

Микробные технологии – основа биотехнологии

Промышленная биотехнология:

- культивирование микроорганизмов в открытых экосистемах: вопросы автоселекции в промышленных аппаратах, при непрерывном культивировании, инфицирования чистых культур и взаимодействия с посторонней микрофлорой,
- получение специализированных биопрепаратов (для биоремедиации, биоудобрений, биопестицидов и др.),
- биоконверсия возобновляемого сырья, биотопливо
- биodeградируемые пластики,
- переработка отходов биотехнологических производств, отходов других производств,
- очистка промышленных сточных вод, газо-воздушных выбросов.

Пищевая биотехнология:

- закономерности культивирования микроорганизмов при получении различных продуктов пищевого назначения,
- хранение продуктов;
- загрязнение окружающей среды и качество пищевых продуктов, токсикологические исследования на загрязненность продуктов,

Медицинская биотехнология:

- получение специализированных биопрепаратов для улучшения состояния внутренней среды человека (*пробиотики, нормофлора* для коррекции кишечной микрофлоры человека, *пребиотики* (препараты с молочной кислотой), получение *лечебно-профилактических продуктов* с использованием биотехнологий.
- вопросы токсикологии (ксенобиотики), санитарной гигиены (микробное заражение), биобезопасности; влияние загрязнений на здоровье человека (иммунитет, онкологические заболевания и т.п.) и окружающего живого мира, какие разумные меры надо предпринимать для снижения экологических рисков;

-

Сельскохозяйственная биотехнология:

- восстановление плодородия земель, поддержание урожайности растений (**биоремедиация, биорекультивация**),
- использование микроорганизмов для повышения плодородия почв и борьбы с заболеваниями растений, повышения устойчивости их к стрессам (биопрепараты для сельского хозяйства: биоудобрения, биологические средства защиты растений, биорегуляторы),
- кормовые добавки, **БОО** (белок одноклеточных организмов)
- вопросы использования генетически-модифицированных культур, трансгенных растений, биологических средств защиты растений.

Биогеотехнология:

- биогеохимические закономерности трансформации различных веществ, природные круговороты веществ, миграция и трансформация химических элементов; роль микроорганизмов в этих процессах,
- повышение отдачи нефтяных пластов, удаление метана из шахт, обессеривание угля, биоизвлечение и биовыщелачивание металлов, биосорбция металлов, очистка природных сред от радионуклидов и тяжелых металлов,
- биоизвлечение и биовыщелачивание металлов, биосорбция металлов,
- очистка природных сред от радионуклидов и тяжелых металлов.

Биокатализ:

Биоиндикация и биомониторинг, биотест-системы; использование ферментов и других биокаталитических систем (рибозимов, каталитических антител) для решения задач охраны окружающей среды.

Основные направления использования экобиотехнологических исследований и разработок

- 1. Очистка сточных вод, газовоздушных выбросов, загрязненных почв и водоемов.**
- 2. Переработка, утилизация твердых, жидких, газообразных отходов.**
- 3. Биоконверсия возобновляемого сырья.**
- 4. Биоповреждения и биокоррозия.**
- 5. Биомодификация.**
- 6. Мониторинг выбросов биотехнологических производств. Биомониторинг, биоиндикация и биотестирование воздействий различных техногенных источников.**

Микроорганизмы-продуценты практически важных веществ и их применение в биотехнологии

- Микроорганизмы-продуценты принадлежат к разным таксонам: грибы, бактерии, водоросли.
- Из 100000 видов используется примерно 100 видов, несколько тысяч штаммов.

Требования к промышленным штаммам

Штаммы должны обладать способностью :

- синтезировать целевой продукт на определенном сырье (желательно дешевом);
- обладать направленной биосинтетической активностью (один продукт);
- обладать генетической однородностью и стабильностью;
- обладать высокой скоростью роста и высокой продуктивностью;
- отличаться конкурентоспособностью;
- быть устойчивым к фагам;
- быть безвредным;
- быть способным выживать в широких диапазонах параметров внешней среды (рН, температура, концентрация кислорода и концентрация элементов питания);
- желательно быть термофилом и ацидофилом;
- продукт должен иметь экономическую и хозяйственную ценность и легко выделяться из субстрата.

Культивирование микроорганизмов

Из-за малых размеров микроорганизмов работу в лаборатории проводят не с одной особью, а с популяцией организмов, или культурой.

Накопительные и чистые культуры

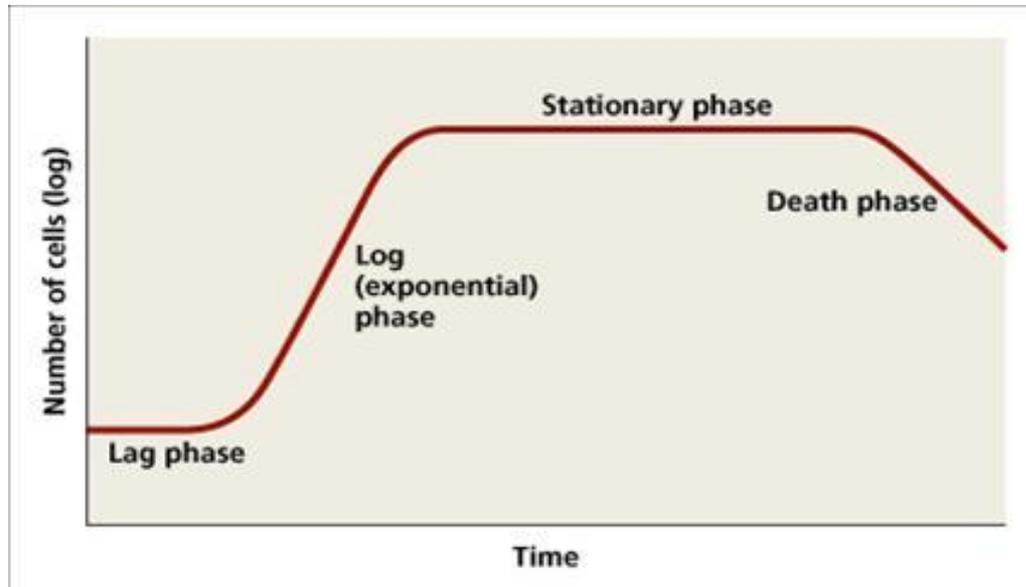
Чистая культура – это культура, состоящая из клеток одного вида.

Смешанная культура – это культура, содержащая два или более видов микроорганизмов.

Метод **накопительных культур** используют для выделения микроорганизмов из природных местообитаний, где они существуют в виде смешанных популяций. За счет создания **элективных условий** для микроорганизмов определенной группы происходит их накопление в процессе культивирования.

Периодическое культивирование

Культивирование микроорганизмов в сосуде определенного объема в закрытой системе.



При периодическом культивировании популяция микроорганизмов проходит ряд фаз:

- 1- лаг-фаза;
- 2- экспоненциальная (логарифмическая) фаза;
- 3 – фаза замедление роста;
- 4 – стационарная фаза;
- 5 – фаза отмирания

При периодическом культивировании
каждая фаза характеризуется
определенными физиологическими
параметрами

- **Лаг-фаза** – это фаза «привыкания» клеток к среде, при этом индуцируются соответствующие ферменты, увеличивается количество ДНК и РНК. Лаг-фаза удлиняется, если брать старый посевной материал и переносить клетки в совершенно новую по составу питательную среду. Лаг-фаза сокращается или отсутствует, если молодые активные клетки из экспоненциальной фазы перенести в среду того же состава и температуры.

- **Экспоненциальная фаза** – клетки растут и делятся с максимальной скоростью, их рост не ограничен. Считается, что все клетки живые и рост клеточной массы строго пропорционален увеличению числа клеток. Обычно такие клетки используют в биохимических и физиологических исследованиях.
- При росте в экспоненциальной фазе число клеток увеличивается в геометрической прогрессии: 2^0 2^1 2^2 2^n

- **Стационарная фаза** (фаза замедления роста). Скорость роста снижается по мере накопления продуктов метаболизма и истощения субстратов. Процессы деления и отмирания клеток в популяции находятся в динамическом равновесии.
- Фаза отмирания – скорость отмирания превышает скорость роста, иногда также имеет логарифмический характер.

Двухфазный рост (диауксия)

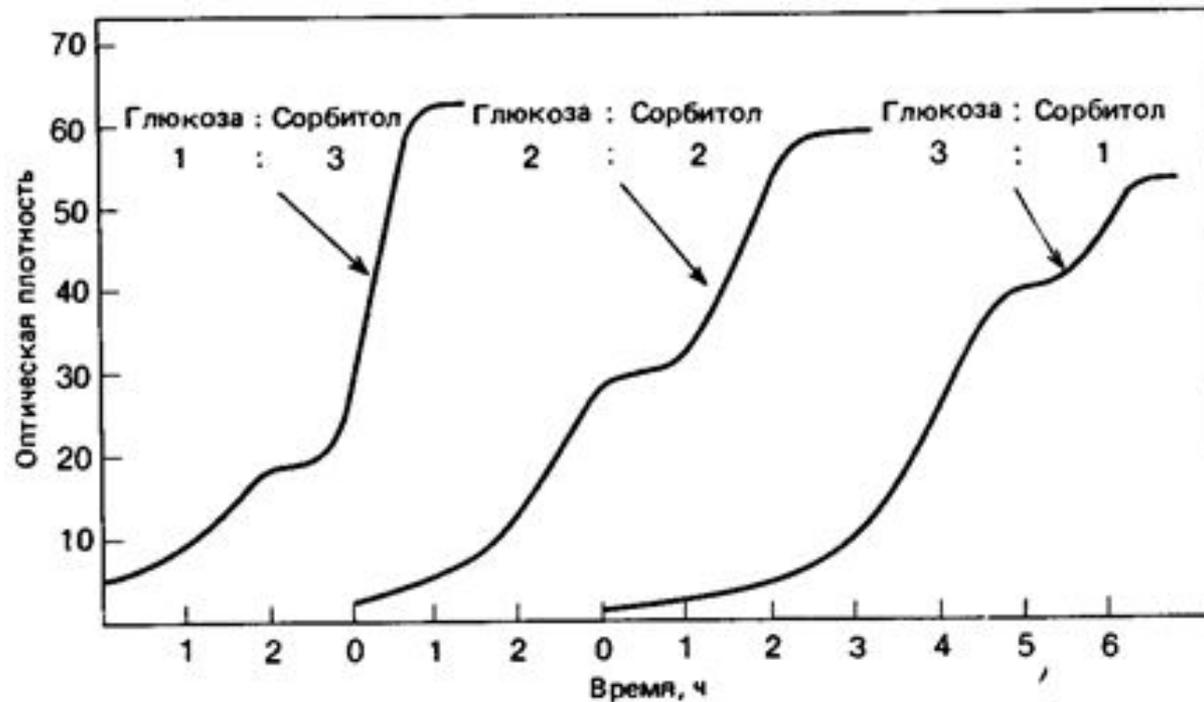


Рис. 6.7. Двухфазный рост (диауксия) *Escherichia coli* в питательных средах, содержащих глюкозу и сорбитол в разных соотношениях. (Monod J., Recherches sur la croissance des cultures bactériennes, Paris: Hermann, 1958.)

Некоторые характеристики роста культуры

- N_0 - начальное число клеток,
- N_1 - число клеток через время t ,
- n – число делений, то $N_1 = N_0 \cdot 2^n$

$$\lg N_1 = \lg N_0 + n \lg 2$$

$$n = (\lg N_1 - \lg N_0) / \lg 2$$

Тогда константа скорости деления

$$v = n/t = (\lg N_1 - \lg N_0) / \lg 2 (t - t_0),$$

а время генерации $g = t/n = 1/v$

- Самые быстрорастущие – фотобактерии, их число удваивается каждые 8 минут.
- *E.coli* - делится каждые 20 минут.

- Константа скорости роста культуры – μ

$$\mu = 1/N \cdot dN/dt \text{ или, } N = N_0 \cdot e^{\mu t}$$

Константа скорости роста культуры зависит от условий выращивания, но в постоянных условиях для данной культуры она определенная.

Непрерывное (проточное) культивирование

- Проточная система культивирования позволяет зафиксировать культуру в какой-то определенной фазе (обычно экспоненциальной).
- Состав среды и условия роста остаются постоянными.
- Подача свежей среды и удаление части суспензии (проток) происходят с той же скоростью, с какой растет культура.
- Существует два принципиально разных типа непрерывных культур – **хемотат** и **турбидостат**.

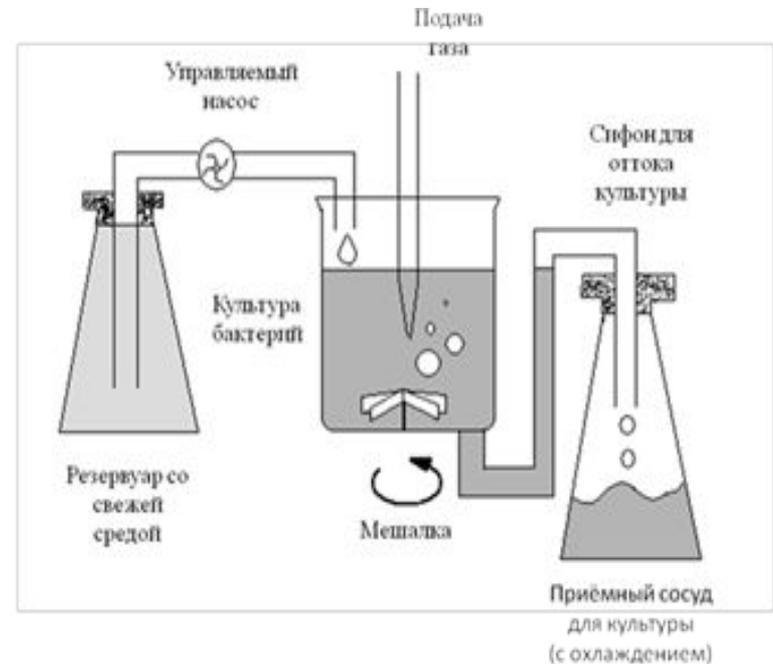


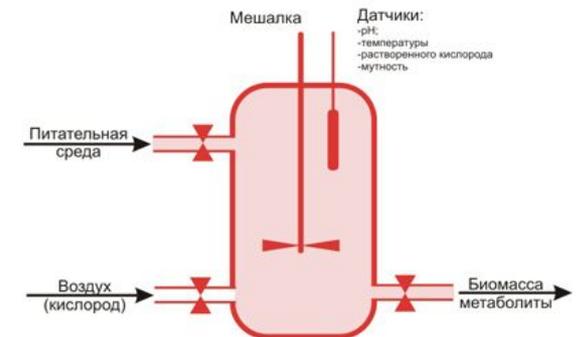
Схема проточного ферментера

Хемостат

- В хемостате фиксируется какой-нибудь химический параметр (концентрация субстрата, кислорода).

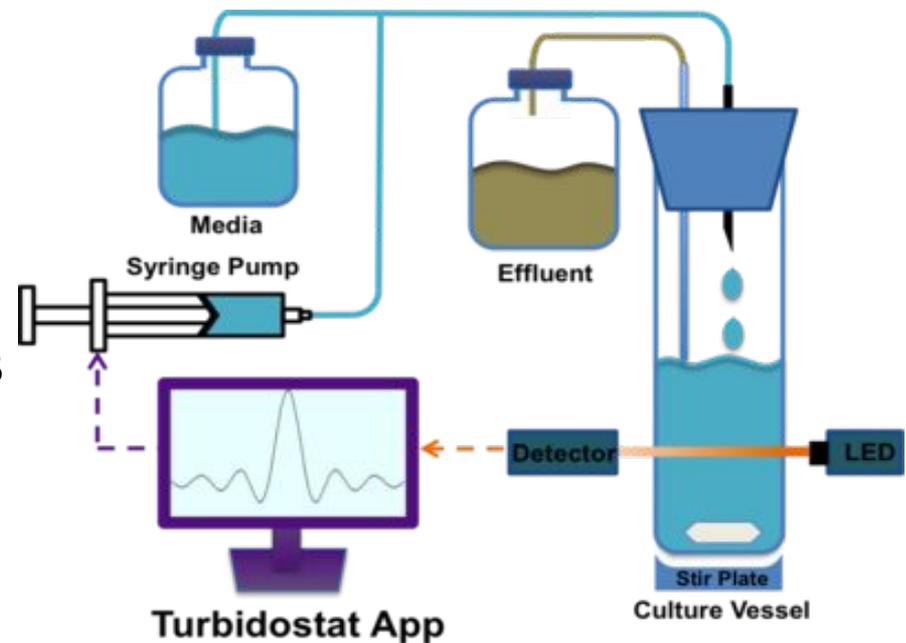
Эта концентрация лимитирующая. Если скорость прироста и скорость вымывания равны, то система находится в состоянии динамического равновесия.

Если истинная μ вследствие лимитации по субстрату оказывается меньше μ_{max} то скорость разбавления можно менять в широких пределах без того, чтобы это привело к снижению плотности суспензии, однако скорость разбавления не должна превышать μ_{max} . Уже при небольших концентрациях субстрата бактерии растут с достаточно высокой скоростью, а если концентрация субстрата велика, то $\mu \approx \mu_{max}$



Турбидостат

- Его работа основана на поддержании постоянной плотности бактериальной суспензии. Фотоэлемент измеряет плотность вытекающей суспензии и автоматически изменяет проток (чем плотнее культура, тем больше подается среды). В сосуде для культивирования все питательные вещества содержатся в избытке, а скорость роста бактерий приближена к максимальной.



Технология культивирования микроорганизмов включает обязательные стадии:

1. Выбор культуры (штамма) микроорганизма

При выборе микроорганизмов принимают во внимание ограничения, связанные имеющимся арсеналом технологического оборудования.

2. Подготовка посевного материала

- Посевного материала должно быть достаточно, чтобы обеспечить быстрое развитие микроорганизмов в среде.

Расход посевной культуры грибов, содержащей 0,5-3 млрд. спор на г сух. культуры, на единицу массы среды - 0,005% при глубинном культивировании и 0,01% - при твердофазном.

Расход посевного материала для спорообразующих бактерий - 0,002-0,03% от массы среды; для неспорообразующих бактерий – 3-10% к объему засеваемой среды.

- Активация посевного материала (для сокращения лаг-фазы);
- Ступенчатое выращивание вегетативных форм (пересев в возрастающие объемы питательной среды, дозировка посевного материала – 10% от объема среды);

3. Выбор способа культивирования

Определяется физиологическими особенностями микроорганизмов и свойствами сырья для биоконверсии.

1. Глубинное культивирование (в толще питательной среды) применяют для выращивания бактерий, дрожжей и актиномицетов, а также мицелиальных грибов. Используют жидкие питательные среды с концентрацией питательных компонентов 5-10%. Может осуществляться в периодическом и непрерывном режиме.

Преимущества: высокий уровень механизации и автоматизации процесса; возможность ведения процесса в условиях стерильности; возможность регулировать pH и состав среды; возможность вести процесс в непрерывном режиме.



2. **Поверхностный способ культивирования** (на поверхности жидких и сыпучих питательных сред). Разновидность – твердофазная ферментация. Выращивание микроорганизмов на увлажненных, хорошо аэрируемых твердых (сыпучих) средах (отруби, лигноцеллюлозные субстраты, свекловичный жом и т.п.).

Осуществляется в периодическом режиме.

Применяют почти исключительно для выращивания мицелиальных грибов.

Преимущества: возможность использования крупнодисперсных субстратов, хорошие физические свойства среды, обеспечивающих высокий уровень тепло- и массообменных процессов в культуре, создаются условия, максимально приближенные к естественным



4. Выбор оптимальных режимов культивирования

определяется следующими параметрами: состав среды, рН, температура, уровень аэрации среды, влажность среды и подаваемого воздуха (для твердофазной ферментации), вид пеногасителя (для глубинного способа), продолжительность культивирования.

- рН обычно устанавливают в интервале 5-7;
- Температура для мезофилов 30-37°C (бактерии) и 26-30 °C (грибы); для термофилов - 65 °C.
- Аэрация – за счет перемешивания и барботажа;
- Гашение пены – добавки природных или синтетических пеногасителей (адеканолю, пропинолу и др.)

Литература

- 1. Кузнецов А.Е., Градова Н.Б. **Научные основы экобиотехнологии.** – М.: Мир, 2006.
 - – 504 с.
- 2. Кузнецов А.Е., Градова Н.Б., Лушников С.В. и др. **Прикладная экобиотехнология**
 - (в 2-х томах). – М.: Бином. Лаборатория знаний, 2010. – Т.1 - 829 с., Т.2 + 485 с.
- 3. Экологическая биотехнология./ Под ред. К.Ф.Форстера, Д.А.Дж. Вейза. – Л.: Химия,
 - 1990. – 384 с.

- CMR (The Comprehensive Microbial Resource) – свободный web-сайт для предоставления информации обо всех полностью секвенированных прокариотических геномах. Помимо удобного доступа ко всем организмам на одном сайте, в CMR возможен удобный многофункциональный поиск и перекрёстный анализ различий и сходств между геномами (<http://cmr.jcvi.org/tigr-scripts/CMR/CmrHomePage.cgi>). Доступ к полностью секвенированным бактериям и геномному инструментарию, в частности проведение виртуального рестрикционного анализа нуклеотидных последовательностей и многое другое (Peterson et al., 2001).
- LPSN (List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature) — современный перечень названий прокариот согласно номенклатуре (<http://www.bacterio.cict.fr/index.html>).