



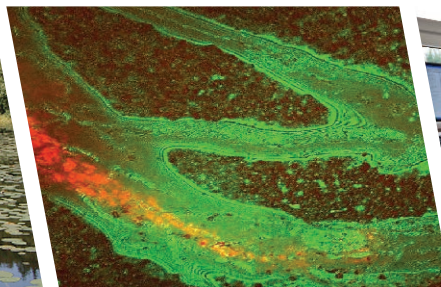
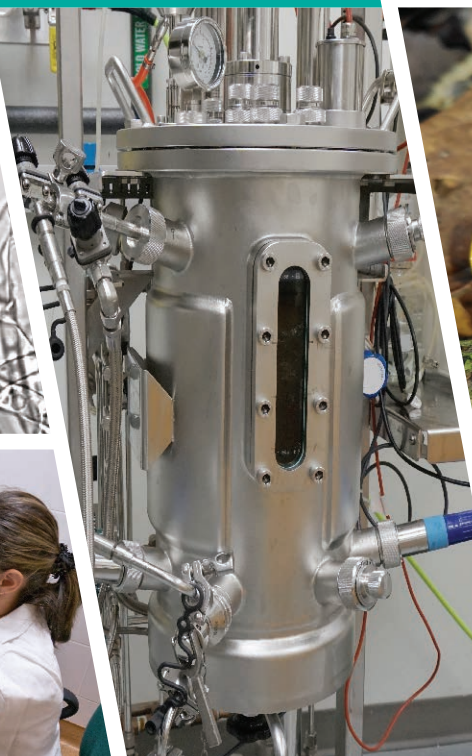
Biotechnologia drobnoustrojów w laboratorium i w praktyce

Wydanie drugie, uzupełnione

Teoria, ćwiczenia
i pracownie
specjalistyczne

pod redakcją Jerzego Długońskiego

 WYDAWNICTWO
UNIWERSYTETU
ŁÓDZKIEGO



Biotechnologia drobnoustrojów w laboratorium i w praktyce





WYDAWNICTWO
UNIWERSYTETU
ŁÓDZKIEGO

[Kup książkę](#)



Biotechnologia drobnoustrojów w laboratorium i w praktyce

Teoria, ćwiczenia
i pracownie
specjalistyczne

pod redakcją **Jerzego Długońskiego**

Wydanie drugie, uzupełnione

WYDAWNICTWO
UNIwersYTETU
ŁÓDZKIEGO
Łódź 2022

[Kup książkę](#)

Jerzy Długoński – Uniwersytet Łódzki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Instytut Mikrobiologii, Biotechnologii i Immunologii
Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Biotechnologii, 90-237 Łódź, ul. Banacha 12/16

RECENZENT
Grażyna Plaza

REDAKTOR INICJUJĄCY
Beata Koźniewska

REDAKTOR WYDAWNICTWA UŁ
Katarzyna Gorzkowska

SKŁAD I ŁAMANIE
Munda – Maciej Torz

PROJEKT OKŁADKI
krzysztof de mianiuk

Opisy i źródła zdjęć wykorzystanych na okładce wymieniono na s. 580

© Copyright by Authors, Łódź 2022

© Copyright for this edition by Uniwersytet Łódzki, Łódź 2022

Redaktor naukowy podręcznika wraz ze Współautorami otrzymali w lutym 2022 r.

Nagrodę Ministra Edukacji i Nauki za znaczące osiągnięcia w zakresie działalności dydaktycznej
w kategorii „*autorstwo lub współautorstwo wybitnych i innowacyjnych podręczników akademickich*”



Wydane przez Wydawnictwo Uniwersytetu Łódzkiego
Wydanie II uzupełnione. W.10442.21.0.S
Ark. wyd. 24,0; ark. druk. 36,375

W 2021 r. została wydana również angielska wersja podręcznika w koedycji
z Wydawnictwem Uniwersytetu Jagiellońskiego i dystrybuowana przez Columbia University Press

ISBN 978-83-8220-681-4
e-ISBN 978-83-8220-682-1

[Kup książkę](#)

Spis treści

Wprowadzenie (J. Długoński) / 11

Wstęp do wydania podręcznika *Biotechnologia mikrobiologiczna. Ćwiczenia i pracownie specjalistyczne* z 1997 roku (J. Długoński) / 15

1. Metody pozyskiwania, hodowli, doskonalenia i przechowywania drobnoustrojów o znaczeniu przemysłowym / 17

- 1.1. Ogólna charakterystyka drobnoustrojów wykorzystywanych w procesach biotechnologicznych (J. Długoński) / 19
- 1.2. Pozyskiwanie drobnoustrojów przydatnych w procesach mikrobiologicznych (J. Długoński, K. Lisowska, N. Wrońska, K. Zawadzka, A. Felczak) / 21
 - 1.2.1. Przydatność różnych środowisk do izolacji drobnoustrojów wykorzystywanych w procesach przemysłowych / 21
 - 1.2.2. Gleba jako źródło potencjalnych producentów związków biologicznie aktywnych / 23
 - 1.2.3. Skrining drobnoustrojów / 25
 - 1.2.4. Gleba środowisk zanieczyszczonych jako źródło drobnoustrojów wykorzystywanych w procesach ochrony środowiska / 28
- 1.3. Metody hodowli oraz stabilizacji drobnoustrojów w warunkach tlenowych (z uwzględnieniem bioreaktorów i immobilizacji w żelach) (J. Długoński, P. Bernat, K. Lisowska, S. Walisch) / 35
 - 1.3.1. Hodowla okresowa / 36
 - 1.3.2. Hodowla półciągła – okresowa z ciągłym dozowaniem pożywki do fermentora (ang. *fed-batch culture*) / 39
 - 1.3.3. Hodowle ciągłe (ang. *continous culture*) / 39
 - 1.3.4. Bioreaktory do hodowli węgłbnych / 42
 - 1.3.5. Stabilizacja drobnoustrojów na drodze immobilizacji / 44
- 1.4. Hodowla drobnoustrojów w warunkach beztlenowych (M. Krupiński) / 49
- 1.5. Protoplasty grzybów: otrzymywanie, właściwości, zastosowanie (J. Długoński, K. Paraszkiewicz, M. Słaba, K. Milczarek) / 56
- 1.6. Doskonalenie szczepów – mutageneza, fuzja i elektroporacja protoplastów (J. Długoński, D. Wilmańska, S. Różalska, K. Lisowska, K. Milczarek) / 61
- 1.7. Sposoby przechowywania szczepów przemysłowych (K. Zawadzka, N. Wrońska, S. Walisch, K. Milczarek, D. Wilmańska) / 77

Literatura / 84

2. Podstawy nowoczesnych technik wykorzystywanych w biotechnologii mikrobiologicznej i naukach pokrewnych / 89

- 2.1. Mikroskopia konfokalna, fluorescencyjna i spektrofлуorymetria (*S. Różalska*) / 91
 - 2.1.1. Zjawisko fluorescencji / 91
 - 2.1.2. Spektrofлуorymetria / 93
 - 2.1.3. Mikroskopia fluorescencyjna i konfokalna – porównanie / 93
 - 2.1.4. Autofluorescencja i znaczniki fluorescencyjne / 95
 - 2.1.5. Białka fluorescencyjne / 95
- 2.2. Techniki izotopowe (izotopy promieniotwórcze) (*J. Długoński, S. Różalska*) / 100
- 2.3. Chromatografia (*R. Szewczyk*) / 103
 - 2.3.1. Podstawowe wielkości mierzone w chromatografii / 103
 - 2.3.2. Chromatografia cieczowa / 108
 - 2.3.3. Chromatografia gazowa / 114
- 2.4. Spektrometria mas (*R. Szewczyk*) / 116
 - 2.4.1. Zasada działania spektrometru masowego / 117
 - 2.4.2. Źródła jonów i rodzaje jonów w spektrometrii mas / 118
 - 2.4.3. Analizatory masowe / 121
 - 2.4.4. Podstawowe tryby skanowania / 124
 - 2.4.5. Detekcja jonów / 126
 - 2.4.6. Zastosowanie spektrometrii mas / 127
- 2.5. Absorpcyjna spektrometria atomowa (*M. Słaba*) / 127
- 2.6. Nowoczesne techniki cyfrowe stosowane do rejestrowania zmian zachodzących w środowisku (*A. Długoński*) / 132
 - 2.6.1. Obrazowanie satelitarne w analizowaniu dawnego i obecnego zagospodarowania terenu / 134
 - 2.6.2. Zasady pracy wybranych systemów teledetekcyjnych / 136
 - 2.6.3. Skanowanie pokrycia terenu z wykorzystaniem samolotu / 138
- Literatura / 141

3. Określanie przynależności taksonomicznej drobnoustrojów / 145

- 3.1. Genotypowe techniki różnicowania i identyfikacji bakterii (*M. Krupiński*) / 147
 - 3.1.1. Izolacja z gleby i identyfikacja beztlenowców metodą multipleks PCR / 151
 - 3.1.2. Określenie przynależności gatunkowej promieniowców z rodzaju *Streptomyces* w oparciu o metodę PCR 16s rRNA / 157
- 3.2. Grzyby należące do Mucoromycota, Ascomycota i Basidiomycota – cechy morfologiczne, biochemiczne i analiza genetyczna (*M. Słaba, S. Różalska*) / 165
 - 3.2.1. Mucoromycota / 170
 - 3.2.2. Ascomycota (workowce) / 171
 - 3.2.3. Basidiomycota (podstawczaki) / 174
 - 3.2.4. Identyfikacja molekularna grzybów strzępkowych / 177
 - 3.2.5. Drożdże / 181
- 3.3. Biotypowanie drobnoustrojów metodami LC-MS/MS i MALDI-TOF/TOF (*R. Szewczyk*) / 185
 - 3.3.1. Biotypowanie LC-MS/MS na przykładzie szczepów *Mycobacterium* / 187
 - 3.3.2. Biotypowanie MALDI-TOF i MALDI-TOF/TOF / 193
- Literatura / 199

4. Przemysłowe wykorzystanie drobnoustrojów / 203

- 4.1. Procesy biosyntezy (J. Długoński) / 205
 - 4.1.1. Otrzymywanie i wykorzystanie biomasy drobnoustrojów (P. Bernat) / 206
 - 4.1.2. Biosurfaktanty – mikrobiologiczne związki powierzchniowo czynne. Skrining bakterii z rodzaju *Bacillus*, zdolnych do produkcji biosurfaktantów o budowie cyklicznych lipopeptydów (K. Paraszewicz, A. Walaszczyk) / 210
 - 4.1.3. Mikrobiologiczna produkcja enzymów z grupy hydrolaz (J. Długoński, K. Paraszewicz, A. Jasińska, K. Milczarek) / 222
 - 4.1.4. Biosynteza wielocukrów (J. Długoński, S. Różalska) / 233
 - 4.1.5. Biosynteza antybiotyków na przykładzie tetracyklin (J. Długoński, P. Bernat) / 244
 - 4.1.6. Otrzymywanie lipopeptydów bakteryjnych z użyciem bioreaktora (P. Bernat) / 251
 - 4.1.7. Biosynteza kwasu cytrynowego (S. Walisch, P. Bernat, K. Paraszewicz) / 254
- 4.2. Procesy fermentacji (J. Długoński) / 259
 - 4.2.1. Winiarstwo i browarnictwo (S. Walisch, P. Bernat, K. Paraszewicz) / 260
 - 4.2.2. Praktyczne wykorzystanie bakterii fermentacji mlekowej (S. Walisch, P. Bernat, K. Paraszewicz) / 267
 - 4.2.3. Wykorzystanie drobnoustrojów w przemyśle piekarniczym oraz do produkcji fermentowanych produktów mięsnych i warzywnych (K. Paraszewicz, A. Jasińska, A. Góralczyk-Bińkowska) / 273
 - 4.2.4. Żywność azjatycka otrzymywana przy udziale drobnoustrojów (A. Jasińska, A. Góralczyk-Bińkowska, K. Paraszewicz) / 287
- 4.3. Procesy biotransformacji (J. Długoński) / 294
 - 4.3.1. Biotransformacja etanolu i sorbitolu (J. Długoński, S. Walisch) / 295
 - 4.3.2. Biotransformacja steroidów (J. Długoński) / 300
- Literatura / 306

5. Drobnoustroje w ochronie środowiska i zdrowia człowieka / 315

- 5.1. Rewitalizacja zdegradowanych terenów zieleni miast (A. Długoński) / 317
 - 5.1.1. Interdyscyplinarność badań w rewitalizacji miejskiej: etapy pracy / 318
 - 5.1.2. Badania terenowe z zakresu architektury krajobrazu i dyscyplin pokrewnych / 320
 - 5.1.3. Badania laboratoryjne z zakresu biotechnologii, mikrobiologii, chemii środowiskowej i dyscyplin pokrewnych / 322
 - 5.1.4. Łączna ocena i podsumowanie badań / 324
- 5.2. Analiza mikrobiologiczna skażonych środowisk – sekwencjonowanie nowej generacji (S. Różalska) / 331
- 5.3. Biologiczne oczyszczanie ścieków / 338
 - 5.3.1. Biologiczne metody oczyszczania ścieków w oczyszczalniach komunalnych (K. Lisowska, K. Zawadzka) / 340
 - 5.3.2. Oczyszczanie ścieków komunalno-przemysłowych (A. Długoński) / 342
 - 5.3.3. Oczyszczalnie ścieków w terenie o zabudowie rozproszonej – mała infrastruktura (A. Długoński) / 344
- 5.4. Kompostowanie odpadów (A. Długoński, K. Lisowska) / 347
 - 5.4.1. Kompostowanie odpadów w kompostowniach zakładów komunalnych / 347
 - 5.4.2. Lokalne wykorzystanie odpadów z terenów zieleni miejskiej / 349

5.5. Wykorzystanie odpadów zieleni miejskiej do produkcji energii w lokalnych biogazowniach i spalarniach oraz syntezy lakaz grzybowych (A. Długoński, A. Góralczyk-Bińkowska)	/ 352
5.5.1. Produkcja energii	/ 352
5.5.2. Wykorzystanie odpadów zieleni miejskiej do biosyntezy enzymów grzybowych na przykładzie lakaz	/ 354
5.6. Biodegradacja toksycznych ksenobiotyków (J. Długoński)	/ 357
5.6.1. Bisfenol A (A. Jasińska)	/ 359
5.6.2. Organiczne związki cyny (P. Bernat, A. Felczak, J. Długoński)	/ 364
5.6.3. Zastosowanie drobnoustrojów do eliminacji pestycydów (P. Bernat)	/ 368
5.6.4. Nonylofenol (J. Długoński, S. Różalska)	/ 372
5.6.5. Jednoczesna eliminacja zanieczyszczeń pochodzenia organicznego i nieorganicznego na przykładzie alachloru i cynku (M. Staba, J. Długoński)	/ 373
5.6.6. Związki heterocykliczne (A. Felczak, N. Wrońska)	/ 377
5.6.7. Barwniki (A. Jasińska, A. Góralczyk-Bińkowska)	/ 381
5.7. Mikrobiologiczna eliminacja metali ciężkich ze środowiska (M. Staba, J. Nykiel-Szymańska)	/ 386
5.8. Procesy detoksykacji skażonych środowisk. Testy toksykologiczne (M. Krupiński)	/ 397
5.9. Wykorzystanie odpadów przemysłowych w biotechnologii mikrobiologicznej (K. Paraszkie-wicz, A. Góralczyk-Bińkowska, A. Jasińska)	/ 403
5.10. Biodeterioracja wywołana przez grzyby (S. Różalska, M. Staba, A. Długoński)	/ 411
5.11. Charakterystyka i wykorzystanie enzymów ligninolitycznych produkowanych przez grzyby w ochronie środowiska, przemyśle i medycynie (A. Jasińska, A. Góralczyk-Bińkowska, A. Długoński)	/ 419
5.12. Określanie właściwości przeciwdrobnoustrojowych makromolekuł (dendrymery) i nowo syntetyzowanych związków srebra (A. Felczak, K. Zawadzka)	/ 426
5.13. Grzyby entomopatogenne i ich wykorzystanie w biokontroli (S. Różalska)	/ 431
5.14. Grzyby toksynotwórcze. Poszukiwanie i identyfikacja aflatoksyn (K. Paraszkie-wicz, M. Staba, R. Szewczyk)	/ 436
Literatura	/ 447

6. Omics w biotechnologii drobnoustrojów / 459

6.1. Proteomika w analizie mikrobiologicznej degradacji ksenobiotyków (R. Szewczyk)	/ 461
6.1.1. Izolacja i separacja białek	/ 462
6.1.2. Identyfikacja białek	/ 466
6.2. Analiza metabolomiczna jako narzędzie służące do wielopoziomowej charakterystyki proce-su biodegradacji (R. Szewczyk)	/ 474
6.3. Zastosowanie lipidomiki w badaniu procesów detoksykacji u drobnoustrojów (P. Bernat)	/ 480
6.4. Poszukiwanie biomarkerów w przemyśle i medycynie (R. Szewczyk)	/ 487
6.4.1. Metody analityczne	/ 488
6.4.2. Charakterystyka i źródła biomarkerów	/ 489
6.5. Analiza ilościowa pestycydów – multimetody (R. Szewczyk)	/ 492
6.5.1. Multimetody	/ 492
6.5.2. Walidacja metody	/ 494
Literatura	/ 499

7. Podłoża, bufory (K. Milczarek, N. Wrońska, A. Felczak) / 501

7.1. Podłoża / 503

7.2. Bufory / 521

Literatura / 523

8. Zdjęcia makroskopowe i mikroskopowe szczepów grzybów stosowanych w badaniach i w dydaktyce Katedry Mikrobiologii Przemysłowej i Biotechnologii Uniwersytetu Łódzkiego / 525

8.1. Zdjęcia grzybów z hodowli prowadzonych w warunkach laboratoryjnych (K. Milczarek, S. Różalska) / 527

8.1.1. *Aureobasidium pullulans* / 5278.1.2. *Ashbya gossypii* / 5288.1.3. *Aspergillus niger* / 5298.1.4. *Aspergillus versicolor* IM2161 / 5308.1.5. *Chaetomium globosum* / 5318.1.6. *Cunninghamella echinulata* IM1785 21Gp (poprzednia nazwa *C. elegans*) / 5328.1.7. *Curvularia lunata* IM2901 / 5358.1.8. *Curvularia lunata* IM4417 / 5388.1.9. *Exophiala* sp. / 5398.1.10. *Kluyveromyces marxianus* / 5408.1.11. *Metarhizium robertsii* IM2358 / 5418.1.12. *Mucor ramosissimus* IM6203 / 5428.1.13. *Myrothecium roridum* IM6482 / 5448.1.14. *Nectriella pironii* IM6443 / 5458.1.15. *Paecilomyces marquandii* IM6003 (obecna nazwa *Metarhizium marquandii*) / 5468.1.16. *Phanerochaete chrysosporium* DSM1556 / 5488.1.17. *Schizosacharomyces pombe* / 5498.1.18. *Serpula himantoides* DSM6419 / 5518.1.19. *Stachybotrys chartarum* DSM2144 / 5528.1.20. *Trametes versicolor* / 5538.1.21. *Trichoderma harzianum* QF10 / 5558.1.22. *Trichoderma viride* IM6325 / 5568.1.23. *Umbelopsis ramanniana* IM833 / 557

8.2. Fotografie drzew i drewna porażonych przez grzyby ligninolityczne (A. Długoński) / 558

8.2.1. *Pleurotus ostreatus* (bocznik ostrygowaty) / 5588.2.2. *Trametes versicolor* (wrośniak różnobarwny) / 5598.2.3. *Heterobasidion annosum* (korzeniowiec sosnowy) / 559

8.2.4. Brunatna zgnilizna drewna / 560

8.2.5. Biała zgnilizna drewna / 562

8.2.6. Szara zgnilizna drewna / 563

8.2.7. *Tremella mesenterica* (trzęsak pomarańczowożółty) / 5648.2.8. *Phellinus pomaceus* (czyreń śliwowy) / 5668.2.9. *Piptorus betulinus* (białoporek brzozy, biała huba brzozy) / 5678.2.10. *Fomes fomentarius* (hubiak pospolity) / 568

8.2.11. Współdziałanie patogenów powodujących zgniliznę drzew / 569

8.2.12. *Schizophyllum commune* (rozszczepka pospolita) / 570

Literatura / 571

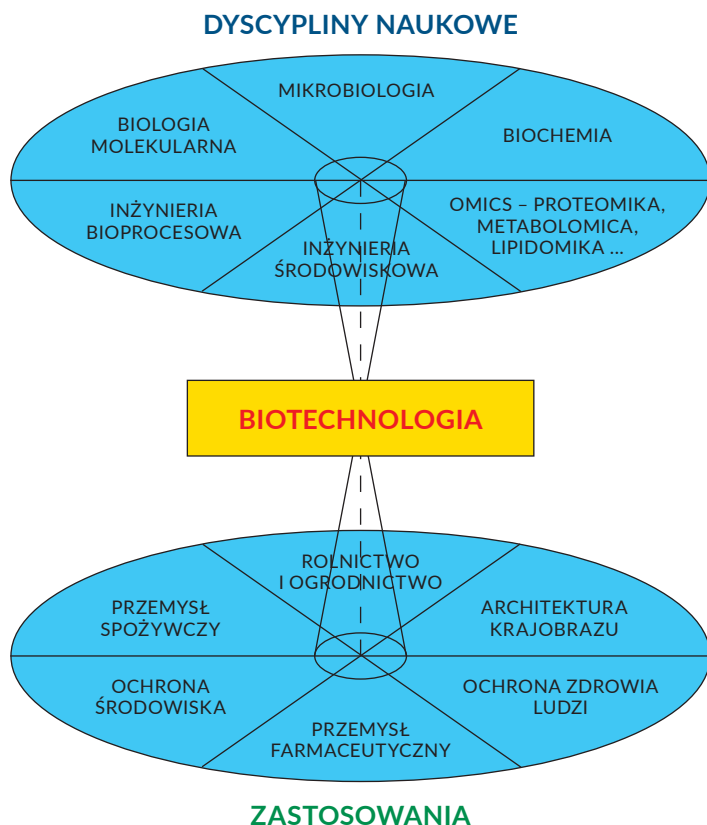
Autorzy / 573

Wprowadzenie

Nauki biologiczne, w tym biotechnologia, mikrobiologia i dyscypliny pokrewne, należą do jednych z najszybciej rozwijających się obszarów nauki w drugiej połowie XX wieku i w czasach obecnych. Przyczyniło się do tego zarówno odkrycie struktury DNA w 1953 roku przez Watsona i Cricka, jak i rozwój nowoczesnych technik i metod badawczych, pozwalających na analizowanie i opisywanie procesów zachodzących w organizmach z dużą dokładnością w krótkim okresie czasu. Odzwierciedleniem tego jest stale wzrastająca w obiegu międzynarodowym liczba publikacji naukowych, a także pojawianie się na uczelniach nowych kierunków nauczania, często o charakterze interdyscyplinarnym, umożliwiających studentom zdobycie wiedzy z różnych obszarów nauki i ułatwiających odnalezienie się na ciągle zmieniającym się rynku pracy. Taką rolę spełnia m.in. biotechnologia, łącząca najnowsze osiągnięcia intensywnie rozwijających się nauk przyrodniczych z ich wykorzystaniem w różnych dziedzinach działalności człowieka, co zobrazowano na rycinie poniżej, uwzględniając zarówno w górnym, jak i dolnym polu przede wszystkim obszary wiedzy i praktyki omawiane w tym podręczniku.

W pierwszych dwóch rozdziałach omówiono zasady pozyskiwania szczepów drobnoustrojów wykorzystywanych w praktyce, metody ich hodowli, ulepszania pod względem właściwości przydatnych z aplikacyjnego punktu widzenia oraz najistotniejsze kwestie związane z przechowywaniem w warunkach sprzyjających przeżyciu drobnoustrojów i utrzymaniu ich pożądanых cech. W tej części podręcznika pominięto podstawowe techniki mikrobiologiczne, zakładając, że są one znane z kursów ogólnych mikrobiologii. Natomiast skoncentrowano się na zaznajomieniu Czytelnika z najnowszymi technikami analitycznymi stosowanymi w mikrobiologii, biotechnologii i naukach pokrewnych – z mikroskopią konfokalną, fluorescencyjną, spektrofotometrią, technikami

izotopowymi, chromatograficznymi, absorpcyjną spektrometrią atomową. Przedstawiono tutaj również zasady teledetekcji lotniczej i satelitarnej, umożliwiające szybkie wykrycie i obiektywną ocenę zagrożeń spowodowanych przez patogeny bakteryjne, wirusowe i grzybowe na terenach upraw rolniczych, leśnych, a także w obrębie obszarów zieleni miejskiej (ryc. 2.6.1.4).



Ryc. 1. Powiązania między wybranymi naukami przyrodniczymi i obszarami działalności człowieka

Rozdział trzeci poświęcony został identyfikacji uprzednio wyizolowanych bakterii i grzybów z uwzględnieniem wykorzystania najnowszych technik, w tym przedstawionych już w poprzednim rozdziale metod MALDI-TOF/TOF i LC-MS/MS.

W rozdziale czwartym przedstawiono możliwości wykorzystania drobnoustrojów w skali przemysłowej. Ta część publikacji została w dużej mierze oparta na poprzednio wydanym

podręczniku *Biotechnologia mikrobiologiczna. Ćwiczenia i prace specjalistyczne* pod redakcją Jerzego Długońskiego, który ukazał się w 1997 roku w Wydawnictwie Uniwersytetu Łódzkiego. Ze względu na to, że układ tamtego podręcznika zyskał aprobatę zarówno dydaktyków, jak i studentów, utrzymano podział omawianych zagadnień na procesy biosyntezy, fermentacji i biotransformacji, uaktualniając jednocześnie zawarte tam treści oraz wprowadzając dodatkowe podrozdziały dotyczące produkcji biosurfaktantów i żywności wytwarzanej z udziałem mikroorganizmów.

Przesłanką przy opracowywaniu rozdziału piątego, najobszerniejszego i jednocześnie odzwierciedlającego interdyscyplinarne podejście autorów poszczególnych podrozdziałów do rozwiązywania problemów związanych z ochroną zdrowia i środowiska człowieka, były zarówno wcześniejsze publikacje, w tym obszerna monografia *Microbial Biodegradation. From Omics to Function and Application* (edited by Jerzy Długoński, Caister Academic Press, Norfolk 2016), jak i współpraca z naukowcami z innych dziedzin nauki, w kraju i za granicą.

Rozdział szósty stanowi zbiór przykładów uwidaczniających korzyści wynikające z wykorzystania najnowszych technik analitycznych w badaniach naukowych oraz w szeroko rozumianej ochronie zdrowia i środowiska.

Końcowa część podręcznika (rozdział siódmy i ósmy) to wykaz podłoży i buforów wraz z ich składem, stosowanych w części praktycznej poszczególnych podrozdziałów, a także zdjęcia makroskopowe i mikroskopowe szczepów grzybów wykorzystywanych przez autorów podręcznika w badaniach i dydaktyce.

Podręcznik został przygotowany na podstawie wieloletniego doświadczenia dydaktycznego i naukowego autorów, prowadzących zajęcia na różnych kierunkach i specjalnościach, co zaowocowało wielostronnym charakterem opracowania. Z tego względu autorzy podręcznika wyrażają przekonanie, że będzie on przydatny zarówno dla studentów biotechnologii, mikrobiologii, ekologii, jak i kierunków o charakterze interdyscyplinarnym, takich jak ekomiasto, ochrona środowiska, biomonitoring i biotechnologie ekologiczne czy rewitalizacja miast.

Autorzy podręcznika pragną wyrazić serdeczne podziękowania Recenzentce, prof. dr hab. Grażynie Płazie, której cenne

uwagi i komentarze przyczyniły się owocnie do przygotowania jego końcowej wersji. Szczególne podziękowania kierowane są także do mgr Aleksandry Góralczyk-Bińkowskiej, dr Anny Jasińskiej, mgr Małgorzaty Krokockiej i dr Katarzyny Zawadzkiej za zatroszczenie się o staranną szatę edytorską i graficzną podręcznika.

Mając na względzie ewentualne kolejne wydanie podręcznika, autorzy będą wdzięczni za nadsyłanie uwag krytycznych do redaktora naukowego (jerzy.dlugonski@biol.uni.lodz.pl).

Jerzy Długoński

Łódź, 12 grudnia 2019 r.

Wstęp do wydania podręcznika ***Biotechnologia mikrobiologiczna*** ***Ćwiczenia i pracownie specjalistyczne*** **z 1997 roku**

Zgodnie z definicją przyjętą przez Europejską Federację Biotechnologii „biotechnologia jest dziedziną integrującą nauki przyrodnicze i inżynierskie w celu wykorzystania organizmów komórek, ich składników oraz analogów molekularnych w produkcji i usługach”. Jedną z nauk wchodzących w skład biotechnologii jest mikrobiologia przemysłowa zajmująca się wykorzystaniem drobnoustrojów w praktyce. Do najważniejszych czynników sprzyjających szerokiemu stosowaniu drobnoustrojów w procesach biotechnologicznych należą stosunkowo łatwe techniki prowadzenia hodowli w dużej skali, zdolność do wykorzystania różnych surowców jako źródła węgla i energii, duża szybkość metabolizmu, dobrze poznana struktura genetyczna niektórych gatunków oraz łatwość manipulacji genetycznych. Należy jednak nadmienić, że do pełnego wykorzystania właściwości drobnoustrojów niezbędna jest znajomość fizjologii szczepów przemysłowych oraz mechanizmów regulujących przemiany zachodzące we wnętrzu komórki. Zagadnienia te stanowią główną tematykę pracowni specjalistycznych oraz ćwiczeń z mikrobiologii przemysłowej dla studentów IV roku specjalności biotechnologia i mikrobiologia na kierunku biologia Wydziału BNZ UŁ. Studenci, przystępując do zajęć prowadzonych w semestrze 8 i 9, posiadają już znaczny zasób wiedzy z zakresu chemii, mikrobiologii ogólnej, biochemii, mikologii, genetyki drobnoustrojów. Dlatego też w skrypcie nie omówiono podstawowych technik stosowanych w pracy laboratoryjnej, a skoncentrowano się głównie na

zagadnieniach dotyczących fizjologii drobnoustrojów przemysłowych i ich wykorzystaniu w procesach biotechnologicznych.

Skrypt został opracowany w oparciu o wieloletnie doświadczenie dydaktyczne i naukowe pracowników Zakładu Mikrobiologii Przemysłowej UŁ. Autorzy pragną w tym miejscu wyrazić głęboką wdzięczność organizatorowi i wieloletniemu kierownikowi Zakładu Mikrobiologii Przemysłowej, prof. dr. hab. Leonowi Sedlaczekowi, bez którego wkładu w dorobek dydaktyczny i naukowy Zakładu nie byłoby możliwe opracowanie niniejszego skryptu.

Niemniej serdeczne podziękowania należą się Recenzentowi tego opracowania, prof. dr. hab. Aleksandrowi Chmielowi, dzięki którego cennym uwagom i sugestiom powstała ostateczna wersja skryptu.

Skrypt został napisany przede wszystkim z myślą o studentach specjalizujących się w zakresie biotechnologii i mikrobiologii. Niemniej będzie on przydatny dla studentów innych specjalności zainteresowanych biotechnologią mikrobiologiczną oraz dla różnych osób zajmujących się wykorzystaniem drobnoustrojów w praktyce.

Jerzy Długoński

Łódź, 27 czerwca 1996 r.

ROZDZIAŁ 1

Metody pozyskiwania, hodowli, doskonalenia i przechowywania drobnoustrojów o znaczeniu przemysłowym

1.1. Ogólna charakterystyka drobnoustrojów wykorzystywanych w procesach biotechnologicznych

Mimo że od czasu stworzenia przez Ludwika Pasteura podstaw mikrobiologii i biotechnologii minęło już ponad półtora wieku, ocenia się, że znanych jest obecnie tylko 5% grzybów mikroskopijnych (grzybów strzępkowych i drożdży) oraz 12% gatunków eubakterii i archeonów, zdolnych do wzrostu w warunkach laboratoryjnych. Stwarza to duże pole do działania dla biologów, zwłaszcza mikrobiologów, tym bardziej że drobnoustroje charakteryzują się szeregiem cennych właściwości, korzystnych z punktu widzenia ich wykorzystania w procesach technologicznych:

- szybki, w stosunku do innych organizmów, przebieg procesów metabolicznych;
- poznany dobrze genom licznych gatunków drobnoustrojów i łatwość manipulacji genetycznych;
- dobrze opracowane sposoby hodowli w skali laboratoryjnej i przemysłowej;
- tanie i powszechnie dostępne składniki podłoży hodowlanych;
- różnorodność metabolizmu (z tych samych surowców, stosując różne szczepy drobnoustrojów, można uzyskać różne produkty);
- przystosowalność drobnoustrojów (stosując ten sam drobnoustrój, z różnych surowców można uzyskać ten sam produkt, np. w fermentacji alkoholowej – produkcja etanolu).

Do cech ograniczających wykorzystanie drobnoustrojów należy zaliczyć:

- wytwarzanie dużej biomasy i tym samym zużycie składników podłoża oraz koszty utylizacji biomasy i/lub płynu pochodowlanego;
- nieopłacalność produkcji większości substancji niskocząsteczkowych (za wyjątkiem przemysłu spożywczego oraz związków stosowanych w lecznictwie).

Przy izolowaniu mikroorganizmów z różnych środowisk, a następnie ocenianiu ich przydatności do wykorzystania w różnych procesach technologicznych, brane są pod uwagę nie tylko zdolność do syntezy, przekształcania czy degradacji różnych związków, ale również:

- właściwości pokarmowe (niskie wymagania odżywcze);
- właściwości temperaturowe (preferowane są szczepy termofilne, ze względu na brak konieczności chłodzenia hodowli prowadzonej w bioreaktorach o dużej objętości);
- typ procesu (hodowle ciągłe);
- brak szkodliwego oddziaływania mikroorganizmu z elementami urządzeń (korozja biologiczna);
- stabilność cech morfologicznych i biochemicznych;
- oporność na bakteriofagi i zakażenia bakteryjne;
- podatność na manipulacje genetyczne (pozyskiwanie na bazie szczepu wyjściowego mutantów oraz GMM);
- wysoka wydajność (na bazie konwersji substratu);
- wysoka produktywność (wydajność produktu w przeliczeniu na jednostkę czasu);
- odzysk produktu (koszty ekstrakcji oraz usuwania obecnych w ekstrakcie produktów ubocznych).

Analizując właściwości wyodrębnionych drobnoustrojów oraz ich przydatność do zastosowania w określonych procesach technologicznych, należy też pamiętać, że ten sam mikroorganizm (lub zespoły współdziałających ze sobą mikroorganizmów) może być przydatny w kilku różnych działach przemysłu czy ochronie środowiska, jak również być przyczyną poważnych szkód. Przykładem mogą być tzw. bakterie octowe z rodzaju *Acetobacter* i *Gluconobacter*, stosowane do produkcji kwasu octowego czy sorbozy, a jednocześnie stanowiące poważne zagrożenie w trakcie produkcji wina czy piwa. Inne, podobne przykłady przedstawiono w tab. 1.1.

Drobnoustroje (dominujące)	Zastosowanie w praktyce	Aktywność niekorzystna
<i>Claviceps purpurea</i>	biosynteza leków psychotropowych	zatrucie sporyszem („ogień św. Antoniego”)
Liczne gatunki <i>Bacillus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Flavobacterium</i> , <i>Streptomyces</i> , <i>Aspergillus</i>	produkcja kompleksów licznych, utylizacja odpadów przemysłu rolno-spożywczego, kompostowanie, oczyszczanie ścieków	rozkład surowców i produktów spożywczych
<i>Bacillus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Acinetobacter</i> <i>Micrococcus</i> , <i>Sphingomonas</i> <i>Mucor</i> , <i>Phanerochaete</i>	bioremediacja terenów skażonych substancjami ropopochodnymi, produkcja, biosurfaktantów	śluzowacenie i degradacja produktów naftowych (oleje, smary, benzyny)
<i>Bacillus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Trichoderma harzianum</i> , <i>Paecilomyces marquandii</i> , <i>Cunninghamella echinulata</i> , <i>Umbelopsis isabellina</i> , <i>Nectriella pironii</i> , <i>Myrothecium roridum</i>	biodegradacja toksycznych ksenobiotyków, w tym z grupy EDCs (<i>Endocrine Disruptig Compounds</i>), dekoloryzacja ścieków przemysłowych, biosynteza hydrolaz, lakaz i innych enzymów	korozja biologiczna materiałów budowlanych, zasobów bibliotecznych, wyposażenia wnętrz, choroby roślin

1.2. Pozyskiwanie drobnoustrojów przydatnych w procesach mikrobiologicznych

1.2.1. Przydatność różnych środowisk do izolacji drobnoustrojów wykorzystywanych w procesach przemysłowych

Tabela 1.1. Przykłady negatywnych i pozytywnych przejawów aktywności drobnoustrojów (z punktu widzenia zdrowia i działalności człowieka)

Drobnoustroje o określonych cechach metabolicznych są szeroko stosowane w nowoczesnych procesach biotechnologicznych. Głównym źródłem mikroorganizmów jest środowisko naturalne, a zwłaszcza gleba. Występujące w niej bakterie właściwe, promieniowce i grzyby mikroskopowe zdolne są do biosyntezy, rozkładu i biotransformacji wielu związków ważnych dla człowieka (antybiotyków, witamin, kwasów organicznych, związków steroidowych), a także eliminacji zanieczyszczeń, w tym toksycznych ksenobiotyków. Różnorodność genetyczna drobnoustrojów glebowych może być doskonałym źródłem szczepów o uznanych właściwościach biotechnologicznych, wykorzystywanych w nowoczesnych technologiach.

Poszukując szczepów przydatnych w procesach przemysłowych, należy również mieć na uwadze mniej typowe (ekstremalne) siedliska drobnoustrojów, np. zbiorniki wodne o dużym zasoleniu, wody jezior polarnych i wysokogórskich, gorące źródła,

okolice gejzerów. Izolując drobnoustroje z miejsc skażonych ksenobiotykami, takich jak np. składowiska odpadów przemysłowych, możemy pozyskać szczepy zdolne do ich detoksykacji i rozkładu. Większość nisz ekologicznych jest przydatnym rezerwuarem mikroorganizmów o unikatowych właściwościach, często bardzo cennych z biotechnologicznego punktu widzenia. Zwłaszcza mikroorganizmy zdolne do przeżycia w nietypowych, często ekstremalnych warunkach (ekstremofile), mogą być źródłem enzymów wykorzystywanych dla celów przemysłowych, leczniczych, naukowych (tab. 1.2.1).

Termofile (organizmy przystosowane do życia w temperaturze powyżej 80°C) są z powodzeniem wykorzystywane w różnych gałęziach przemysłu. Izolowane są najczęściej z terenów (gleb) wulkanicznych. Klasycznym przykładem jest *Thermus aquaticus* – producent termostabilnej polimerazy DNA, używanej do przeprowadzenia reakcji PCR. Bardzo dużo enzymów pozyskiwanych przy udziale tej grupy drobnoustrojów (np. proteazy, lipazy) jest stosowanych w przemyśle, np. spożywczym, chemicznym, galanterijnym. Również drobnoustroje bytujące w środowiskach o bardzo niskich temperaturach, takich jak obszary polarne, zimne wody oceaniczne, lodowce czy podziemne jaskinie (to mikroorganizmy psychrofilne) są źródłem enzymów, powszechnie stosowanych jako dodatek do proszków do prania, wykazujących aktywność w niskich temperaturach. Natomiast proteazy i lipazy, otrzymywane z psychrofilii, wykorzystywane są także w przemyśle spożywczym, np. do produkcji serów.

Kolejną grupą mikroorganizmów, zasiedlającą nietypowe środowiska, są mikroorganizmy acidofilne bytujące w środowiskach kwaśnych. Po raz pierwszy zostały one zidentyfikowane w wodach powstałych w procesie odwadniania kopalń. Ta grupa bakterii utlenia nieorganiczne związki siarki, pełniąc istotną rolę w cyklu geochemicznym tego pierwiastka. Znalazły one także praktyczne zastosowanie w górnictwie do odsiarczania węgla kamiennego czy do odzyskiwania rzadkich metali, w tym metali o znaczeniu strategicznym, np. uranu. Do omawianej grupy zalicza się również bakterie fermentacji mlekowej, które znalazły zastosowanie w przemyśle spożywczym i farmaceutycznym, np. probiotyki (podrozdział 4.2.2). Alkalofile – mikroorganizmy zamieszkujące środowiska o odczynie zasadowym – są bardzo

cennym źródłem proteaz wykorzystywanych w przemyśle spożywczym, produkcji środków czystości oraz amylaz stosowanych w przemyśle piwowarskim, spożywczym, piekarniczym. Ponadto, dzięki obecności reduktaz NO_2 i NO_3 , mogą być wykorzystywane w procesie oczyszczania silnie zasolonych ścieków.

1.2.2. Gleba jako źródło potencjalnych producentów związków biologicznie aktywnych

Gleba stanowi bogate i niewyczerpane źródło drobnoustrojów. W 1 g gleby uprawnej występuje około 10^6 – 10^8 komórek bakterii, 10^4 – 10^6 konidiów promieniowców, 10^2 – 10^4 zarodników grzybów. Mają one bardzo duże znaczenie w przebiegu cykli biogeochemicznych oraz mineralizacji resztek organicznych pochodzenia roślinnego i zwierzęcego, poprawiając jednocześnie żyzność (tworzenie próchnicy) i produktywność gleb. Mikroorganizmy glebowe wpływają także na funkcjonowanie ekosystemów oraz kondycję roślin. Ponadto, ze środowiska glebowego od lat izolowane są drobnoustroje o właściwościach stanowiących o ich przydatności biotechnologicznej.

Gleba jest naturalnym środowiskiem życia wielu gatunków drobnoustrojów. Składa się ona ze związków mineralnych i substancji organicznych (stanowiących 50% składu gleby), powietrza glebowego (około 35%) i roztworu glebowego (15%). W skład części stałej gleby wchodzi głównie koloidy glebowe. Najważniejszą funkcję pełnią koloidy organiczne (związki humusowe), które powstają na skutek rozkładu materii organicznej przez drobnoustroje. Koloidy mineralne natomiast decydują o stosunkach wodno-powietrznych. Wodę glebową, zawierającą rozpuszczone substancje organiczne i mineralne, nazywamy roztworem glebowym. Ta frakcja gleby ma właściwości buforowe i warunkuje pH gleby. Przestrzeń pomiędzy cząsteczkami stałymi gleby (niezajętymi przez roztwór glebowy) wypełnia powietrze glebowe. W skład powietrza glebowego wchodzi głównie NH_3 , CO_2 , N_2 i O_2 , w mniejszych ilościach również H_2S i CH_4 . Struktura gleby składa się z ziaren mineralnych, zlepionych przez związki humusowe i śluz, które tworzą gruzełki o wielkości 0,5–5 mm. Drobnoustroje znajdują się na powierzchni gruzełek w substancjach humusowych, a także w kompleksach organiczno-mineralnych.

Bogata mikrobiota jest obecna także w częściowo rozłożonej materii organicznej. Z gruzełek glebowych zbudowane są większe skupiska, tzw. agregaty glebowe. Na ich zewnętrznej części obecne są głównie bakterie przetrwalnikujące, promieniowce i grzyby strzępkowe. W części wewnętrznej bytują bakterie asymilujące mineralne związki azotu, inne bakterie, głównie Gram-ujemne oraz pleśnie z rodzaju *Fusarium*.

Mikrobiota gleby jest bardzo bogata i zależy od typu gleby, w tym składu chemicznego (związki nieorganiczne i organiczne), pH, dostępności tlenu, wilgotności, temperatury, głębokości, strefy geograficznej, obecności roślin. Ogólnie mikrobiotę gleby dzielimy na: mikrobiotę autochtoniczną (stale bytującą w danej glebie) oraz mikrobiotę zymogenną (wprowadzaną okresowo). Źródłem węgla i energii dla mikrobioty autochtonicznej są substancje humusowe (związki powstałe z rozkładu materii organicznej pochodzenia roślinnego i zwierzęcego). Rozwój mikrobioty zymogennej zależy jest od dopływu z zewnątrz łatwo przyswajalnej materii organicznej.

Grzyby strzępkowe oraz znaczna część bakterii preferują środowiska wilgotne. W glebach przesuszonych rozwijają się drobnoustroje o niskim zapotrzebowaniu na wodę – są to mikroorganizmy kserofilne. Promieniowce, a także bakterie nityfikacyjne z rodzaju *Arthrobacter* również zasiedlają suche podłoża (grunty). Gleby podmokłe, które mają ograniczoną ilość substancji pokarmowych i tlenu, obfitują w drobnoustroje względnie i bezwzględnie beztlenowe (mikroorganizmy anaerobowe). Różnorodność mikrobioty gleby zależy również od temperatury. Najlepszą porą roku do izolacji drobnoustrojów jest wiosna. Zimą mikrobiota gleby jest znacznie ograniczona. Istotnym parametrem, decydującym o rozwoju drobnoustrojów w glebie, jest też jej odczyn. Gleby o odczynie alkalicznym lub obojętnym zawierają kilkakrotnie większą liczbę drobnoustrojów w porównaniu do gleb kwaśnych (np. torfowisk). Gleba żyzna, bogata w substancje próchnicze, również charakteryzuje się bogatą mikrobiotą w porównaniu do zbitych gleb łąkowych.

Drobnoustroje są bardzo wrażliwe na słońce (promienianie UV) i wiatr (wysuszenie), dlatego też na powierzchni gleby jest ich zdecydowanie mniej. Najwięcej drobnoustrojów

jest w strefie przykorzeniowej (ryzosferze) i na powierzchni korzeni (ryzoplane). Natomiast w głębszych warstwach gleby (1–2 m pod powierzchnią ziemi) liczba drobnoustrojów jest znacznie mniejsza.

1.2.3. Skrining drobnoustrojów

W celu pozyskania nowych szczepów ze środowiska opracowano specjalne metody skringowe. Skrining możemy zdefiniować jako zespół selektywnych procedur mających na celu wyizolowanie spośród dużej liczby drobnoustrojów tylko tych, które spełniają konkretne wymagania technologiczne. Skrining obejmuje także wstępną ocenę ich przydatności do danego procesu, np. ocenę potencjału biodegradacyjnego. W początkowym etapie skringingu mamy do czynienia z drobnoustrojami o nieokreślonej przynależności systematycznej, wśród których mogą być również szczepy patogenne. Zazwyczaj szczepy wyizolowane bezpośrednio ze środowiska wytwarzają niewielkie ilości interesujących nas metabolitów. Dopiero po ich udoskonaleniu, z zastosowaniem technik genetycznych i mikrobiologicznych (patrz podrozdział 1.6), uzyskuje się szczepy wykorzystywane w skali przemysłowej. Skuteczną i prostą techniką służącą do izolacji drobnoustrojów jest metoda selektywnego namnażania kultur. W tym przypadku stosuje się ściśle zdefiniowane podłoża i określone warunki hodowli, tj. skład podłoża, temperatura, pH, ciśnienie osmotyczne, dostępność światła, dostępność tlenu, które umożliwiają wzrost konkretnej grupie mikroorganizmów (tab. 1.2.1).

Warunki hodowli	Rodzaj izolowanych drobnoustrojów
Ekstremalnie kwaśny odczyn (pH 2–4)	acidofile
Niska temperatura (4–15°C)	psychrofile
Wysoka temperatura (42–100°C)	termofile
Wysokie stężenie NaCl	<i>Nocardia</i> , halofile
Brak tlenu	beztlenowce
Chityna jako substrat wzrostu	<i>Lysobacter</i>
Kora drzewa, korzenie	myksobakterie
Pyłki zbóż	<i>Actinoplanes</i>
Podłoża z dodatkiem metali ciężkich	drobnoustroje akumulujące metale ciężkie

Tabela 1.2.1. Sposoby stymulacji wzrostu wybranych grup drobnoustrojów przez dobór odpowiednich warunków hodowli

Poszukiwanie drobnoustrojów o pożądanых cechach może być też przyspieszone przez wysiew pobranych próbek z przygotowanego wyciągu bezpośrednio na płytce z podłożem różnicującym, umożliwiającym izolację mikroorganizmów o określonej aktywności metabolicznej (tab. 1.2.2).

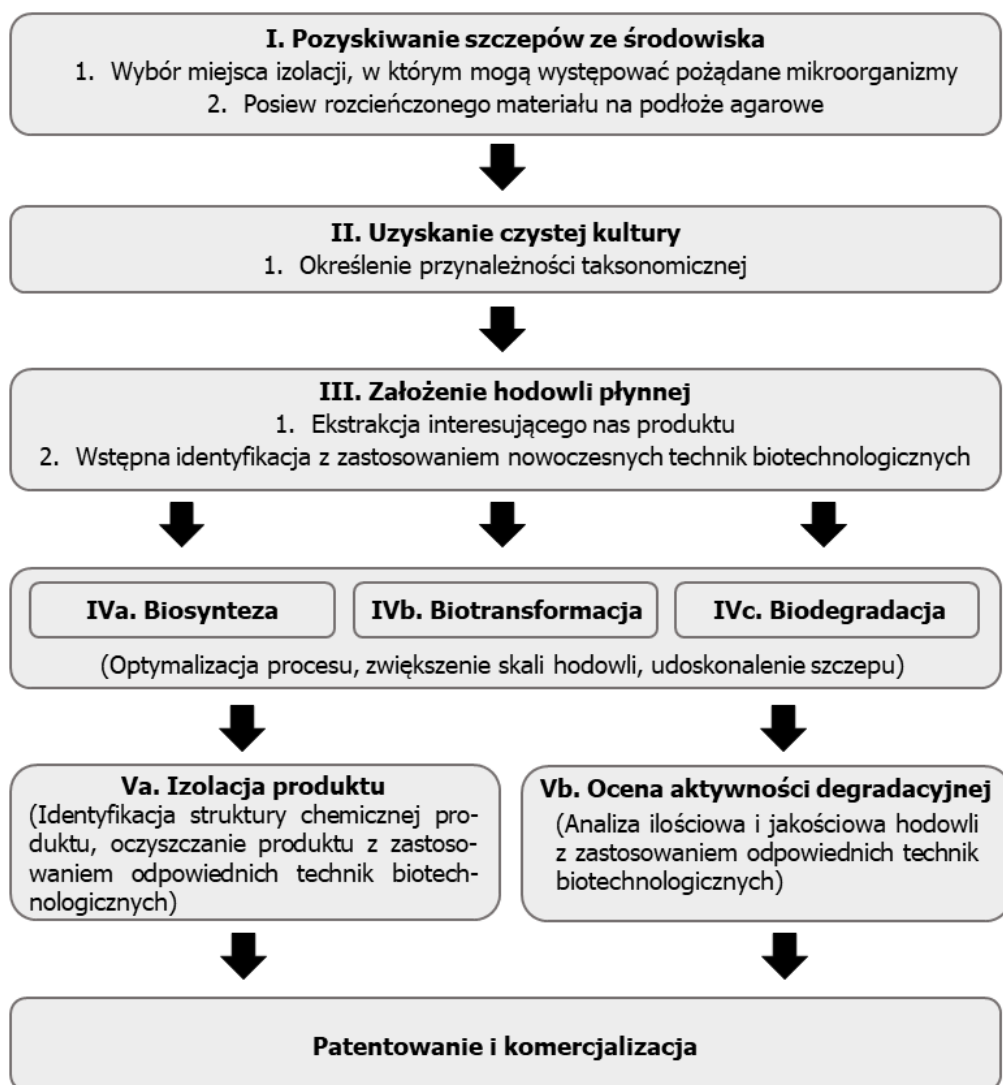
Tabela 1.2.2. Przykłady metod sprzyjających pozyskaniu mikroorganizmów o określonych aktywnościach metabolicznych

Producenci	Zasady wstępnej selekcji
antybiotyków	Wysiew na płytce agarowej ze szczepami testowych mikroorganizmów, np. <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Penicillium avelaneum</i> . Strefy zahamowania wzrostu są wskaźnikiem aktywności.
antybiotyków opornych na β-laktamazę	Posiew na płytce agarowej z dodatkiem β-laktamazy.
proteaz	Posiew na płytce agarowej z kazeiną. Selekcjonuje się kolonie, które wytwarzają strefy przejaśnienia w podłożu.
amylaz	Posiew na płytce agarowej ze skrobią. Wybór kolonii po barwieniu płynem Lugola (J/KJ).
lipaz	Posiew na płytce agarowej z dodatkiem zemulgowanego oleju. Selekcja kolonii po wytrąceniu wolnych kwasów tłuszczowych z jonami wapnia.
fosfataz	Posiew na płytce agarowej z difosforanem fenoloftaleiny. Wybór na podstawie zmiany barwy podłoża wokół kolonii.
celulaz	Posiew na płytce agarowej z dodatkiem fosfocelulazy. Selekcja kolonii wytwarzających przezroczyste strefy aktywności enzymu.
pektynaz	Posiew na płytce agarowej z dodatkiem pektyn. Selekcja kolonii wytwarzających jasne strefy na opalizującym tle – reakcja z roztworem TBA (bromku cetylotrimetyloamonowego).
Drobnoustroje rozkładające ksenobiotyki	Posiew na płytce agarowej z wybranym ksenobiotykiem stanowiącym jedyne lub główne źródło węgla i energii. Analiza wyrosłych kolonii pod kątem ich aktywności degradacyjnej.

Początkowy etap skryningu obejmuje dobór miejsca pobrania próbek i sposobu izolacji mikroorganizmów z użyciem odpowiednich podłoży selekcyjnych. Jeżeli poszukujemy bakterii wytwarzających proteazy, to dogodnym miejscem pobrania próbek mogą być m.in. tereny wokół zakładów przemysłowych wytwarzających znaczne ilości odpadów zawierających białka, np. mleczarnie, zakłady mięsne. W dalszym etapie izolowane są czyste kultury drobnoustrojów, na bazie których zakłada się hodowle płynne i przeprowadza wstępną ocenę przydatności wyizolowanych szczepów do wykorzystania w określonym procesie technologicznym. W przypadku uzyskania pożądanego przez

nas produktu przeprowadza się optymalizację procesu, często połączoną z udoskonalaniem wyizolowanego szczepu oraz zwiększeniem skali hodowli. Końcowe etapy skringingu obejmują oczyszczanie produktu (o ile zachodzi taka konieczność), opatentowanie istotnych (kluczowych) etapów produkcji i komercjalizacja uzyskanych rezultatów badań. Zasadnicze etapy skringingu przedstawiono na ryc. 1.2.1.

Ryc. 1.2.1. Etapy pozyskiwania drobnoustrojów przydatnych w procesach biotechnologicznych



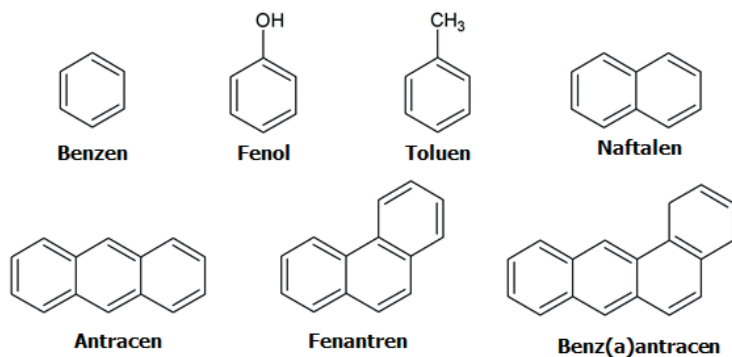
1.2.4. Gleba środowisk zanieczyszczonych jako źródło drobnoustrojów wykorzystywanych w procesach ochrony środowiska

W następstwie intensywnego rozwoju przemysłu obserwuje się znaczny wzrost zanieczyszczenia środowiska, które wywiera bardzo duży wpływ na skład i bioróżnorodność gleby. Duża część gatunków mikroorganizmów, bytujących w glebie, ma zdolność do biodegradacji zanieczyszczeń szkodliwych dla człowieka, np. toksycznych ksenobiotyków. Aktywność degradacyjna drobnoustrojów zależy przede wszystkim od bioróżnorodności środowiska, ale także od parametrów fizykochemicznych (temperatura, natlenienie, pH, dostępność związków odżywczych). Spośród wszystkich zanieczyszczeń szczególne zagrożenie stanowią węglowodory aromatyczne. Wykazują one właściwości silnie toksyczne i kancerogenne. Skażenie produktami ropopochodnymi jest największe w okolicach rafinerii, stacji paliw, lotnisk, autostrad, linii kolejowych oraz stacji diagnostycznych, warsztatów naprawczych i myjni pojazdów samochodowych. Niemniej istotne jest skażenie przez węglowodory aromatyczne i inne substancje szkodliwe terenów zieleni miast – i związana z tym rewitalizacja obszarów zdegradowanych. Zagadnienia te zostały bliżej omówione w podrozdziale 5.1 podręcznika. Produkty ropopochodne, zwłaszcza związki o budowie wielopierścieniowej, są substancjami trudno rozkładalnymi, część z nich może zalegać w środowisku przez wiele lat. Utylizacja tych związków następuje głównie w wyniku działania drobnoustrojów. Dlatego poszukiwanie szczepów zdolnych do wykorzystywania substancji ropopochodnych jako źródeł węgla i energii lub przetwarzania ich do produktów nieszkodliwych dla środowiska jest bardzo ważnym zadaniem współczesnej biotechnologii środowiskowej.

Wzory chemiczne wybranych węglowodorów aromatycznych przedstawiono na ryc. 1.2.2.

Szybkość degradacji tych związków zależy od liczby pierścieni aromatycznych w cząsteczce. Obecnie znanych jest wiele mikroorganizmów zdolnych do degradacji węglowodorów o niskiej masie cząsteczkowej, natomiast biotransformacja wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA) o dużej masie cząsteczkowej jest mniej poznana. Węglowodory aromatyczne mogą być całkowicie rozkładane (mineralizowane) lub jedynie

częściowo przekształcane przez konsorcja mikroorganizmów, rzadziej przez pojedyncze gatunki czy szczepy.



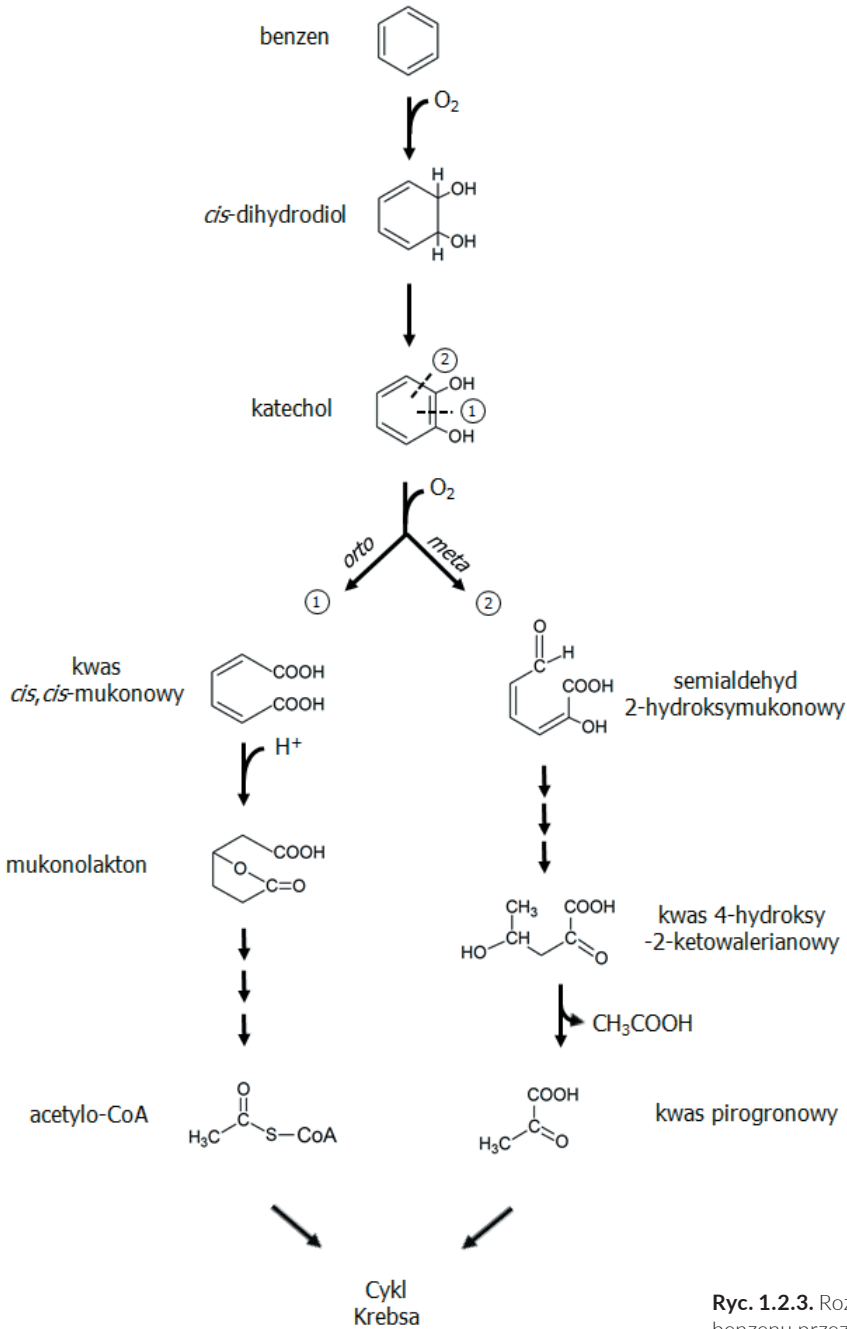
Ryc. 1.2.2. Przykłady węglowodorów aromatycznych

Mikroorganizmy prokariotyczne w degradacji węglowodorów aromatycznych wykorzystują najczęściej dioksygenazy, które wprowadzają dwa atomy tlenu do pierścienia aromatycznego. Następnie przez dehydrogenację powstają pochodne dihydroksylowe (katechole). Pierścień katecholu, kluczowego metabolitu pośredniego, ulega następnie rozszczepieniu w pozycji *orto* lub *meta*. W kolejnych reakcjach powstają metabolity, które są włączane do cyklu Krebsa (ryc. 1.2.3).

Niektóre mikroorganizmy, takie jak grzyby strzępkowe, są zdolne do biotransformacji węglowodorów aromatycznych do produktów pośrednich. Organizmy te wykorzystują monoksygenazy zawierające cytochrom P-450, które wprowadzają jeden atom tlenu do pierścienia aromatycznego. Powstały epoksyd jest następnie przekształcany do fenolu lub dihydrodiolu, te zaś mogą być sprzęgane w koniugaty ze związkami polarnymi, takimi jak glukoza, kwas glukuronowy, ksylloza (ryc. 1.2.4).

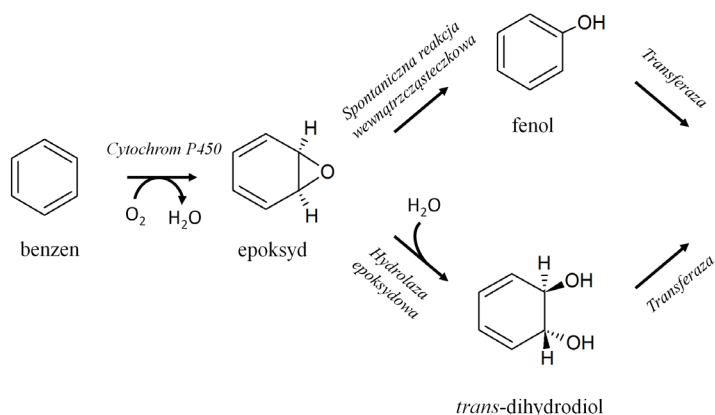
Ponadto, procesy biotransformacji WWA zarówno u grzybów, jak i bakterii mogą być katalizowane przez enzymy utleniająco-redukujące, takie jak lakazy czy peroksydazy. Mechanizm tych reakcji został opisany w podrozdziale 5.11.

O podatności węglowodorów na rozkład biochemiczny decyduje nie tylko budowa chemiczna produktów ropopochodnych. Spośród innych czynników wpływających na ten proces można wymienić m.in. rozpuszczalność substratu oraz wytwarzanie



Ryc. 1.2.3. Rozkład benzenu przez bakterie

przez mikroorganizmy substancji powierzchniowo czynnych, procesy adsorpcji węglowodorów, ilość drobnoustrojów, stężenie związków biogenywnych azotu i fosforu, stężenie węglowodorów, odczyn (pH), wilgotność, temperaturę, zawartość tlenu, obecność innych aniżeli węglowodory źródeł węgla dla drobnoustrojów, obecność związków toksycznych.



Ryc. 1.2.4.
Biotransformacja
benzenu przez grzyby
strzępkowe

Tworzenie koniugatów ze
związkami polarnymi
(np. glukozą, kwasem
glukuronowym,
siarczanem, GSH)

Tylko niewielka liczba bakterii glebowych (0,01–0,3%) jest zdolna do wykorzystania węglowodorów jako jedynych źródeł węgla i energii. Metody skriningu mają bardzo duże zastosowanie w izolowaniu mikroorganizmów zdolnych do rozkładu toksycznych ksenobiotyków. Najprostszym sposobem jest pobranie próbki gleby i wykonanie posiewu z odpowiednich rozcieńczeń na podłoża selektywne z dodatkiem ksenobiotyków jako źródła węgla i energii. Wyrosłe kolonie są następnie izolowane i sprawdzane pod kątem ich aktywności degradacyjnych.

CZĘŚĆ PRAKTYCZNA

Materiały i podłoża

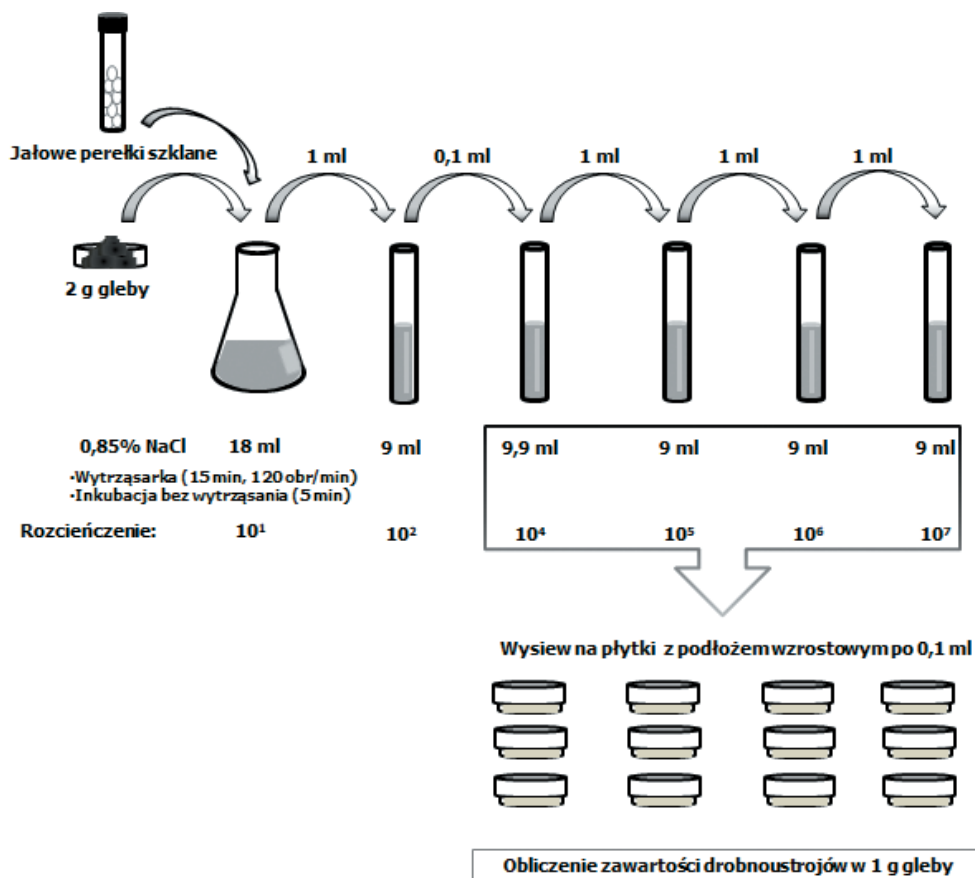
1. Źródło izolowanych bakterii: gleba ogrodowa, łąkowa, a także próbki gleb pobrane z okolic: mleczarni, stacji benzynowej lub autostrady.
2. Drobnoustroje:
 - a) szczepy wyizolowane z próbek gleby;
 - b) szczepy wzorcowe bakterii: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442.
3. Podłoża stałe: agarowe, ZT, uniwersalne, maltozowe, uniwersalne z dodatkiem antracenu i fenantrenu (0,1 g/l), podłoże z mlekiem, podłoże ze skrobią, podłoże z Tween 80.
4. Odczynniki: antracen, fenantren.
5. Aparatura: chromatograf gazowy Agilent GC7890 z dołączonym spektrometrem masowym MS5975C.

Cel ćwiczenia

Uzyskanie szczepów drobnoustrojów zdolnych do biosyntezy substancji aktywnych biologicznie oraz do rozkładu związków ropopochodnych.

Wykonanie

1. Sporządzić wyciąg z gleby.
Odważyć 2 g gleby, przenieść do kolby o pojemności 100 ml, zawierającej 20 ml 0,85% roztworu NaCl oraz dodać jałowe szklane perełki. Inkubować na wytrząsarce przez 0,5 h w temperaturze pokojowej. Po zakończeniu inkubacji należy odczekać 2–3 minuty aż do opadnięcia większych cząstek gleby.
2. Wykonać szereg rozcieńczeń wyciągu z gleby w 0,85% roztworze NaCl według schematu:



- Wysiewać z odpowiednich rozcieńczeń wyciągu glebowego (ryc. 1.2.5) po 0,1 ml na płytki z podłożem: agarowym, ZT, agarowym z antracenenem lub fenantrenem (0,1g/l), podłoże z mlekiem, podłoże z Tween 80, podłoże ze skrobią.

Z każdego rozcieńczenia należy wysiać po 2 powtórzenia. Płytki inkubować 48 h w temp. 28°C.

- Przeprowadzić obserwację makroskopową posiewów, obliczyć liczbę drobnoustrojów w 1 g gleby.
- Izolacja pojedynczych kolonii drobnoustrojów:
 - wytwarzających proteazy (przejaśnienia wokół kolonii na płytkach z podłożem zawierającym mleko); pojedyncze kolonie należy przenieść na świeże płytki z mlekiem i wykonać posiew redukcyjny;

Ryc. 1.2.5. Szereg rozcieńczeń wyciągu z gleby

b) promieniowców; pojedyncze kolonie należy przenieść na płytki maltozowe i posiać w postaci rysy. Po 7 dniach zbadać właściwości antagonistyczne wybranych promieniowców glebowych w stosunku do bakterii testowych: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*;

c) potencjalnie zdolnych do rozkładu związków ropopochodnych (antracenu i fenantrenu); pojedyncze kolonie należy przenieść na podłoże uniwersalne.

Dodatkowo należy wykonać preparat mikroskopowy izolowanego drobnoustroju.

Izolaty drobnoustrojów zdolnych do wytwarzania enzymów proteolitycznych, wytwarzających substancję o działaniu antagonistycznym w stosunku do testowanych bakterii należy zabezpieczyć do kolejnych badań.

- 6.** Ocena aktywności enzymów proteolitycznych drobnoustrojów wyizolowanych z gleby (patrz podrozdział 4.1.3).
- 7.** Ocena aktywności substancji, o działaniu antagonistycznym w stosunku do testowanych bakterii, wytwarzanych przez drobnoustroje wyizolowane z gleby (patrz podrozdział 4.1.5).
- 8.** Ocena zdolności wyizolowanych szczepów (bakterii i grzybów strzępkowych) do rozkładu związków ropopochodnych:

a) posiew wybranych kolonii z płytek na skosy uniwersalne (bakterie) i ZT (grzyby);

b) posiew z podłoża płynnego (10% inokulum) szczepów wyizolowanych z gleby – do 20 ml podłoża uniwersalnego z dodatkiem antracenu lub fenantrenu w stężeniu 0,5 g/l.

Inkubacja 96 h w temp. 28°C (grzyby) i 30°C (bakterie);

c) ekstrakcję wykonać z użyciem octanu etylu. Odparowany ekstrakt przygotować do oznaczeń chromatograficznych (patrz podrozdział 5.6.6);

d) analizę chromatograficzną dla prób wyekstrahowanych z użyciem octanu etylu i zatężonych pod obniżonym ciśnieniem wykonać, stosując chromatograf gazowy z dołączonym spektrometrem masowym

GC/MS (Agilent GC 7890 i MS 5975C) na kolumnie HP 5 MS (30 m × 0,25 mm × 0,25 mm) w zakresie temperatur 80–300°C (patrz podrozdział 2.3) przy przepływie helu 1 ml/min.

Analiza wyników

Na podstawie przeprowadzonych analiz ocenić przydatność wyizolowanych drobnoustrojów do:

- produkcji enzymów proteolitycznych;
 - wytwarzania substancji o działaniu antagonistycznym;
 - degradacji związków ropopochodnych.
-

1.3. Metody hodowli oraz stabilizacji drobnoustrojów w warunkach tlenowych (z uwzględnieniem bioreaktorów i immobilizacji w żelach)

WPROWADZENIE

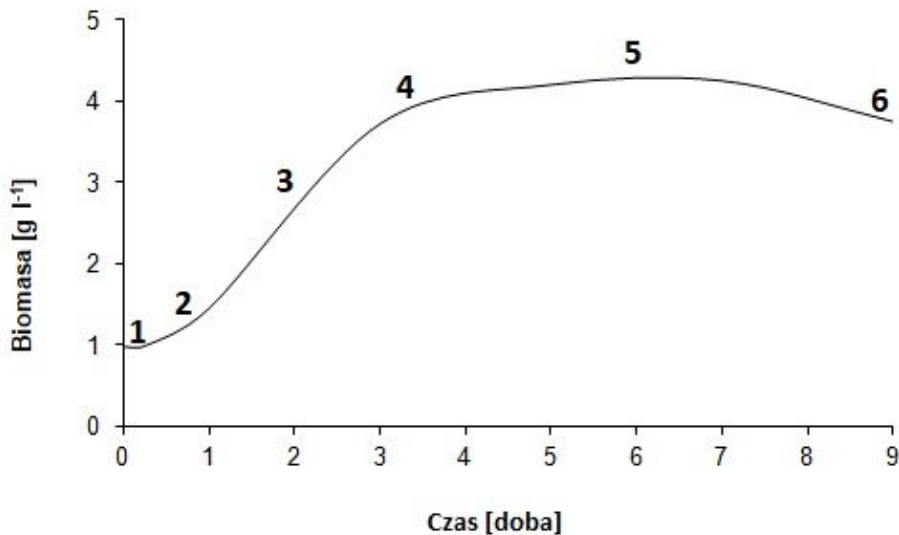
Znajomość fizjologii drobnoustrojów, w tym fizjologii wzrostu, jest niezbędna do prawidłowego kontrolowania procesów technologicznych, w których wykorzystywane są drobnoustroje. W biotechnologii do hodowli szczepów przemysłowych mogą być wykorzystywane metody powierzchniowe lub wgłębne. Ze względu na konieczność dysponowania stosunkowo dużą powierzchnią pomieszczeń produkcyjnych i zazwyczaj mniejszą wydajnością procesu technologicznego, metody powierzchniowe są obecnie rzadko stosowane. Do hodowli wgłębnych stosowane są bioreaktory (fermentory), które są zamkniętymi hermetycznie naczyniami wykonanymi z metalu i/lub szkła (fermentory laboratoryjne), pozwalającymi na prowadzenie pełnej kontroli procesu wzrostu i wytwarzania produktów przez drobnoustroje. W skali laboratoryjnej stosuje się fermentory o objętości od kilkudziesięciu mililitrów do kilkunastu litrów. W przemyśle stosowane są bioreaktory nawet o objętości 200 tys. litrów i większe. W warunkach laboratoryjnych, na etapie namnażania inokulum, do hodowli wgłębnej stosowane są także kolby szklane o objętości do kilku litrów. W procesach biotechnologicznych oprócz

drobnoustrojów wolno zawieszonych w podłożu często wykorzystuje się komórki „uwięzione” w żelach. Stosowanie hodowli immobilizowanych pozwala na ich użycie w kilku lub nawet w kilkunastu cyklach produkcyjnych, co obniża wydatnie koszty procesu technologicznego. Hodowle drobnoustrojów w warunkach tlenowych w podłożach płynnych można podzielić na trzy podstawowe typy: okresową, okresową z ciągłym dozowaniem pożywki i ciągłą.

1.3.1. Hodowla okresowa

Hodowla okresowa (ang. *batch culture*) jest układem zamkniętym. Polega ona na przygotowaniu jałowego podłoża hodowlanego z dodanym inokulum i prowadzeniu hodowli w fermentorze przez określony okres. Od momentu rozpoczęcia inkubacji obserwuje się zmiany w ilości biomasy mikroorganizmów (ryc. 1.3.1).

Ryc. 1.3.1.
Przykładowa
hodowla okresowa
drobnoustrojów
w czasie



Wzrost drobnoustrojów jest opisywany przez 6 etapów. W fazie zastoju (lag-faza) nie obserwuje się przyrostu biomasy, ten czas drobnoustroje wykorzystują na adaptację do nowego środowiska. W fazie przyspieszenia wzrostu następuje coraz szybszy

przyrost w ilości biomasy, aż przechodzi do osiągnięcia tempa wykładniczego (faza wykładnicza lub wzrostu logarytmicznego). Podczas tego etapu wzrost drobnoustroju osiąga największe wartości. Ponieważ po pewnym czasie w układzie hodowlanym zaczyna brakować substratu wzrostowego, jak również mogą pojawiać się toksyczne produkty przemiany materii, namnażanie drobnoustroju ulega spowolnieniu (faza zahamowania wzrostu), aby w kolejnym etapie ulec całkowitemu zahamowaniu (faza stacjonarna). W trakcie tego okresu wzrost drobnoustroju obserwowana jest największa ilość biomasy w układzie. Wraz z brakiem substancji odżywczych i coraz większym nagromadzeniem toksycznych metabolitów hodowla wchodzi w fazę śmierci (zamierania) powiązaną ze spadkiem ilości biomasy w układzie. Szybkość wzrostu drobnoustroju opisuje równanie:

$$r_x = \mu X$$

gdzie:

- r_x – rzeczywista szybkość wzrostu,
- μ – właściwa szybkość wzrostu,
- X – zawartość biomasy w hodowli.

Współczynnik μ , nazywany także specyficznym współczynnikiem wzrostu, można zdefiniować jako stosunek szybkości przyrostu biomasy do już istniejącej. Najczęściej jego jednostką jest h^{-1} .

Faza wzrostu	Właściwa szybkość wzrostu
Przygotowawcza	$\mu = 0$
Przyspieszonego wzrostu	$\mu < \mu_{max}$
Wykładnicza	$\mu = \mu_{max}$
Zahamowania wzrostu	$\mu < \mu_{max}$
Stacjonarna	$\mu = 0$
Zamierania	$\mu < 0$

Tabela 1.3.1.
Współczynnik wzrostu w zależności od fazy wzrostu

Ponieważ w fazie wykładniczej wzrost drobnoustroju przebiega z największą prędkością, substrat jest łatwo dostępny i powstałe metabolity nie wpływają negatywnie na wzrost (panują optymalne warunki), to przyrost biomasy osiąga swoją

największą wartość $\mu_{\max}$. Bilans biomasy dla tego typu hodowli opisywany jest następująco:

$$\frac{dx}{dt} = \mu X$$

W fazie wykładniczej, dla wartości $\mu = \mu_{\max}$:

$$X = X_0 e^{\mu_{\max}(t - t_0)}$$

Wzrost drobnoustroju można także wyrazić parametrem – czas podwojenia biomasy (t_d). Korzystając z założenia, że:

$$2 X_0 = X_0 e^{\mu_{\max} t_d}$$

doprowadzamy do zależności $\ln 2 = \mu_{\max} t_d$, czyli $t_d = \frac{\ln 2}{\mu_{\max}}$

Najprostszy sposób wyznaczenia $\mu_{\max}$ w hodowli polega na obserwacji zmian ilości biomasy w czasie, przygotowaniu wykresu w układzie $\ln X$ – czas hodowli. Dla zidentyfikowanej fazy wykładniczej wyznaczamy dwa punkty $t_1 X_1$ oraz $t_2 X_2$ i stosując wzór:

$$\mu_{\max} = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{t_2 - t_1}$$

obliczamy $\mu_{\max}$ [h^{-1}].

Przyrost biomasy drobnoustroju powiązany jest z utylizacją znajdującego się w podłożu hodowlanym substratu. Parametrem opisującym stosunek przyrostu biomasy do ilości zużytego substratu jest masowy współczynnik wydajności Y_{xs} :

$$Y_{xs} = \frac{\Delta X}{-\Delta S} = \frac{X - X_0}{-(S - S_0)}$$

dla X_0 , S_0 opisujących początkowe stężenie biomasy i substratu.

Zalety hodowli okresowej:

- krótki czas hodowli ułatwia utrzymanie jałowych warunków oraz zapobiega mutacjom;
- prostota przygotowania hodowli.

Wady:

- brak regulacji stężenia substratu oraz niska wydajność procesu.

1.3.2. Hodowla półciągła – okresowa z ciągłym dozowaniem pożywki do fermentora (ang. *fed-batch culture*)

W przeciwieństwie do hodowli okresowej, podczas inkubacji następuje zwiększenie objętości czynnej bioreaktora. Taki typ prowadzenia procesu zaprojektowano dla hodowli, w których niskie stężenie substratu jest niezbędne dla otrzymania dużej ilości produktu (np. synteza antybiotyków) i proces ten może zachodzić podczas fazy zahamowania wzrostu lub fazy stacjonarnej. Tego typu hodowle są często stosowane warunkach przemysłowych.

Zalety:

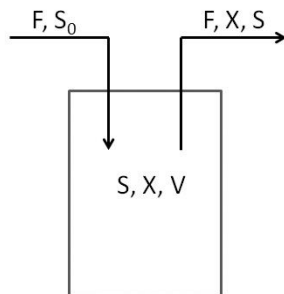
- możliwość regulacji parametrów hodowli ze względu na rodzaj drobnoustroju i otrzymywanego produktu oraz składu podłoża hodowlanego.

Wady:

- możliwość zakażenia pożywki oraz degeneracji szczepu.

1.3.3. Hodowle ciągłe (ang. *continuous culture*)

Po wstępnym namnożeniu drobnoustrojów hodowle ciągłe prowadzone są w bioreaktorze przepływowym zasilanym pożywką. Do bioreaktorów w sposób ciągły doprowadza się jałową pożywkę o natężeniu przepływu F i jednocześnie dla tego samego przepływu odbiera się płyn hodowlany ze zbiornika, zachowując stałą objętość cieczy (ryc. 1.3.2).



Ryc. 1.3.2. Schemat chemostatu

Objaśnienia:

F – objętościowe

natężenie przepływu;

S_0 – stężenie substratu

w dozowanej

pożywce; S – stężenie

substratu w podłożu

hodowlanym;

X – zawartość biomasy

w hodowli;

V – objętość hodowli

Ze względu na typ prowadzonej hodowli ciągłej wyróżnia się dwa podstawowe rodzaje:

- turbidystat – w tym modelu drobnoustroje mogą rosnąć z maksymalną szybkością, ponieważ zawartość biomasy

jest utrzymana na stałym poziomie, a ilość doprowadzonego podłoża zależy od szybkości wzrostu;

- chemostat – parametrem odgrywającym decydującą rolę w chemostacie jest szybkość rozcieńczania D , zależna od objętościowego natężenia przepływu F i objętości hodowli V :

$$D = \frac{F}{V}$$

W warunkach ustalonych, kiedy szybkość odprowadzania biomasy z bioreaktora jest równa szybkości jej przyrostu w aparacie $\mu = D$. Warunek ten można wyprowadzić z bilansu biomasy dla chemostatu.

$$\begin{aligned} \frac{d(VX)}{dt} &= FX_0 - FX + r_x V \\ X \frac{dV}{dt} + V \frac{dX}{dt} &= FX_0 - FX + r_x V : V \end{aligned}$$

Brak zmiany objętości zbiornika:

$$\frac{dX}{dt} = \frac{F}{V}(X_0 - X) + r_x$$

gdzie $X_0 = 0$ i brak jest zmiany zawartości biomasy:

$$\begin{aligned} \frac{dX}{dt} &= -DX + \mu X \\ D &= \mu \end{aligned}$$

Dla sytuacji, gdy $\mu < D$ następuje wymywanie biomasy ze zbiornika, a w przypadku $\mu > D$ biomasa gromadzona jest w zbiorniku.

Zależność pomiędzy szybkością wzrostu a stężeniem substratu limitującego wzrost opisuje równanie Monoda:

$$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{K_s + S}$$

gdzie K_s – stała nasycenia substratem dla takiego stężenia substratu, przy którym $\mu = \mu_{\max}/2$.

Dla warunku $\mu = D$ równanie Monoda ulega modyfikacji i stężenie substratu w zbiorniku wynosi:

$$S = \frac{DK_s}{\mu_{\max} - D}$$

Biorąc pod uwagę tę zależność oraz opierając się na stałej wartości masowego współczynnika wydajności Y_{XS} :

$$Y_{XS} = \frac{\frac{dX}{dt}}{\frac{dS}{dt}}$$

uzyskuje się zależność stężenia substratu i zawartości biomasy od szybkości rozcieńczania:

$$X = Y_{XS} \left(S_0 - \frac{DK_s}{\mu_{\max} - D} \right)$$

gdzie S_0 – stężenie substratu w jałowej pożywce wprowadzanej do hodowli.

Szybkość wzrostu drobnoustroju i ilość biomasy w strumieniu wylotowym jest powiązana z natężeniem przepływu, dlatego jego maksymalną wartość dla sytuacji, gdy $S = S_0$ opisuje równanie:

$$D_{\max} = \frac{\mu_{\max} S_0}{K_s + S_0}$$

W przypadku, gdy $D > \mu_{\max}$, następuje proces wymywania biomasy (z ang. *wash-out*). Warto także zwrócić uwagę, że dla większości hodowli K_s ma dużo niższe wartości niż stężenie substratu wprowadzane z jałową pożywką, czyli $D_{\max} = \mu_{\max}$.

Kolejny parametr opisujący hodowlę ciągłą to produktywność, wyrażana wzorem $Q_x = DX$. Maksymalna produktywność ma miejsce dla szybkości rozcieńczania:

$$D_{opt} = \mu_{\max} \left(1 - \sqrt{\frac{K_s}{K_s + S_0}} \right)$$

Zalety hodowli ciągłych:

- preferowane są dla otrzymywania biomasy i metabolitów pierwotnych;
- użycie mniejszych bioreaktorów w porównaniu do hodowli okresowych.

Wady:

- zagrożenie zakażeniem i możliwością mutacji u stosowanych drobnoustrojów ze względu na długi czas pracy;
- nie jest raczej stosowany dla grzybów strzępkowych.

1.3.4. Bioreaktory do hodowli wgłębnych

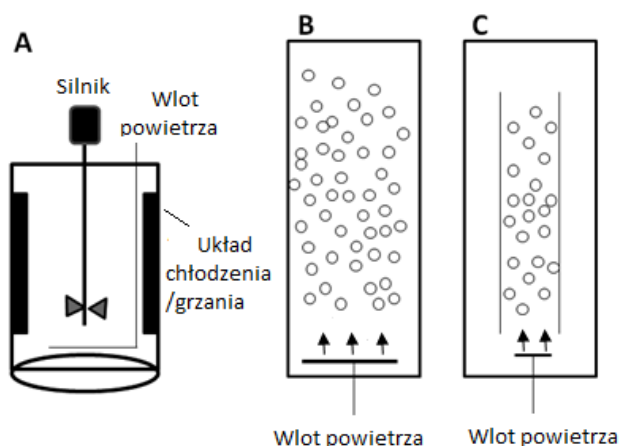
Podstawowym urządzeniem stosowanym do hodowli drobnoustrojów w warunkach przemysłowych jest bioreaktor. Najczęściej jest to cylindryczne naczynie o różnej pojemności, napowietrzaniu i/lub mieszaniu mechanicznym (ryc. 1.3.3). Pojemność bioreaktorów jest bardzo zróżnicowana i wynosi od kilku mililitrów do kilku tysięcy litrów w zależności od zastosowań. W bioreaktorach hodowane są komórki drobnoustrojów, a także roślinne, zwierzęce i struktury subkomórkowe.

Bioreaktory do hodowli beztlenowych zazwyczaj są bardzo prostymi konstrukcjami pozbawionymi napowietrzania i często mieszania. Bardziej skomplikowanymi urządzeniami są bioreaktory do hodowli tlenowych. Wyróżnia się tu przede wszystkim bioreaktory z mieszaniem mechanicznym. Zastosowanie mieszadeł turbinowych (najczęściej używanych), łopowych lub śmigłowych umożliwia utrzymanie podobnych parametrów hodowli w całej objętości zbiornika. Dokładny typ użytego mieszadła zależy od rodzaju biokatalizatora. Znajdujące się po bokach zbiornika przegrody zaburzają tworzenie się wirów, a tlen wraz z powietrzem dostarczany jest najczęściej przez zastosowanie bełkotki, dyszy strumieniowej lub tarczy porowatej. Natomiast takie przegrody mogą wpływać negatywnie na komórki silnie podatne na stres mechaniczny, np. komórki zwierzęce.

Zazwyczaj zbiornik jest tak zaprojektowany, aby podłoże hodowlane zajmowało do 80% objętości zbiornika. Pozostała część jest przeznaczona na pojawiającą się pianę. Jeśli nadmiar piany stanowi istotny problem podczas hodowli, wówczas stosuje się mechaniczne lub chemiczne sposoby jej redukcji. Należy jednak

pamiętać, że użycie metod chemicznych może ograniczyć dostęp tlenu w hodowli mikroorganizmów.

Alternatywą dla bioreaktorów z mieszaniem mechanicznym są zbiorniki z mieszaniem gazem. W przypadku kolumny barbotażowej (ang. *bubble column*) pęcherzyki powietrza, tłoczone od dołu, kierując się ku górze zbiornika, wpływają na ruch cieczy. Wersją bardziej złożoną, z wyraźnym podziałem zbiornika na część strumienia wznoszącego i opadającego, jest „winda wznosząca” (ang. *air-lift*). Bioreaktory tych typów są zwykle wysokimi kolumnami, tak aby pęcherzyki powietrza pokonywały długą drogę zanim dotrą do powierzchni. Ich zastosowanie często jest związane z hodowlami komórek, na które łatwo oddziałują uszkodzenia mechaniczne (ang. *shear stress*) związane z pracą mieszadeł.



Ryc. 1.3.3. Typy bioreaktorów: A) z mieszaniem mechanicznym, B) kolumna barbotażowa, C) *air-lift*

Innym typem bioreaktora są zbiorniki z nieruchomym złożem upakowanym, przez które w sposób ciągły przepływa podłoże wzrostowe. Szczególnie ważny jest tu rozmiar cząstki nośnika. Zbyt duże cząstki powodują spowolnienie wymiany masy i opory dyfuzyjne, a zbyt małe cząstki nośnika utrudniają przepływ przez złożo.

Oprócz klasycznych bioreaktorów coraz większą popularność zdobywają bioreaktory jednorazowe o pojemności od kilku mililitrów do kilku tysięcy litrów. Zbiorniki te są przygotowane do napowietrzania, odbierania próbek i mieszania. Dzięki swoim zaletom, m.in. niskim kosztom, sterylności, braku konieczności mycia, coraz częściej są one stosowane w warunkach przemysłowych.

1.3.5. Stabilizacja drobnoustrojów na drodze immobilizacji

Immobilizacja, czyli unieruchamianie, polega na adsorpcji, chemicznym związaniu lub też mechanicznym „zamknięciu” komórek drobnoustrojów lub wolnego enzymu w/na odpowiednio dobranych substancjach-nośnikach. Cechą nośnika użytego do immobilizacji (w procesach prowadzonych w roztworach wodnych) musi być jego nierozpuszczalność w wodzie, a także znaczna wytrzymałość mechaniczna, istotna w różnych operacjach technologicznych. Istotną zaletą użycia w biotechnologii immobilizowanych enzymów lub całych komórek drobnoustrojów jest możliwość wielokrotnego powtórzenia procesu z tym samym materiałem biologicznym bez konieczności każdorazowego namnażania drobnoustrojów lub preparowania enzymu. Poza tym użycie immobilizowanego materiału biologicznego umożliwia prowadzenie procesów biotechnologicznych w systemach ciągłych, tak ważnych pod względem ekonomicznym.

Historycznie najstarszym sposobem immobilizacji drobnoustrojów jest osadzanie bakterii octowych na wiórach bukowych i użycie tak unieruchomionych drobnoustrojów do produkcji octu spożywczego metodą stojakową (XVIII wiek), a następnie, po znacznych modyfikacjach technologicznych, wypracowanie wysoko wydajnej metody generatorowej (początki XX wieku). W latach 60. ubiegłego wieku bardzo intensywnie rozwijały się prace nad immobilizacją różnych enzymów otrzymanych z drobnoustrojów, a przydatnych w otrzymywaniu określonych produktów. Udało się np. z powodzeniem unieruchomić inwertazę oraz aspartazę i otrzymać na tej drodze fruktozę z glukozy oraz kwas asparaginowy z fumaranu amonowego.

Jednak w przypadku, gdy otrzymywanie interesującego nas produktu opiera się na działaniu kompleksów enzymatycznych lub też gdy działać musi kilka enzymów w kolejno następujących po sobie reakcjach, to o wiele korzystniej jest unieruchamiać całe komórki drobnoustrojów. Dodatkową zaletą takiego postępowania jest to, że niejednokrotnie optymalne pH reakcji enzymatycznych oraz optymalna temperatura tego procesu różni się od optimum dla wzrostu użytych do immobilizacji mikroorganizmów. Można więc przez użycie unieruchomionych drobnoustrojów uniezależnić się od warunków ich hodowli.

W immobilizacji całych komórek drobnoustrojów najczęściej stosuje się metodę pułapkowania (zamykania) w odpowiednich polimerach matrycowych. Jako nośników używa się zarówno określonych substancji chemicznych, jak i żeli pochodzenia naturalnego. Do najczęściej stosowanych należą: poliakrylamid, poliuretan, polistyren, a z naturalnych: kolagen, agar, alginian sodu i χ -karagenan.

Alginian jest wielocukrem otrzymanym z brunatnych alg morskich, zawierającym reszty β -D-mannopyranozylo-uronianowe powiązane wiązaniami 1–4 z resztami α -L-gulopyranozylo-uronianowymi w regularne sekwencje. Natomiast χ -karagenan, również pochodzenia morskiego, jest mieszaniną wielocukrów, w których głównym składnikiem jest reszta α -D-galaktopyranozylova w formie estru siarczanowego.

W latach 70. ubiegłego wieku, głównie w Japonii i USA, rozwinęły się intensywne badania nad zastosowaniem immobilizacji całych komórek w różnorodnych biotechnologiach.

Szczególnie udanym rozwiązaniem jest metoda otrzymywania kwasu asparaginowego z kwasu fumarowego i amoniaku przy użyciu immobilizowanych w karagenanie komórek *E. coli* z aktywną aspartazą. Immobilizat *E. coli* użyty w tym procesie okazał się niezwykle trwały, jego połowiczny okres utraty aktywności wynosił około dwóch lat.

Wykorzystując żele poliakrylamidowe, poliuretan, alginian wapnia lub inne nośniki, opracowano kilka systemów otrzymywania różnych aminokwasów. Przy użyciu *Pseudomonas putida* otrzymano L-argininę i L-cytrulinę; *P. dacunhae* – L-alaninę z kwasu asparaginowego; *E. coli* – tryptofan z indolu i L-seryny; *Micrococcus glutamicus* – kwas glutaminowy.

Stosowane są również systemy otrzymywania kwasów organicznych z użyciem immobilizowanych drobnoustrojów, np. przy użyciu bakterii z rodzaju *Brevibacterium* unieruchomionych w żelu poliakrylamidowym lub karagenanie uzyskano w skali przemysłowej 80% wydajności konwersji kwasu fumarowego do kwasu jabłkowego.

Szerokie zastosowanie znalazły immobilizowane konidia *Aspergillus niger* w alginianie, np. przy produkcji kwasu cytrynowego w systemie ciągłym.

W biokonwersji steroidów (podrozdziały 1.6 i 4.3.2) również stosowane są preparaty komórek immobilizowanych. Unieruchomione w żelu alginianowym zarodniki, grzybnie oraz protoplasty *Cunninghamella elegans* zastosowano do przekształcania korteksolonu (na drodze 11 α - i 11 β -hydroksylacji) do epihydrokortyzonu i hydrokortyzonu. W procesie 11 β -hydroksylacji korteksolonu stosowana była też grzybnie *Curvularia lunata* uwięziona w poliakrylamidzie lub alginianie wapnia. W biokonwersji hydrokortyzonu do prednisolonu (dehydrogenacja) zastosowano unieruchomione w poliakrylamidzie komórki *Arthrobacter globiformis*. Również dalsze przekształcenia prednisolonu były możliwe z użyciem immobilizowanych drobnoustrojów.

Z powodzeniem stosuje się technikę immobilizacji bakterii z rodzaju *Gluconobacter* do biokonwersji sorbitolu do sorbozy – surowca do produkcji witaminy C.

Zastosowanie znalazły także immobilizowane w alginianie komórki *Saccharomyces cerevisiae* i *Kluyveromyces marxianus* do otrzymywania (dla celów pędnych) etanolu z glukozy i inuliny.

CZĘŚĆ PRAKTYCZNA

A. Część praktyczną dotyczącą hodowli okresowej i ciągłej (na przykładzie drożdży przedstawiono w podrozdziale 4.1.1)

B. Badanie wzrostu grzybów strzępkowych. Wyznaczanie specyficznego współczynnika wzrostu

Materiały i podłoża

1. Drobnoustroje: *Cunninghamella echinulata*.
2. Podłoża: podłoże płynne Sabouraud.

Cel ćwiczenia

Wyznaczenie specyficznego współczynnika wzrostu drobnoustroju w hodowlach wgłębnej i powierzchniowej.

Wykonanie

1. Porównanie szybkości wzrostu *Cunninghamella echinulata* w hodowli wgłębną i powierzchniową w podłożu Sabouraud.
2. **HODOWLA WGLEBNA.** 7-dniową hodowlę *C. echinulata* na skosie podłoża Sabouraud zmyć 3 ml jałowej wody destylowanej i przenieść zawiesinę hodowlaną do 20 ml sterylnego podłoża płynnego Sabouraud umieszczonego w kolbie 100 ml. Do doświadczenia należy użyć oddzielnie 6 kolb. Posiewu dokonuje się bezpośrednio po zmyciu skosów, hodowlę prowadzi się na wytrząsarce w temp. 28°C, a następnie po 0, 6, 9, 12, 18 i 24 godzinach hodowli należy:
 - a) opisać wzrost drobnoustrojów w hodowli;
 - b) hodowlę z każdej kolby przesączyć przez bibułę filtracyjną pod próżnią, przemyć jałową wodą destylowaną, a następnie wysuszyć w temp. 105°C do stałej wagi;
 - c) wyznaczyć maksymalną szybkość właściwą wzrostu.
3. **HODOWLA STATYCZNA.** 7-dniową hodowlę *C. echinulata* na skosie podłoża Sabouraud zmyć 3 ml jałowej wody destylowanej i przenieść zawiesinę hodowlaną do 20 ml podłoża Sabouraud umieszczonego w kolbie 100 ml. Do doświadczenia należy użyć oddzielnie 6 kolb. Posiewu dokonuje się bezpośrednio po zmyciu skosów, a następnie po 12, 24, 36, 48, 60 i 72 godzinach hodowli należy:
 - a) opisać wzrost drobnoustrojów w hodowli;
 - b) hodowlę z każdej kolby przesączyć przez bibułę filtracyjną pod próżnią, przemyć jałową wodą destylowaną, a następnie wysuszyć w temp. 105°C do stałej wagi;
 - c) wyznaczyć maksymalną szybkość właściwą wzrostu.

Analiza wyników

Na podstawie otrzymanych wartości specyficznego współczynnika wzrostu wyjaśnić różnice w tempie przyrostu biomasy w obu typach hodowli.

C. Stabilizacja drobnoustrojów na drodze immobilizacji

Materiały i podłoża

1. Drobnoustrój: *Saccharomyces cerevisiae*.
2. Podłoża: brzeczka słodowa 12°Błg i 8°Błg.
3. Odczynniki: alginian sodowy, karagenan, 0,2 M roztwór CaCl_2 .

Cel ćwiczenia

Porównanie zdolności fermentacyjnej wolnych komórek drożdży oraz drożdży unieruchomionych w żelach.

Wykonanie

1. Immobilizacja komórek *S. cerevisiae* w alginianie.
 - a) 48-godzinna hodowlę wstrząsaną *S. cerevisiae* w 12°Błg brzeczce słodowej odwirować od podłoża, przemyć roztworem jałowej soli fizjologicznej i ponownie odwirować. Osad drożdży dokładnie rozproszyc w jałowej wodzie destylowanej (w 0,1 pierwotnej objętości). W uzyskanej zawieszynie policzyć komórki drożdży w komorze Thoma i podać ich gęstość w przeliczeniu na 1 ml immobilizatu. Osad drożdży uzyskany z hodowli podzielić na 2 równe części;
 - b) przygotować 4% jałowy roztwór alginianu sodowego;
 - c) w stosunku objętościowym 1:1 zmieszać zawieszinę drożdży z roztworem alginianu;
 - d) zawieszinę komórek w alginianie umieścić w jałowej strzykawce z igłą o średnicy 1 mm i z przyciętym końcem; kroplami wprowadzać zawieszinę do jałowego 0,2 M CaCl_2 . Pozostawić kulki w roztworze przez 20 min. Utwardzone kulki 2 razy przemyć jałową wodą destylowaną;
 - e) kulki umieścić w kolbie zawierającej 100 ml 8°Błg brzeczki słodowej; kolbę przenieść do cieplarki o temp. 28°C;
 - f) przeprowadzić identyczną próbę fermentacyjną z wolnymi komórkami *S. cerevisiae* przy takiej samej wyjściowej gęstości;

- g)** po 3 dobach fermentacji oznaczyć zawartość etanolu w próbie z drożdżami immobilizowanymi i porównawczo w próbie kontrolnej;
- h)** przeprowadzić następny cykl fermentacyjny. Po usunięciu przefermentowanej brzeczeki i przemyciu kulek immobilizatu jałową wodą destylowaną wprowadzić świeże podłoże w takiej samej objętości, jak w pierwszym cyklu. Powtórzyć próbę fermentacyjną oraz analizę zawartości etanolu po 3 dniach fermentacji. Wyniki porównać z próbą pierwszą oraz z kontrolną. Następne cykle można powtarzać kilkakrotnie, wytrzymałość mechaniczna kulek, jak i aktywność enzymatyczna immobilizowanych drożdży wynosi co najmniej 12 tygodni.

2. Immobilizacja komórek *S. cerevisiae* w χ -karagenanie.

Przygotowanie zawiesiny drożdży identyczne jak w punkcie 1a.

- a)** przygotowanie roztworu χ -karagenanu. Sporządzić na gorąco (60°C) 4% roztwór karagenanu w 0,9% NaCl;
- b)** ciepły roztwór karagenanu (40°C) zmieszać dokładnie z zawiesiną drożdży w stosunku 9:1; utrzymując temp. 40°C;
- c)** zawiesinę komórek w karagenanie umieścić w strzykawce (jak w punkcie 1d) i wkraplać do jałowego 2% roztworu KCl. Pozostawić kulki w roztworze przez 20 minut. Utworzone kulki przemyć 2 razy jałową wodą destylowaną;
- d)** dalej postępować jak w punktach 1e–h.

1.4. Hodowla drobnoustrojów w warunkach beztlenowych

WPROWADZENIE

Bakterie beztlenowe odgrywają kluczową rolę w cyklu biogeochemicznym wielu ważnych pierwiastków (np. węgla, azotu, fosforu, siarki, żelaza), przyczyniając się do zachowania równowagi biologicznej zarówno w ekosystemach naturalnych, jak i przekształconych w wyniku działalności człowieka

(antropogenicznych). Liczne gatunki beztlenowców to patogeny stanowiące podstawowy czynnik etiologiczny wielu chorób zakaźnych ludzi i zwierząt. Niezbędnym warunkiem hodowli anaerobów jest wytworzenie, a następnie utrzymanie atmosfery pozbawionej tlenu cząsteczkowego. Klasyfikacja metod hodowli beztlenowców opiera się przede wszystkim na rodzaju procedur stosowanych do wytworzenia i utrzymania środowiska wzrostu pozbawionego tlenu, ze szczególnym uwzględnieniem takich aspektów, jak: (1) uzyskanie próżni, (2) zastąpienie powietrza gazami niezawierającymi tlenu cząsteczkowego, (3) redukcja tlenu, (4) pochłanianie tlenu przez czynniki chemiczne, (5) zamknięcie dostępu do tlenu atmosferycznego z wykorzystaniem zasad fizycznych lub urządzeń mechanicznych. Techniki najczęściej stosowane do hodowli mikroorganizmów w warunkach beztlenowych dzielą się na: chemiczne, biologiczne, fizyczne oraz mieszane.

Metody chemiczne oparte są głównie na usuwaniu tlenu za pomocą czynnika redukującego. W tym celu stosuje się związki chemiczne umieszczane w słojach lub innych naczyniach, w których prowadzone są hodowle beztlenowe. Do związków tych należą m.in. pirogalol czy wodorotlenek potasu. W hodowlach wykorzystuje się także takie środki, jak ditiotreitol, chlorowodorek L-cysteiny, 2-merkaptotanosulfonian (koenzym M), siarczyn sodu, tiosiarczan sodu, glutation czy cytrynian tytanu (III), które mogą być wprowadzane bezpośrednio do pożywek płynnych lub zestalonych agarem. Ze względu na różne właściwości chemiczne i biologiczne stosowanych substancji redukujących (np. potencjał redoks, toksyczność) mogą one jednak hamować wzrost niektórych grup anaerobów.

Biologiczne techniki hodowli drobnoustrojów beztlenowych bazują głównie na metodzie Fortnera (tzw. płytki Fortnera). Polega ona na wspólnej hodowli (obok siebie) anaerobów oraz drobnoustrojów aerofilnych. Drobnoustroje tlenowe, wykorzystując w trakcie swojego rozwoju tlen, po pewnym czasie stwarzają warunki sprzyjające wzrostowi beztlenowców.

Do najczęściej stosowanych fizycznych oraz mieszanych (fizykochemicznych) metod otrzymywania warunków beztlenowych należy prowadzenie hodowli w specjalnie do tego przygotowanych urządzeniach zwanych anaerostatami. Warunki beztlenowe

uzyskiwane są w tych naczyniach poprzez: (1) wypompowanie powietrza przy użyciu pompy próżniowej, a następnie wprowadzenie gazu lub gazów anaerobowych przez system odpowiednich zaworów lub/i (2) zastosowanie chemicznych metod generowania atmosfery beztlenowej w oparciu o proste reakcje chemiczne i metaliczne katalizatory. W procedurach z użyciem czynników chemicznych zastosowanie znajdują przeważnie: borowodorek sodu, katalizator palladowy oraz tabletki CO_2 zawierająca dodatkowo wodorowęglan sodu oraz kwas cytrynowy, które uzupełniają atmosferę anaerostatu wodorem. Powszechne zastosowanie znajdują jednorazowe, komercyjnie dostępne chemiczne generatory gazów beztlenowych, takie jak GasPak, AnaeroGen czy Anaerocult, które występują przeważnie w postaci saszetek lub kopert umieszczanych wewnątrz słoików do prowadzenia hodowli. W celu kontroli występowania warunków beztlenowych w anaerostacie często wprowadza się do nich także odpowiednie wskaźniki, np. oparte na reakcji błękitu metylenowego, który w postaci utlenionej występuje w kolorze niebieskim, a po przyłączeniu wodorów staje się bezbarwny.

Jednym ze standardów otrzymywania warunków beztlenowych metodami fizycznymi jest system ANOXOMAT, którego podstawę stanowi urządzenie umożliwiające przygotowanie hodowli w warunkach beztlenowych lub z niską zawartością tlenu poprzez w pełni zautomatyzowany mechanizm odpompowania powietrza i wymiany składu atmosfery w hodowlanych słoikach anaerobowych. Kontrola otrzymywania pożądaných warunków wzrostu mikroorganizmów wrażliwych na różną koncentrację tlenu w środowisku odbywa się na każdym etapie realizacji procesu poprzez system mikroprocesorowy, zapewniający precyzyjne, szybkie i powtarzalne osiągnięcie oraz utrzymywanie warunków beztlenowych lub niskotlenowych.

Powszechne zastosowanie w hodowlach beztlenowców znajdują też komory beztlenowe, które minimalizują wystawienie drobnoustrojów tlenowrażliwych na działanie tego czynnika. Komory beztlenowe wyposażone są w specjalistyczne układy wspomagające kontrolę procesu tworzenia i utrzymywania atmosfery anaerobowej. Zaopatrzone są także w zestawy rękawów lub mankietów przymocowanych do portów dostępu do rąk oraz służące do wprowadzania i wyjmowania materiału.

Do hodowli w atmosferze anaerobowej wykorzystuje się ponadto bioreaktory, które dzięki ciągłemu podawaniu substratów i usuwaniu produktów ubocznych pozwalają na osiągnięcie stabilnych warunków wzrostu drobnoustrojów przy jednoczesnym odwzorowaniu naturalnych warunków środowiskowych.

Wiele metod hodowli anaerobów opiera się na modyfikacjach istniejących już technik, które niejednokrotnie sprowadzają się do wyodrębniania określonych grup drobnoustrojów. Udoskonalenia te polegają m.in. na zmianie składu pożywek hodowlanych (np. zastosowaniu antybiotyków w celu ułatwienia wzrostu archeonów metanogennych), wprowadzaniu nowych kokultury czy zastosowaniu hodowli *in situ/in vivo*, które poprzez odwzorowanie prawie identycznych do naturalnych warunków bytowania umożliwiają wzrost anaerobów, przysparzających wiele trudności w hodowaniu. Do ulepszonych procedur hodowli beztlenowców należy także metoda z użyciem 6-dółkowych płytek hodowlanych i beztlenowego systemu opakowań gazowych. Technika ta opata jest na posiewie na płytkę 6-dółkową określonego rozcieńczenia badanego materiału zmieszanego wcześniej z podłożem wzrostowym zawierającym gumę gellanową, a następnie umieszczeniu płytki z odpowiednimi katalizatorami w szczelnie zamkniętym worku i poprzez wprowadzoną do środka worka igłę wytworzeniu atmosfery anaerobowej. Metoda ta jest szczególnie przydatna w hodowli obligatoryjnych beztlenowców, w tym metanogenów i bakterii redukujących siarczany.

Bakterie rodzaju *Propionibacterium* należą do typu *Actinobacteria*. Charakteryzują się dużą heterogennością pod względem cech morfologicznych, biochemicznych i wymagań pokarmowych. Ich komórki mogą przybierać różne kształty (pleomorfizm) w zależności od fazy wzrostu oraz ilości tlenu w środowisku. Przeważnie występują w postaci cylindrycznej, ale mogą też przybierać formy kuliste lub przypominające literę Y lub V. Wszystkie gatunki *Propionibacterium* są nieprzetrwalnikujące, nie posiadają organelli ruchu oraz należą do bakterii Gram-dodatnich. Zaznaczyć jednak należy, że niektóre szczepy, we wstępnej fazie wzrostu, mogą być Gram-zmienne. Wymagają do wzrostu warunków beztlenowych, chociaż większość może tolerować niskie stężenia tlenu w środowisku, dlatego należą do bakterii mikroaerofilnych.

Gatunki należące do *Propionibacterium* dzieli się umownie na dwie grupy: tzw. „klasyczne”, nazywane również mlecznymi, izolowane m.in. z sera oraz innych produktów mleczarskich, ale także z gleby czy naturalnych produktów, jak sok pomarańczowy; oraz bakterie „skórne” należące do egzo- i endogennej mikrobioty bakteryjnej, zasiedlające skórę i błony śluzowe jamy ustnej czy przewodu pokarmowego. Wyróżnia się 13 gatunków należących do tego rodzaju, z czego 6 należy do bakterii „klasycznych” (*P. thoenii*, *P. freudenreichii*, *P. jensenii*, *P. cyclohexanicum*, *P. microaerophilum* oraz *P. acidipropionici*), a 7 do bakterii „skórnych” (*P. acnes*, *P. granulosum*, *P. australiens*, *P. propionicus*, *P. humerusii*, *P. acidifaciens* oraz *P. avidum*).

Bakterie *Propionibacterium* ze względu na wiele korzystnych właściwości klasycznych są wykorzystywane w wielu gałęziach gospodarki. Największy potencjał znajdują w przemyśle spożywczym i szeroko pojętej ochronie zdrowia ludzi i zwierząt. Z uwagi na właściwości prozdrowotne, takie jak wytwarzanie witaminy B₁₂ oraz B₉, kwasu propionowego, trehalozy, stymulowanie do wzrostu innych szczepów probiotycznych czy syntezę bakteriocyn posiadających szeroki zakres aktywności przeciwdrobnoustrojowej, mogą pełnić funkcje preparatów probiotycznych lub suplementów witaminowo-białkowych, wpływając korzystnie na organizm przez działanie w przewodzie pokarmowym. Dodatkowo, bakterie „klasyczne” mogą zwiększać biodostępność wielu składników mineralnych i białek, zmniejszać objawy nietolerancji laktozy oraz przeciwdziałać dolegliwościom jelitowym, takim jak zaparcia czy biegunki. Na skalę przemysłową *Propionibacterium* mleczne stosuje się m.in. w produkcji witaminy B₁₂, żywieniu zwierząt jako dodatek do pasz i kiszzonek, a także w przemyśle mleczarskim, piekarnictwie i serowarstwie ze względu na ich zdolność do wytwarzania kwasu propionowego i octowego oraz CO₂ jako ubocznego produktu fermentacji. Właściwości te są szczególnie przydatne przy produkcji twardych serów podpuszczkowych, zakwaszonych produktów fermentowanych czy sałatek warzywnych. Dwutlenek węgla odpowiada m.in. za proces „oczekowania” serów, natomiast kwas propionowy i octowy wykazują silne właściwości przeciwdrobnoustrojowe oraz nadają produktom odpowiednie cechy organoleptyczne, jak również zapobiegają powstawaniu nieprzyjemnego zapachu i smaku.

CZĘŚĆ PRAKTYCZNA

Materiały i podłoża

1. Drobnoustroje: *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* DSMZ 4902.
2. Podłoża: z ekstraktem drożdżowym, podłoże kazeinowe, podłoże z hydrolizatem kazeiny.
3. Odczynniki: substancje wzorcowe (witamina B₁₂, kwas mlekowy, kwas octowy, kwas propionowy), chlorek kobaltu (CoCl₂ × 6 H₂O).
4. Aparatura: urządzenie ANOXOMAT umożliwiające przygotowanie i hodowlę bakterii w atmosferze beztlenowej oraz mikroaerofilnej (6% O₂), słoje do hodowli bakterii w warunkach beztlenowych i mikroaerofilnych, inkubator, wytrząsarka obrotowa, chromatograf cieczowy sprzężony ze spektrometrem masowym (LC/MS), wirówka laboratoryjna, dezintegrator mechaniczny.
5. Pozostałe materiały: pipety serologiczne, pipety automatyczne, sterylne końcówki do pipet automatycznych, kolby Erlenmeyera (100 ml).

Cel ćwiczenia

Wpływ zawartości tlenu oraz rodzaju podłoża wzrostowego na wydajność biosyntezy witaminy B₁₂ oraz kwasów organicznych (mlekowego, octowego i propionowego) przez bakterie *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii*.

Wykonanie

1. Założenie hodowli bakterii *Propionibacterium*: założyć hodowlę *Propionibacterium* na podłożu płynnym z ekstraktem drożdżowym, podłożem z hydrolizatem kazeiny oraz podłożem kazeinowym w kolbach o obj. 100 ml. W tym celu należy zaszczyć 20 ml podłoża materiałem pobranym oczkiem ezy z 24-godzinnej hodowli bakterii na podłożu z ekstraktem drożdżowym. Do wytworzenia warunków beztlenowych oraz mikroaerofilnych należy

użyć urządzenia ANOXOMAT. Do wszystkich hodowli dodać sole kobaltu ($10 \text{ mg/l CoCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$). Hodowle prowadzić w słojach anaerobowych oraz w warunkach tlenowych przez 6 dni w temp. 28°C , na wytrząsarce obrotowej 160 obr./min w następujących warunkach:

- a) cały czas beztlenowo,
 - b) cały czas tlenowo,
 - c) 3 dni beztlenowo, a następnie 3 dni w warunkach tlenowych,
 - d) cały czas w atmosferze o obniżonej zawartości tlenu 6%,
 - e) 3 dni w atmosferze o obniżonej zawartości tlenu 6%, a następnie 3 dni w warunkach tlenowych.
2. Przygotowanie krzywych wzorcowych: krzywe wzorcowe kwasów organicznych oraz witaminy B_{12} do oznaczeń prób badanych metodą chromatografii cieczowej (LC-MS) przygotować według warunków rekomendowanych przez producenta aparatu dla poszczególnych analizowanych substratów. Rozdziały prowadzić na kolumnie chromatograficznej ze złożem C_{18} .
3. Ilościowe oznaczanie substratów w hodowlach: po 6 dniach inkubacji wszystkie testowane układy hodowlane odwirować ($6000 \times \text{g}$, 15 min), supernatanty przesączyć przez sączki z o średnicy por $0,2 \mu\text{m}$, a następnie oznaczyć zawartość badanych kwasów oraz witaminy techniką chromatografii cieczowej (według tej samej metody, którą przygotowywano krzywe wzorcowe substancji). W przypadku analizy biosyntezy witaminy B_{12} hodowle bakteryjne dodatkowo inkubować 20 min. w temp. 80°C , następnie homogenizować przy użyciu dezintegratora mechanicznego i dalej postępować analogicznie, jak z próbami do oznaczeń ilościowych kwasów organicznych.

Analiza wyników

Na podstawie uzyskanych wyników ilościowych z oznaczeń chromatograficznych wyciągnąć wnioski dotyczące wpływu zawartości tlenu oraz składu podłoża wzrostowego na wydajność produkcji witaminy B_{12} i kwasów organicznych przez szczep *P. freudenreichii* ssp. *shermanii*.

1.5. Protoplasty grzybów: otrzymywanie, właściwości, zastosowanie

WPROWADZENIE

Terminem „protoplast” opisywana jest komórka bakteryjna, grzybowa lub roślinna całkowicie pozbawiona ściany komórkowej, która jako jedyną zewnętrzną osłonę posiada błonę komórkową. Z kolei termin „sferoplast” odnosi się do komórki, na powierzchni której obecne są fragmenty ściany komórkowej. Protoplasty i sferoplasty nie występują w warunkach naturalnych. Wyjątek stanowią chorobotwórcze dla owadów szczepy niektórych mikroskopowych grzybów strzępkowych z podtypu Entomophthoromycotina, typu Zoopagomycota (dawniej Zygomycota), w przypadku których komórki o charakterze protoplastów i sferoplastów obecne są podczas jednego z etapów stadium rozwojowego. Dodatkowe dane dotyczące tej grupy grzybów zamieszczono w podrozdziale 5.13. W porównaniu do komórek wyjściowych własności fizjologiczne i biochemiczne protoplastów są podobne. Wyjątek stanowi szybkość syntezy DNA (jest wyższa w komórkach wyjściowych niż w protoplastach) oraz szybkość przebiegu procesów, w których ściana komórkowa stanowi barierę ograniczającą dostęp substratów do wewnątrzkomórkowych enzymów. W tym przypadku procesy takie jak np. reakcje hydroksylacji związków steroidowych przebiegają szybciej przy użyciu protoplastów.

Do charakterystycznych cech protoplastów należą:

- kulisty kształt;
- brak odporności mechanicznej – dlatego podczas procesu uwalniania protoplastów konieczne jest stosowanie niskich wartości wytrząsania (poniżej 90 obr./min) oraz delikatnych warunków oddzielania protoplastów od niestrawionej biomasy grzybni (szybkość wirowania nie powinna przekraczać $500 \times g$);
- wrażliwość na ciśnienie osmotyczne – protoplasty umieszczone w wodzie pękają w ciągu kilku sekund. Dlatego podczas uwalniania protoplastów oraz w kolejnych etapach badań konieczne jest stosowanie środowiska hipertonicznego, zapewnianego przez użycie stabilizatorów

osmotycznych. Stabilizatory osmotyczne to wodne roztwory (0,4–1,0 M) związków nieorganicznych (np. MgSO_4 , CaCl_2 , KCl) lub organicznych (np. mannitolu, sorbitolu, sorbozy). Zazwyczaj do otrzymania protoplastów grzybów strzępkowych używane są nieorganiczne stabilizatory osmotyczne (np. 0,6–0,8 M KCl), natomiast uwalnianiu protoplastów drożdży sprzyja środowisko związków organicznych o stężeniu 0,8–1,2 M.

Pierwsze doniesienia naukowe na temat izolacji protoplastów drożdży i grzybów pochodzą z lat 60. XX wieku. Prowadzone w tych czasach badania koncentrowały się na opracowaniu wydajnych metod dezintegracji bakteryjnych i grzybowych ścian komórkowych w celu izolacji i charakterystyki wewnątrzkomórkowych białek oraz materiału genetycznego. W kolejnych latach poszerzono zakres badań, w których wykorzystywano protoplasty i sferoplasty.

Kierunki praktycznego wykorzystania protoplastów i sferoplastów obejmują:

- badanie budowy i przebiegu syntezy ściany komórkowej – po otrzymaniu protoplastów przeprowadzana stopniowo rewersja (proces odbudowy ściany komórkowej) umożliwia charakteryzowanie kolejnych etapów odtwarzania ściany komórkowej oraz enzymów zaangażowanych w powyższy proces;
- izolowanie i charakterystyka organelli komórkowych;
- ustalanie homologii genetycznej, oparte na porównywaniu podobieństw dużych odcinków wyizolowanego z protoplastów DNA; wyniki powyższych badań miały zastosowanie w taksonomii – do opisywania jednostek systematycznych i ustalania pokrewieństwa drobnoustrojów (szczególnie grzybów);
- badania procesów metabolicznych (obejmujących m.in. biosyntezę niektórych antybiotyków i mykotoksyn oraz transformacje związków steroidowych), w których ściana komórkowa może stanowić barierę istotnie ograniczającą szybkość pobierania substratu do wnętrza komórki lub wydzielania produktu do środowiska wzrostu;
- podniesienie wydajności drobnoustrojowych procesów metabolicznych o dużym znaczeniu komercyjnym

(tzw. ulepszanie szczepów), w których wykorzystywane są metody mutagenizacji, rekombinacji oraz fuzji protoplastów (dodatkowe dane zamieszczono w podrozdziale 1.6).

Opracowane dotąd sposoby usuwania ściany komórkowej w celu otrzymania protoplastów oparte są na wykorzystaniu czynników fizycznych lub biologicznych. Metody fizyczne polegają na mechanicznej dezintegracji komórek bakteryjnych oraz strzępek grzybni i stosowane były głównie w początkowym etapie badań nad protoplastami. Wynikało to z niskiej wydajności, a także z niekorzystnego wpływu na fizjologię otrzymywanych komórek. W metodach biologicznych wykorzystywane są enzymy zdolne do rozkładu składników ściany komórkowej drobnoustrojów. W przypadku grzybów strzępkowych są to tzw. kompleksy lityczne, będące mieszaniną wielu enzymów. Powyższe enzymy w większości mają charakter indukcyjny i katalizują rozkład różnych związków (głównie wielocukrów), wchodzących w skład ściany komórkowej.

Do otrzymywania enzymów litycznych mogą być wykorzystywane:

- enzymy soku trawiennego ślimaka winniczka (*Helix pomatia*), uprzednio karmionego biomasą takich drobnoustrojów, z których planowane jest otrzymanie protoplastów;
- płyny pohodowlane otrzymane z hodowli niektórych drobnoustrojów – bakterii glebowych (głównie promieniowców z rodzaju *Streptomyces* i *Micromonospora*) oraz szczepów mikroskopowych grzybów strzępkowych należących do rodzaju *Trichoderma* (w tym przede wszystkim do gatunków *T. viride* i *T. harzianum*). Ponieważ, jak już wcześniej zaznaczono, enzymy lityczne to głównie enzymy indukcyjne, więc podłoża hodowlane do namnażania powyższych bakterii i grzybów muszą zawierać, jako główne źródło węgla i energii, biomasę tych drobnoustrojów, z których będą otrzymywane protoplasty. Dodatkowe dane na temat otrzymywania kompleksów litycznych przy użyciu drobnoustrojów zamieszczono w podrozdziale 4.1.3.

Na ryc. 8.1.6. J–K przedstawiono proces trawienia grzybni z gatunku *Cunninghamella echinulata* IM1785 21Gp