характеризующиеся структурной целостностью и способностью осуществлять активный метаболизм и выполнять биосинтезы и трансформацию энергии. Термин был использован Д. Ханстеином в 1880 г. для обозначения морфологически обособленных образований при плазмолизе. Впервые выделение растительных протопластов было осуществлено в 1892 г. Дж. Клеркером.

Наиболее простыми, но длительными и трудоемкими методами получения растительных протопластов являются механические. При этом фрагмент растительной ткани вносят в 0,1 М раствор сахарозы, более концентрированный, чем вакуолярный сок, выдерживают определенное время до тех пор, пока протопласты не сожмутся и не отойдут от клеточных стенок, а затем аккуратно рассекают эпидермис, и протопласты выходят в среду. Однако при применении даже модифицированных механических методов можно получить только ограниченное число протопластов и в этом случае использовать только те ткани, в которых возможен экстенсивный плазмолиз (получить протопласты из меристемы или зрелой ткани очень сложно).

Принципиально отличный метод получения изолированных протопластов – энзиматический. В этом случае для удаления клеточной стенки используются ферменты. Изолирование протопластов из клеток высших растений с использованием ферментов впервые было успешно осуществлено Е. Кокингем в 1960 г. Он удачно применил ферментный препарат из культуральной жидкости гриба *Myrothecium verrucaria* для получения больших количеств изолированных протопластов из кончиков корней томатов.

В сравнении с механическим методом ферментативное выделение протопластов имеет определенные преимущества: 1) одновременно можно получить большое количество протопластов; 2) протопласты не подвергаются сильному осмотическому сжатию; 3) клетки более интактны и не повреждены; 4) метод сравнительно быстрый.

Для удаления клеточной стенки используются ферментные препараты трех типов: целлюлазы, гемицеллюлазы и пектиназы – чаще всего грибного или бактериального происхождения. Выбор ферментной системы производится на основании знаний об особенностях растительных тканей. В результате обработки тканей ферментными препаратами образуется смесь, содержащая протопласты, обломки разрушенных клеток и целые клетки. Чтобы отделить протопласты от примесей, суспензию фильтруют через нейлоновые фильтры, а затем подвергают центрифугированию в мягких условиях.

Источником клеток для получения протопластов помимо фрагментов растительных тканей являются также клеточные суспензии и каллусные культуры. Схема общей процедуры изоляции протопластов та же, однако в этом случае нет необходимости в стерилизации исходного материала (рис. 7).

Выделение протопластов достаточно легко выполнимая и технически хорошо отработанная процедура, однако сложно получить жизнеспособные протопласты и также непросто их в дальнейшем культивировать. Успех процесса зависит от многих факторов – состава ферментов, их качества, рН среды, выбора осмотического раствора. Большое значение при этом имеет состояние растительного материала, а именно, его видовая, генетическая, энергетическая и физиологическая характеристики, а также применяемые методы получения и культивирования протопластов.

Для стабильного получения большого количества протопластов важны стандартные условия выращивания исходных растений или клеток, определение оптимального для выделения протопластов возраста растения или органа, температуры, освещения, питания.

Для получения протопластов из суспензионных клеточных культур наилучшей является поздняя логарифмическая фаза роста, когда клеточные стенки лучше всего поддаются ферментативному разрушению, а протопласты наиболее жизнеспособны.

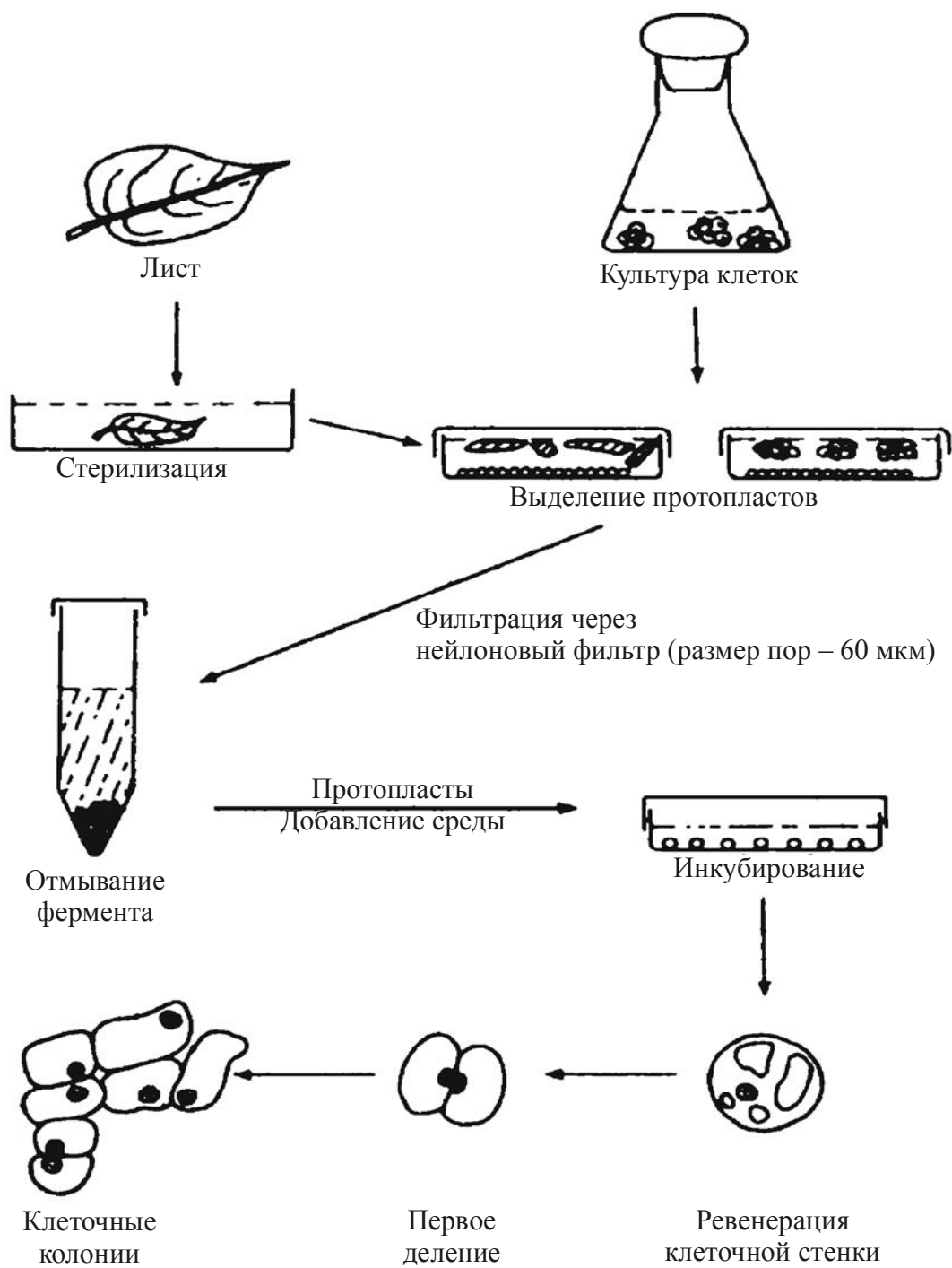


Рис. 7. Схема общей процедуры получения растительных протопластов

## Культивирование растительных протопластов

Для культивирования протопластов можно использовать *метод жидких капель* (К. Као и др., 1971). В этом случае суспензия протопластов в виде капель в жидкой среде помещается в пластиковые чашки Петри. Метод обеспечивает хороший газообмен через воздушную фазу и диффузию в раствор экскретируемых продуктов. Кроме того, легко можно добавлять свежий раствор в нужной концентрации. Однако при культивировании этим способом протопласты агрегируются в центре каждой капли. Накапливаясь, они образуют значительное количество фенольных или других токсических соединений, что препятствует дальнейшему успешному культивированию. Этот метод также неудобен, если требуется исследовать развитие индивидуальной колонии протопластов.

Другой широко распространенный метод – *агаровая культура* (Т. Нагата, И. Такебе, 1971). В этом случае определенный объем суспензии протопластов в жидкой питательной среде наливают в пластиковые чашки Петри, добавляют равный объем той же самой среды, содержащей 1 % агар-агара. Температура не должна превышать 45° С. Чашки заклеивают парафиллюмом и культивируют при температуре около 28° С. Протопласты фиксированы в одном положении и физически отдалены один от другого. Этот метод имеет важное преимущество: можно наблюдать для одного конкретного протопласта все этапы его развития – формирование клеточной стенки, деление клеток, рост и развитие растения. Недостаток этого метода заключается в том, что возможно некоторое повреждение протопластов при смешивании с теплым агар-агаром.

Одним из вариантов данной методики является использование «кормящих» протопластов или клеток, подвергнутых воздействию рентгеновского или гамма-излучения (доза облучения выбирается такой, чтобы клетки утратили способность к клеточному делению, но поддерживали и стимулировали рост других клеток). Они смешиваются с жизнеспособными протопластами и платируются. Этот метод позволяет культивировать суспензию протопластов более низкой концентрации, чем та, что обычно необходима для их роста.

Сходным с этим методом является *метод совместных культур*. Он используется для эффективного культивирования труднокультивируемых протопластов. Такие протопласты культивируются совместно с протопластами, отличающимися быстрым ростом. Успех такого культивирования основан на активных веществах, которые выделяются быстро растущими видами.



Удобным вариантом метода жидких капель является *культивирование в малом объеме* (до 1 мкл) единичных протопластов (микроизоляция). В микрокаплях, даже если в них находится только одна клетка, соотношение объема клетки к объему питательной среды такое же, как в культуре плотностью около 1000 клеток/мл.

По питательным потребностям изолированные протопласты сходны с целыми клетками. Поэтому питательные среды подобны таковым для клеточных культур. Наиболее часто используют среды Мурасиге – Скуга, модифицированную среду Нагата – Такебе, среду В5 Гамборга – Эвелейта, и среду 8Р Као – Мичайлук, представляющую собой обогащенную витаминами, аминокислотами и сахарами среду В5 Гамборга. Все эти среды содержат минеральные вещества, являющиеся источниками макро- и микроэлементов, источники углерода, стабилизаторы осмотического давления, витамины, фитогормоны.

Поскольку центральная проблема при культивировании растительных объектов на искусственных питательных средах – создание определенной буферной емкости смеси, то обычно используют сопряженные пары солей, в которые объединяют химически и физиологически кислые и щелочные соли. К основным сопряженным парам относятся соли, содержащие азот и фосфор. Среда содержит железо в хелатной форме и сахарозу как источник углерода.

Рекомендуется добавлять в среду сахара, входящие в состав клеточной стенки, а также ксилозу, рибозу и другие. Это стимулирует образование клеточной стенки. Состав этих добавок может быть очень специфичным в зависимости от видовых особенностей протопластов. Для индукции деления протопластов многих видов растений эффективно добавлять в среду ауксины – 2,4-Д, НУК, БАП, а также цитокинины – кинетин, зеатин, бензиладенин.

Температура культивирования является в значительной степени видоспецифичной и варьирует в достаточно широких пределах. При культивировании растительных протопластов температурный режим должен строго выдерживаться, т. к. обычно протопласты чувствительны даже к незначительным отклонениям от оптимальной температуры. То же касается и интенсивности освещенности. Оптимальные значения освещенности могут варьировать от абсолютной темноты до яркого света.

Существенным фактором культивирования является плотность засева протопластов. При очень низкой плотности протопласты часто не делятся, в то время как при очень высокой плотности возникают затруднения на поздних этапах культивирования из-за появления в ростовой среде

токсичных продуктов обмена. Оптимальная плотность протопластов в культуре составляет  $10^3$ – $10^5$  кл/мл.

Таким образом, используя разнообразные методы, учитывая характерные особенности исходного материала и соблюдая все условия, можно успешно осуществить культивирование растительных протопластов, добиваясь в отдельных случаях получения целого растения из единичных протопластов.

Детальная разработка техники культивирования растительных клеток, получения и культивирования растительных протопластов послужила основой для создания методов биологического конструирования растений с заданными свойствами.

### **1.3. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ЖИВОТНЫХ КЛЕТОК**

Первые опыты по культуре животных тканей были проведены немецким биологом В. Ру, которому удалось в 1885 г. в течение нескольких дней поддерживать развитие нервной пластинки куриного эмбриона в теплом солевом растворе. Однако лишь предложенная американским биологом Р. Гаррисоном в 1907 г. воспроизводимая техника послужила основой для дальнейшего развития метода культивирования животных клеток вне организма. Культивируя в сгустках лимфы небольшие кусочки нервной трубки эмбриона лягушки, Гаррисон через несколько недель наблюдал образование нервных волокон. Французский хирург и патофизиолог А. Каррель, сумевший в течение 34 лет сохранять у штамма клеток сердца куриного эмбриона способность к активным делениям, доказал таким образом, что животные клетки могут неограниченно долго расти в культуре *in vitro*.

Культивирование клеток и тканей животных к настоящему времени получило широкое распространение в различных областях исследований – от клеточной и молекулярной биологии до быстро прогрессирующих прикладных областей биотехнологии. Культуру животных тканей применяют для изучения механизмов роста и дифференцировки клеток, гистогенеза, межтканевых и межклеточных взаимодействий, обмена веществ и т. п. Культуры животных клеток являются важными продуцентами многих биологически важных веществ. На них выращивают вирусы для их идентификации и получения вакцин. Клеточные культуры часто применяют при тестировании и изучении механизма действия лекарственных и косметических средств, пестицидов, консервантов и т. п. Мето-

ды культуры клеток нашли широкое применение для реконструкции различных тканей и органов. Так, культура клеток кожи используется для заместительной терапии при ожогах, культура клеток эндотелия – для реконструкции стенок сосудов. Способность клеток к росту в культуре привела к развитию методов клонирования, хранения и слияния клеток, что, в свою очередь, вызвало становление новой области науки – генетики соматических клеток. Органные культуры используют при изучении закономерностей развития органов, для изучения способов сохранения жизнеспособности изолированных органов, предназначенных для трансплантации.

В настоящее время практически любые клетки человека и животных могут быть введены в культуру и тем самым служить средством и объектом во многих медико-биологических исследованиях.

Наиболее часто культивируются следующие элементы:

- соединительной ткани – фибробласты;
- скелетной – кость и хрящи;
- мышечной – скелетные, сердечные и гладкие мышцы;
- эпителиальной – печень, легкие, кожа, мочевого пузыря, почки, молочная железа;
- нервной – глиальные клетки и нейроны (хотя они лишены способности к пролиферации);
- эндокринной системы – гипофиз, надпочечники, клетки островков Лангерганса;
- различные типы опухолевых клеток.

## Культуральные системы животных клеток

Различают 3 основных типа культур животных клеток: **первичные культуры**, получаемые практически из любого органа и существующие лишь до первого пересева; **диплоидные культуры**, чаще получаемые из эмбриональных тканей и сохраняющие диплоидный набор хромосом до 50 пересевов, которые затем трансформируются в **постоянные** (перевиваемые) гетероплоидные **культуры**, существующие вне организма десятки лет.

Кроме того, культуры тканей могут подразделяться *по виду животного*, от которого они происходят; *по типу ткани-источника*; *по состоянию ткани на момент извлечения* (нормальные, опухолевые), *по способу выращивания* (монослойные, суспензионные, на микроносителях и т. п.).

Главным фактором при выборе ткани или линии клеток для дальнейшего исследования является природа процесса, который будет изучаться на этих клетках.

Как правило, культуры, полученные из эмбриональных тканей, характеризуются лучшей выживаемостью и более активным ростом по сравнению с культурами из соответствующих взрослых тканей, но несмотря на ряд практических преимуществ, необходимо помнить, что эти клетки по некоторым параметрам отличаются от взрослых клеток.

Нормальные ткани, как правило, дают начало культурам с ограниченным временем жизни, тогда как культуры клеток, полученные из опухолей, способны пролиферировать неограниченно долгое время.

### **Первичные культуры**

Клетки, полученные от животного, и поддерживаемые в культуре, называют первичными до тех пор, пока они не будут пассированы (субкультивированы), т. е. до первого пересева. Клетки первичной культуры обычно гетерогенны и характеризуются малым пролиферативным пулом, но в них наиболее полно представлены типы клеток той ткани, откуда они были получены и четко обнаруживается экспрессия ряда свойств, присущих данной ткани. Однако первичная культура лишена многих клеток, присутствующих в исходной ткани, поскольку не все клетки способны прикрепиться к субстрату и выжить в условиях *in vitro*.

Первичные культуры клеток получают путем стерильного удаления фрагмента ткани и его механической или ферментативной (0,01–0,05–0,25 % трипсин, 200–2000 ед./мл коллагеназа) дезагрегации. В случае механической дезагрегации фрагмент ткани измельчают до кусочков размером около 1 мм, которые прикрепляются к субстрату благодаря собственной адгезивности, поверхности субстрата или сгустку плазмы. Ферментативная дезагрегация дает более высокий выход клеток, хотя метод является селективным, поскольку не все клетки переживают диссоциацию. На практике наиболее успешное получение первичных клеток из многих тканей связано с использованием коллагеназы, приводящим к снижению размера экспланта до небольшого кластера клеток, который прикрепляется к субстрату и распластывается.

Культуры первичных клеток легко получить из многих тканей. Какое-то время эти клетки экспоненциально размножаются, но затем примерно через 6 месяцев скорость роста культуры снижается, а через 10 месяцев клетки деградируют и погибают. Это наблюдается примерно после 20–50 генераций (в зависимости от возраста тканей-источников пер-

вичных клеток: из эмбриональной – 50, из взрослой – 20). На ранних стадиях клетки остаются эуплоидными, т. е. обладают правильным диплоидным набором хромосом, а позднее они становятся анеуплоидными. В некоторых случаях отдельные анеуплоидные клетки выживают и продолжают размножаться, что приводит к установлению клеточного штамма. Частоту таких трансформаций можно увеличить, обработав клетки мутагенами или некоторыми вирусами.

При успешном установлении культуры первичные клетки начинают размножаться и их необходимо периодически пересевать (субкультивировать). Субкультивирование обеспечивает возможность продления существования культуры (получение линии клеток), клонирования, исследования и сохранения клеток, а также получения более однородных популяций. Главным преимуществом получения клеточных линий из первичных культур является наработка большого количества стабильного материала, пригодного для продолжительного использования.

### **Постоянные культуры**

После нескольких пересевов линия клеток либо гибнет (ограниченная линия клеток), либо трансформируется и становится постоянной клеточной линией. Различия в свойствах этих клеток и большой период времени, предшествующий их появлению (иногда несколько месяцев), позволяет предположить мутационную природу появления клеток постоянной культуры (стволовые клетки). Нельзя исключить и возможность существования «бессмертных» клеток, особенно в культурах, полученных из опухолей.

Появление постоянной линии клеток констатируется по морфологическим изменениям (уменьшение размера клеток, снижение их адгезивности, округление, увеличение ядерно-цитоплазматического соотношения), по увеличению скорости роста (время удвоения клеток снижается в 1,5–3 раза), по снижению зависимости от сыворотки и возможности поддержания в более простых средах, по снижению зависимости от субстрата и, следовательно, их способности к росту в суспензии; по увеличению гетероплоидности и анеуплоидности, а также по увеличению опухоленности. Однако нормальные клетки, спонтанно трансформируясь в постоянную линию, не становятся при этом злокачественными (несмотря на некоторые черты сходства).

Таким образом, постоянные клеточные линии имеют определенные преимущества: высокая скорость роста, возможность достижения более высокой плотности и, следовательно, более высокого выхода биомассы;

возможность использования более дешевых сред; способность к суспензионному росту. Но также они имеют и недостатки – повышенная хромосомная нестабильность, отклонение от фенотипа донора, утрата специфических маркеров.

Необходимо отметить, что в литературе имеются разногласия по поводу употребления терминов «линия клеток» и «штамм клеток», в связи с чем многие авторы рассматривают их как взаимозаменяемые. Другие исследователи определяют штамм клеток как популяцию клеток, полученную из первичной культуры путем пересева, а под линией клеток понимают клеточную популяцию, полученную из первичной культуры и выращиваемую неопределенно долгое время *in vitro*.

## Типы культуральных систем

**Непроточные культуры.** Обычный тип культур, в котором клетки вводят в фиксированный объем среды. Эти системы пригодны для культивирования клеток как в монослое, так и в суспензии. По мере роста клеток в среде культивирования происходит использование питательных веществ и накопление метаболитов – следовательно, среда должна постоянно меняться, что, в свою очередь, приводит к изменению клеточного метаболизма (физиологической дифференцировке). Системы непроточных культур характеризуются в той или иной степени накоплением отходов и непостоянством внешних условий.

Способы увеличения продолжительности жизни культур:

а) *прерывистый* – часть культуры заменяется равным объемом свежей среды;

б) *постоянный* – объем культуры постоянно увеличивается с низкой скоростью, а небольшие порции клеток периодически удаляются;

в) *перфузионный* – постоянное поступление свежей среды в культуру и одновременное удаление равного объема использованной бесклеточной среды.

**Проточные культуры.** Проточные культуры обеспечивают истинные гомеостатические условия без изменения концентрации питательных веществ и метаболитов, а также числа клеток. Это единственная система, в которой все клетки гомогенны и сохраняют гомогенность в течение длительно периода, что имеет очень важное значение в физиологических исследованиях. Однако использование таких культур для получения клеточных продуктов невыгодно с экономической точки зрения. Системы пригодны для суспензионных культур и монослойных культур на микроносителях.

## Монослойные культуры

**Требования к поверхности субстрата.** Большинство нетрансформированных клеток млекопитающих могут расти только в виде монослоя, будучи прикрепленными к субстрату: к другим клеткам либо к стеклу (алюмоборосиликатное стекло, чаще модифицированное), пластику (полистирол, полиэтилен, поликарбонат, поливинилхлорид, тефлон, целлофан и другие при условии правильной обработки этих полимеров – пластиковая поверхность должна быть специально обработана, чтобы клетки могли к ней прикрепиться, причем клетки эукариот не прикрепляются к пластиковым чашкам, предназначенным для бактериальных культур) или металлу (качественная нержавеющая сталь или титан).

Поверхности клеток животных и поверхности традиционных культуральных сосудов из стекла и пластика, обладающие высокой поверхностной энергией, несут отрицательные заряды. Поэтому для прикрепления клеток необходимо образование поперечных сшивок с гликопротеинами (наиболее изученным является фибронектин, присутствующий в сыворотке и других физиологических жидкостях), а также присутствие двухвалентных катионов кальция и магния. Суммарный отрицательный заряд поверхности субстрата (например, за счет образования отрицательно заряженных карбоксильных групп) может достигаться предварительным воздействием химическими (окисляющие агенты) и физическими факторами (высоковольтный разряд, облучение УФ), что облегчает электростатическое прикрепление клеток. Поверхность культурального сосуда может быть также покрыта веществом, облегчающим прикрепление клеток. К природным субстратам, на которых растут клетки, относятся коллаген и желатин. Для этих целей используют коммерческие препараты коллагена для культуры тканей (например, «Витроген 100»), что позволяет избежать утомительной процедуры получения коллагена из крысиных хвостов.

**Культуральная посуда.** Монослойное культивирование осуществляют во флаконах (флаконы Ру – самые большие стационарные флаконы поверхностью до 200 см<sup>2</sup>) или пробирках для культуры тканей, обеспечивающих поверхность роста 5–200 см<sup>2</sup>.

**Рост клеток в монослое.** В случае монослойных культур необходимо проводить систематические пассажи клеток, используя для этого культуры предыдущего посева или музейные клетки, сохранившиеся в условиях консервации. Полноценная популяция может быть получена только от генерации, состоящей из жизнеспособных клеток. Поэтому просмотр и оценка качества монослоя имеют решающее значение при выборе культур для посева.

Первичные клетки, которые делятся в культуре, могут претерпевать так называемое *контактное торможение* движения. Когда две клетки приближаются друг к другу, то в зоне контакта прекращаются специфические движения клеточной мембраны. Первичные клетки, следовательно, не могут расти друг над другом, и в большинстве случаев достижение полного монослоя сопровождается прекращением клеточных делений. Этот феномен характерен не только для первичных клеток, но наблюдается также во многих клеточных линиях. Нетрансформированные клетки могут в течение некоторого времени сохранять жизнеспособность в таком покоящемся состоянии, но если их не пересеять, они погибают. Из сыворотки было выделено несколько факторов, обладающих способностью снимать контактное торможение.

Снижение распластывания клеток при достижении полного монослоя, а также ошаривание и прекращение роста клеток при их откреплении от подложки легли в основу представлений о тесной связи распластывания нетрансформированных клеток по мере их роста.

Ослабленным контактным торможением характеризуются клетки, трансформированные вирусами, и такие клетки могут достигать более высокой конечной плотности. Считается, что эти клетки утрачивают зависящую от плотности регуляцию. Трансформированные клетки способны расти вплоть до полного истощения среды, и если после этого не наступает смена среды, то клетки быстро погибают.

Одним из факторов, лимитирующим рост клеток, является истощение в среде необходимых питательных компонентов. Следовательно, для получения высокой плотности клеток необходима периодическая замена питательной среды, а это может приводить к постоянному изменению состава среды, омывающей клетки, что весьма нежелательно.

Процесс подготовки клеточного монослоя к отделению от стекла и формированию суспензии (обработка клеток в монослое 0,02 % раствором химопсина в фосфатно-солевом буфере или 0,1 % трипсином и 0,01 % ЭДТА) происходит при комнатной температуре в течение 5–10 мин в зависимости от типа культуры и ее индивидуального состояния. Как только клеточный монослой достаточно разрыхляется и начинает отделяться от стекла, раствор фермента сливают, а в культуральную посуду заливают определенное количество ростовой среды. Этой средой тщательно смывают клетки со стенки сосуда и легким пипетированием способствуют образованию гомогенной взвеси. Полученную взвесь после подсчета числа клеток разводят ростовой средой до посевной дозы и используют при новых посевах.



Монослойные культуры имеют ряд преимуществ, являющихся предпосылками их широкого использования:

1) выделение секретируемого продукта многими клетками осуществляется эффективнее в случае их прикрепления к субстрату;

2) возможность быстрой и легкой замены питательной среды, сопоставления времени и количества среды с периодом роста клеток или временем наработки продукта;

3) обеспечение наибольшей гибкости исследований, поскольку в монослой могут быть введены любые типы клеток;

4) достижение искусственно высокой плотности клеток с использованием перфузионной техники;

5) возможность использования одной и той же аппаратуры с разным отношением клетки-среда, легко изменяемым в ходе эксперимента.

Однако при использовании монослойных культур выявляются и недостатки:

1) сложность масштабирования;

2) отсутствие информативности визуального анализа;

3) трудности с определением и поддержанием таких параметров, как кислотность и содержание  $O_2$ , и обеспечением гомогенности культуры клеток;

4) необходимость значительных пространств.

## **Суспензионные культуры**

Для наращивания клеточной массы удобнее использовать не монослойные, а суспензионные культуры. Как правило, клетки, отделившиеся от субстрата, на котором они росли, неспособны к росту в суспензии и быстро деградируют. Но если некоторые клетки культивировать во вращающемся флаконе (2 об/мин), не дающем возможности прикрепления клеток к поверхности, в среде, содержащей метилцеллюлозу, предотвращающую агрегацию клеток, можно получить жизнеспособные суспензионные клеточные штаммы. Иногда этого бывает достаточно для получения суспензионной культуры, но обычно требуются специальные сосуды для культивирования суспензий и использование среды с дефицитом ионов кальция и магния.

Суспензионные культуры также можно получать путем обработки отобранной для пересева монослойной клеточной культуры 0,02 % раствором химопсина в фосфатно-солевом буфере или 0,1 % трипсином и 0,01 % ЭДТА с последующим длительным периодом адаптации, сопро-

вождающимся различными манипуляциями, предотвращающими возврат к монослою.

Суспензионные культуры лучше растут внутри ограниченного диапазона концентраций клеток и в том случае, когда сосуд наполнен средой наполовину. Для обеспечения этих условий необходимо каждый день или (в случае медленно растущих культур) через день, удалять половину суспензии через боковое горлышко и добавлять равный объем свежей среды.

Некоторые клетки (трансформированные и кроветворные клетки, асцитные опухоли) способны расти как на субстрате, так и в суспензии в зависимости от солевого состава среды культивирования.

Культуры лимфоцитов не обнаруживают тенденции к адгезии к поверхности стекла или пластика и выживают на дне культивационного сосуда под тонким слоем среды.

Суспензионное культивирование первичных и перевиваемых клеточных линий проводят в роллерных установках, где создаются благоприятные для клеток условия постоянного перемешивания жидкой и газовой фаз, общий объем среды при этом снижается вдвое по сравнению со стационарными условиями.

Суспензионное культивирование клеток также можно проводить в ферментерах, предназначенных для суспензионного культивирования микроорганизмов, в которых постоянное перемешивание клеток в среде осуществляется магнитными или механическими мешалками в колбах с высокой скоростью вращения, препятствующей прикреплению клеток к стенкам сосудов.

Суспензионное культивирование дает, по меньшей мере, 2–3-кратную экономию питательных сред, по сравнению с общепринятым стационарным монослойным культивированием при полном исключении дорогостоящих протеолитических ферментов и буферных растворов. Кроме того, суспензионные культуры представляются предпочтительными с точки зрения получения больших количеств биомассы.

## **Монослойное культивирование на микроносителях**

Сочетать положительные стороны монослойного и суспензионного культивирования позволяет использование системы с микроносителями. Микроносители – мелкие твердые частицы (поддерживаемые в суспензии благодаря перемешиванию), на поверхности которых клетки растут в виде монослоя. Использование микроносителей дает клеткам, обладающим адгезивными свойствами, все преимущества крупномасштабных суспензионных культур.

Микроносители должны быть нетоксичными, не сорбировать компоненты питательных сред и продукты метаболизма клеток, а также иметь поверхностный заряд или обменную емкость, достаточную для прикрепления клеток. Коммерческие микроносители имеют диаметр 100–200 мкм и подразделяются на 6 основных групп:

- 1) декстрановые микроносители, поперечно сшитые, типа Cytodex 1;
- 2) декстрановые микроносители типа Cytodex 2;
- 3) микроносители, покрытые коллагеном или желатином, типа Cytodex 3;
- 4) полистироновые микроносители типа Biosilon, Cytospheres;
- 5) стеклянные микроносители типа Bioglass;
- 6) целлюлозные микроносители типа ДЕ-53.

Используемые в настоящее время микроносители на основе микропористого желатина или пористого боросиликатного стекла имеют емкость около 3000 клеток/микроноситель.

### **Питательные среды**

Оптимизация состава питательных сред для культур животных клеток развивалась в двух направлениях – разработка сред, требующих внесения природных добавок (сыворотки, эмбриональные экстракты и др.), и создание сред химически определенного состава.

В настоящее время наиболее широко применяются среды, содержащие источники энергии (углеводы) и азота; незаменимые аминокислоты; витамины; неорганические соли – источники макро- и микроэлементов, включая селенит; нуклеозиды; жиры и жирорастворимые компоненты; гормоны (инсулин, трансферрин, глюкокортикоиды, эстроген, андроген, тироксин, трийодтиронин); ростовые факторы (фактор роста, синтезируемый тромбоцитами, фактор роста фибробластов, фактор роста эпидермиса), а также сыворотку (до 10 %) и в ряде случаев некоторые другие добавки (бактопептон, триптозофосфат и т. п.).

В 40–50-е гг. прошлого века большая часть клеток выращивалась в плазме или на фибриногеновом сгустке в присутствии тканевых экстрактов или их ультрафильтратов. Начиная со среды 199, предложенной Г. Моргоном в 1950 г. и содержащей более 60 синтетических ингредиентов, широко осуществляется подбор состава и методов приготовления различных питательных сред. В своей классической работе в 1955 г. Х. Игл исследовал потребности клеточных линий мышей L и HeLa в питательных веществах. Это злокачественные клетки, характеризующиеся различным кариотипом и сходные по своей морфологии с клетками

плоского эпителия. Х. Игл использовал среды определенного состава, содержащие смесь аминокислот, витаминов, солей и углеводов, а также небольшое количество диализированной сыворотки лошади или человека. В ходе исследований 27 факторов были определены как незаменимые для роста. Они составили основу среды, известной как «базальная среда Игла», или БСИ. Из 20 аминокислот 13 оказались незаменимыми, а остальные 6 могли быть синтезированы клетками из других источников углерода. Удаление любого из 7 витаминов приводило к развитию симптомов недостаточности. Таким образом, Х. Игл, используя метод культивирования клеток, продемонстрировал питательные потребности клеток мыши и человека. Вскоре БСИ была заменена минимальной средой Игла (МСИ), в которой концентрация различных компонентов была повышена, что обеспечивало непрерывный рост клеток в культуре в течение нескольких суток без смены среды. Указанные среды широко используются для культивирования различных клеточных линий. Сыворотка в их составе служит источником неидентифицированных факторов.

До сих пор нет общего мнения относительно роли сыворотки в клеточных культурах, как нет и общего мнения относительно физиологической роли некоторых ее компонентов. Считается, что сыворотка обеспечивает клетки гормональными факторами, стимулирующими их рост и функции, служит источником низкомолекулярных соединений, требующихся клеткам в очень малых дозах и переносимых сывороточными белками, а также обеспечивает клетки незаменимыми соединениями. В конце 1950-х гг. было показано, что  $\alpha$ -глобулиновая сывороточная фракция (фетуин) способствует прикреплению клеток к стеклу и их распластыванию, т. е. процессам, необходимым для размножения клеток. В сыворотке содержатся коллаген и фибронектин. В 70-х гг. исследователей заинтересовала роль сывороточного альбумина в культурах в связи со способностью этого белка служить переносчиком для небольших молекул гормонов, которые могут стимулировать *in vivo* или *in vitro* рост различных типов клеток.

Однако культивирование клеток в присутствии сыворотки обнаруживает ряд недостатков:

- 1) для большинства клеток сыворотка не является физиологической жидкостью, с которой они контактировали в исходной ткани;
- 2) часто недооценивается возможность цитотоксичности сыворотки;
- 3) сыворотки могут содержать недостаточное количество специфических для данного вида клеток ростовых факторов;
- 4) возможны изменения свойств сыворотки от партии к партии.

В настоящее время предпринимаются попытки создания и применения бессывороточных питательных сред, в которых сыворотка заменяет-

ся смесью гормонов (инсулин, трансферрин, глюкокортикоиды и др.) и ростовых факторов. Эти среды необходимы, если по условиям эксперимента требуется избежать присутствия чужеродного белка и из-за высокой стоимости эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота. Однако в настоящее время бессывороточная среда имеет существенные недостатки: добавление в дешевую среду гормонов и факторов роста делает ее такой же дорогой, как среда с сывороткой. Кроме того, чаще всего бессывороточные среды пригодны для ограниченного числа клеток.

Одна из проблем, возникающих при попытках получить культуры одиночных клеток или культуры клеток с низкой плотностью (100 кл\мл), заключается в том, что в этих условиях клетки погибают или растут очень медленно. В результате подробных исследований была разработана концепция «кондиционированной среды», т. е. среды, в которой концентрация метаболитов находится на таком уровне, что наступает равновесие между выходом метаболитов из клеток в среду и обратным захватом этих метаболитов клетками.

### Клеточный цикл и цикл роста

После посева клеток во флакон они входят в лаг-период продолжительностью 2–24 ч, сменяющийся периодом экспоненциального роста (логарифмическая фаза). В конце этого периода клетки достигают полного монослоя и входят в период замедленного роста или покоя (стационарная фаза), за которым следует фаза снижения количества и гибели клеток (рис. 8).

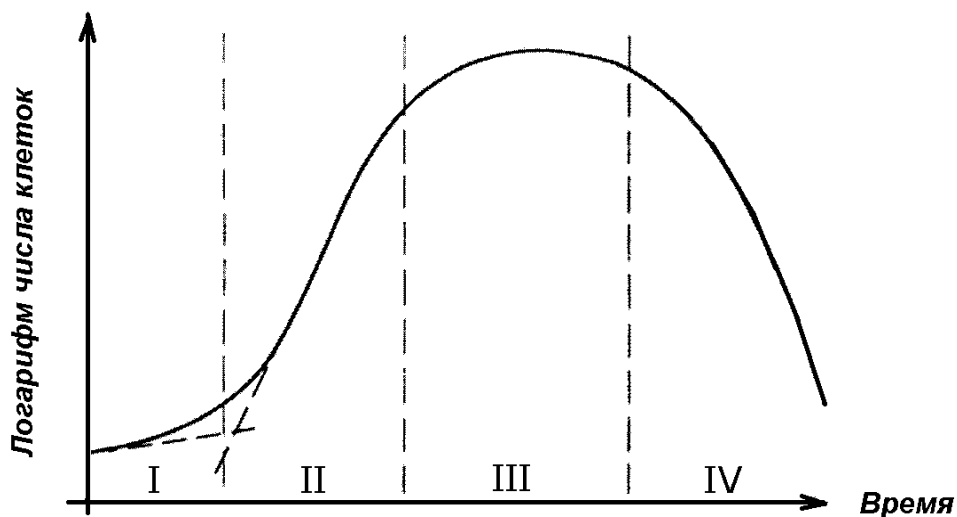


Рис. 8. Фазы роста культуры животных клеток:  
I – лаг-фаза; II – фаза логарифмического роста; III – стационарная фаза;  
IV – фаза снижения количества клеток и их гибели

Эти фазы характерны для всех клеточных линий и позволяют получить воспроизводимые характеристики: продолжительность лаг-периода, время удвоения популяции и насыщающую плотность клеток в монослое на фазе плато. Воспроизводимость данных характеристик возможна только при постоянстве условий культивирования.

Два наиболее очевидных события в растущих клетках – это деление клетки и синтез ДНК. Эти события могут служить маркерами, характеризующими клеточный цикл. Когда митоз начинается, клетка принимает форму шара и готовится к делению. На стадии метафазы клетки слабо прикреплены к субстрату, и их легко отделить встряхиванием или мягкой трипсинизацией. Это явление лежит в основе метода синхронизации путем отбора митотических клеток.

Растущие клетки регулярно делятся примерно один раз в каждые 24 часа. При отсутствии каких-либо ограничений клетки равномерно распределены по клеточному циклу, и если количество клеток удваивается через правильные промежутки времени, то говорят, что культура находится на стадии экспоненциального роста.

Обычно после короткого периода экспоненциального роста тот или иной фактор становится лимитирующим. Это может происходить в результате истощения какого-либо фактора среды или в результате того, что культивируемые клетки полностью покроют поверхность, на которой растут. Скорость роста замедляется, и количество клеток в культуре достигает насыщения (конечная плотность клеток). Когда дальнейшие деления клеток прекращаются, наступает стационарная фаза роста культуры. При восстановлении в культуре лимитирующего фактора клетки возвращаются в фазу G1 клеточного цикла, происходит цикл синтеза ДНК, после чего клетка делится. Все теории, объясняющие такой тип контроля роста, исходят из предположения, что контроль осуществляется на каком-то этапе, расположенном вскоре после деления. После прохождения этого этапа клетки включаются в клеточный цикл и делятся.

Большая часть клеток животных находится под такой формой контроля роста, что они прекращают продвижение по клеточному циклу вскоре после митоза. Следовательно, для стимуляции первичной клеточной культуры, прежде чем клетки возобновят движение по циклу к фазе деления, следует устранить ограничение роста. Клетки некоторых быстро растущих опухолей утрачивают чувствительность к контролю роста, и полученные из опухолей первичные клетки легко адаптируются к росту в культуре и могут дорасти до более высокой плотности по сравнению с клетками из нормальных тканей.

В суспензии, однако, клетки могут поддерживать экспоненциальный рост в течение долгого периода и теоретически бесконечно, если их культивировать в хемостате, где увеличение поступления питательных веществ балансируется увеличением оттока клеточной суспензии. Это приводит к постоянству окружающих условий и числа клеток. На практике, однако, этого трудно достигнуть из-за возможности бактериального заражения. Клетки в суспензии растут обычно в непроточных культурах, которые характеризуются примерно такой же кинетикой роста, как и клетки в монослое.

В культурах иногда образуются гигантские клетки – особенно в случаях роста в неоптимальных условиях, когда растущие клетки теряют способность делиться и могут увеличиваться в размере, пока не достигнут в диаметре 1 мм и более. Если число гигантских клеток в культуре растет, это указывает на плохие условия культивирования.

### **Синхронизация клеток**

При необходимости получить популяцию клеток, находящихся в одной и той же фазе клеточного роста, используются два различных принципа.

1. Можно блокировать клетки таким образом, чтобы они накапливались на специфической стадии цикла. Блокировка может быть химической или физиологической, но оба этих метода имеют тот недостаток, что клетки подвергаются неблагоприятному воздействию и в результате становятся по некоторым параметрам аномальными.

2. Можно отобрать клетки, находящиеся на определенной стадии клеточного цикла. Отбор может происходить на основании тех или иных физических свойств, например слабого прикрепления митотических клеток к субстрату или различного содержания ДНК в клетках, находящихся на разных стадиях клеточного цикла. С другой стороны, отбор можно производить на основе химических свойств, вызывая избирательную гибель остающихся клеток.

Выбор метода зависит от целей эксперимента. В ряде случаев бывает целесообразно проводить начальную стадию эксперимента на не синхронизированной экспоненциально растущей культуре и затем отбирать клетки на определенной фазе клеточного цикла.

Клетки, растущие в монослое, при делении принимают форму шара. Поэтому во время митоза они оказываются менее прочно прикрепленными к субстрату и могут быть легко отделены от него. При работе этим методом используются экспоненциально растущие клетки, и важно на

протяжении всей процедуры поддерживать постоянное значение рН и температуры.

В основе метода избирательной гибели клеток лежит гибель клеток в определенной фазе клеточного цикла, что приводит к избирательному отбору клеток, находящихся вне фазы-мишени. При экспоненциальном росте клеток и прохождении клеток по клеточному циклу увеличение периода экспозиции приводит к снижению количества выживающих клеток и ширины диапазона клеточного цикла, в котором оказываются выживающие клетки.

### **Культивирование клеток и тканей беспозвоночных**

В настоящее время известно около 150 перевиваемых линий клеток беспозвоночных, наибольшее число из которых получено от насекомых.

Среды для культивирования клеток и тканей насекомых сильно варьируют по составу. При составлении питательных сред часто руководствуются данными по составу гемолимфы, различающейся у разных видов насекомых. В настоящее время предложено более 50 вариантов питательных сред для культивирования клеток беспозвоночных. Все эти среды отличаются от сред для клеток млекопитающих наличием органических кислот, повышенным содержанием аминокислот и более высоким осмотическим давлением. Ни одна из этих сред не пригодна для получения культур клеток всех видов беспозвоночных, т. е. не является универсальной.

Для получения культур клеток насекомых часто берут эмбриональные клетки. Первичные культуры служат источником для получения длительно пересеваемых линий клеток беспозвоночных. С помощью методов первичного культивирования клеток удается исследовать дифференцировку и метаболизм клеток беспозвоночных в культуре.

После длительного периода адаптации клеток к условиям культивирования удается проводить пересев клеток. Обычно период адаптации занимает 3–10 месяцев от момента эксплантации клеток в первичную культуру. В настоящее время получен целый ряд пересеваемых линий клеток из различных тканей, взятых на разных стадиях развития беспозвоночных животных.

Культуры клеток беспозвоночных животных представляют огромный интерес для изучения молекулярных механизмов взаимодействия хозяин – паразит, роли мобильных генетических элементов в адаптации беспозвоночных к стрессовым ситуациям окружающей среды, регуляции действия генов в клетках высших организмов и клеточных механизмов дифференцировки и т. д.



## 2. СУБСТРАТЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ БИООБЪЕКТОВ

---

### Принципы составления питательных сред

Все живые клетки нуждаются в экзогенных источниках питания, содержащихся в питательных средах. Питательная среда обеспечивает жизнедеятельность, рост и развитие биообъектов.

Прежде чем начинать работы по культивированию разных типов клеток, необходимо точно знать их питательные потребности и зависимости.

Постоянным компонентом питательных сред является вода, в которой нуждаются все живые клетки. Питательные вещества образуют в воде истинные (минеральные соли, сахара, аминокислоты, карбоновые кислоты, спирты, альдегиды) или коллоидные (белки, липиды, неорганические соединения) растворы. Некоторые компоненты питательных сред, находящиеся в твердом агрегатном состоянии, могут либо образовывать придонный осадок, либо равномерно распределяться по всему объему в виде взвеси, либо плавать на поверхности раствора (частицы угля). Жидкие углеводороды при внесении в воду образуют несмешивающуюся фракцию.

В питательной среде должны присутствовать все элементы, необходимые для построения компонентов живых клеток в доступной для усвоения форме. В больших количествах клеткам необходимы макроэлементы: углерод, азот, кислород, водород, фосфор, сера, калий, кальций, магний. Снабжение клеток кислородом и водородом осуществляется за счет воды. Углерод является составной частью всех органических соединений и его источники многочисленны и многообразны: чаще всего сахара, многоатомные спирты и органические кислоты. В качестве азотистого субстрата для изготовления питательных сред служат в основном белки животного и растительного происхождения.

Помимо макроэлементов, клетки в незначительных количествах нуждаются также и в некоторых микроэлементах: натрий, марганец, никель, кобальт, хлор, цинк, медь, кремний, молибден, бор, ванадий и некоторые другие.

Кроме основных пластических и энергетических компонентов, питательные среды могут содержать и так называемые факторы роста. Это органические соединения (витамины, аминокислоты, пуриновые и пиримидиновые основания и др.), в которых нуждаются ауксотрофные клетки и

которые они синтезировать не в состоянии. Отсутствие таких веществ приводит к нарушению обменных процессов и прекращению роста клеток.

В качестве необходимых компонентов питательных сред могут выступать газы: хорошо ( $\text{NH}_3$ ,  $\text{H}_2\text{S}$ ), умеренно ( $\text{CO}_2$ ) или плохо ( $\text{N}_2$ ,  $\text{O}_2$ ,  $\text{H}_2$ ,  $\text{CH}_4$ ) растворимые в воде.

Питательные среды могут иметь неопределенный состав, т. е. включать биогенные добавки (растительного, животного или микробного происхождения), например мясной экстракт, дрожжевой экстракт, кукурузную муку, морские водоросли и т. д. Такие питательные среды называются натуральными. Применяют также среды, приготовленные из чисто химических соединений в заранее определенных соотношениях. Это так называемые синтетические среды. Применение находят и полусинтетические питательные среды, сочетающие в своем составе компоненты как натуральных, так и синтетических сред.

Среды данных типов имеют как преимущества, так и недостатки. С экономической точки зрения наиболее целесообразно использование природного, более дешевого сырья, чем веществ в чистом виде, полученных химическим путем. Однако только применение сред строго определенного состава позволяет точно регистрировать и регулировать протекающие в культуральной среде процессы, добиваясь их оптимизации. Компромиссным подходом является использование полусинтетических сред, в состав которых наряду с соединениями известной химической природы входят биогенные добавки.

Определенные типы и состав питательных сред для культивирования различных видов клеток рассмотрены в главе 1 «Культивирование клеток».

### **3. ОБОРУДОВАНИЕ, ИСПОЛЬЗУЕМОЕ ПРИ РАБОТЕ С КЛЕТОЧНЫМИ КУЛЬТУРАМИ**

---

#### **Оборудование для очистки воды**

Качество воды, используемой для приготовления питательных сред либо для мытья культуральной посуды, имеет важное значение. До недавнего времени такая вода приготавливалась путем простой и двукратной дистилляции питьевой воды. В настоящее время наряду с традиционными широкое применение получили методы очистки воды путем использования физико-химических процессов обратного осмоса, ионного обмена и мембранной фильтрации. Водопроводная вода, используемая в качестве исходной и прошедшая в этих установках через очистку обратным осмосом, поступает на фильтры из активированного угля, с них – на колонки с ионообменными смолами и затем – на мембранные фильтры с диаметром пор 0,22 мкм. При необходимости вода дополнительно подвергается воздействию мощного потока УФ облучения.

Для очистки воды подобным способом наиболее часто применяются установки типа ОВ-1, состоящие из двух конструктивно самостоятельных частей, допускающих независимое использование, – ОВ-2 и ОВ-3. Установка ОВ-2 осуществляет приготовление общелабораторной воды, превосходящей по качеству очистки дистиллированную воду. Установка ОВ-3 предназначена для получения пригодной для приготовления питательных сред сверхчистой из общелабораторной или дистиллированной воды.

#### **Приборы и аппараты для мытья и стерилизации посуды**

Приборы и аппараты для мытья и стерилизации посуды обеспечивают выполнение всех этапов технологического процесса: предварительную стерилизацию посуды, поступающей из опыта, насыщенным водяным паром в паровых стерилизаторах (автоклавах); предварительное замачивание в водных растворах химических реагентов (5 % растворе гипохлорита натрия, 3 % растворе перекиси водорода и т. д.); полоскание после замачивания холодной или слегка нагретой водой; мытье горячим раствором детергента с низким пенообразованием; вторичное полоскание горячей водой; финишное полоскание дистиллированной или общелабораторной водой; сушку в сушильных шкафах с принудительной продувкой горячим воздухом; упаковку и финишную стерилизацию в паровых или воздушных стерилизаторах.

Оптимальным вариантом для мытья посуды является использование автоматических моечных машин («Forma Scientific», «Miele», «Hotpack-Heinicke») либо отечественных машин типа РЗ-АММ).

### **Приборы для дозирования, разведения и пробоотбора**

В практике работ с клеточными культурами постоянно возникает необходимость массового дозирования, пробоотбора или разведения биологически активных жидкостей. Для этого используются автоматические или полуавтоматические устройства, называемые в различных источниках дозаторы-дилюторы, автоматические пипетки и т. п.

Одним из основных требований к такого рода приборам является отсутствие контакта между дозируемым раствором и частями конструкции дозатора. Данным требованиям отвечают полуавтоматические и автоматические шприцевые дозаторы, которые производят разведение или дозирование одновременно по двум каналам и могут работать как в автоматическом, так и полуавтоматическом режимах.

Наиболее часто применяемый автоматический шприцевой дозатор типа «Дозатрон-4» предназначен для автоматического дозирования жидкостей в иммунологические планшеты с микроюветами. Объем единичной дозы устанавливается в зависимости от целей эксперимента.

Пипетки лабораторные типа ПЛ-01, дозаторы пипеточные типа КДП-1 и П1 производят полуавтоматическое дозирование биологически активных жидкостей. Пипетки лабораторные ПЛ-01 поставляются в наборах из 3 моделей. Величина дозы задается пользователем в определенном диапазоне (2–20 мкл, 20–200 мкл, 200–1000 мкл). Комплект дозаторов пипеточных КДП-1 включает 8 моделей, каждая из которых обеспечивает выдачу 2 фиксированных по объему доз (от 5 до 1000 мкл). Комплект дозаторов П1 включает 5 моделей, настроенных на 1 фиксированную дозу (от 20 до 500 мкл). Все указанные типы устройств предполагают использование сменных наконечников, которые могут подвергаться паровой стерилизации и повторно использоваться.

Описанные выше приборы позволяют работу с жидкостями, нагретыми до 40° С и имеющими вязкость, близкую к вязкости воды. Тем самым не обеспечивается дозирование питательных сред на основе агара, которые для придания им малой вязкости должны быть нагреты до температуры не менее 60° С. В таких случаях используются приборы типа «Агар-1». Этот аппарат для разлива питательных сред, состоящий из перистальтического насоса-дозатора и разливочного механизма, обеспечи-

вает автоматическое одновременное заполнение в течение 1 мин 16 стеклянных чашек Петри диаметром 100 мм, находящихся в специальных планшетах. Стерильные условия в аппарате поддерживаются путем УФ облучения его внутреннего объема.

В экспериментах также применяются устройства малой лабораторной техники, не являющиеся по своей сути дозаторами, но способные облегчить этот процесс. Это так называемые приборы «Pipet-Aid» (фирмы «Flow», «Bellco», «Cole-Parmer» и другие), предназначенные для пробоотбора и выдачи дозы при работе с пипетками Пастера и любыми градуированными пипетками емкостью до 75 мл. Пипетка вставляется в специальный держатель, соединенный с малогабаритным вакуумным насосом, находящимся либо непосредственно в держателе, либо автономно. Управление работой прибора производится нажатием кнопок, размещенных на держателе.

### **Устройства для приготовления питательных сред**

Одним из главных требований к жидким питательным средам для клеточных культур является их стерильность, достигаемая в ряде случаев и так называемой стерилизующей фильтрацией, освобождающей питательные среды от примесных частиц, бактерий и коллоидов.

Следует различать микро- и ультрафильтрацию сред. При микрофильтрации из жидкости удаляются частицы примесей и бактерий размерами от 0,25 до 10 мкм. Ультрафильтрация приводит к извлечению из раствора очень мелких частиц и коллоидов, а также молекул растворенных веществ с молекулярными массами от 1 тыс. до 1 млн.

Процесс микрофильтрации осуществляется пропусканием жидкости через мембранные или глубинные фильтры. Ряд недостатков, свойственных глубинным фильтрам, изготавливаемым из ваты, стекловолокна, асбеста, фарфора и других материалов (например, возможность роста микроорганизмов в массе фильтра, поглощение значительных количеств фильтруемых жидкостей), делают предпочтительным использование при очистке питательных сред мембранных фильтров, которые имеют поры гарантированного размера и лишены перечисленных выше недостатков. Мембранные фильтры изготавливаются из различных полимеров, в том числе позволяющих стерилизацию (фторопласт, поливинилдендифторид, эфиры целлюлозы) и обеспечивающих химическую стойкость к компонентам питательных сред. Для стерилизующей фильтрации питательных сред чаще всего используются мембранные фильтры диаметром 0,2–0,22 мкм. Для очистки питательных сред пригодны мембранные

фильтры, производимые фирмами «Millipore», «Sartorius», «Shleier-Shull», и другие.

В общем случае установка для стерилизующей фильтрации состоит из системы создания избыточного давления на фильтруемую жидкость, стерильного держателя фильтра, фильтрующей мембраны, трубопроводов и сосудов для размещения фильтруемой жидкости и фильтрата.

Для обеспечения движения жидкости через фильтр к ней необходимо приложить определенное давление извне. Подобное давление может быть создано центробежными силами, вакуумом на выходе установки, но чаще для этой цели используется подача нейтрального газа (например, азота) под определенным давлением в сосуд со средой, подлежащей очистке. Величина избыточного давления зависит от размера пор и площади мембраны.

### **Помещения для работы с культурами клеток**

Стерилизация питательных сред, как и все другие манипуляции при работе с клеточными культурами, проводится в **боксовых помещениях или в ламинар-боксах**.

Боксовое помещение представляет собой изолированную комнату с несорбирующими пыль моющимися покрытиями, имеющую предбоксы и обеспеченную необходимым общим и специальным освещением, системами приточной и вытяжной вентиляции, холодным и горячим водоснабжением, а также подводами газов и сжатого воздуха.

Альтернативой боксовым помещениям, требующей меньших затрат на оборудование, являются ламинар-боксы, или стерильные рабочие места. В этом случае в любом помещении может быть создан локальный стерильный объем, необходимый для работы и создающий биологическую защиту пользователей. Технически задача решается путем постоянного обдува места проведения работ ламинарным потоком. При работе с заведомо непатогенными материалами поток обеспыленного воздуха из рабочей зоны выходит непосредственно в окружающее пространство. В случае работы с потенциально патогенным материалом воздух перед выходом из рабочей зоны дополнительно фильтруется, возможность обдува оператора при этом исключена. В зависимости от устройства ламинар-боксов поток обеспыленного воздуха в рабочей зоне может быть горизонтальным, вертикальным или наклонным.

Ламинар-бокс с горизонтальным потоком обеспыленного воздуха типа УОБГ (установка обеспыливания биологическая с горизонтальным

потоком) обеспечивает очистку воздуха, подаваемого в рабочую зону, путем фильтрации на фильтрах грубой и тонкой очистки, встроенных в прибор (по мере загрязнения грубый фильтр промывается, тонкий сменяется). Прибор имеет встроенные источники освещения, УФ облучения (для стерилизации рабочей зоны в перерывах между использованием бокса) и регулятор скорости воздушного потока.

Организация ламинар-боксов с вертикальным и наклонным потоками обеспыленного воздуха типов УОБВ и УОБН аналогична организации ламинар-боксов с горизонтальным потоком, описанным выше.

Ламинар-бокс для работ с потенциально патогенными культурами типа БП-4004 («Бокс-Р») имеет некоторые отличия. В приборе обеспечивается рециркуляция воздушного потока, заключающаяся в том, что воздух из рабочего объема попадает на специальный фильтр тонкой очистки, откуда часть его выходит в окружающее пространство, а остальной поток повторно проходит через фильтр тонкой очистки и вновь поступает в рабочий объем. Этим достигается невозможность выноса обрабатываемого материала в помещение. Возможность попадания выходящего воздуха на оператора предотвращается созданием зоны подсоса на открытой стороне рабочего объема бокса. Прибор имеет встроенные источники света и УФ облучения, столешницу из нержавеющей стали. Передняя часть рабочего объема закрыта прозрачным стеклом, перемещаемым по высоте. Бокс снабжен системой регулирования скорости потока воздуха и индикаторами загрязнения фильтра тонкой очистки.

Перечисленные выше типы ламинар-боксов предназначены для размещения в любых производственных помещениях, имеющих приточную вентиляцию с грубой предварительной очисткой воздуха.

## **Оборудование культуральных лабораторий**

### **Лабораторные термостаты**

Лабораторные термостаты для культивирования клеток должны отвечать ряду специальных требований: 1) обеспечивать высокую стабильность поддержания заданной температуры; 2) создавать минимальный градиент температуры по полезному объему; 3) обладать системой быстрого восстановления температуры после кратковременного открывания полезного объема; 4) внутренний объем должен изготавливаться из биологически пассивных материалов, т. е. не влияющих на жизнедеятельность клеток и стойких к воздействию компонентов питательных сред. Материалы и покрытия внутренних и наружных частей конструкции

термостата должны позволять деконтаминацию водными растворами спирта ректификата и стерилизацию УФ облучением.

По своей конструкции лабораторные термостаты подразделяются на жидкостные и воздушные. В жидкостных термостатах полезный объем окружен емкостью, наполненной дистиллированной водой, которую собственно и нагревают. Воздушные термостаты имеют полезный объем, непосредственно контактирующий с электронагревательными элементами. Жидкостные термостаты обеспечивают малые значения температурного градиента в камере, но имеют очень большую тепловую инерцию и поэтому длительное время вхождения в рабочий режим. Усовершенствованные формы воздушных термостатов, ранее уступавших жидкостным по ряду основных параметров, теперь составляют значительную часть серийно выпускаемых моделей.

### **СО<sub>2</sub>-инкубаторы**

Необходимость поддержания постоянной величины рН в питательной среде и ее минимального испарения в период инкубации клеток привела к разработке специальных приборов, аналогичных описанным выше термостатам. Главным отличием является наличие систем создания и поддержания определенного состава газовой среды в полезном объеме и высокой относительной влажности в нем. Это так называемые углекислотные инкубаторы, выпускаемые фирмами «Heraeus», «Hotpack», «Flow».

Газовая среда в камерах СО<sub>2</sub>-инкубатора содержит повышенную концентрацию кислорода и углекислого газа, а в большинстве случаев только углекислого газа. Величина концентрации задается по условиям культивирования и поддерживается автоматически. В автоматических СО<sub>2</sub>-инкубаторах заданный состав газовой среды поддерживается дозированным поступлением нужного газа в поток очищенного от пыли внешнего воздуха, подаваемого во внутренний объем прибора. Другой разновидностью инкубаторов являются так называемые газо-проточные инкубаторы типа ГПИ-1, где подача нужных газов производится непрерывно, а точное процентное содержание достигается изменением скорости протока.

### **Аэраторы**

Для обеспечения аэрации культуральной среды – снабжения кислородом – используют воздух, а также воздух, обогащенный кислородом, реже – чистый кислород. Процессы, протекающие без доступа кислорода (анаэробные), зависят от газообразных субстратов и требуют отвода га-



зообразных продуктов жизнедеятельности. Аэраторы – основной пример функционирующих систем газоснабжения и газоотвода.

### **Лабораторные встряхиватели**

Большое значение в оснащении лаборатории, предназначенной для культивирования клеток, имеют приборы, обеспечивающие принудительное перемешивание питательных сред с помещенными в них клеточными культурами, обеспечивая лучший газообмен и тем самым повышая эффективность культивирования. Большинство моделей встряхивателей позволяет перемешивание в одном режиме – вращательном или возвратно-поступательном. Хотя наиболее современные модели (фирма «Infors») являются универсальными, т. е. работают в разных режимах перемешивания. *Роллерные установки* – аппараты, позволяющие успешно применять один из общепринятых методов культивирования клеток – выращивание их в цилиндрических сосудах из боросиликатного стекла с небольшим количеством питательной среды, вращающихся в горизонтальном положении со скоростью 8 оборотов/мин, обеспечивая постоянное перемешивание питательной среды и интенсивный рост клеток. Для повышения эффективности массового культивирования установки обеспечены системой, дающей возможность заменять питательную среду и удалять супернатант без остановки вращения. Для этого сосуды снабжаются специальными перфузионными пробками, в которых центральная часть вращается независимо от периферийной. В эту часть пробки вводятся трубки для смены питательной среды, удаления супернатанта и введения инокулята. В состав данной системы также входят перистальтические насосы и блок автоматики, регулирующий их работу.

### **Лабораторные ферментеры**

Это комплексы приборов и аппаратов для массового суспензионного или глубинного культивирования клеточных и бактериальных культур. В лабораторной практике ферментеры применяются для ведения научно-исследовательских работ или отработки технологии массового культивирования (пилотные биореакторы).

В общем случае ферментер состоит из культивационного сосуда, насосов и соединительных трубопроводов (для подачи питательной среды, газов, инокулята и отбора продукта), измерительных приборов и регуляторов, управляющих температурой среды в сосуде, ее рН, окислительно-восстановительным потенциалом и другими параметрами.

В лабораторной практике наиболее часто применяются ферментеры с емкостью сосудов от 1 до 20 л, для отработки технологий – от 30 до 400 л. Во всех случаях питательной средой заполняется не более 75 % объема сосуда.

Части ферментеров, контактирующие с питательной средой (сосуды, соединительные трубопроводы, насосы и др.), изготавливаются из биологически пассивных, химически стойких материалов, позволяющих производить стерилизацию насыщенным водяным паром (качественная нержавеющая сталь, фторопласт, боросиликатное стекло, силиконовая резина).

Сосуды ферментеров имеют цилиндрическую (реже коническую) форму. В них размещены датчики температуры, рН, кислорода, а также система для аэрации питательной среды, производимой барботированием газов (подача газов снизу через барботер) через питательную среду или сочетанием продувки газов с механическим перемешиванием среды. При использовании механических мешалок их соединение с приводным двигателем производится при помощи магнитных муфт, что снижает риск загрязнения питательной среды. Помимо механического и пневматического перемешивания используются также системы циркуляционного (гидродинамического) перемешивания направленным током жидкости по замкнутому контуру при помощи насосов.

Большинство перемешиваемых и аэрируемых культур во время роста образуют довольно много пены. Образование на поверхности среды культивирования слоя из пузырьков связано с наличием в среде поверхностно-активных веществ (ПАВ), к числу которых относятся продукты распада жиров – мыла, а также белки. ПАВ включают как полярные ионные, так и неполярные группировки. Заряженные группы имеют сродство к водной фазе, а нейтральные выталкиваются в воздушную фазу, где, встраиваясь в стенки газовых пузырьков, увеличивают время их жизни. Умеренное пенообразование способствует росту многих аэробных микроорганизмов (пенный слой – кислородный коктейль). Особое внимание уделяется борьбе с избыточным пенообразованием, так как если не препятствовать этому, пена смачивает фильтры для стерилизации воздуха, что приводит к контаминации культуры посторонней микрофлорой, уменьшению полезного объема биореактора, а также выходу пены наружу. Контроль пенообразования осуществляется путем введения в сосуд специального датчика. Для борьбы с избыточным пенообразованием используется механическое и химическое пеногашение. При механическом пеногашении лопасти пеногасителя размещаются на валу мешалки. При

химическом пеногашении в крышке сосуда предусматривается специальный ввод для реагента гашения. Химические пеногасители более дешевы, их используют время от времени при необходимости подавления пенообразования. Однако при добавлении этих веществ может изменяться состав питательной среды. Пеногасящие вещества растительного (кукурузное, касторовое, соевое, подсолнечное масло, масло из семян хлопчатника и другие) и животного (свиной, говяжий, бараний, китовый и другие жиры) происхождения могут служить микроорганизмам источником углерода и энергии и, следовательно, стимулировать их активное развитие. Однако известны случаи, когда природные пеногасители оказывали отрицательное действие на метаболизм клетки. А такие неметаболизируемые пеногасители, как силиконы, в высокой концентрации токсичны. Поэтому пеногасители, являющиеся поверхностно-активными веществами, следует использовать только в очень низких концентрациях и только после тщательной проверки. Пеногасители добавляют непосредственно в среду перед стерилизацией или в ферментер через специальный ввод.

## 4. КУЛЬТУРАЛЬНАЯ ПОСУДА

---

Основная часть ассортимента специальной культуральной посуды предназначена для роста клеток в монослое, что определяет особые требования к свойствам поверхности и материала изделий как из стекла, так и из пластика. Для культивирования клеток обычно используют флаконы, колбы, матрасы, чашки Петри, платы, роллерные сосуды, пробирки, пипетки и т. д.

### Посуда из стекла

Хотя в последние годы широко применяется пластиковая посуда одноразового использования, посуда из стекла не утратила своего значения благодаря ряду бесспорных преимуществ: хорошие адгезионные свойства поверхности, способствующие прикреплению клеток; многократность использования; биологическая инертность стекла ряда составов; термостойкость и другие. Кроме того, в экспериментах с контролируемым уровнем кислорода необходимо пользоваться именно стеклянной посудой, т. к. в пластике кислород может растворяться. Помимо этого из пластика могут экстрагироваться водорастворимые органические соединения.

Для стеклянной лабораторной и культуральной посуды на практике в основном применяются два типа составов – многощелочное и малощелочное боросиликатное стекло типа «Пирекс». Щелочесодержащие силикатные стекла имеют недостаточную термостойкость и химическую устойчивость к воде, кислотам и щелочам. Алюмоборосиликатные малощелочные стекла типа «Пирекс» характеризуются высокой устойчивостью к воде, устойчивостью к щелочным растворам и ко всем кислотам, за исключением плавиковой (фтористоводородной) и горячей фосфорной. Кроме того, стекла типа «Пирекс» обладают хорошими оптическими свойствами.

Существует также группа макропористых стекол, которые не используются для изготовления посуды, но применяются при культивировании клеток в качестве микроносителей.

Однако успех в эксперименте обеспечивается не только качеством стекла, но и степенью подготовки лабораторной посуды. Посуда для культивирования должна быть чистой физически, химически и бактериологически.

## Пластиковая посуда

Начиная с 1965 г. все большее применение в лабораторной практике находит пластиковая посуда одноразового использования. При работе с культурами клеток пластиковая посуда в отдельных случаях более пригодна из-за характерных особенностей некоторых клеточных линий. Такая посуда проста в использовании, т. к. выпускается в стерильном, готовом к работе виде. Стерилизация производится в процессе изготовления физическими (облучение УФ светом или гамма-лучами) или химическими (газы – окись этилена, жидкости – этиловый спирт, раствор пергидроля) способами. Пластиковая посуда производится в двух модификациях: для культивирования микроорганизмов и для культивирования клеток. Такое разделение вызвано тем, что культивируемые клетки (речь идет о монослойном культивировании) в отличие от бактериальных клеток находятся в непосредственном контакте с поверхностью сосуда, которая является для них субстратом. Клетки оседают на этой поверхности, прикрепляются и распластываются. Для улучшения адгезионных свойств поверхности из полистирола ее подвергают специальной обработке, в то время как биологическая посуда не обрабатывается.

Таким образом, одним из первых условий успешного культивирования клеток является хороший субстрат, т. е. посуда, обеспечивающая максимальную адгезию, распластывание и, следовательно, рост.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Методы культивирования клеток. Л.: Наука, 1988. 315 с.
2. *Перт С. Дж.* Основы культивирования микроорганизмов и клеток. М.: Мир, 1978. 333 с.
3. Культура клеток растений. М.: Наука, 1981. 168 с.
4. *Адамс Р.* Методы культуры клеток для биохимиков. М.: Мир, 1983. 263 с.
5. Новые методы культуры животных тканей. М.: Мир, 1976. 255 с.
6. Культура животных клеток. Методы / Под ред. Р. Ферши. М.: Мир, 1989. 332 с.
7. *Никольский Н. Н., Вахтин Ю. Б., Игнатова Т. Н.* и др. Биология клетки в культуре. Л.: Наука, 1984. 280 с.
8. *Баснакьян И. А.* Культивирование микроорганизмов с заданными свойствами. М.: Медицина, 1992. 192 с.
9. Методы общей бактериологии. М.: Мир, 1983. Т. 1, ч. 2. С. 163–512.
10. *Глеба Ю. Ю., Сытник К. М.* Клеточная инженерия растений. Киев: Наук. думка, 1984. 160 с.

Учебное издание

**Блажевич** Ольга Валентиновна

# **КУЛЬТИВИРОВАНИЕ КЛЕТОК**

**Курс лекций**

В авторской редакции

Технический редактор *Г. М. Романчук*  
Корректор *Е. И. Бондаренко*  
Компьютерная верстка *А. С. Домбровской*

Ответственный за выпуск *А. Г. Купцова*

---

Подписано в печать 06.10.2004. Формат 60×84/16. Бумага офсетная.  
Гарнитура Таймс. Печать офсетная. Усл. печ. л. 4,65. Уч.-изд. л. 4,87.  
Тираж 100 экз. Зак.

Белорусский государственный университет.  
Лицензия на осуществление издательской деятельности  
№ 02330/0056804 от 02.03.2004.  
220050, Минск, проспект Франциска Скорины, 4.

Отпечатано с оригинала-макета заказчика.  
Республиканское унитарное предприятие  
«Издательский центр Белорусского государственного университета».  
Лицензия ЛП № 461 от 14.08.2003.  
220030, Минск, ул. Красноармейская, 6.